



HAL
open science

Rôle des micro-ARNs des Polyomaviridae dans l'infection à Polyomavirus BK

Baptiste Demey

► **To cite this version:**

Baptiste Demey. Rôle des micro-ARNs des Polyomaviridae dans l'infection à Polyomavirus BK. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0063 . tel-04095079

HAL Id: tel-04095079

<https://theses.hal.science/tel-04095079v1>

Submitted on 11 May 2023

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

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



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie-Santé
Spécialité Virologie*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Baptiste Demey

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Rôle des micro-ARNs des Polyomaviridae dans l'infection à
Polyomavirus BK*

Soutenue le jeudi 8 décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. L. Metzinger, Professeur d'Université, Université Picardie Jules Verne	Président
M. S. Pfeffer, Directeur de Recherche, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS	Rapporteur
M F. Glowacki, Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Lille	Rapporteur
M ^{me} C. Bressollette, Maître de Conférences – Praticien Hospitalier, Université de Nantes	Examineur
M. E. Brochot, Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université Picardie Jules Verne	Directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury,

Monsieur le Professeur Laurent Metzinger

Professeur d'Université, Université Picardie Jules Verne

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous en remercie. Je me rappelle encore d'une présentation que vous aviez faites sur les micro-ARNs pour les chercheurs du CURS, alors que j'étais encore en Master 2. Il me paraissait donc naturel de vous inviter à examiner mes travaux de thèse.

Monsieur le Docteur Sébastien Pfeffer

Directeur de Recherche, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS

Merci de me faire l'honneur de rapporter mon manuscrit de thèse. Votre présentation et les échanges que nous avons eu à Sète lors de l'école thématique InteRNAAt m'ont énormément aidé à murir dans mes recherches sur les micro-ARNs viraux. Cette dernière année de doctorat n'aurait pas été aussi stimulante sans vos précieux conseils.

Monsieur le Professeur François Glowacki

Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Lille, CHU de Lille, Institut Pasteur de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. Votre regard clinique et votre vision des modifications cellulaires au cours des affections rénales chez les transplantés de rein nous permettront d'ouvrir nos perspectives de recherche sur l'infection à Polyomavirus BK chez ces patients.

Madame le Docteur Céline Bressolette-Bodin

Maître de conférences des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Nantes – CHU de Nantes

Merci de participer au jury de cette thèse. Les discussions que nous avons eu aux différents congrès de l'AFIPP ont toujours été très enrichissantes.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Etienne Brochot

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université Picardie Jules Verne – CHU Amiens-Picardie

J'ai déjà eu l'occasion de partager tout le respect et l'admiration que je te porte. J'ai commencé cette thèse en marchant dans tes pas et tu m'as appris à tracer mon propre chemin. J'ai eu la chance d'avoir un directeur de thèse stimulant, à l'écoute et généreux dans son accompagnement. J'espère travailler encore longtemps à tes côtés. Avec toute l'aide que tu m'as apportée pour ma carrière hospitalo-universitaire, j'imagine que c'est réciproque.

Aux directeurs du laboratoire AGIR, les Professeurs Sandrine Castelain et Pascal Sonnet

Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant comme doctorant dans ce laboratoire. Il fait bon vivre chez AGIR et c'est en grande partie grâce à vous.

Aux membres de l'équipe de virologie du laboratoire AGIR, pour votre accueil, votre aide et votre convivialité. **Véronique Descamps**, tu as toujours su être présente pour m'accompagner dans mes nombreuses manip de biologie moléculaire. **Virginie Morel**, merci pour ton aide dans le séquençage de mes souches et dans mes purifications. **François Helle**, j'ai gagné un ami quand tu m'as accueilli dans ton bureau. Merci de m'accompagner profiter des beaux quartiers d'Amiens avec **François Peltier** quand il fait beau. Merci au **Professeur Gilles Duverlie** et à **Catherine François** pour leur mentorat, aussi bien en recherche qu'à l'hôpital. Merci à mes camarades doctorants, **Lynda Handala**, **Toni Fiore** et **Marine Bentz**, ainsi qu'à **Caroline Lambert** et **Aurélien Aubry** pour leur aide et leurs conseils.

A ma famille et à mes amis, pour m'avoir compris et soutenu pendant ces nombreuses années d'études. J'espère vous rendre fier et serai toujours là pour vous. Je ne peux pas tous vous remercier un par un encore une fois (*cf.* ma thèse de Pharmacie) mais rien n'a changé, je vous aime tous toujours autant.

A ma femme, Victoria, merci de m'aimer et me faire vivre à tes côtés la meilleure vie que je puisse avoir. Merci de me soutenir dans ma passion pour la recherche même si elle peut entraîner des conséquences sur notre vie personnelle. Je te promets de ne jamais faire passer ma réussite avant ton bonheur. Mon amour pour toi est comme l'infection à BK, « Endlessly ».

Au travers de cette thèse j'ai accompli ce pour quoi j'ai entamé mes études supérieures : avoir l'opportunité de devenir pharmacien enseignant-chercheur. Ce choix s'est presque imposé à moi quand, en fin de Terminale, je ne savais pas quelle voie choisir et que la plateforme Onisep m'a suggéré ce cursus suite à un bref questionnaire. J'ai découvert au fil du temps que ce choix, presque par défaut, a révélé en réalité une authentique vocation. En réalisant mes stages de recherche, et malgré les nombreuses difficultés que le monde académique réserve, j'ai vite été convaincu que cette vie était faite pour moi. Je remercie l'ensemble des chercheurs et étudiants que j'ai rencontré au cours de ces 12 premières années pour avoir nourri mon désir de suivre ce chemin, sans jamais savoir ce qu'il y a au bout.

SIC PARVIS MAGNA

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	8
TABLE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	10
I. INTRODUCTION	11
1. Les <i>Polyomaviridae</i>	11
2. Le Polyomavirus BK	12
a. Structure.....	12
b. Génome	13
c. Rôles de protéines virales.....	15
d. Cycle.....	16
e. Epidémiologie	17
f. Physiopathologie	17
g. Manifestations cliniques et facteurs de risques.....	18
h. Diagnostic.....	20
i. Traitement	21
j. Suivi de l'infection : perspectives.....	24
3. Le Polyomavirus JC	25
a. Génome et structure.....	25
b. Epidémiologie et physiopathologie	26
4. Les micro-ARNs	27
a. Généralités sur les micro-ARNs	27
b. Les micro-ARNs des <i>Polyomaviridae</i>	30
c. Méthodes de dosage des miARNs du BKPyV par RT-PCR	37
5. Hypothèses et objectifs.....	40
a. Stabilité et répartition du bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire	41
b. Cinétiques et intérêt clinique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les transplantés de rein.....	41
c. Fonctionnalité croisée des miARNs du JCPyV dans la réplication du BKPyV	43
II. MATERIEL ET METHODES	46
1. Population d'étude.....	46
a. Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique	46

b.	Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein	47
2.	Diagnostic des infections à BKPyV et JCPyV	48
3.	PCR temps réel à partir de cellules infectées.....	48
4.	Quantification des miARNs des <i>Polyomaviridae</i>	49
a.	Expérimentations <i>in vitro</i> sur cellules, vésicules et surnageants	49
b.	Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique	51
c.	Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein	54
d.	Quantification du jcv-miR-J1-5p chez les patients transplantés de rein.....	55
e.	Performances de la RT-PCR vis-à-vis des miARNs de <i>Polyomaviridae</i>	55
5.	Cultures cellulaires	57
6.	Stabilité physico-chimique.....	57
7.	Anticorps et réactifs	58
8.	Transfections.....	58
9.	Immunomarquage	59
10.	Viabilité cellulaire	59
11.	Ultracentrifugation & Ultrafiltration.....	60
12.	Immunoprécipitation.....	61
13.	Immunocapture d'exosomes	62
14.	Analyse Western-Blot	62
15.	Statistiques	63
III.	RESULTATS.....	63
1.	Stabilité et répartition du bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire.....	63
2.	Analyse des urines des patients transplantés rénaux	79
a.	Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique	79
b.	Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein	89
3.	Fonctionnalité croisée des miARNs du JCPyV dans la réplication du BKPyV	103
IV.	DISCUSSION	113
V.	CONCLUSION	143

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1: Structure du BKPyV (d’après Hurdiss *et al.*, 2016) (4) 13

Figure 2 : Carte génomique du BKPyV (d’après Helle *et al.*, 2017) (5)..... 14

Figure 3: Facteurs de risques d’infection à BKPyV pour les transplantés de rein (d’après Demey *et al.*, 2018) (21)..... 20

Figure 4 : Balance des complications post-transplantation (adaptée de Shen *et al.* 2021) (29)..... 22

Figure 5 : Synthèse et mécanisme d’action général des micro-ARNs 28

Figure 6 : Export des miARNs dans le milieu extracellulaire (d’après Baulande *et al.* 2014) (73) 29

Figure 7: Mécanismes d’expression des miARNs du BKPyV, d’après Zou *et al.* (2020) (76)..... 31

Figure 8 : Séquences des pre-miARNs du BKPyV et du JCPyV 32

Figure 9: Modèle du rôle des micro-ARNs des *Polyomaviridae* au cours de différents types de cycles de réplication (d’après Tian *et al.*, 2014) (93). 36

Figure 10: Homologie de séquence entre les miARNs du BKPyV et ceux du JCPyV..... 44

Figure 11: Fréquence de détection de l’ADN du BKPyV et du JCPyV dans les urines des patients transplantés de rein du CHU Amiens-Picardie au cours de la première année post-transplantation. 45

Figure 12 : Principe de la réaction de transcription inverse (RT) du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®)..... 52

Figure 13: Principe de la réaction de PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®)... 52

Figure 14: Protocole de purification d’exosomes par ultracentrifugation différentielle (107)..... 61

Figure 15: Corrélation entre les différents marqueurs quantifiés dans les culots cellulaires (ARNm VP1, ARNm AgT, bk3p et bk5p) avec la charge virale (ADN BKPyV) mesurée en routine dans les urines au cours du suivi des patients transplantés de rein. 80

Figure 16 : Courbes ROC des marqueurs urinaires ARNm AgT, ARNm VP1, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p pour distinguer les patients présentant de l’ADN BKPyV dans l’urine (BKU+) ou non (BKU-). 82

Figure 17: Cinétique au cours du temps post-greffe des concentrations d’ADN, de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et du ratio ARNm VP1/AgT du BKPyV dans les urines de 8 patients transplantés de rein n’ayant pas souffert d’une infection persistante à BKPyV.. 85

Figure 18: Cinétique au cours du temps post-greffe des concentrations d’ADN, de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et du ratio ARNm VP1/AgT du BKPyV dans les urines de 23 patients transplantés de rein ayant souffert d’une infection persistante à BKPyV. 86

Figure 19 : Evolution de la quantité d’ADN de BKPyV présent dans les urines des patients transplantés de rein entre l’instant de détection du jcv-miR-J1-5p dans les urines (instant t) et le prélèvement d’urine recueilli à l’instant suivant (t+n). 104

Figure 20: Viabilité cellulaire relative de cellules RPTEC-hTERT1 infectées par le BKPyV (MOI = 1) après transfection par mimic de miARN à l’aide du réactif Interferin (OZYME) à t + 48h (A) et à t + 72h (B), comparativement à des cellules infectées non transfectées. 105

Figure 21: Images de microscopie à fluorescence après immunomarquage de cellules RPTEC-hTERT1.	106
Figure 22: Expression relative en ARNm de l'AgT (A) et en ADN intra-cellulaires (B), ainsi que la charge virale par millilitre de surnageant de culture en ADN extra-cellulaire (C) du BKPyV de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1.	108
Figure 23: Analyse par Western Blot de l'expression protéique de l'Actine (A) et de l'AgT du BKPyV (B) par des cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1.	109
Figure 24: Images de microscopie à fluorescence après immunomarquage de cellules RPTEC-hTERT1. Les images représentent, de gauche à droite, le marquage des noyaux par le DAPI, la présence d'AgT du BKPyV sur le canal FITC, et la superposition des 2 images (Merged).	110
Figure 25: Pourcentage absolu (A) et relatif (B) de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1.	111
Figure 26: Pourcentage absolu de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à des surnageants de culture de cellules exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1.	112
Tableau 1: Principales caractéristiques des études utilisant une technique de RT-PCR dirigée contre les miARNs des <i>Polyomaviridae</i> , telles que décrites dans les articles.	40
Tableau 2: Mélange réactionnel de l'étape de transcription inverse du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®).....	53
Tableau 3 : Programme du thermocycleur pour la transcription inverse du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®)	53
Tableau 4 : Mélange réactionnel de l'étape de PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®).....	53
Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour la PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems ®).....	54
Tableau 6: Résultat de l'analyse de corrélation linéaire de Pearson entre la concentration en ADN BKPyV et les différents marqueurs (ARNm VP1, ARNm AgT, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p) dans les urines.....	81
Tableau 7 : Résumé des paramètres calculés à partir de l'analyse ROC pour distinguer les patients présentant de l'ADN BKPyV dans l'urine (BKU+) ou non (BKU-) à partir des concentrations urinaires en ARNm AgT, ARNm VP1, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p.	83
Tableau 8 : (A) Tableau de contingence de la détection ou non de jcv-miR-J1-5p au cours du premier mois suivant la greffe chez les patients transplantés de rein développant une infection urinaire à BKPyV (BKU+) ou non (BKU-). (B) Tableau récapitulatif des statistiques relatives au tableau (A).	104
Tableau 9 : Technologies existantes pour la quantification des miARNs (adapté de Moody <i>et al.</i>) (136)	134

TABLE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
Agt :	Petit antigène de tumeur (small t antigen, tAg)
AgT :	Grand antigène de tumeur (large t antigen, TAg)
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
BHE :	Barrière Hémato-Encéphalique
BKPyV :	BK polyomavirus
BKP(+/-) :	Plasma positif (+) ou négatif (-) pour l'ADN de BKPyV
BKU(+/-) :	Urine positive (+) ou négative (-) pour l'ADN de BKPyV
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CSH :	Cellules Souches Hématopoïétiques
DNQ :	Détecté mais Non Quantifiable
ddPCR :	Digital Droplet PCR
EBV :	Epstein-Barr Virus
FT :	Facteur de transcription
HPyV :	Human polyomavirus
(H)RPTEC :	(Human) renal proximal tubular cells (cellules rénales proximales tubulaires (humaines))
IC :	Intervalle de confiance
Ig :	Immunoglobuline
JCPyV :	JC polyomavirus
LEMP :	Leuco-Encéphalite Multifocale Progressive
MCPyV :	Polyomavirus des cellules de Merkel
MOI :	Multiplicity Of Infection (Multiplicité d'infection)
miARN :	micro-ARN
MWCO :	Molecular weight cutoff (seuil de poids moléculaire)
NBKPyV:	Néphropathie à Polyomavirus BK
NCCR :	NCCR : non coding control region
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OR :	Odds ratio
ORI :	Origine de la réplication
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Pré-miARN :	pré-micro-ARN
RT :	Reverse Transcription (Transcription inverse)
RBP :	RNA-binding proteins (protéines se liant à l'ARN)
SNP :	Single nucleotide polymorphism
SV40 :	Simian Virus 40
tAgT :	Grand antigène de tumeur tronqué (truncated large t antigen, truncTAg)
VPN :	Valeur Prédictive Négative
VPP :	Valeur Prédictive Positive

I. INTRODUCTION

1. Les Polyomaviridae

Les membres de la famille des *Polyomaviridae* ont été découverts à partir des années 1980. Initialement, ils n'appartenaient qu'à un seul genre (Polyomavirus) avant une révision taxonomique de 2011 séparant les Polyomavirus de mammifères (Orthopolyomavirus et Wukipolyomavirus) des Polyomavirus aviaires (Avipolyomavirus) (1). En 2016, l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) a précisé la taxonomie des *Polyomaviridae* en les classant en quatre genres (2).

Les Alphapolyomavirus incluent plus de 30 espèces capables d'infecter l'homme et certains mammifères. Le polyomavirus des cellules de Merkel (MCPyV) et le polyomavirus du raton laveur sont jusqu'à présent les seuls membres connus pour provoquer un cancer chez leur hôte naturel.

Plus de 20 espèces appartiennent au genre Betapolyomavirus, dont les membres infectent les mammifères. Les polyomavirus humains (HPyVs) BK et JC, bien étudiés et particulièrement impliqués en pathologie humaine, font partie de ce genre.

Les Gammapolyomavirus sont responsables d'infections chez les oiseaux pouvant évoluer vers des maladies graves et même la mort, mais aucune oncogénicité n'a été observée.

Enfin, les principaux Deltapolyomavirus sont les polyomavirus humains 6, 7, 10 et 11 pouvant être retrouvés au niveau de la peau ou du tractus gastro-intestinal.

La famille des *Polyomaviridae* compte aujourd'hui une centaine de virus distincts. Les caractéristiques génétiques et biologiques des *Polyomaviridae*, et plus généralement des Polyomavirus, les rendent phylogénétiquement très différents des autres familles de virus. L'étude de leurs mécanismes physiopathologiques est donc difficile et nombre d'entre eux restent à éclaircir. De manière générale, les virions présentent une taille de 40-45 nm, une capsidie icosaédrique et sont dépourvus d'enveloppe. Leur génome est composé d'une molécule d'ADN double brin d'environ 5 kb, dont la

réplication est bidirectionnelle à partir d'une unique région d'origine. La transcription implique des produits précoces et tardifs, de l'épissage alternatif ainsi que la mise en jeu de cadres de lecture ouverts (3). Le polyomavirus typique utilisé comme modèle pour étudier les *Polyomaviridae* est le Simian Virus 40 (SV40). Les *Polyomaviridae* peuvent infecter des mammifères, des oiseaux, des poissons ou les humains mais il existe seulement 14 polyomavirus strictement humains (3). Les principaux HPyVs impliqués en pathologie sont le polyomavirus BK (BKPyV) et le polyomavirus JC (JCPyV) qui présentent des propriétés génomiques et structurales communes, comme en témoigne leur classification au sein du même genre (Betapolyomavirus). Ils sont pourtant responsables d'infections très variables qui dépendent de facteurs individuels et les présentations cliniques peuvent être très différentes pour une espèce donnée.

2. Le Polyomavirus BK

a. Structure

Les particules infectieuses de BKPyV présentent un diamètre d'environ 45 nm et sont dépourvues d'enveloppe. Au sein des particules, le génome viral est associé à des histones de l'hôte (H2A, H2B, H3, H4). La protéine virale VP1 est le constituant principal des virions puisque la quantité des protéines VP1 représente 80% du contingent total des protéines du BKPyV. Sa capside icosaédrique est structurée par 360 molécules de VP1 organisées en pentamères. Les pentamères de VP1 sont stabilisés notamment par des ponts disulfures et sont présentés à la surface externe de la capside. Deux autres protéines virales, VP2 et VP3, résident dans la partie interne de la capside en s'insérant grâce à leur structure en épingle à cheveux dans la cavité des pentamères de VP1 (4).

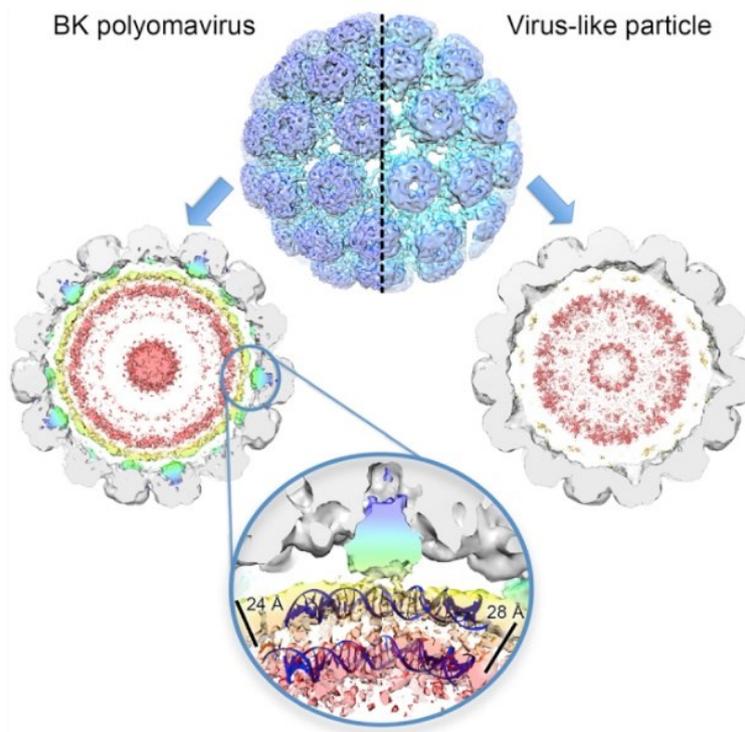


Figure 1: Structure du BKPyV (d'après Hurdiss et al., 2016) (4)

b. Génome

Le génome du BKPyV est une molécule totalement circulaire d'ADN double brin d'une taille d'environ 5000 paires de bases. Il a la particularité de se répliquer de manière bidirectionnelle à partir d'une origine unique (5). Le génome est composé de deux régions très conservées codantes pour des protéines dites précoces et tardives, respectivement. Ces deux régions sont séparées par une région de contrôle non codante (NCCR) qui peut varier et entraîner des dysrégulations de l'expression des gènes précoces et tardifs.

Les gènes précoces codent pour 3 protéines : le grand antigène de tumeur AgT (large tumor antigen, TAg), le petit antigène de tumeur Agt (small tumor antigen, tAg) et le grand antigène de tumeur tronqué tAgT (truncTAg). Ces 3 gènes sont exprimés très tôt après l'infection de la cellule hôte à partir d'un unique ARN messager (ARNm) issu d'épissage alternatif (6).

Les gènes tardifs codent pour les trois protéines structurales VP1, VP2 et VP3 mais aussi la protéine Agno. Ils sont exprimés après l'initiation de la réplication génomique du virus. La circularité du génome du BKPyV implique l'absence de frontière parfaitement définie entre les gènes précoces et tardifs quant à leur régulation par le NCCR. Ainsi, une partie de la séquence des gènes précoces est transcrite selon le même mode et le même sens que les gènes tardifs. Le transcrit non-codant issu de ce phénomène correspond à un pré-micro-ARN (pre-miARN) parfaitement complémentaire d'une partie du gène précoce de l'AgT (7). Le pre-miARN permet la génération tardive de deux micro-ARNs (miARNs) matures : bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p.

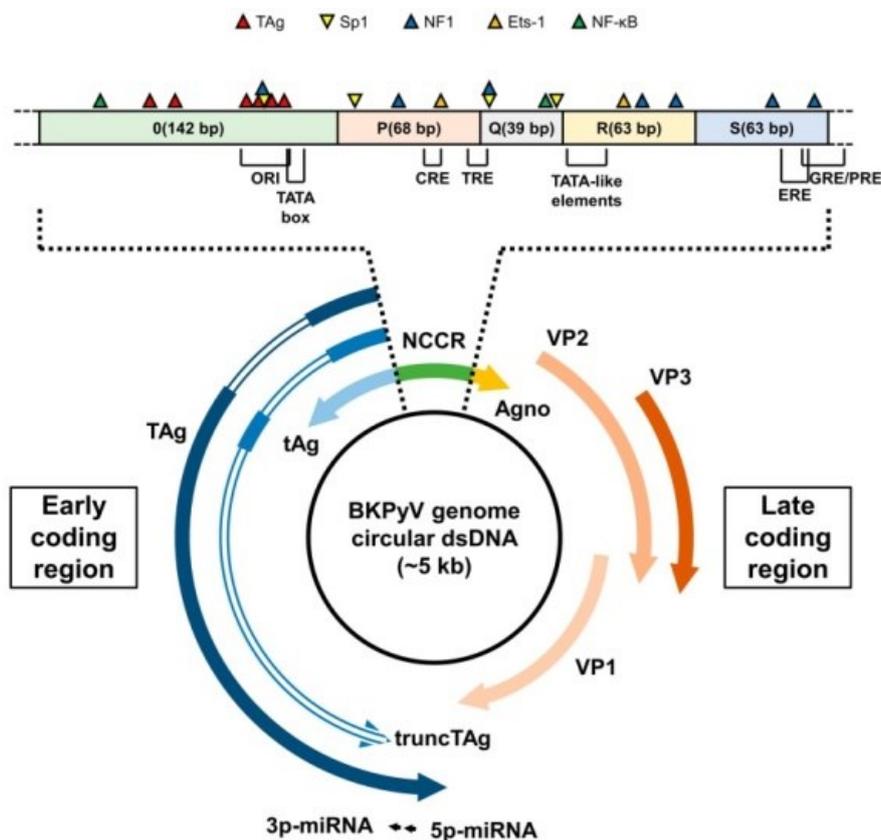


Figure 2 : Carte génomique du BKPyV (d'après Helle et al., 2017) (5)

Les souches de BKPyV majoritairement retrouvés dans les urines sont dites « archétypes ». Elles semblent être celles qui sont transmissibles et qui peuvent circuler

de manière asymptomatique dans la population humaine (8). Le NCCR des souches archétypes est divisé en 5 blocs séquences (O, P, Q, R, S) incluant l'origine de réplication (ORI), la TATA box et les éléments TATA-like.

Même si la majorité des souches présente un NCCR conservé, il existe une grande variabilité de séquence du NCCR entre les différents isolats. La conséquence de cette variabilité (duplication, triplication, inversion ou délétion de régions) est la génération de souches dites « réarrangées » qui sont plus souvent retrouvées dans le rein et d'autres tissus dans des contextes pathologiques (9).

Plusieurs études ont montré que les NCCRs archétypes favorisaient l'expression importante des gènes tardifs comme VP1 et la faible expression des gènes précoces. Au contraire, les formes réarrangées présentent une hyperexpression des gènes précoces, notamment l'AgT, et une sous-expression des gènes tardifs. La structure du NCCR détermine aussi la permissivité, le tropisme cellulaire et le potentiel oncogénique du BKPyV *in vitro* (10).

Alors que les souches archétypes se cultivent très peu *in vitro*, les souches réarrangées sont plus productives et la culture chronique de souches archétypes aboutit à la génération de souches réarrangées (11). Les réarrangements du NCCR pourraient donc constituer un mécanisme adaptatif du virus pour favoriser sa réplication dans divers types cellulaires. L'expression limitée de l'AgT associée à une forte production de micro-ARNs régulateurs dans les formes archétypes seraient un facteur limitant de la propagation virale, d'autant que l'induction d'une hyperexpression de l'AgT permet de restaurer la réplication des formes de BKPyV archétypes (12).

c. Rôles de protéines virales

La région précoce du génome du BKPyV code pour les protéines AgT, Agt et truncAgT produits par des ARNm épissés alternativement. L'AgT et le tAgT sont d'abord localisés dans le noyau. Leur structure leur permet de s'associer à la protéine

pRb et d'autres membres de sa famille (p107 et p 130) pour induire l'entrée ou la progression du cycle cellulaire, et *a fortiori* la réplication virale (5). Les propriétés oncogéniques de l'AgT et de l'AgT, passant par l'altération du cycle cellulaire, confèrent au BKPyV une catégorisation dans le groupe 2B des agents cancérigènes selon l'OMS (13).

Comme mentionné précédemment, les protéines VP1, VP2 et VP3 sont les composants de la capsid du BKPyV. VP2 et VP3 peuvent être absentes de l'assemblage de la particule virale et leur suppression n'altère pas la stabilité du virion. Cependant, ces deux protéines sont indispensables pour que les virions conservent leurs propriétés infectieuses (14).

La protéine Agno est une protéine abondamment exprimée par le BKPyV, surtout lors de la phase tardive du cycle de réplication du virus. Son rôle n'est pas parfaitement défini mais elle est impliquée dans l'assemblage, la maturation et/ou la libération des virions infectieux (5).

d. Cycle

La protéine majeure de capsid VP1 est exposée à la surface du BKPyV et facilite l'attachement du virus à la membrane plasmique. En effet VP1 est reconnue par les acides sialiques présents sur les gangliosides et protéines N-glycosylées de la membrane cellulaire (15). Des vésicules d'endocytoses formées à la suite de l'attachement membranaire permettent l'entrée du BKPyV dans la cellule et la motilité du cytosquelette entraîne le transport du virus vers le noyau.

Le chromosome viral peut alors être libéré et servir de support pour la transcription des ARN messagers (ARNm) des gènes viraux précoces. A partir de ces ARNm, des protéines sont produites dès leur arrivée dans le noyau et permettent de déclencher la réplication du génome. Les protéines de structure sont exprimées dans un deuxième temps pour encapsider le génome et libérer de nouveaux virions.

La sortie du virion se fait de manière lytique comme pour la majorité des virus non enveloppés mais un mécanisme de transmission « en bloc » du virus a récemment été identifié (16). Celui-ci est caractérisé par la génération de vésicules extra-cellulaires contenant de multiples virions qui permet une sortie non-lytique des virions et favoriserait également l'entrée du BKPyV dans de nouvelles cellules hôtes par fusion membranaire.

e. Epidémiologie

Le BKPyV est un *Polyomaviridae* strictement humain présent ubiquitairement dans la population. Dans la majorité des cas, la primo-infection intervient pendant l'enfance de manière asymptomatique. La voie de transmission reste incertaine mais une transmission interhumaine impliquant les voies respiratoires hautes semble la plus plausible, bien qu'il existe une possibilité de transmission féco-orale, par le sperme, la transfusion ou la transplantation d'organe (17). Dans la population générale la séroprévalence est proche de 100% à l'âge de 10 ans puis diminue pour atteindre les 70-80% chez les sujets âgés (6).

Après la primo-infection, le BKPyV reste présent dans l'organisme. Les virions peuvent séjurer dans les cellules tubulaires rénales et l'urothélium, ou d'autres tissus (pulmonaire, vésical, colique, etc.) (5). Le virus prospère alors sous forme non répliquative, ou se réplique à bas bruit. Il a également été décrit une persistance d'ADN sous forme épisomale non intégré dans les cellules tubulaires rénales (5).

f. Physiopathologie

Le BKPyV étant strictement humain il est difficile d'élucider parfaitement son histoire naturelle. Celle-ci a en grande partie été extrapolée à partir des études sur les modèles animaux avec un virus apparenté, le SV40.

Lors de la primo-infection le virus se multiplie au niveau des amygdales après contamination aérienne. Les monocytes infectés rejoignent la circulation sanguine et disséminent le virus vers les organes cibles tels que le rein ou le tractus urogénital. La persistance virale peut alors perdurer de nombreuses années ou l'infection peut se pseudo-réactiver régulièrement. Dans le cas du BKPyV, il n'existe donc pas de mécanisme de latence et de réactivation comme cela peut être le cas des *Herpesviridae*. La persistance se caractérise par une réplication virale à bas bruit contrôlée par le système immunitaire et des facteurs viraux. Les pseudo-réactivations sont, elles, définies par une réplication virale plus intense pouvant être ponctuelle ou prolongée.

Les infections et les réactivations du BKPyV entraînent des manifestations cliniques d'intensités variables dépendantes de facteurs individuels.

g. Manifestations cliniques et facteurs de risques

Il existe des facteurs de risques de primo-infection bruyante et de réplication intense du BKPyV, qui concernent essentiellement les patients immunodéprimés. Bien souvent, l'intensification de la réplication virale survient en cas de dépression de l'immunité cellulaire. Ce phénomène peut entraîner des conséquences pathologiques, notamment au niveau de l'arbre urinaire du fait du tropisme du BKPyV.

Chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'infection à BKPyV se présente généralement sous la forme d'une cystite hémorragique précoce, dans les 2 à 8 semaines qui suivent la greffe (18). Les cystites hémorragiques à BKPyV sont aussi retrouvées chez les patients sous chimiothérapie et recevant des fortes doses de cyclophosphamide. Les patients au stade SIDA de l'infection par le VIH peuvent aussi développer plus facilement des pneumopathies interstitielles et des encéphalites à BKPyV, pouvant s'associer à une néphropathie ou plus rarement à une rétinite (19).

En cas de greffe rénale, l'infection ou la réplication active est observée fréquemment. On retrouve une excrétion urinaire importante du virus chez 30 à 40%

des receveurs de transplant. La multiplication virale est responsable d'une nécrose tissulaire entraînant une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle. Si l'infection n'est pas prise en charge, elle va évoluer vers une ADNémie (retrouvée dans 10 à 20% des cas) et aboutir à une néphropathie à BKPyV et une perte du greffon dans plus de la moitié des cas (20).

De nombreuses publications se sont intéressés aux facteurs de risque pouvant expliquer pourquoi certains receveurs de greffe rénale étaient plus à risque de développer une infection grave à BKPyV. Cependant les nombreuses études, reposant sur des cohortes hétérogènes, ont mis en évidence des facteurs de risques pouvant entrer en contradiction avec les autres études. Dans cette optique, nous avons réalisé une revue systémique de la littérature afin d'isoler les facteurs de risque d'infection à BKPyV chez les transplantés de rein, retrouvés dans de multiples études avec une analyse statistique forte (analyse multivariée). Ce travail a abouti à une publication (annexe 1) qui a confirmé l'importance de certains facteurs de risques fréquemment repris, tout en montrant l'influence modérée voire nulle d'autres facteurs de risque pourtant régulièrement cités (21). Ainsi, nous avons montré que l'utilisation de stent urétral, les reins provenant de donneurs décédés, les antécédents de transplantation, le retard de fonction du greffon, l'âge et le sexe du receveur, la survenue de rejet aigu au décours de la greffe et les régimes immunosuppresseifs à base de tacrolimus sont des facteurs de risque robustes d'infection à BKPyV chez les transplantés rénaux (21). D'autres facteurs de risques supposés comme les incompatibilités HLA et les statuts sérologiques donneurs/receveurs vis-à-vis du BKPyV ont aussi été décrits mais restent à confirmer sur d'autres cohortes.

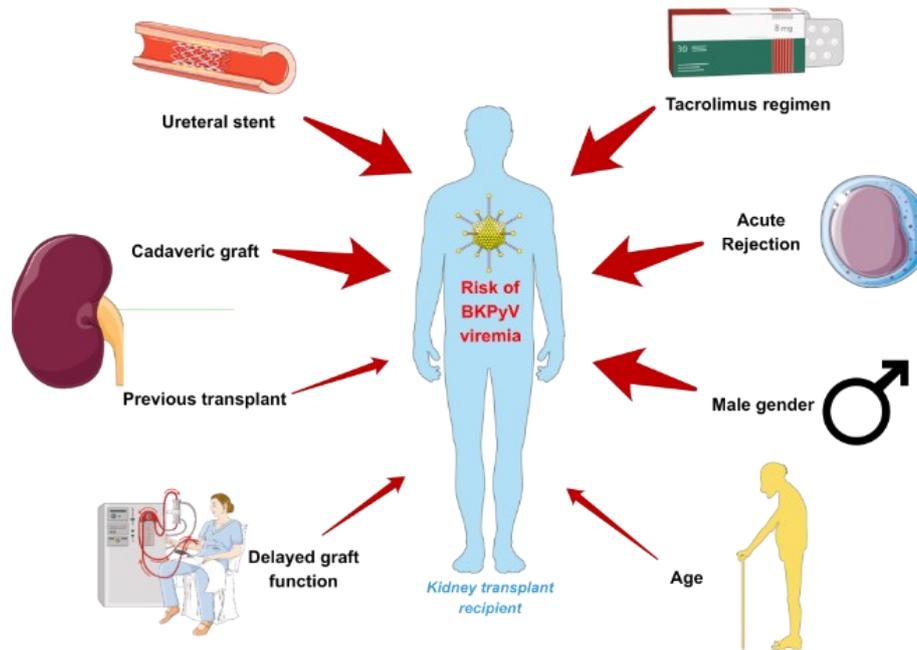


Figure 3: Facteurs de risques d'infection à BKPyV pour les transplantés de rein (d'après Demey et al., 2018) (21)

h. Diagnostic

Les signes cliniques évocateurs d'une pathologie à BKPyV sont souvent absents en début d'infection. Il est donc recommandé de réaliser un suivi préemptif de l'infection en détectant et en quantifiant l'ADN viral par PCR dans les prélèvements urinaires et sanguins des patients à risque. Bien que le suivi ne soit pas homogène entre les centres, il est recommandé de rechercher l'ADN viral à J0 d'une greffe rénale puis régulièrement les 6 premiers mois, et tous les ans à la suite d'une transplantation (22). Les recommandations concernent essentiellement la recherche de virus dans le plasma. Cependant, l'analyse des urines permet une détection plus précoce de l'infection et une modification de la prise en charge plus rapide, le virus étant obligatoirement retrouvé dans les urines dans les semaines qui précèdent l'ADNémie. Le suivi rapproché et précoce dans les urines a pour but de prévenir l'apparition de lésions rénales irréversibles dues au BKPyV et le développement d'une néphropathie potentiellement délétère à l'intégrité du greffon. La surveillance préemptive de l'ADN du BKPyV dans les urines permet également d'intervenir thérapeutiquement quand la répllication virale est la plus faible. Ainsi, la durée de prise en charge pour contrôler

l'infection serait plus courte. Ce concept de prise en charge a montré son efficacité puisqu'il a été prouvé que la surveillance de la charge virale dans le sang et les urines des patients transplantés permet de réduire la prévalence des néphropathies à BKPyV (23). Des analyses rétrospectives ont montré qu'une ADNurie du BKPyV supérieure à 10^7 UI/mL augmentait le risque d'ADNémie (24), et que si celle-ci était supérieure à 10^4 UI/mL il y avait un risque majeur de néphropathie (25).

Une technique cytologique est encore utilisée dans certains centres et consiste à rechercher dans les urines des « decoy cells ». Il s'agit de cellules altérées provenant de la dégradation du tissu tubulaire rénale et qui présentent des inclusions cellulaires spécifiques du BKPyV.

La technique de référence pour le diagnostic de néphropathie à BKPyV est la ponction biopsie rénale avec analyse histologique. Le délai de survenue moyen d'une néphropathie à BKPyV est d'environ 3 mois mais les lésions observées sont alors irréversibles. C'est pour cette raison que les techniques de biologie moléculaire sont préférées car moins invasives et permettant une intervention thérapeutique en amont des lésions irréversibles du greffon.

Lorsque l'infection est diagnostiquée, le suivi se fait par surveillance de la charge virale plasmatique sans que des seuils soient définis pour juger du contrôle de l'infection (22).

i. Traitement

A ce jour, la communauté médicale est toujours en manque d'un traitement antiviral efficace et peu toxique pour prendre en charge les pathologies induites par le BKPyV (26). Les immunocompétents étant peu symptomatiques, un traitement n'est pas indiqué. Chez les patients immunodéprimés, l'intervention thérapeutique habituelle en cas d'infection à BKPyV est la modification du traitement immunosuppresseur (27). Les modifications sont hétérogènes et non établies dans les recommandations actuellement (22). Elle peut correspondre à une diminution des

posologies, un changement de classe pharmacologiques voire une interruption du traitement. Le but est de restaurer suffisamment la réponse immunitaire pour lutter contre l'infection. La limite de cette pratique est le risque de rejet de greffe qui est prévenu plus facilement si l'infection à BKPyV est diagnostiquée précocement. En effet, lorsque l'infection est peu développée et localisée, le temps nécessaire de réduction des immunosuppresseurs est moins important (28). Une fois le diagnostic de l'infection réalisé, par biologie moléculaire dans les urines ou le sang, l'intervention thérapeutique de première intention est donc la levée partielle de l'immunosuppression. Cependant, les recommandations actuelles ne définissent pas précisément les critères suffisants pour restaurer l'immunosuppression normale (22). Il est recommandé de considérer l'évolution clinique et de la fonction rénale pour modifier à nouveau le traitement. La surveillance de la charge virale est perfectible puisque des patients peuvent rester positifs en ADNémie pendant de nombreux mois sans évolution clinique défavorable, suggérant des infections contrôlées. Dans ces cas-là, il existe un risque de maintenir inutilement le régime immunosuppresseur à des doses faibles, et d'accroître le risque de complication immunologique.

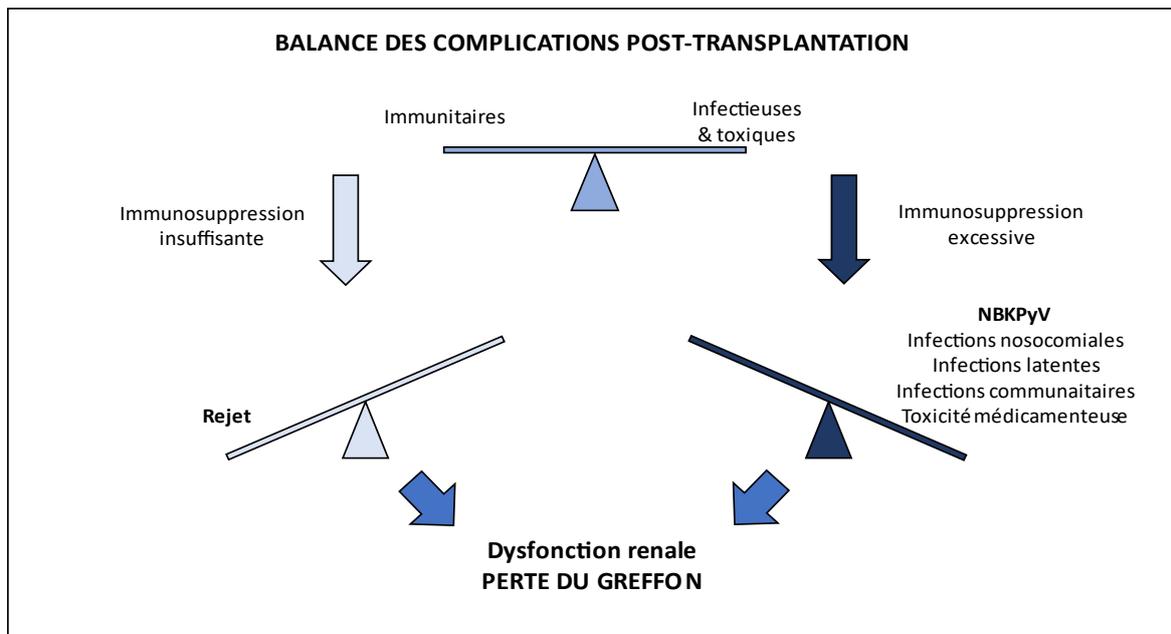


Figure 4 : Balance des complications post-transplantation (adaptée de Shen et al. 2021) (29)

Le cidofovir, le leflunomide, les fluoroquinolones et les immunoglobulines intraveineuses ont été proposés à plusieurs reprises comme thérapies adjuvantes avec des efficacités hétérogènes en fonction des études cliniques.

Le cidofovir, analogue nucléosidique de la désoxycytidine-monophosphate, est connu comme traitement des infections à CMV. Des études *in vitro* ont mis en évidence une inhibition de la réplication du BKPyV par le cidofovir, associée à une toxicité envers le métabolisme cellulaire et la synthèse d'ADN (30). Malgré la description de cas de traitements efficaces d'infection à BKPyV à l'aide du cidofovir, ce traitement n'est pas recommandé (31). Le cidofovir et ses dérivés comme le CMX001 restent des candidats pour développer un traitement des infections à BKPyV (32).

Le leflunomide est un immunomodulateur pouvant être prescrit chez les patients transplantés de foie ou de rein en cas d'immunosuppression insuffisante avec les traitements habituels (33). Malgré une activité *in vitro* vis-à-vis du BKPyV et une néphrotoxicité moins importante que le cidofovir, les effets indésirables fréquents (hépatotoxicité, myélotoxicité) et l'efficacité clinique incertaine ne justifient pas son utilisation dans le traitement des infections à BKPyV chez les transplantés rénaux (31).

Les fluoroquinolones, notamment la ciprofloxacine, ont été évaluées chez les patients transplantés rénaux et les allogreffés de CSH pour la prévention des infections à BKPyV. Plusieurs études ont montré une efficacité alors que 8 études ont conclu au contraire, et certaines ont mis en évidence un risque accru d'infections à bactéries résistantes aux fluoroquinolones (34,35).

Les immunoglobulines intraveineuses (IGIV) sont produites à partir de mélange d'un millier de plasmas venant des dons de sang. Ceux-ci peuvent donc contenir des IgG neutralisants le BKPyV, ou du moins certains sérotypes. *In vitro*, les IGIV peuvent neutraliser jusque 90% de particules infectieuses (36) mais les résultats des études cliniques sont hétérogènes et biaisés par la variabilité des traitements associés et des titres d'anticorps des patients receveurs et donneurs de greffe rénale (37).

Novartis a récemment décrit la production d'un peptide antiviral de synthèse pouvant se lier au pore de la protéine VP1 du BKPyV et du JCPyV. Ce peptide, appelé D1min, est dérivé des protéines mineures de structure VP2/3 et a des propriétés antivirales à faible concentration sans présenter de toxicité cellulaire apparente. Son mécanisme d'action se concentrerait sur la voie d'entrée du virus et ne serait plus efficace sur le virus intracellulaire puisque le peptide ne traverse pas librement les membranes cellulaires. Pour exploiter ce novateur potentiel traitement il reste encore à définir une formulation pharmaceutique assurant la biodisponibilité du peptide aux sites d'infection et évaluer la toxicité *in vivo* (38).

Le MAU868 est une nouvelle IgG1 humaine monoclonale, développée par Vera Therapeutics, qui se lie à la protéine majeure de la capsid du BKPyV (VP1) avec une puissante activité neutralisante *in vitro* contre les 4 principaux géotypes du BKV (EC50s allant de 0,009 à 0,093 µg/ml). Un essai clinique est en cours et certains résultats sont déjà connus. Le MAU868 a été sûr et bien toléré avec une pharmacocinétique typique d'une IgG humaine. L'activité neutralisante *ex vivo* suggère dans quelles limites la marge thérapeutique pour le traitement ou la prévention de la maladie à BKPyV. Les premiers résultats justifient la poursuite de l'étude clinique du MAU868 chez les patients atteints ou à risque d'être atteints par le BKPyV (39).

j. Suivi de l'infection : perspectives

Lorsque l'infection est installée dans le temps et que la charge virale reste positive, même faiblement, il est difficile d'objectiver le contrôle de l'infection. En effet, certains patients peuvent maintenir une charge virale plasmatique pendant plusieurs mois après le diagnostic initial et l'adaptation du traitement immunosuppresseur. Au cours de la réplication, des milliards de particules virales et d'épisomes sont produits et peuvent persister dans le tissu épithélial rénal après neutralisation de l'infection par le système immunitaire. Les transplantés de rein étant à risque accru de dommages tissulaires (40), des particules virales déficientes ou de l'ADN libre provenant de

cellules en souffrance peuvent être excrétés dans les urines. Dans les cas d'infection persistante, la prise en charge médicale est hétérogène car dépendante de nombreux facteurs : pratique clinique du médecin, tolérance du patient, risque de rejet aigu, etc. Le traitement immunosuppresseur peut alors, aux extrêmes, être maintenu à faible dose trop longtemps et augmenter inutilement le risque de rejet, ou être restauré trop précocement aux doses initiales avec un danger d'aggravation de l'infection à BKPyV (29). Un marqueur spécifique de réplication est donc nécessaire. Tous les éléments produits au cours du cycle viral, des transcrits aux protéines, pourraient constituer des marqueurs de réplication mais leurs spécificités diagnostiques ne se valent pas. Les protéines et l'ADN, libres ou incorporés dans des virions non réplicatifs, ne permettent pas de prédire exactement la réplactivité du BKPyV. En revanche, les transcrits du génome présentent un potentiel élevé quant à cette utilisation. Il peut s'agir des ARNm des protéines majeures, VP1 et AgT, ou des miARNs matures. L'utilisation des ARNm urinaires comme marqueurs de réplication virale est cependant discutable. En effet, ils sont présents en faible quantité et de façon non stable dans le milieu extracellulaire (41,42). Ces propriétés impliquent donc la nécessité d'étapes pré-analytiques contraignantes telles que la centrifugation et la récupération des culots cellulaires à partir d'urines fraîches. A l'inverse les miARNs sont très stables et facilement détectables en biologie moléculaire, même à partir d'urines congelées (43,44). Le développement d'un marqueur sensible et spécifique pour le suivi d'infection à BKPyV permettrait de mieux prendre en charge la pathologie et le risque de néphropathie, tout en limitant la survenue de rejet aigu.

3. Le Polyomavirus JC

a. Génome et structure

La structure et le génome du JCPyV sont très similaires à ceux du BKPyV. Il est également un petit virus non enveloppé à capsidie icosaédrique. Son génome de 5130 kb se présente sous la forme d'une molécule d'ADN double brin circulaire (45). Les

gènes précoces sont séparés des gènes tardifs par une région de contrôle non codante (NCCR) contenant l'origine de réplication (ORI), le promoteur et les éléments d'initiation (46). Les gènes précoces codent pour un « antigène T » et un « antigène t », mais aussi pour des variants d'épissage T'135, T'136 et T'165 (47). Les gènes tardifs codent pour les protéines de structure VP1, VP2, VP3 et la protéine non structurale Agno. Comme pour le BKPyV, deux micro-ARNs sont transcrits à partir des gènes tardifs et ciblent les ARN messagers précoces (7). De la même manière que pour le BKPyV, le NCCR est la région la plus variable du génome viral. Les formes archétypes sont supposées être impliquées dans la transmission de l'infection, et les formes réarrangées sont surtout retrouvées au niveau des localisations d'infections actives (48).

b. Epidémiologie et physiopathologie

Le JCPyV est commun et 50-60% des adultes sains sont séropositifs vis-à-vis de ce virus (49). La primo-infection est généralement asymptomatique et a lieu durant l'enfance. Après une contamination aérienne ou féco-orale, le virus se multiplie dans les amygdales. Ensuite, une infection persiste durant toute la vie de l'hôte. Le JCPyV colonise principalement les reins et les tissus lymphoïdes. C'est à partir de ces sites que le virus peut acquérir ses propriétés neurotropiques et rejoindre le système nerveux central en traversant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette migration virale est notamment favorisée par l'échappement immunitaire et l'augmentation de la perméabilité de la BHE causés par les traitements immunosuppresseurs systémiques. Le JCPyV peut alors entraîner le développement d'une maladie appelée « leuco-encéphalopathie multifocale progressive » (LEMP). Celle-ci est une maladie neurodégénérative à l'issue fatale caractérisée par une démyélinisation et une destruction des oligodendrocytes infectés par le JCPyV (50). La LEMP se manifeste par des difficultés de langage, des troubles visuels et une dysfonction motrice. Les lésions multifocales caractéristiques sont visibles et permettent d'étayer le diagnostic puisque les signes cliniques sont non spécifiques. La détection d'ADN de JCPyV dans le LCR

ou la mise en évidence de protéines et d'ADN viraux sur les biopsies cérébrales permettent le diagnostic de certitude. Les patients les plus à risque sont les individus infectés par le VIH, chez qui l'incidence de la LEMP est de 3% (51). Les traitements utilisant des anticorps monoclonaux, notamment le Natalizumab et le Rituximab sont associés à un risque accru de survenue de LEMP (52,53).

Le JCPyV est également responsable de neuropathie à cellules granuleuses, de méningites, d'encéphalite et de néphropathie. Ce virus est excrété de manière asymptomatique dans les urines au cours de l'infection persistante, chez près de 20% des individus, et est même retrouvé dans les eaux usées (54,55).

Le JCPyV n'est pas considéré comme cancérigène puisqu'aucune causalité n'a été montré entre le virus et la survenue de cancer malgré la présence d'ADN et de protéines du JCPyV dans les tissus tumoraux humains (56).

4. Les micro-ARNs

a. Généralités sur les micro-ARNs

Environ 90% du génome humain n'est pas codant pour des protéines alors que les gènes sont pourtant transcrits. Les ARN non codants provenant de cette transcription sont impliqués dans des processus de régulation génique sophistiqués et peu connus. Parmi ces ARNs non codants, il existe la famille des miARNs, dont le mécanisme d'action a été identifié précocement (57).

Les miARNs sont des petits ARNs d'environ 22 nucléotides de long pouvant inhiber l'expression de gènes lors de régulations post-transcriptionnelles (58). Les miARNs sont typiquement produits à partir des introns, mais leur transcription peut aussi se faire par d'autres processus comme c'est le cas pour les miARNs viraux (59). La première étape de synthèse des miARNs est la transcription de gènes par l'ARN polymérase II dans le noyau en miARN primaire (pri-miARN), acide nucléique de 60-100 nucléotides présentant une structure tige-boucle (Figure 5). L'enzyme Drosha clive le pri-miARN en pre-miARN pour permettre son exportation vers le cytoplasme au

travers de l'exportine 5 (60). La RNase III endonucléase DICER peut alors scinder le pre-miARN en deux miARNs matures (61). Les miARNs matures s'intègrent ensuite dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), préférentiellement par association aux protéines de la famille des argonautes (Ago 1 à 4) (62,63). La spécificité de l'action du miARN dépend de sa complémentarité avec le gène cible. La complémentarité est souvent importante entre les 2 à 8 premiers nucléotides en -5' du miARN et les nucléotides en -3' de l'ARNm cible. Le phénomène majoritairement observé est ensuite la fixation du complexe à des zones spécifiques de la partie 3' d'ARNm. En cas d'homologie de séquence importante entre le miARN et l'ARNm, l'ARNm sera dégradé par clivage selon un modèle siARN-like (64,65). La liaison au niveau du 9 à 11^{ème} nucléotide du miARN avec l'ARNm semble constituer un site de clivage majeur (66). Cependant, il n'est pas nécessaire que la complémentarité soit parfaite entre la séquence du miARN et de l'ARNm pour observer ce processus. Chez les mammifères, Guo *et al.* ont montré que 10-20% de la régulation des quantités d'ARNm passe par une inhibition purement traductionnelle (67). Dans les deux cas, l'interaction miARN-ARNm a pour conséquence une diminution de l'expression du gène. Cette variation des taux d'ARNm et de protéines est souvent modérée, de l'ordre de 10 à 20% d'inhibition et dépassant rarement les 50% (68).

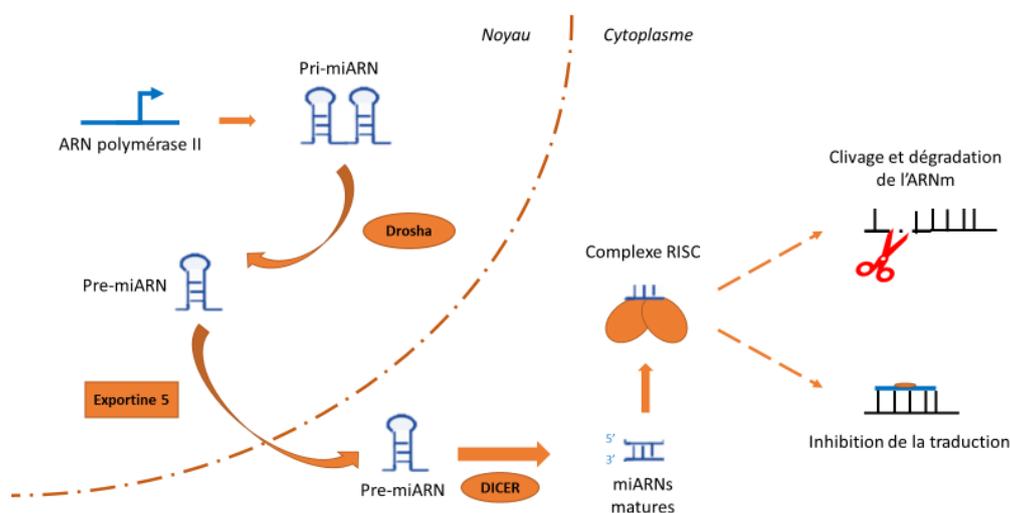


Figure 5 : Synthèse et mécanisme d'action général des micro-ARNs

Alors que les miARNs ont longtemps été considérés comme des éléments uniquement intracellulaires, une étude de 2008 a montré la présence de miARNs dans le milieu extracellulaire (69). Cette observation a été, un temps, controversée puisque les miARNs extracellulaires pouvaient résulter de leur libération passive du cytoplasme en conséquence de l'apoptose et de la destruction cellulaire. Par la suite, il a été montré que les miARNs circulants étaient généralement sécrétés de manière « active » par les cellules et agir comme messagers. Dans le secteur extra-cellulaire les miARNs sont retrouvés dans les vésicules lipidiques de différentes tailles : les exosomes (50 – 100 nm), les microvésicules (0,1 – 1 μm) ou les corps apoptotiques (0,5 – 2 μm) (70). Les lipoprotéines comme les LDL ou les HDL sont aussi des transporteurs de miARNs (71). Plus de 90% des miARNs sont cependant transportés en restant liés aux protéines argonautes (surtout Ago2) qui les protègent de la dégradation par les RNAses circulantes (72).

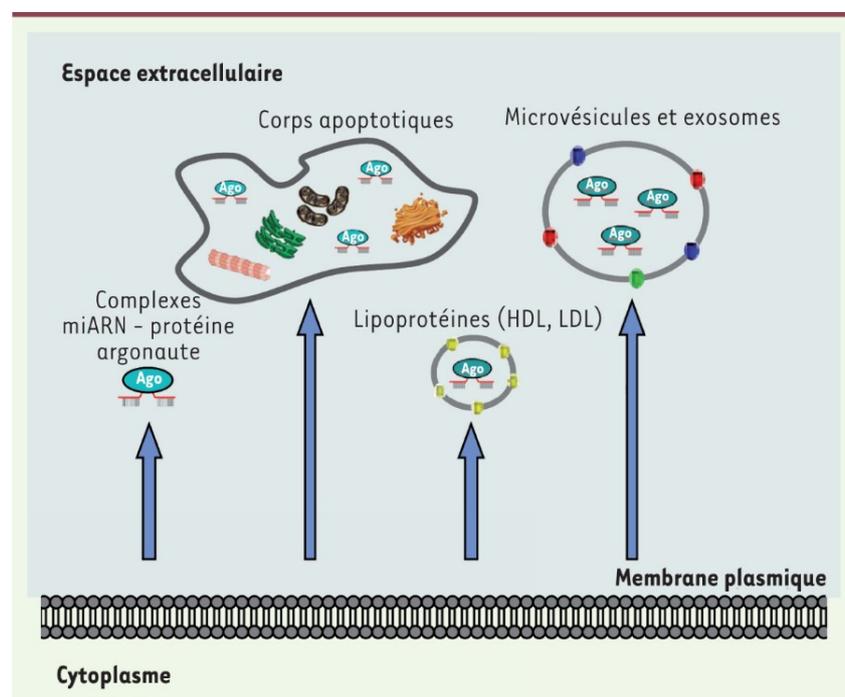


Figure 6 : Export des miARNs dans le milieu extracellulaire (d'après Baulande et al. 2014) (73)

Les miARNs s'accumulent donc dans les liquides biologiques de manière variées. Les liquides biologiques se distinguent par leur composition et leur concentration en miARNs (74). L'urine ou le liquide céphalo-rachidien sont pauvres en miARNs à la différence de la salive ou du lait maternel qui contiennent une grande variété de molécules. De même, la spécificité des miARNs est différente entre les liquides biologiques et les tissus. Le miR-10a est retrouvé uniquement dans les prélèvements broncho-alvéolaires par exemple (74). Les miARNs peuvent aussi orienter sur l'origine d'une atteinte tissulaire. En effet, la présence de certains miARNs comme le miR-105* dans les urines est témoin d'une pathologie urothéliale car jamais retrouvé dans les urines de patients sains (74). La perturbation de l'homéostasie cellulaire dans un contexte pathologique est souvent associée à la modification de l'expression des miARNs de ces cellules. Les miARNs ont donc été envisagés comme nouvelle classe de biomarqueurs. Ce sont des éléments pouvant être quantifiés avec fiabilité dans différents fluides biologiques en s'affranchissant de l'invasivité des biopsies tissulaires. Ainsi, de nombreuses publications ont décrit les altérations quantitatives des taux de miARNs circulants lors de pathologies actives comme les atteintes tumorales, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 mais aussi les infections bactériennes et virales (43).

b. Les micro-ARNs des *Polyomaviridae*

Les premiers miARNs viraux ont été identifiés à partir de l'Epstein Barr Virus et ont ouvert l'hypothèse de l'existence de miARNs pour d'autres espèces virales (75). Ainsi, les miARNs des *Polyomaviridae* ont été mis en évidence en 2005 par Sullivan *et al.* grâce à un screening *in silico* de pre-miARNs dans le génome du SV40 (7). La séquence de ce pre-miARN se situe au sein de la séquence de l'AgT. En raison de la structure du génome des *Polyomaviridae* sous forme d'ADN double brin circulaire, les miARNs de ces virus sont donc parfaitement complémentaires de ce gène précoce, ce qui leur confère un effet inhibiteur de type siARN-like. Habituellement, les miARNs

sont transcrits à partir d'introns des gènes codants. Or, la plupart des transcrits de polyomavirus de mammifères ne présentent pas ce genre d'intron d'où pourrait dériver les miARNs. Une récente étude s'est attardée à élucider cette question et a suggéré une activité prolongée de l'ARN polymérase II lors de la transcription des gènes tardifs du BKPyV (76). En effet, les matrices d'ADN circulaire exprimaient des quantités plus importantes de miARNs que les matrices linéaires. Ce phénomène s'explique par une transcription avec répétitions « en tandem » du génome circulaire, avec une activité de l'ARN polymérase sur plusieurs tours du génome. Ainsi, les transcrits peuvent alors placer la séquence du pre-miARN dans un intron de la taille du génome du BKPyV, avec des zones d'épissages définies. Ces résultats sur le BKPyV font échos à d'autres observations faites sur le MuPyV et le MCPyV (77,78).

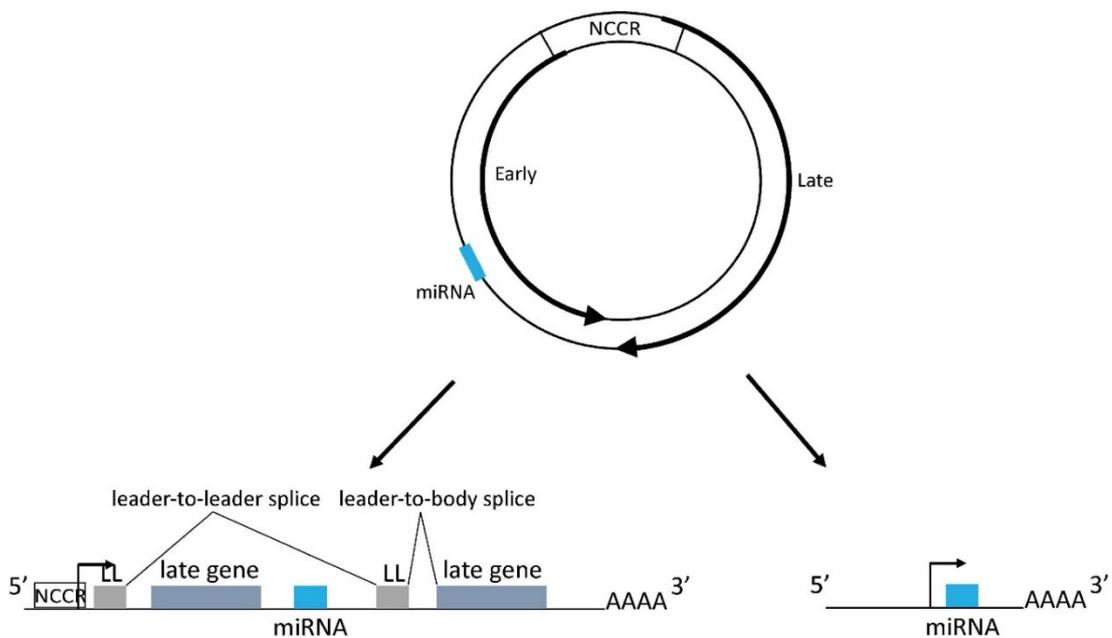


Figure 7: Mécanismes d'expression des miARNs du BKPyV, d'après Zou et al. (2020) (76)

La première étude de Sullivan *et al.* a montré que la présence des miARNs viraux était responsable du clivage des ARNm précoces du SV40, dont celui de l'AgT, soulevant l'hypothèse nouvelle d'un rôle autorégulateur des miARNs dans le cycle biologique des *Polyomaviridae* et des virus de manière générale (7). Bien que les

miARNs des *Polyomaviridae* puissent cliver les ARNm de gènes précoces au niveau de différents sites de la séquence, la propriété intrinsèque de complémentarité parfaite avec au moins une partie de la séquence du gène précoce leur confère une action inhibitrice universelle dans l'inhibition de l'AgT. Cette propriété est connue pour tous les *Polyomaviridae* pour lesquels l'existence d'un miARN est rapportée, et est donc corrélée à une propriété conservée au cours de l'évolution de la famille (79).

La fonction régulatrice des miARNs du BKPyV a été plus finement étudiée en 2013 par Nicole Broekema et Michael Imperiale (80). Le pre-miARN du BKPyV est à l'origine de 2 miARNs matures de 22 nucléotides : le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p. Par ailleurs, la structure du pre-miARN du JCPyV est très proche de celui du BKPyV et aboutit à deux miARNs matures : le jcv-miR-J1-3p qui est strictement identique au bkv-miR-B1-3p, et le jcv-miR-J1-5p (81). A ce jour, il n'a pas été décrit de polymorphisme au niveau de la séquence du miR-B1/J1-3p. Quelques « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) ont été identifiés pour le bkv-miR-B1-5p et le jcv-miR-J1-5p, mais sont extrêmement rares (80,82). De plus, ces SNPs sont généralement retrouvées dans la partie boucle du pre-miARN. Le SNP le plus remarquable est un de ceux décrits pour le jcv-miR-J1-5p, se situant au niveau du miARN mature sans modification de la région d'origine du miARN, et entraînant une modification des acides aminés de l'AgT (82). La conservation importante des séquences de miARNs des *Polyomaviridae* suggère une importance majeure de ces éléments dans la réplication virale et comme avantages évolutifs.

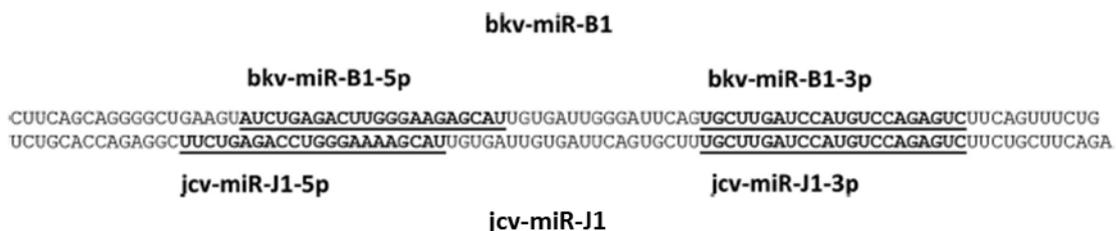


Figure 8 : Séquences des pre-miARNs du BKPyV et du JCPyV

La conservation de séquence du pre-miARN est donc essentielle à ces virus. En effet, la mutation au niveau de 3 nucléotides du pre-miARN bloquait totalement la production de miARN matures en 3p et en 5p (80). De plus, la production de bkv-miR-B1-3p et de bkv-miR-B1-5p est dépendante de la balance régulatrice du NCCR. Les souches archétypes du BKPyV produisent plus de bkv-miR-B-5p, entraînant une diminution de la quantité de transcrits et de protéines d'AgT, comparativement aux souches réarrangées. Alors que la réplication est plus importante pour les souches réarrangées, une mutation délétère au niveau de la séquence du pre-miARN du BKPyV archétype augmente par un facteur 100 la quantité d'ADN de BKPyV retrouvée par PCR quantitative. Enfin, en inversant la structure du NCCR, c'est-à-dire en induisant la régulation des gènes précoces par le promoteur tardif et inversement, les auteurs ont pu révéler une diminution des miARNs pour les souches archétypes et une augmentation pour les souches réarrangées. Ces résultats ont donc pu confirmer que la régulation de la transcription des miARNs du BKPyV était modulée par le promoteur tardifs du NCCR et était dépendante des réarrangements de séquences de cette région.

L'activité du NCCR des *Polyomaviridae* est dépendante de l'interaction avec divers facteurs de transcription (FT). Peu de données existent sur l'influence des FTs sur l'expression des miARNs viraux, alors que l'expression des FTs peut elle-même dépendre de l'action de ces miARNs (83). Sp1 a été le premier FT décrit comme pouvant agir sur le NCCR du SV40 et par extension à celui de tous les *Polyomaviridae* (84,85). Parmi 4 sites du NCCR du BKPyV pouvant interagir avec Sp1, Betghe *et al.* ont montré que la mutation du site proximal d'amorçage de la transcription des gènes tardifs (SP1-4) activait la transcription des gènes précoces. A l'inverse, la mutation du site proximal d'amorçage de la transcription des gènes précoces (SP1-2) inhibait la transcription des gènes précoces (86). Par la suite, il a été montré que les souches archétypes de BKPyV mutées au niveau de SP1-4 exprimaient moins de miARNs, à des taux similaires que les souches réarrangées (87).

Au-delà de ces résultats, Chen *et al.* ont montré l'importance des variations géniques des *Polyomaviridae* sur leur « targetome », c'est-à-dire les gènes ciblés par les miARNs (88).

Parmi les principales cibles des miARNs viraux des *Polyomaviridae*, nous retrouvons les gènes du virus lui-même, dans un processus d'auto-régulation du cycle viral. Ce mécanisme est d'autant plus relevant que le pre-miARN des virus de cette famille est parfaitement complémentaire du gène de l'AgT, un FT majeur du génome viral. Lors d'une infection lytique, les miARNs servent à optimiser le niveau des transcriptions virales précoces et/ou des protéines virales précoces dans les cellules infectées. Dans un autre modèle, les miARNs pourraient contribuer à l'établissement et/ou au maintien d'une infection persistante, en régulant négativement à la fois les transcriptions virales précoces et les transcriptions de l'hôte sélectionné. A l'opposé, il a été montré que les quantités de miARN produites par les souches réarrangées étaient 1000 fois supérieures que celles des souches archétypes (80). Cette information contradictoire questionne sur le réel rôle auto-régulateur des miARNs du BKPyV sur sa réplication. Ce débat est notamment supporté par une absence d'effet sur l'intensité de la réplication virale lorsque la séquence du miARN est muté dans des souches réarrangées de MuPyV et de SV40 (7,89). Comme énoncé précédemment, les séquences des miARNs des *Polyomaviridae* sont particulièrement conservées, très proches entre espèces, voire identiques pour le bkv-miR-B1-3p et le jcv-miR-J1-3p. De plus, les nucléotides 10 et 11, région potentiellement critique pour le clivage de l'AgT, sont identiques sur les deux miARNs matures bkv-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p. Il est donc possible de supposer que les miARNs du BKPyV et du JCPyV peuvent réguler la réplication de l'un et l'autre virus, d'autant que ces virus ont un tropisme cellulaire similaire. A ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur l'interaction inter-espèces des miARNs chez les *Polyomaviridae*, particulièrement entre le BKPyV et le JCPyV qui sont très répandus et présentent tous deux un tropisme rénal important.

D'autre part, l'effet des miARNs des *Polyomaviridae* sur les gènes cellulaires, notamment ceux impliqués dans la réponse immunitaire ont été explorés. Bauman *et*

al. ont identifié en 2011 une médiation d'ULBP3 par le bkv-miR-B1-3p, le miARN commun au BKPyV et au JCPyV (90). ULBP3 est une protéine induite par le stress et reconnue par le récepteur NKGD2, exprimé par les lymphocytes NK et d'autres sous-types de lymphocytes T. Leur étude a montré que le bkv-miR-B1-3p diminuait l'expression d'ULBP3 et limitait la réponse cellulaire NK contre les cellules infectées. L'inhibition de l'activité du bkv-miR-B1-3p permettait de restaurer la réponse immunitaire. En conséquence, il a été suggéré un rôle immunomodulateur du bkv-miR-B1-3p pour l'échappement des virus au système immunitaire et le maintien de l'infection persistante. En 2014, il a été montré que la mutation de la séquence des miARNs du SV40, autant dans des souches archétypes que réarrangées, entraînait des taux hépatiques et rénaux élevés d'ADN viral persistant chez des hamsters infectés, comparativement à la souche sauvage (91). Dans cette étude, à l'opposé des observations de Bauman *et al.*, la clairance des mutants n'était pas affectée, ce qui suggérait une absence d'effet des miARNs du SV-40 sur l'échappement immunitaire. Plus récemment, l'effet de l'infection du BKPyV sur le transcriptome a été étudié par RNA-Seq et PCR sur des biopsies de NBKPyV et des cellules épithéliales rénales proximales tubulaires (RPTEC) *in vitro* (92). La protéine TP53INP2, activatrice d'autophagie, était régulée négativement tandis que des protéines pro-inflammatoires dont BCL2A1, IL-6 et IL-8 étaient surexprimées. Il a été constaté que l'infection était liée à une sous-expression des miARNs cellulaires miR-10b et miR-30a. La sous-expression de ces molécules devrait théoriquement faciliter la reconnaissance des cellules infectées par les récepteurs NKGD2, en contradiction avec les travaux de Bauman *et al.* précédemment mentionnés. De plus, l'expression des ligands de NKGD2, dont ULBP3, n'était nullement altérée dans les biopsies de NBKPyV. Ainsi, la capacité du virus à échapper au système immunitaire par le biais de ses miARNs ne semblent pas si évidente. Ces différentes études soulèvent donc la question de l'influence des modèles d'évaluation et des conclusions tirées quant au rôle des miARNs des *Polyomaviridae* sur leur physiopathologie, tant par rapport aux types cellulaires utilisés *in vitro* qu'aux conséquences réelles observées *in vivo*.

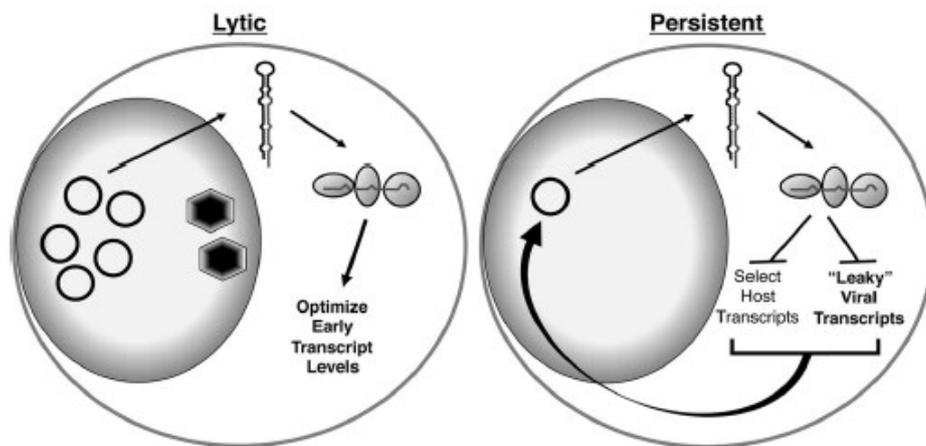


Figure 9: Modèle du rôle des micro-ARNs des Polyomaviridae au cours de différents types de cycles de réplication (d'après Tian et al., 2014) (93).

Par la suite, Tian *et al.* ont démontré que les taux de bkv-miR-B1 étaient directement liés à la régulation de l'expression de l'AgT et de la réplication du BKPyV (93). En induisant une expression accrue de bkv-miR-B1 (par transfection de plasmide ou d'analogues nucléosidiques dits « mimics ») en parallèle de l'infection à BKPyV sur cellules tubulaires proximales rénales, les auteurs ont montré une diminution importante de l'AgT et de la quantité d'ADN viral produit. A l'inverse, en utilisant des « éponges » à bkv-miR-B1-3p ou -5p ou en inhibant la maturation du pre-miARN par altération du Dicer, nous observons une augmentation de la réplication virale. Typiquement, parmi le duplex de miARNs produit à partir d'un pre-miARN, un est considéré comme effectif dans le complexe RISC et l'autre accessoire (94). Cependant, les différentes études sur les miARNs des *Polyomaviridae* énoncées précédemment ont montré que les miARN -3p et -5p présentaient tous deux une activité inhibitrice *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats permet donc d'illustrer l'impact important des miARNs du BKPyV dans sa réplication *in vitro*. *In vivo*, il a été rapporté que les vésicules extracellulaires, notamment les exosomes, permettent le transport de

particules virales, de protéines, et de miARNs viraux dans les fluides biologiques (95). Ce mécanisme permettrait la modulation de la signalisation cellulaire et de l'immunité pour favoriser les infections à de nouvelles cellules et permettre la persistance virale. Il est supposé que les *Polyomaviridae* tels que le BKPyV ou le JCPyV utilisent ces mêmes mécanismes. Les miARNs du JCPyV ont été retrouvés dans des biopsies cérébrales dans des contextes de LEMP (79). Différentes études ont ensuite isolé les miARNs du JCPyV et du BKPyV dans différentes matrices : plasma, urines, liquide cérébro-spinal (96). Initialement, seuls les miARNs du JCPyV avait été mis en évidence dans les exosomes. Cependant, de récentes études ont permis de montrer la présence de miARNs du BKPyV dans les exosomes de patients transplantés rénaux, et une détection variable de ces miARNs au niveau plasmatique (97,98). Il a donc été suggéré leur utilisation comme potentiel marqueur diagnostique de néphropathie à BKPyV (NBKPyV), sans pour autant avoir comparé l'intérêt du dosage des miARNs à la quantification de l'ADN viral du BKPyV habituellement réalisé pour le diagnostic précoce de l'infection. En effet, les miARNs sont des molécules issues de la réplication virale du BKPyV, et sont produits avant que le virion entier soit libéré de la cellule. Ils peuvent donc présenter un intérêt pour diagnostiquer au plus tôt de l'infection. Ils ont également le potentiel d'être des marqueurs plus spécifiques d'une infection active, contrairement à l'ADN du BKPyV qui peut provenir de virus latents ou déficients, ou d'épisomes, libérés dans les urines lors d'une atteinte tissulaire.

c. Méthodes de dosage des miARNs du BKPyV par RT-PCR

Pour obtenir les données énoncées précédemment, les différentes équipes de recherche ont développé des méthodes de dosage des miARNs du BKPyV. Ces méthodes présentent une hétérogénéité dépendante des équipements des laboratoires mais aussi de l'évolution technologique. Au total, 9 publications ont traité de la quantification de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p dans des échantillons cliniques de

patients développant des infections à *Polyomaviridae*. Les principales caractéristiques des méthodes de quantification sont résumées dans la Tableau 1.

Alors que les premières études utilisaient une simple normalisation à un contrôle positif ou à un miARN présent naturellement dans l'échantillon biologique, les dernières techniques privilégiaient une quantification selon une gamme préparée à partir de standards (81,92,93,97,98). Les protocoles hétérogènes ont favorisé la publication de résultats également divergents. En effet, nous retrouvons dans la littérature des différences au niveau de la spécificité des kits de RT-PCR puisque certaines études montrent des RT-PCRs positives même sans échantillon (96,98). Les analyses dans les plasmas peuvent se révéler négatives même pour des patients avec de forte quantité d'ADN de BKPyV dans l'échantillon (98,99). Les publications scientifiques détaillent peu ou pas les performances de leurs méthodes de dosage des miARNs, ce qui limite les comparaisons des résultats quantitatifs entre les études (92). De plus, les différentes études montrent que le choix des populations et la taille des effectifs influencent fortement les résultats. En effet, les évaluations précédentes ont porté sur un nombre d'échantillon variant de 8 à 67 spécimens seulement et la plus grande cohorte étudiée étaient composée de 13 patients atteints de NBKPyV et 15 patients contrôles. Les recherches de Pietilä *et al.* ont potentiellement porté sur plus de patients mais il est simplement précisé que le travail a porté sur au moins 17 patients (96). De plus, il est rarement précisé si les échantillons correspondent bien à des patients distincts ou s'ils proviennent du même patient prélevé à des temps différents. Le choix de matrice rend également les techniques et les résultats hétérogènes puisque les équipes ont pu travailler sur les urines natives (93,96) ou spécifiquement sur les fractions exosomales (87,97) et cellulaires (98). Ainsi, la robustesse de la méthode de RT-PCR ciblant les miARNs des *Polyomaviridae* et la taille de la population d'étude est primordiale pour déterminer avec fiabilité l'utilisation de cette technique dans les échantillons biologiques de patients transplantés rénaux.

Matrice	Kit d'extraction	Kit de biologie moléculaire	Quantités utilisées	Méthode de quantification	Seuil de détection	Nombre d'échantillons	Nombre de patients	Année	Référence
Plasmas	Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies)	TaqMan miRNA assays	4 µL d'ARN puis 1µL d'ADNc	Gamme de standards dilués dans un plasma de contrôle	1000 copies / réaction	31	? patients virémiques pour BKPyV	2014	(81)
						5	? patients ayant éliminé une virémie à BKPyV		
						10	10 patients n'ayant jamais développé de virémie à BKPyV		
Urines	miRNA isolation kit (Geneaid)	TaqMan microRNA assays (ABI)	ND	Normalisation au petit ARN RNU44	ND	13	6 NBKPyV	2014	(93)
						13	10 transplantés sans PVAN		
Plasmas	mirVana™ PARIS™ RNA (Ambion)	TaqMan microRNA assays (ABI)	10 ng d'ARN, 1,3 µL d'ADNc (PCR en triplicat)	Gamme de standards	ND	50	? patients diagnostiqués ou suivi pour une infection sévère à Polyomavirus	2015	(96)
Urines						67			
Liquide cérébrospinal						3			
Urines (exosomes)	exoRNeasy Serum/Plasma mini kits (QIAGEN)	TaqMan microRNA assays (ABI)	3 µL d'ARN puis 1 µL d'ADNc	Normalisation à un contrôle positif (bkv-miR-B1 ; IDT, Coralville, IA, USA) et un miARN spécifique des exosomes (miR-16)	ND	15	15 non-NBKPyV	2017	(97)
						13	13 NBKPyV		
Plasmas	mirVana™ PARIS™ RNA (Ambion)	TaqMan miRNA assays (ABI)	10 ng d'ARN, 1,3 µL d'ADNc (PCR en triplicat)	Normalisation au cel-miR-39	ND	55	9 patients virémiques (>4 log copies/mL de plasmas) 2 contrôles	2018	(99)
Urines (exosomes)	mirVana miRNA isolation Kit (Ambion)	stem-loop RT-PCR MiRNA assay (Life technologies)	10 ng d'ARN	Gamme de standards (10 ¹ à 10 ⁶ copies)	10 copies/ng ARN soit 100 copies	12	Patients atteints de sclérose en plaque sous natalizumab	2018	(87)
Biopsies rénales	1mm3 de biopsie paraffine extrait avec PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit (Invitrogen)	miRNA Sequencing : TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina) et SuperScript II Reverse Transcriptase puis miScript PCR System (Qiagen)	ND	Normalisation par rapport au petit ARN cellulaire SNORD11	ND	6	6 PVAN	2019	(92)
						5	5 transplantés avec fonction rénale stable		

Plasmas	miRNeasy Serum/plasma kit (QIAGEN)	SuperScript III Reverse Transcriptase (RT) Kit + Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems)	500 ng d'ARN	Gamme de standards (Integrated DNA technologies) : 2.10 ¹ molécules/μL à 2.10 ⁷ molécules/μL	3400 copies/mL	8	BKU+/BKP-	2019	(98)
Urines (cultot cellulaire)	Extraction Trizol (1,5 mL d'urine 15 minutes à 2000 rpm)				50 copies /mL	8	BKU+/BKP+		

Tableau 1: Principales caractéristiques des études utilisant une technique de RT-PCR dirigée contre les miARNs des *Polyomaviridae*, telles que décrites dans les articles. ND : information non disponible. ? : effectif non défini.
PVAN : Polyomavirus-associated nephropathy

5. Hypothèses et objectifs

Ce travail de thèse s'est articulé autour de trois projets de recherche visant à explorer le rôle fonctionnel et l'intérêt en tant que biomarqueurs des miARNs des *Polyomaviridae*. Dans un premier temps, il était important de caractériser la stabilité et la répartition extracellulaires de ces molécules. La connaissance de ces propriétés fondamentales est impérative à une hypothétique application biomédicale et n'avaient pourtant pas été décrites spécifiquement à ce jour. Ensuite, nous avons mis à profit la biobanque d'échantillons cliniques provenant de la cohorte de patients transplantés au CHU Amiens-Picardie pour évaluer rétrospectivement les cinétiques de quantités de miARNs des *Polyomaviridae in vivo*. D'une manière inédite, nous avons utilisé une approche longitudinale pour observer des variations quantitatives au cours du suivi et les comparer à d'autres marqueurs viraux (ADN, ARNm), alors que les précédentes études réalisaient des analyses transversales. Ce versant du travail de thèse a reposé sur une large cohorte d'échantillons d'urines et de plasmas de patients, la plus importante jusqu'alors décrite dans la littérature. Enfin, nous avons mesuré l'effet croisé des miARNs du JCPyV sur la réplication du BKPyV à l'aide un modèle de cellules rénales humaines *in vitro*. Malgré les connaissances établies sur le tropisme tissulaire commun au niveau de l'appareil urinaire et le partage d'un même miARN mature, aucune étude ne s'était intéressée à cette potentielle interaction moléculaire inter-espèce.

a. Stabilité et répartition du bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire

Alors que plusieurs études se sont intéressées à la quantification des miARNs des *Polyomaviridae* dans différentes matrices et avec des méthodes hétérogènes, aucune d'entre elle n'a évalué la stabilité et répartition de ces miARNs spécifiques au niveau extra-cellulaire. Ces données sont indispensables pour garantir une interprétation juste des quantifications réalisées, surtout dans un contexte d'usage des miARNs des *Polyomaviridae* comme biomarqueur clinique. La première partie de ce travail de thèse a donc été d'évaluer la présence du bkv-miR-B1-5p, miARN spécifique du BKPyV, dans les vésicules (dont les exosomes) par rapport au reste du compartiment extra-cellulaire. L'hypothèse était de retrouver le bkv-miR-B1-5p dans les vésicules extracellulaires, comme la littérature le décrit, mais dans des proportions relatives très faibles. L'objectif était également de déterminer si le bkv-miR-B1-5p était lié à Ago2, comme c'est le cas de la majorité des miARNs retrouvés chez les humains, et ainsi transposer les protocoles expérimentaux et les résultats obtenus à d'autres modèles d'étude des miARNs. Enfin, l'étude de la stabilité du bkv-miR-B1-5p, supposée très importante, en fonction de la température de conservation et des cycles de congélation, devait nous permettre de simplifier les protocoles expérimentaux et garantir des résultats fiables en cas d'étude rétrospective d'échantillons cliniques.

b. Cinétiques et intérêt clinique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les transplantés de rein

Lors de la réplication virale du BKPyV chez les patients transplantés de rein, les miARNs du virus sont également excrétés dans les urines. A ce jour, aucune étude n'a évalué l'intérêt spécifique du dosage des bkv-miR-B1-3p et -5p par RT-PCR pour le diagnostic et le pronostic des infections à BKPyV, comparativement à la quantification d'ADN.

L'expression des miARNs est dépendante du NCCR qui régule également la réplication du BKPyV au cours de l'infection chez les transplantés de rein. Les

réarrangements du NCCR favorisent la surexpression des gènes précoces, notamment l'AgT, au détriment de la région tardive comprenant le gène de VP1 et la séquence du transcrit de pre-miARN. L'influence simultanée du NCCR sur le niveau d'expression de l'AgT, VP1 et des miARNs matures a déjà été analysée de manière transversale *in vitro* au cours de l'infection précoce, mais jamais de façon longitudinale pour des infections chroniques sur des échantillons *ex vivo*. Une étude transversale de Addetia *et al.* en 2021 avait mis en évidence une association entre le réarrangement génomique des souches et un ratio d'expression VP1 / AgT faible (100). Un premier travail a donc été réalisé à partir de culots cellulaires d'urines de patients transplantés de rein, souffrant de répllication intense et prolongée de BKPyV. L'hypothèse était de caractériser la variation de niveau d'expression des miARNs du virus en fonction du ratio d'expression des ARNm de VP1 et de l'AgT, reflet du déséquilibre d'expression des gènes précoces et tardifs, et donc des réarrangements du NCCR. Cette étude était également l'occasion d'évaluer la pertinence de la quantification des différents marqueurs (bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p, ARNm VP1 et ARNm AgT) dans les urines de patients infectés par le BKPyV, à partir de culots cellulaires.

La deuxième, et principale, partie de notre étude sur les échantillons cliniques consistait à quantifier de manière longitudinale les miARNs bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p dans les urines des patients transplantés de rein entre juillet 2017 et juillet 2018 au CHU Amiens Picardie. Après avoir mis au point une méthode robuste et standardisée pour la quantification des miARNs des *Polyomaviridae*, nous avons analysé plus de 300 échantillons cliniques, pour 67 patients, ce qui constitue la plus grande cohorte d'échantillons évaluée dans la littérature. Les objectifs étaient :

- Evaluer l'intérêt prédictif du dosage des miARNs du BKPyV vis-à-vis de l'infection au cours du suivi post-transplantation. Compte-tenu de la capacité des miARNs à réguler négativement la répllication virale, nous supposons que la détection de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p serait de bon pronostic et constituerait un facteur protecteur contre les infections graves. A l'inverse,

l'autre hypothèse était une détection plus précoce des miARNs comparativement à l'ADN. Cette hypothèse s'expliquerait par la libération plus rapide des miARNs dans le milieu extracellulaire, par rapport aux virions entiers qui nécessitent plus d'étapes et de maturation intra-cellulaire.

- Evaluer l'intérêt du dosage des miARNs des *Polyomaviridae* dans les urines des transplantés de rein pour le diagnostic non invasif des infections à BKPyV, comparativement à l'ADN qui est actuellement le marqueur de référence. Les miARNs étant plus spécifiques que l'ADN pour témoigner d'une réplication virale, nous supposons retrouver des valeurs prédictives négatives et positives similaires, voire augmentées, quant au diagnostic de l'infection active.
- Evaluer l'intérêt du suivi des taux des miARNs des *Polyomaviridae* dans les urines des transplantés de rein faisant une infection à BKPyV comme marqueur de bon pronostic quant au contrôle de l'infection. La spécificité des miARNs vis-à-vis de la réplication du BKPyV par rapport à l'ADN nous laissait supposer que les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p seraient plus précis pour suivre et prédire l'évolution de l'infection.

c. Fonctionnalité croisée des miARNs du JCPyV dans la réplication du BKPyV

Le BKPyV et le JCPyV présentent des similitudes géniques notamment au niveau des séquences de leurs miARNs matures et de leur tropisme. Ils sont tous deux présents au niveau du tissu rénal et sont retrouvées de manière intermittente dans les urines de patients asymptomatiques. Cependant, alors que le BKPyV et le JCPyV peuvent être retrouvés dans les urines de patients transplantés de rein, l'infection active simultanée des deux virus est rare (101,102). De plus, il a été suggéré que la détection d'ADNurie à JCPyV était un facteur protecteur de complication après transplantation rénale, sans distinction entre les causes immunes, organiques ou infectieuses (103). Puisque les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p ont un effet régulateur

sur la réplication du BKPyV, nous pouvons supposer que le JCPyV peut lui aussi réguler l'infection à BKPyV grâce à ses miARNs matures, essentiellement le jcv-miR-J1-3p qui possède strictement la même séquence que le bkv-miR-B1-3p. La similitude de séquence entre le bkv-miR-B1-5p et le jcv-miR-J1-5p, notamment au niveau de la région charnière pour le clivage de l'ARNm de l'AgT, laisse également supposer un effet du jcv-miR-J1-5p sur la réplication du BKPyV.

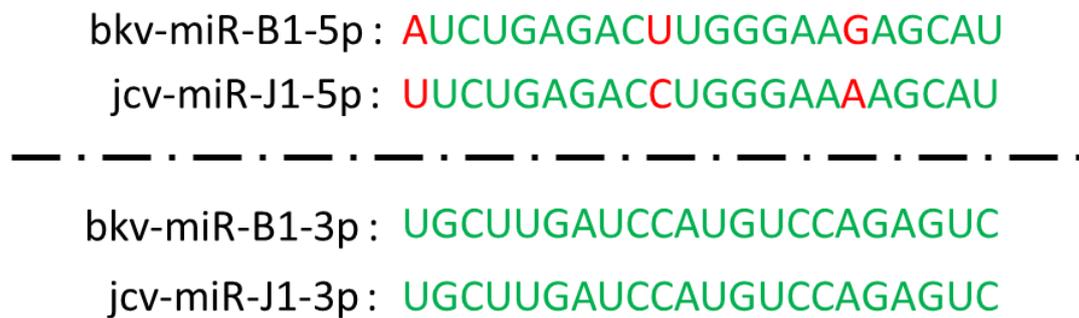


Figure 10: Homologie de séquence entre les miARNs du BKPyV et ceux du JCPyV. Les variations nucléotidiques sont marquées en rouge. Les nucléotides homologues sont marqués en vert.

Une étude épidémiologique de la prévalence des infections à JCPyV et BKPyV a été réalisée localement sur la cohorte de patient transplantés de rein au CHU Amiens-Picardie (article en cours de rédaction). 436 patients receveurs de greffe rénale entre 2013 et 2020 ont été inclus dans cette étude qui a confirmé que les co-réplications JCPyV + BKPyV étaient très peu fréquentes (3,7%) comparativement aux réplifications du JCPyV (16,7%) et du BKPyV (23,6%) isolées.

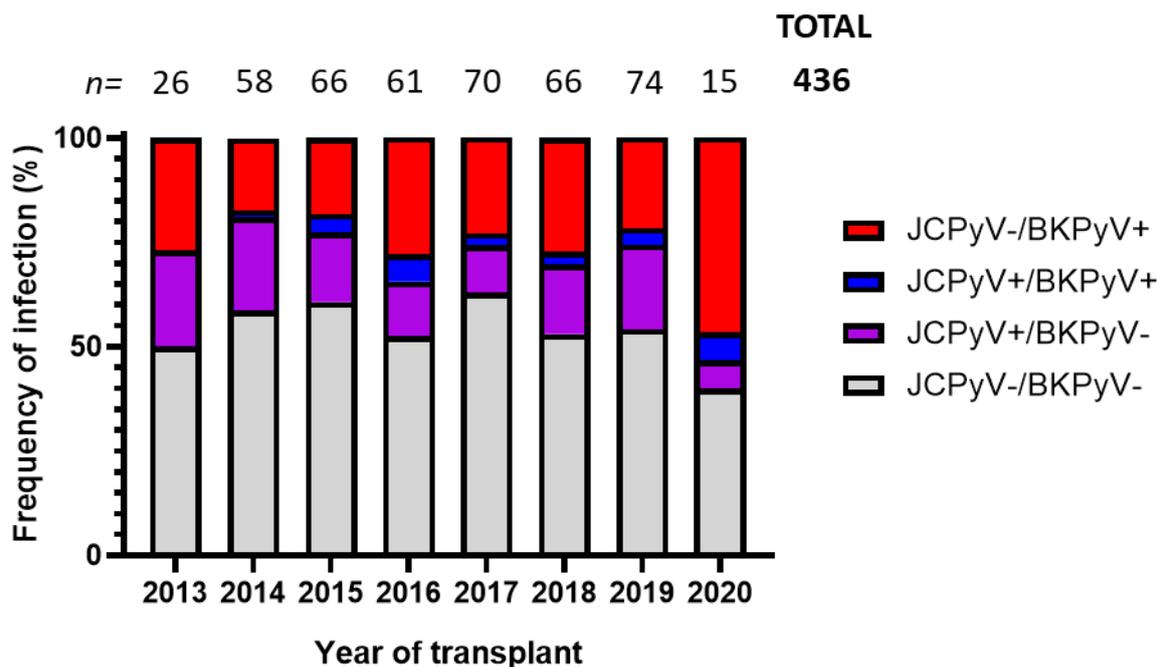


Figure 11: Fréquence de détection de l'ADN du BKPyV et du JCPyV dans les urines des patients transplantés de rein du CHU Amiens-Picardie au cours de la première année post-transplantation.

Les infections à JCPyV étaient significativement moins fréquentes chez les patients infectés par le BKPyV que chez les patients contrôles ($p = 0,03$). De plus, la présence de JCPyV dans les urines des patients était un facteur protecteur de l'infection à BKPyV avec un Odds ratio égal à 0,519 (intervalle de confiance à 95% = 0,292 – 0,942).

A partir de la cohorte et des échantillons d'urine recueillis pour l'évaluation des quantifications de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p chez les transplantés de rein, nous avons également quantifié le jcv-miR-J1-5p. L'objectif principal était de déterminer si la détection précoce du jcv-miR-J1-5p dans les urines était un facteur protecteur de réplication de BKPyV au cours du suivi. L'objectif secondaire était d'analyser l'évolution de la réplication du BKPyV si le jcv-miR-J1-5p était détecté de manière intercurrente.

Enfin, afin d'apporter des preuves de l'efficacité des miARNs du JCPyV sur la régulation de la réplication du BKPyV, nous avons développé un modèle *in vitro* permettant de transfecter des mimics de miARNs puis d'infecter par le BKPyV des

cellules épithéliales rénales proximales tubulaires humaines (HRPTEC). Nous souhaitons évaluer l'effet répresseur du jcv-miR-J1-3p / bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p sur le BKPyV, et de comparer ces effets à ceux du jcv-miR-J1-5p. Cette dernière expérimentation n'a jamais été décrite dans la littérature.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Population d'étude

Les échantillons cliniques utilisés dans les différentes étapes de ce travail proviennent des patients transplantés de rein au CHU d'Amiens entre 2015 et 2021. L'étude a été réalisée avec le consentement informé des patients et a été déposée auprès du Comité de Protection des Personnes du CHU Amiens Picardie et de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL). Le numéro de protocole attribué est le PI2021_843_0012. En fonction des étapes du travail, les populations de patients incluses diffèrent.

a. Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique

La population d'étude est constituée de 59 patients parmi ceux ayant reçu une transplantation de rein entre le 01/01/2017 et le 31/12/2018 au CHU Amiens Picardie.

Les patients retenus dans l'étude répondaient aux critères suivants :

Critères d'inclusion :

- Patients transplantés rénaux avec un suivi virologique régulier au cours de la première année post transplantation
- Patients majeurs

Critères d'exclusion :

- Patients transplantés rénaux avec un retour en dialyse au cours de la première année post-transplantation
- Patient sans suivi virologique au CHU Amiens-Picardie

- Détransplantation lors de la première année
- Décès lors de la première année

Parmi les 59 patients, 28 ont été exclus de l'étude en raison d'un nombre insuffisant de prélèvements et d'un manque de suivi virologique (1 seul prélèvement par patient). 31 patients ont donc été inclus dans cette étude, pour un total de 89 prélèvements d'urine analysés. 8 patients sur les 31 inclus n'ont jamais présenté d'ADN de BKPyV dans les urines prélevées au cours du suivi et ont été considérés comme patients contrôles.

b. Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein

La population d'étude est constituée des 70 patients ayant reçu une transplantation de rein entre le 5/07/2017 et le 5/07/2018 au CHU Amiens Picardie.

Les patients retenus dans l'étude répondaient aux critères suivants :

Critères d'inclusion :

- Patients transplantés rénaux avec un suivi virologique régulier au cours de la première année post transplantation
- Patients majeurs

Critères d'exclusion :

- Patients transplantés rénaux avec un retour en dialyse au cours de la première année post-transplantation
- Patient sans suivi virologique au CHU Amiens-Picardie
- Détransplantation lors de la première année
- Décès lors de la première année

Parmi les 70 patients, 3 patients ont été exclus (un décès, un échec de greffe, un suivi hors centre). Les patients ont bénéficié de recherche de BKPyV dans les urines

et/ou le sang à J0, J15, M1, M2, M3, M6, M9 et M12 post-transplantation. La durée du suivi pour cette étude est de 1 an.

2. Diagnostic des infections à BKPyV et JCPyV

Les échantillons biologiques ont été collectés lors des séjours d'hospitalisation ou des consultations d'hôpital de jour de néphrologie au CHU Amiens Picardie.

Une fois acheminés au Centre de Biologie Humaine, les prélèvements d'urine et de plasma ont été aliquotés et congelés à -80°C avant analyse.

L'extraction d'ADN a été réalisée au moyen du kit « NucliSENS® easyMAG® Extraction » sur l'appareil easyMAG® (bioMérieux, Marcy L'étoile, France). La quantification de l'ADN de BKPyV présent dans les échantillons a ensuite été réalisée avec le kit « RealStar® BKV PCR Kit » (Altona-Diagnostics, Hambourg, Allemagne). Le seuil de détection est de 1 UI/mL. La gamme de quantification s'étend de 2,25 log UI/mL à 11 log UI/mL.

La quantification de l'ADN du JCPyV a été réalisée selon un protocole développé au laboratoire avec les réactifs de PCR Taqman suivants provenant de Applied Biosystems® (Waltham, MA, USA) :
amorce sens
AGAGTGTTGGGATCCTGTGTTTTTC, amorces
antisens
GAGAAGTGGGATGAAGACCTGTTT, la sonde
6-FAM-
TCATCACTGGCAAACATTTCTTCATGGC-TAMRA et le Taqman® Universal
Master Mix. La gamme de quantification a été préparées à partir de plasmide PCR2.1
topoTA contenant la séquence du JCPyV des bases 4212 à 4375. Elle s'étend de 2,42 log
copies/mL à 7,42 log UI/mL. Le thermocycleur utilisé pour les PCRs le ABIPRISM
7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems®).

3. PCR temps réel à partir de cellules infectées

L'ARN cellulaire total a été extrait à l'aide du RNeasy Mini kit et du protocole « Animal tissues and cells » de Qiagen (Venlo, Netherlands), conformément aux

instructions du fabricant. La transcription inverse de l'ARN a été faite à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). L'ADNc a été amplifié classiquement à l'aide du TaqMan Universal Master Mix sur un système de détection de séquence ABI 79000HT (Applied Biosystems®) en utilisant des amorces et des sondes pour VP1, AgT et le gène de référence GAPDH.

L'ADN cellulaire a été extrait à l'aide du QIAmp DNA kit (Qiagen) conformément aux recommandations du fournisseur. L'ADN viral a été amplifié classiquement à l'aide du TaqMan Universal Master Mix sur un système de détection de séquence ABI 79000HT (Applied Biosystems®) en utilisant des amorces et des sondes ciblant une zone à l'interface des gènes de VP1, VP2 et VP3.

L'ADN extracellulaire a été amplifié directement à partir des surnageants de culture chauffés à 95°C et centrifugés. L'amplification et la quantification de la charge virale a été faite classiquement à l'aide du TaqMan Universal Master Mix sur un système de détection de séquence ABI 79000HT (Applied Biosystems®) en utilisant des amorces et des sondes ciblant une zone à l'interface des gènes de VP1, VP2 et VP3.

Les mesures de la PCR en temps réel ont été analysées à l'aide du logiciel SDS 2.4.1 (Applied Biosystems®).

La quantité d'ADN extracellulaire était rapportée à une gamme de calibration pour obtenir des valeurs quantitatives.

Les quantités d'ADN et d'ARN cellulaires mesurées ont été rapportées selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant la GAPDH comme gène de ménage.

4. Quantification des miARNs des *Polyomaviridae*

a. Expérimentations *in vitro* sur cellules, vésicules et surnageants

Les miARNs cellulaires et intra-vésiculaires ont été extraits à partir des culots de centrifugation ou des immuno-précipités. Ceux-ci ont été lysés à l'aide de 700 µL de Qiazol (Qiagen). L'extraction a ensuite été réalisée à partir du kit « miRNEasy mini

kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les extraits ont été conservés à -80°C avant analyse.

Les miARNs provenant de surnageants de culture, de surnageants de centrifugation ou de filtrats ont été extraits à partir de 200 µL de prélèvement. L'extraction a ensuite été réalisée à partir du kit « miRNEasy Advanced Serum/Plasma Kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Les extractions, à partir des différents kits, ont été réalisées sur l'automate Qiacube (Qiagen).

Pour vérifier la qualité de l'extraction et normaliser la quantité de miARNs présente dans l'échantillon initial par rapport à celle mesurée dans l'extrait, une quantité fixe de miARN de contrôle a été ajoutée à chaque prélèvement. Le contrôle utilisé est le cel-miR-39, un miARN de 22 nucléotides, propre à l'espèce parasitaire *Caenorhabditis elegans*. $5,6 \cdot 10^8$ copies de cel-miR-39 ont été ajoutées au moment de la lyse de chaque échantillon. La quantité de cel-miR-39 extraite a été déterminée grâce au kit de RT-PCR « cel-miR-39 TaqMan® MicroRNA Assays » (référence : 00200, Applied Biosystems®). Le résultat obtenu a été comparé à une calibration préparée selon le mode opératoire du « miRNeasy Serum/Plasma Kit » (Qiagen). Pour ce faire, deux gammes de calibration ont été préparées indépendamment : une dont les calibrants étaient dilués dans de l'eau pure RNase-free, l'autre dont les calibrants étaient dilués dans de l'eau RNase-free enrichie avec 20 ng/µL d'ARN. Les PCRs ont été réalisées en duplicat et les moyennes des résultats ont permis la détermination de l'équation de la droite de calibration. Pour chaque extrait, un rendement d'extraction a été calculé selon le rapport « quantité de cel-miR-39 mesurée dans l'extrait / quantité de cel-miR-39 connue ajoutée lors de la lyse ».

Pour les expérimentations basées sur des centrifugations et des purifications successives, 10^{10} copies de cel-miR-39 étaient ajoutées au prélèvement directement avant la première étape de centrifugation. La normalisation des résultats permettait donc de s'affranchir des variations de volumes liées à la succession des étapes analytiques.

b. Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique

Chaque échantillon correspondait à un culot cellulaire à partir de 3,5 mL d'urine fraîche centrifugée à 2000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été éliminé et le culot cellulaire a été lysé dans du tampon RLT (Qiagen). Les lysats ont été conservés à -80°C avant analyse.

L'extraction d'acides nucléiques a été réalisée au moyen du kit « RNEasy Mini kit » de Qiagen sur l'appareil Qiacube® (Qiagen).

La qualité d'extraction et la normalisation des résultats a été réalisée grâce à l'utilisation contrôle cel-miR-39, selon le protocole décrit en partie II.4.a. de ce manuscrit.

Les quantifications des bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p ont été réalisées respectivement à l'aide du kit de RT-PCR « bkv-miR-B1-3p TaqMan® MicroRNA Assays » et « bkv-miR-B1-5p TaqMan® MicroRNA Assays » (références respectives : 006801_mat et 007796_mat, Applied Biosystems®). Le principe du « Taqman® MicroRNA Assays » est de réaliser une première étape de « reverse transcription » (RT) ou transcription inverse spécifique du miARN d'intérêt. L'amorce forme une boucle à l'extrémité du miARN recherché, ce qui permet ensuite une synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'acide nucléique. La deuxième étape est une réaction de PCR spécifique de l'ADNc obtenu. Le principe des 2 étapes est expliqué dans la Figure 12 et la Figure 13.

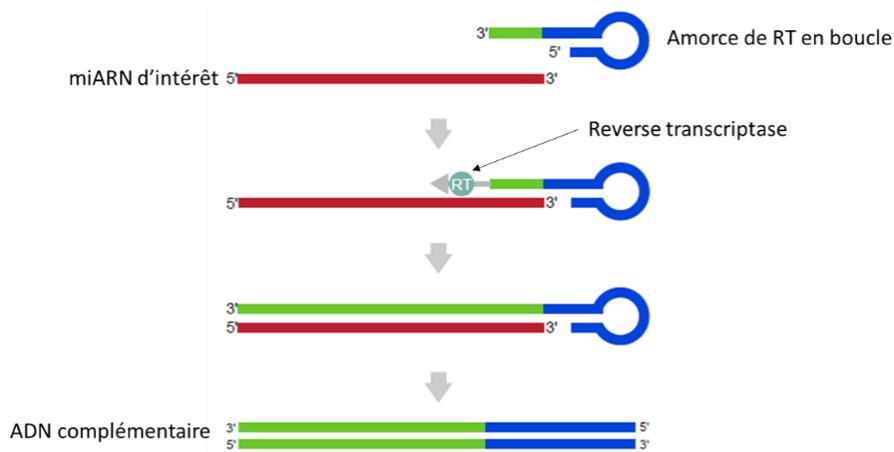


Figure 12 : Principe de la réaction de transcription inverse (RT) du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

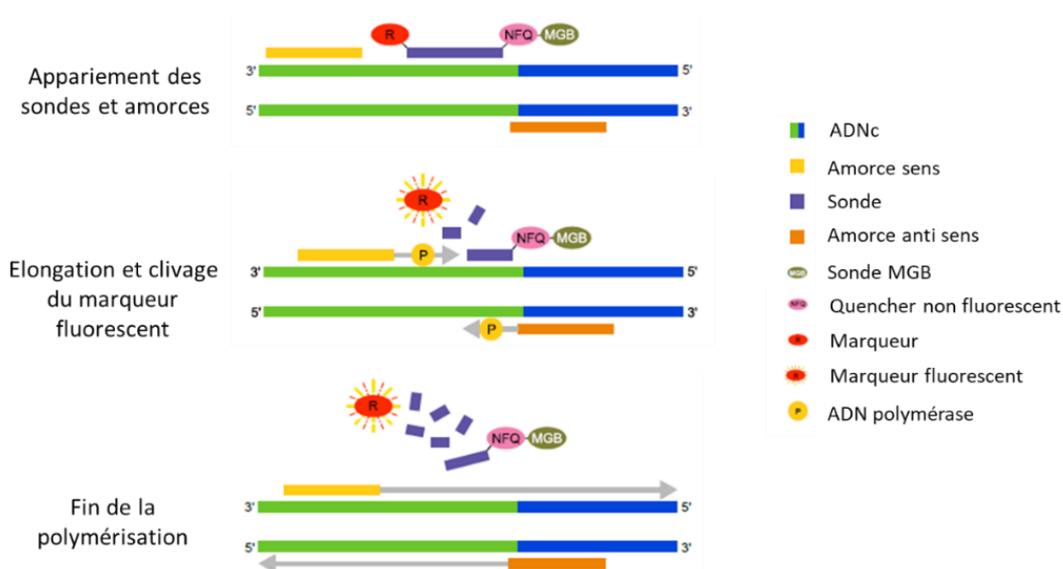


Figure 13: Principe de la réaction de PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

Pour l'étape de RT, le mélange réactionnel était composé comme indiqué dans le Tableau 2 et le protocole utilisé sur le thermocycleur Veriti (Applied Biosystems®) est résumé en Tableau 3.

Réactif	Volume en μL
dNTP	0,15
Multiscribe	1
RT buffer	1,5

RNAse inhibitor	0,19
H2O nuclease free	4,16
Primer	3
Eluât	5
TOTAL	15

Tableau 2 : Mélange réactionnel de l'étape de transcription inverse du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

Etape	Température (°C)	Durée (minutes)
Transcription inverse	16	30
	42	30
Réaction « stop »	85	5
Maintien	4	Jusqu'à l'arrêt de l'appareil

Tableau 3 : Programme du thermocycleur pour la transcription inverse du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

Pour l'étape de PCR, le mélange réactionnel était composé comme indiqué dans le Tableau 4 et le protocole utilisé sur le thermocycleur ABIPRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems®) est résumé en Tableau 5.

Réactif	Volume en µL
Sonde Taqman	1
Master Mix	10
H2o	7
ADNc	2

Tableau 4 : Mélange réactionnel de l'étape de PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

Etape	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme	95	10 minutes	1
Dénaturation	95	15 secondes	40

Appariement et amplification	60	60 secondes	40
------------------------------	----	-------------	----

Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour la PCR du Taqman® MicroRNA Assay (Applied Biosystems®)

Les mesures de la PCR en temps réel ont été analysées à l'aide du logiciel SDS 2.4.1 (Applied Biosystems®).

Pour chaque miARN d'intérêt, le résultat de RT-PCR obtenu a été comparé à une gamme de calibration préparée à partir de miARN de synthèse dit « mimics ». Les mimics de *Polyomaviridae* ont été obtenus chez Applied Biosystems® : bkv-miR-b1-3p (référence : MC14566) et bkv-miR-B1-5p (référence : MC14356). Les mimics de cel-miR-39 ayant servi de contrôle d'extraction et ont permis la calibration de la RT-PCR du cel-miR-39 proviennent également de Applied Biosystems® (référence : MC10956). Le Ct mesuré est alors proportionnel à la quantité de miARN présent dans l'échantillon d'extrait d'ARN. La quantité a ensuite été normalisée au rendement d'extraction du cel-miR-39 calculé pour connaître la quantité de miARN présent dans l'extrait du culot cellulaire obtenu à partir d'un volume défini d'urine (3,5 mL). Puis cette quantité a été transformée pour être exprimée en nombre de copies de miARN par millilitre d'urine. Les kits étant prévus pour permettre un nombre égal de RTs et de PCRs, les PCRs de miARNs n'ont pu être réalisées qu'une seule fois par échantillon (simplicat).

c. Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein

186 urines et 120 plasmas ont été traités lors de cette étude. L'extraction des ARNs, dont les miARNs, contenus dans les échantillons a été réalisée à partir de 400 µL de prélèvement d'urine totale et du kit « miRNeasy Serum/Plasma Kit » (Qiagen). Les extractions ont été réalisées par séries de 12 prélèvements sur l'automate Qiacube (Qiagen) pour obtenir 30 µL d'extrait.

La qualité d'extraction et la normalisation des résultats a été réalisée grâce à l'utilisation contrôlée de cel-miR-39, selon le protocole décrit en partie II.4.a. de ce manuscrit.

Les quantifications des bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p ont été réalisées selon le même protocole que décrit en partie II.4.b.

La quantité de miARN déterminée par RT-PCR temps réel a ensuite été normalisée au rendement d'extraction calculé pour connaître la quantité de miARN présent dans les 400 µL d'urine ou plasma extraits. Puis cette quantité a été transformée pour être exprimée en nombre de copies de miARN par millilitre d'urine ou de plasma. Les kits étant prévus pour permettre un nombre égal de RTs et de PCRs, les PCRs de miARNs n'ont pu être réalisées qu'une seule fois par échantillon.

d. Quantification du jcv-miR-J1-5p chez les patients transplantés de rein

Le jcv-miR-J1-5p a été quantifié sur les mêmes échantillons et extraits que ceux utilisés pour la quantification des miARNs du BKPyV. La quantification du jcv-miR-J1-5p a été réalisée à l'aide du kit de RT-PCR « jcv-miR-J1-5p TaqMan® MicroRNA Assays » (référence : 007464_mat, Applied Biosystems®).

La méthode de RT-PCR et de normalisation des quantités de jcv-miR-J1-5p obtenues était la même que pour le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p.

e. Performances de la RT-PCR vis-à-vis des miARNs de *Polyomaviridae*

Pour la mise au point de la technique de dosage, des solutions de concentration croissante pour chaque miARN de *Polyomaviridae* étudié ont été analysées par RT-PCR en duplicat.

Pour les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p, une amplification était détectée dès 150 copies dans le milieu réactionnel. Les résultats des gammes de calibration (Ct mesuré en fonction de la concentration de la solution de miARN) étaient considérés comme

linéaires pour un coefficient de corrélation de Spearman $r^2 \geq 0,95$. Les courbes de calibration ont été calculées à partir de 5 expériences indépendantes.

Pour le plus petit point de gamme, les Cts moyens étaient respectivement de 33,06 +/- 0,32 et 31,49 +/- 0,68 pour les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p. La limite de quantification théorique était le Ct moyen du dernier point de gamme + 3 écart-types soit 34,03 pour bkv-miR-B1-3p et 35,53 pour bkv-miR-B1-5p. Afin de prendre en compte les recommandations de la littérature et d'harmoniser l'interprétation des résultats, il a été choisi de considérer le résultat des bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p comme négatif si le Ct était supérieur à 35.

A noter que les différents tests de RT-PCR pratiqués ne présentaient pas de réaction croisée entre les miARNs analysés pour cette étude. Les solutions de jcv-miR-J1-5p et bkv-miR-B1-3p n'étaient pas amplifiées par le kit de RT-PCR du bkv-miR-B1-5p. De même, les solutions de jcv-miR-J1-5p et bkv-miR-B1-5p n'étaient pas amplifiées par le kit de RT-PCR du bkv-miR-B1-3p. La réaction à partir d'eau RNase-free était toujours négative avec les kits de RT-PCR des miARNs bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p.

Concernant le kit de RT-PCR du jcv-miR-J1-5p, une amplification aspécifique était retrouvée même avec de l'eau pure RNase-free. Sur 14 réactions témoins, le Ct moyen des blancs était de 34,38 +/- 0,785. La limite de détection est de 32,02 Ct (valeur moyenne du blanc de réaction + 3 écart-types). Les résultats des gammes de calibration étaient linéaires au-delà de 1500 copies dans le milieu réactionnel avec un $r^2 = 0,95$. Le Ct moyen du plus petit point de gamme était 30,66 +/- 1,36 qui garantit une linéarité jusqu'au seuil de 32 Ct. Ainsi, les résultats des RT-PCR jcv-miR-J1-5p ont pu être interprétés en valeurs quantitatives tant que le Ct obtenu était inférieur à 32. En revanche, les résultats avec des Ct > 32 étaient considérés comme des faux positifs de réaction.

5. Cultures cellulaires

La lignée cellulaire Vero dérivée de cellules rénales de singe a été obtenue de l'ATCC (ATCC-CCL-81). La lignée cellulaire HEK-293TT dérivée de cellules embryonnaires rénales humaines, transfectées de façon stable avec le plasmide pTIH contenant l'ADNc codant pour l'AgT du SV40, ont été généreusement fournies par C.B. Buck (104). Les deux lignées ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complété par 10 % de sérum bovin foetal bovin. Les cellules épithéliales des tubules proximaux rénaux humains (HRPTEC), immortalisées par transfection rétrovirale de la protéine pLXSN-hTERT (cellules HRPTEC-hTERT1), ont été obtenues auprès de Evercyte (Leberstraße, Austria; CHT-003-0002) et maintenues dans un milieu de base pour cellules épithéliales rénales (REBM CC-3191, Lonza, Bale, Switzerland) complété par du facteur de croissance épidermique humain, du sérum bovin foetal à 0,5 %, de l'hydrocortisone, de l'épinéphrine, de l'insuline, de la triiodothyronine, de la transferrine et de la GA-1000 (REGM SingleQuots™ Supplement Pack, CC-4127, Lonza). Toutes les cellules ont été cultivées dans un environnement humidifié avec 5% de CO₂ à 37 °C.

6. Stabilité physico-chimique

2 millions de cellules Vero ou HEK-293-TT étaientensemencées en flasque T75 avec 15 mL de milieu puis infectées par un stock de BKPyV Dunlop selon une *Multiplicity Of Infection* (MOI) égale à 1. Cette MOI correspond en moyenne à 1 particule virale inoculée par cellule en culture. Le surnageant était récupéré à t+72h, filtré à 0,22 µm puis conservé 80 jours soit à température ambiante, soit à -20°C. Le tapis cellulaire était lysé par du tampon du tampon RIPA (20 mM HEPES KOH pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 0,1% SDS ; 1% DOC et 1% Triton X-100) puis dilué au 1/10^e dans du PBS. Le lysat cellulaire était ensuite filtré à 0,22 µm puis conservé 80 jours soit à température ambiante, soit à -20°C.

Les urines de patients pour étudier la stabilité étaient conservées à température ambiante et à -20°C pendant 80 jours.

Les aliquots étaient préparés à J0, jour de recueil de l'urine, de manière à avoir deux aliquots distincts à -20°C pour permettre une analyse indépendante de l'effet de la congélation unique et de 5 cycles de congélation-décongélation.

7. Anticorps et réactifs

L'anticorps monoclonal de souris anti-AgT (pAb416) provient de Abcam (Cambridge, UK). Pour les expérimentations d'imagerie immuno-fluorescente et de western blot, l'anticorps (1 µg/mL) était dilué au 1/1000^e. L'anticorps anti- α Actine (référéncé : A5228) utilisé pour les Western blots provient de Sigma (Saint-Louis, MO, USA). L'anticorps anti-IgG (protéine entière) de souris, produit chez le lapin et couplé à la peroxydase, provient de Sigma (référence : A0545). L'anticorps IgG (H+L) anti-souris conjugué au fluorophore Alexa Fluor Plus 488 provient de Thermofisher (référence : A32723). Pour les immunoprécipitations anti-Ago2, l'anticorps monoclonal de rat provenait de chez Millipore (Burlington, MA, USA ; clone 11A9 ; cat. MABE253).

Les mimics utilisés pour les transfections sont les mêmes que ceux utilisés pour les gammes de calibrations de RT-PCR. Ils ont été obtenus chez Applied Biosystems® : bkv-miR-b1-3p (MC14566), bkv-miR-B1-5p (MC14356) et jcv-miR-J1-5p (MC14268).

Le miARN conjugué Cy3 de contrôle de transfection provient de Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA ; référence : 78193).

8. Transfections

Les transfections de mimics et du miARN de contrôle ont été effectués à l'aide du kit Interferin de Ozyme (Saint-Cyr-l'Ecole, France). Les transfections étaient réalisées en plaque 24 puits, contenant chacun 50000 cellules HRPTEC-hTERT1 pour 500 µL de milieu. Les cellules étaientensemencées en fin de journée puis mises dans les

conditions de culture habituelles toute la nuit afin d'obtenir une adhérence complète des cellules. La transfection avait lieu le lendemain matin via un mix composé de 92 μL de REGM, 6 μL de mimic ou du miARN de contrôle à 5 μM , et 2 μL d'Interferin. Le mix était vortexé vigoureusement 10 secondes et incubé à température ambiante 20 minutes. Après ajout du mix de transfection dans la culture cellulaire, la concentration en mimic ou du miARN de contrôle en solution était de 50 nM. L'infection par le BKPyV (MOI = 1) avait lieu 4h après la transfection et le milieu était remplacé par du milieu frais à t+6h. L'expérience était stoppée pour analyse à t+48h, et t+72h pour les essais de cytotoxicité.

9. Immunomarquage

Les cellules étaient lavées par du PBS, fixées avec du paraformaldéhyde 3,7%, et perméabilisée avec du Triton X-100 (0,5% dans du tampon pour cytosquelette : 10 mM PIPES, 300 mM sucrose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA). Les cellules infectées étaient détectées par immunomarquage de l'AgT. Les noyaux étaient marqués par fixation au 4',6-diamidino-2- phénylindole (DAPI). Les cellules immunomarquées étaient observées par lecture au microscope Zeiss Axio Vert.A1 équipé d'une illumination Colibri 7 LED 298 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Les signaux fluorescents ont été acquis grâce à la caméra AxioCam 305 (Zeiss). Le pourcentage de cellules infectées étaient compté de manière automatisée au moyen de la macro QuantIF du logiciel ImageJ (version 1.52e et Java version 8; disponible gratuitement en ligne sur MDPI.com) (105).

10. Viabilité cellulaire

Les cellules transfectées selon les différentes conditions ont été mises en culture pendant 48h et 72h. Le pourcentage de cellules viables a été mesuré par l'utilisation du

test de viabilité CellTiter-glo® (Promega, Madison, WI, USA) comme décrit précédemment (106).

11. Ultracentrifugation & Ultrafiltration

2 millions de cellules Vero étaient ensemencées en flasque T75 avec 15 mL de milieu puis infectées par un stock de BKPyV (MOI = 1). Le surnageant était récupéré à t+72h et 10^{10} copies de cel-miR-39 étaient ajoutées au surnageant pour s'affranchir des variations de volumes liées aux manipulations suivantes et permettre de normaliser les résultats. Le surnageant a subi ensuite une succession de centrifugations différentielles pour éliminer progressivement divers éléments extra-cellulaires et purifier les exosomes selon un protocole précédemment décrit (107) :

- Centrifugation à 1200 g pendant 3 minutes à température ambiante pour éliminer les cellules
- Centrifugation à 14000 g pendant 10 minutes à température ambiante pour éliminer les débris
- Filtration à 0,2 μm pour éliminer les microvésicules
- Ultracentrifugation à 110000 g pendant 2h à 4°C pour éliminer les exosomes. Le surnageant dépourvu d'exosomes était conservé à 4°C avant analyses complémentaires.
- Lavage au PBS de l'ultraculot d'exosomes
- Ultracentrifugation à 110000 g pendant 2h à 4°C du mélange exosomes impures – PBS pour éliminer les traces d'impuretés. Le surnageant d'ultracentrifugation était éliminé. L'ultraculot d'exosomes pur était conservé à -80°C dans du Qiazol (Qiagen) pour la quantification de miARNs.

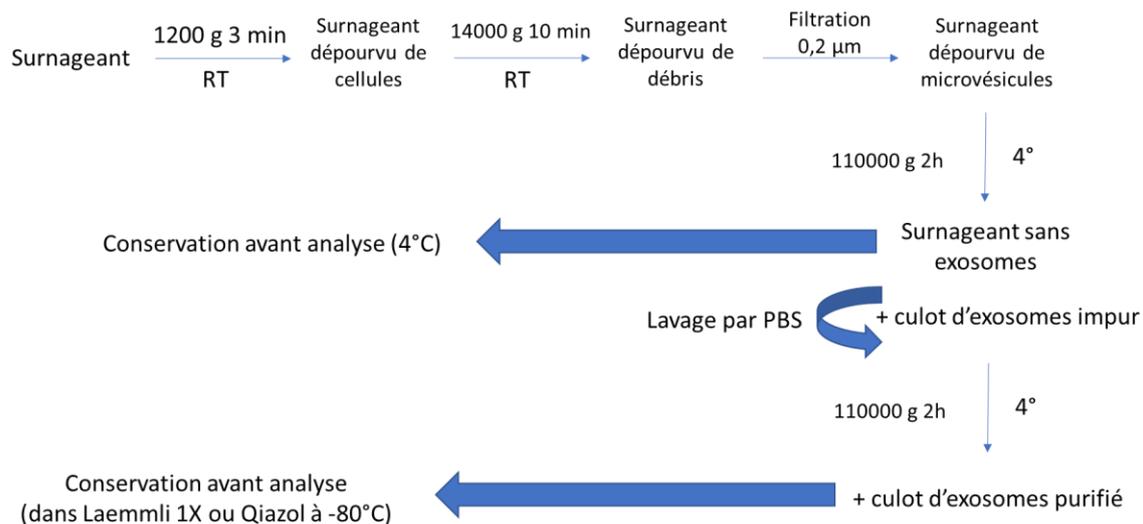


Figure 14: Protocole de purification d'exosomes par ultracentrifugation différentielle (107)

Les ultrafiltrations ont été réalisées à partir des surnageants de cellules infectées, des surnageants de centrifugation, ou d'urines de patients. Les cartouches utilisées pour les filtrations étaient les Vivaspin 20 (Sartorius, Göttingen, Allemagne) avec membrane de polyéthersulfone de porosité 10 000 MWCO, 50 000 MWCO ou 300 000 MWCO (Molecular weight cutoff (seuil de poids moléculaire)). L'ultrafiltration était réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les réténats correspondaient à une concentration par un facteur 30 des solutions de départ. Les filtrats et réténats étaient conservés à 4°C si les expériences secondaires avaient lieu moins de 24h après l'ultrafiltration. Dans le cas contraire, les échantillons étaient conservés à -80°C.

12. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation des miARNs extracellulaires avec l'anticorps anti-Ago2 a été réalisée à l'aide du kit μ MACS™ Protein G MicroBeads de Miltenyi (Bergisch Gladbach, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons traités étaient des réténats 30X d'ultrafiltration 10 000 MWCO de surnageant de culture de cellules Vero infectées par le BKPyV. L'efficacité maximale pour l'immunoprécipitation a été obtenue pour 50 μ L d'échantillon mis en contact avec 2

μg d'anticorps anti-Ago2. Les immunoprécipités étaient récupérés par application de 700 μL de Qiazol (Qiagen) directement sur la colonne et les miARNs étaient extraits comme décrit précédemment.

13. Immunocapture d'exosomes

L'immunocapture des exosomes extracellulaires a été réalisée à l'aide du kit $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$ Pan, human Exosome Isolation de Miltenyi selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons traités étaient des rétentats 30X d'ultrafiltration 10 000 MWCO de surnageant de culture de cellules Vero infectées par le BKPyV, ou d'urine de patient. Les fractions d'exosomes capturés étaient récupérées par application de 700 μL de Qiazol (Qiagen) directement sur la colonne et les miARNs étaient extraits comme décrit précédemment.

14. Analyse Western-Blot

Les rétentats et culots collectés après ultrafiltration ou centrifugation étaient dissous volume à volume dans du tampon Laemmli 2X (S3401 ; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Pour les extraits protéiques cellulaires, les cellules étaient d'abord lysés à t+48h dans du tampon RIPA (20 mM HEPES KOH pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 0,1% SDS ; 1% DOC et 1% Triton X-100). Les lysats étaient ensuite mélangés volume à volume dans le tampon Laemmli 2X (S3401 ; Sigma). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE 12,5 % et transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Après blocage de la membrane par une solution de lait 5%, l'incubation avec l'anticorps primaire était réalisée toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Après triple lavage de la membrane par du PBS Tween 0,1% pendant 5 minutes, l'anticorps secondaire était incubé 1h à température ambiante sous agitation douce. Les anticorps primaires étaient dilués dans du PBS contenant 0,1% de Tween, 5% d'albumine de sérum de bœuf et 0,05% d'azide. Les anticorps primaires étaient dilués dans du PBS contenant 0,1% de Tween et 5% de lait. La membrane était à nouveau

lavée 3 fois par du PBS Tween 0,1% pendant 5 minutes avant révélation. Les protéines d'intérêt ont été identifiées à l'aide du substrat chimioluminescent SuperSignal™ West Pico PLUS (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

15. Statistiques

Les statistiques et figures des résultats ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 8 pour Windows 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Le test de Pearson a été utilisé pour étudier les corrélations. Pour comparer les moyennes, le test de Student était pratiqué si les distributions des valeurs le permettaient. Le test apparié de Student a été utilisé lorsque les mesures étaient elles-mêmes appariées et remplissait les conditions de validité du test. Si la distribution des valeurs ne suivait pas la loi Normale, les tests non paramétriques de Kuskall-Wallis ou Mann Whitney étaient utilisés. Le test de Wilcoxon a été réalisé pour les comparaisons de valeurs appariées. Les aires sous les courbes ROC ont été calculées selon la méthode de Wilson/Brown. Les fréquences d'évènements entre différents groupes étaient comparées à l'aide du test d'exactitude de Fisher. L'ensemble des variables dont la valeur de p était inférieure ou égale à 0,05 ont été considérées comme significatives pour l'ensemble des tests réalisés.

III. RESULTATS

1. Stabilité et répartition du bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Molecular Sciences* en juin 2022 (108).



Article

BK Polyomavirus bkv-miR-B1-5p: A Stable Micro-RNA to Monitor Active Viral Replication after Kidney Transplantation

Baptiste Demey ^{1,2,*}, Marine Bentz ², Véronique Descamps ^{1,2}, Virginie Morel ^{1,2}, Catherine Francois ^{1,2}, Sandrine Castelain ^{1,2}, Francois Helle ² and Etienne Brochot ^{1,2,*}

¹ Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-80000 Amiens, France;

descamps.veronique@chu-amiens.fr (V.D.); morel.virginie@chu-amiens.fr (V.M.); francois.catherine@chu-amiens.fr (C.F.); castelain.sandrine@chu-amiens.fr (S.C.)

² UR UPJV 4294, Agents Infectieux, Résistance et Chimiothérapie (AGIR), Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, F-80000 Amiens, France; marine.bentz@u-picardie.fr (M.B.); francois.helle@u-picardie.fr (F.H.)

* Correspondence: demey.baptiste@u-picardie.fr (B.D.); etienne.brochot@u-picardie.fr (E.B.); Tel.: +33-322087065 (B.D.)

Abstract: Background: Bkv-miR-B1-5p is a viral micro-RNA (miRNA) specifically produced during BK polyomavirus (BKPyV) replication. Recent studies have suggested using bkv-miR-B1-5p as a biomarker to monitor viral infection and predict complications in kidney transplant patients. To identify the technical limitations of this miRNA quantification in biological samples, knowledge of its stability and distribution in the extracellular compartment is necessary. Moreover, a proof of concept for using bkv-miR-B1-5p as a biomarker of active replication in chronic infection is still missing in the published literature. Methods: The stability of bkv-miR-B1-5p was evaluated in samples derived from cell cultures and in urine from BKPyV-infected kidney transplant recipients. The miRNA was quantified in different fractions of the extracellular compartment, including exosomes, and protein binding was evaluated. Finally, we developed an in vitro model for chronic culture of BKPyV clinical isolates to observe changes in the bkv-miR-B1-5p level during persistent infections. Results: Bkv-miR-B1-5p is a stable biomarker in samples from humans and in vitro experiments. Marginally associated with the exosomes, most of the circulating bkv-miR-B1-5p is bound to proteins, especially Ago2, so the miRNA quantification does not require specific exosome isolation. The bkv-miR-B1-5p level is predictable of viral infectivity, which makes it a potential specific biomarker of active BKPyV replication after kidney transplantation.

Keywords: BKPyV; kidney transplantation; micro-RNA; miRNA; BK polyomavirus; biomarker; stability; exosomes

Citation: Demey, B.; Bentz, M.; Descamps, V.; Morel, V.; Francois, C.; Castelain, S.; Helle, F.; Brochot, E. BK Polyomavirus bkv-miR-B1-5p: A Stable Micro-RNA to Monitor Active Viral Replication after Kidney Transplantation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7240. <https://doi.org/10.3390/ijms23137240>

Academic Editor: Cheng-Hsu Chen

Received: 10 June 2022

Accepted: 28 June 2022

Published: 29 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The BK Polyomavirus (BKPyV), a member of the *Polyomaviridae* family, is a common virus in the general population [1]. BKPyV infectious viral particles are non-enveloped, with a diameter of ~45 nm. The capsid which encloses the genome is mainly composed of pentamers of viral protein VP1 associated with viral proteins VP2 and VP3 in the inner part. Genetic variation of the VP1 sequence divides BKPyV into four major subtypes (I, II, III and IV). Subtype I, the most prevalent, is distributed worldwide, whereas the others are less frequently found, with geographic heterogeneity [2]. The seroprevalence of this strictly human virus is close to 100% at the age of 10 years and then decreases to 70–80% in the elderly [3]. The primary infection is known to occur in childhood, causing mild symptoms or no symptoms at all. Then, a slight infection persists in various tissues and cells for which the virions have high tropism, especially in the urinary tract. In the immu-

nocompetent population, this life-long infection is harmless and simply marked by periodical shedding in urine [2]. In contrast, in immunocompromised patients, the viral replication can go haywire, leading to significant clinical outcomes. Hemorrhagic cystitis is the main manifestation in hematopoietic stem cell recipients or patients under chemotherapy such as cyclophosphamide [4]. An intense replication in kidney transplant recipients (KTRs) affects the graft integrity, causing decreased renal function [5]. The final stage of the disease is BKPyV nephropathy (BKPyVN), which leads to graft loss [6].

To date, there is no specific approved therapy to prevent or treat BKPyV infection [7]. Fluoroquinolones, in particular ciprofloxacin, have been evaluated for prophylaxis but the clinical benefit was not sufficient [8,9]. Intravenous immunoglobulin solutions, which contain BKPyV neutralizing antibodies, have not shown a clear efficiency for prevention or treatment of BKPyV infection [10]. Cidofovir and leflunomide, despite numerous studies, did not prove clinical improvement and caused side effects (nephrotoxicity, hepatotoxicity, myelotoxicity) [11–13]. The only form of therapeutic management is the lightening of the immunosuppressive regimen, at the risk of promoting immunological complications [14–16].

Worldwide, almost 79,000 patients received a kidney transplant in 2020 [17]. Up to 40% of KTRs are concerned by BKPyV outcomes, but typical signs of infection are absent or discrete at first [18]. Given that the risk factors are not clearly defined [19], preemptive monitoring of the BKPyV replication is recommended in all KTRs [18]. BKPyV DNA quantification in urine and plasma has become the gold standard diagnostic strategy. In fact, this BKPyV periodic screening method statistically reduced the BKPyVN prevalence in studied populations [20]. Retrospective analyses showed that a BKPyV DNAuria superior to 10^7 IU/mL can predict DNAemia [21]. Moreover, there is an important risk of BKPyVN if DNAemia exceeds 10^4 IU/mL [18]. The immunosuppressive regimen should be reduced once the BKPyV replication is diagnosed, but actual recommendations do not define criteria to reset to normal doses. As BKPyV DNA can be detected for months in urine and plasma, we lack a specific marker that would indicate the cessation of active viral replication and a return to a persistent status. If so, nephrologists would be able to adapt the therapeutics as soon as possible and thus limit the risk of immunological complications such as acute rejection.

BKPyV is a virus with circular double-stranded DNA that replicates in two directions from a unique origin inserted in the non-coding control region (NCCR) [2]. The viral genome encodes sequentially for early proteins that initiate viral replication, then for late proteins implicated in the structural assembly of virions. Early genes encode for the large T, small T, and truncated T antigens (TAg, tAg, and truncTAg, respectively). Late genes encode for the VP1, VP2, VP3, and Agno proteins. Transcription in the direction of late genes is also responsible for the generation of a pre-miRNA whose sequence is perfectly complementary to the TAg sequence [22]. Recently, it was shown that the RNA polymerase II could circle the genome multiple times, producing transcripts with tandem repeats of BKPyV sequences [23,24]. This phenomenon places the pre-miRNA sequence in a genome-sized intron and promotes a higher miRNA expression level. A typical mechanism of maturation involving Dicer and Drosha activity leads to the generation of two mature miRNAs: bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p. The bkv-miR-B1-3p sequence is identical to the JC polyomavirus (JCPyV) 3p miRNA, but the bkv-miR-B1-5p is specific to the BKPyV, with a highly conserved sequence [25,26]. It was shown that bkv-miR-B1-3p is more expressed than bkv-miR-B1-5p during BKPyV infection [27].

Since bkv-miR-B1-5p is specific to the BKPyV and only produced during active replication of the viral genome, its suitability as a novel biomarker for monitoring BKPyV infection can be evaluated. We previously hypothesized that bkv-miR-B1-5p quantification of KTRs in urine would be a relevant non-invasive strategy to monitor BKPyV replication once infection is diagnosed using DNA quantification [28]. However, the sensitivity of the method is still limited and knowledge of bkv-miR-B1-5p properties in extracellular environments is required to improve the assays and to better interpret the results. Many

studies have focused on BKPyV miRNA detection in urine, plasma, or cerebrospinal fluid [29–31]. The strategies for the purification of miRNAs were heterogeneous, with some authors preferring extraction of the exosomal fraction while others chose to analyze untreated total samples. Furthermore, most of the articles about BKPyV miRNAs are based on retrospective experiments using samples that were frozen for a long time. Nevertheless, none of the studies assessed the stability of BKPyV miRNAs following freezing or the room temperature conservation of the samples. In addition, we know neither the part of exosomal bkv-miR-B1-5p nor the degree of protein binding for the remaining part. Generally, a small quantity of miRNA is included in exosomes, especially those produced from viral genomes [32,33]. Most of the circulating miRNAs are usually bound to the Argonaute protein family, whose most dominant member is Argonaute2 (Ago2), in order to confer great extracellular stability [34–37]. These characteristics have never been experimentally demonstrated for bkv-miR-B1-5p.

In the present study, we evaluated the stability of bkv-miR-B1-5p after freezing or room temperature storage, in infected cultured cells and fresh urine of KTRs suffering from BKPyV active replication. We analyzed the part of circulating bkv-miR-B1-5p that is contained in exosomes and bound to the Ago2 protein to define which strategy would be better for bkv-miR-B1-5p purification from biological fluids. Finally, using an *in vitro* model of renal proximal tubular epithelial human cell infection with BKPyV clinical isolates, we showed that bkv-miR-B1-5p levels are related to the replication intensity.

2. Results

2.1. Stability of *In Vitro* Generated bkv-miR-B1-5p

The release of bkv-miR-B1-5p in conditioned media from cell culture infected by the Dunlop BKPyV strain [38], the most commonly used strain for *in vitro* studies, could involve several mechanisms. We supposed that the two main ways for bkv-miR-B1-5p to exit the cell were inclusion in exosomes or discharge after cell lysis caused by BKPyV infection. Depending on the process, the extracellular stability of the miRNA could be altered as lytic infection could imply more protein binding and higher stability, whereas passive excretion through exosomes could reduce the bkv-miR-B1-5p stability because of the limited exosome lifetime.

First, monkey-derived Vero cells and human embryonic kidney HEK-293TT cells were infected with BKPyV. Three days later, conditioned media were collected and bkv-miR-B1-5p was quantified either in untreated media or after five freeze–thaw cycles from $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to room temperature. For both cell lines, the bkv-miR-B1-5p level did not differ after freeze–thaw cycles compared to untreated samples (Figure 1a). The bkv-miR-B1-5p level in conditioned media from Vero cells was higher than that from HEK-293TT cells. Thus, this result confirms that there was no bias in bkv-miR-B1-5p quantification in the retrospective study, even if the templates were thawed multiple times.

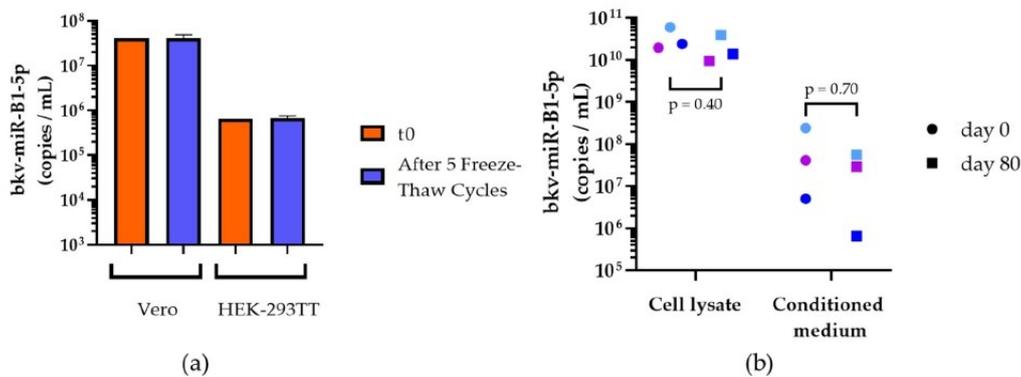


Figure 1. Bkv-miR-B1-5p quantification in samples from in vitro models. (a) bkv-miR-B1-5p level in conditioned medium from Vero cells (left) or HEK-293TT cells (right) at the time of collection (orange) or after five freeze–thaw cycles (blue). Colored bars represent mean, and error bars represent the standard deviation of three independent experiments; (b) bkv-miR-B1-5p level in cell lysate (left) and conditioned medium (right) from Vero cells infected with BKPyV. Dots correspond to the initial quantities and squares correspond to the quantities measured after 80 days storage at room temperature. Pairs of samples are color matched. p values were obtained by a Mann–Whitney test.

Then, we compared the degradation of bkv-miR-B1-5p in the conditioned medium and lysate of Vero infected cells when the samples were kept for 80 days at room temperature, compared to quantities at the time of collection. A previous article on cellular human miRNA showed that it was stable for 60 days in lysed cell solution while the miRNA level decreased, importantly, if the conditioned medium was kept this long at room temperature. Interestingly, we highlighted an equivalent bkv-miR-B1-5p stability at day 80 in the conditioned medium and in the cell lysate of infected Vero cells, as shown in Figure 1b. In fact, 80-day room temperature conservation had no statistically significant effect on bkv-miR-B1-5p measures in the cell lysate or the conditioned medium ($p = 0.40$ and $p = 0.7025$, respectively, with the Mann–Whitney test). Moreover, the bkv-miR-B1-5p level was much higher in cell lysate as compared to conditioned media. Taken together, this suggests that BKPyV miRNAs are highly stable in extracellular media and cell lysate even after prolonged storage at room temperature. Contrary to previous studies on cellular miRNA stability [34], we showed that bkv-miR-B1-5p remained measurable without significant changes after extreme storage conditions, probably because of the cytopathic effect of the infection exacerbating lytic release of miRNAs.

2.2. Stability of bkv-miR-B1-5p in Human Urine

As bkv-miR-B1-5p has the potential to expand the diversity of BKPyV biomarkers in clinical practice, the medical community needs to evaluate the accuracy of the assays and their impact on therapeutic management. The first step would be retrospective analysis of a large cohort of patients. Hence, knowledge about bkv-miR-B1-5p stability in human samples is crucial. Five fresh urine samples from distinct patients with a diagnosed BKPyV infection were collected. Biological and clinical information about the patients are described in Table S1. The bkv-miR-B1-5p level was measured at day 0 in untreated urine. An aliquot was set aside at room temperature for 80 days. Another aliquot was frozen and conserved at -20 °C for 80 days. At day 80, bkv-miR-B1-5p was quantified in the room temperature urine and in the -20 °C urine, after 5 freeze–thaw cycles. As shown in Figure 2, bkv-miR-B1-5p was still detectable with similar levels between day 0 and after the freeze–thaw cycles for all the patients. The change in miRNA load was always less than 1 log copies/mL and a decrease of more than 0.5 log/mL was only observed for patients #1

and #2 (-0.87 and -0.63 log/mL, respectively). According to our *in vitro* results, bkv-miR-B1-5p was still highly detectable in urine from patients #1, #2, and #3 after 80 days at room temperature. Nevertheless, bkv-miR-B1-5p was not quantifiable in urine anymore from patients #4 and #5 without knowing if it was due to a degradation of the molecules or to the sensitivity limit of the assay. Overall, the Mann–Whitney test did not reveal significant differences between the bkv-miR-B1-5p level at day 0 and after five freeze–thaw cycles ($p = 0.841$), or after 80 days of room temperature storage ($p = 0.097$). Therefore, bkv-miR-B1-5p appears to be a relevant non-invasive biomarker with high stability in frozen human urine, but the level measures must be carefully interpreted if the samples are not properly conserved.

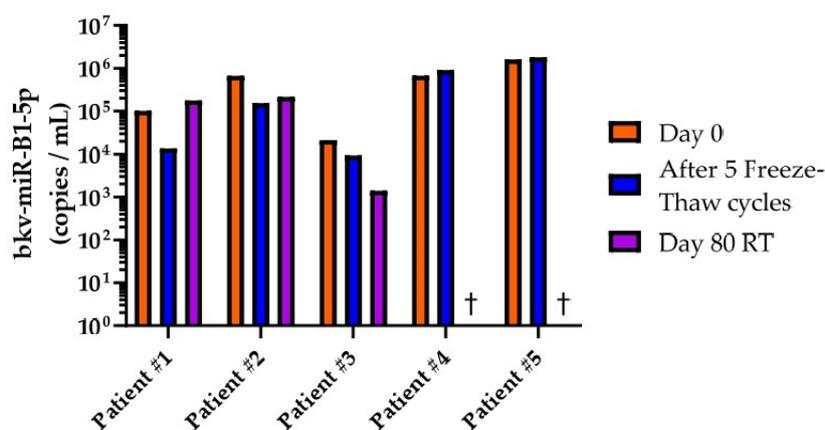


Figure 2. bkv-miR-B1-5p levels in urine from patients diagnosed with a BKPyV infection. The measurements were performed at day 0 (orange bars), after five freeze–thaw cycles following 80 days of -20 °C conservation (blue bars), or after 80 days of room temperature (RT) conservation (purple bars). †: zero value. The five experiments were independently performed between March 2021 and December 2021.

2.3. Part of Exosomal bkv-miR-B1-5p in Extracellular Compartment

Now that the stability of bkv-miR-B1-5p in the extracellular medium was described, we sought to evaluate the proportion of viral miRNA contained in exosomes compared to the rest of the extracellular compartment in order to optimize the purification strategy. Thus, conditioned medium was collected from Vero cells infected with BKPyV (Multiplicity Of Infection: MOI = 1). The liquid was processed by a typical differential centrifugation method to purify exosomes [34]. The bkv-miR-B1-5p level did not decrease after centrifugation at $10,000\times g$ for 10 min and subsequent filtration through $0.22\ \mu\text{m}$ filters (data not shown). These results are in favor of an absence of association of the miRNA with cellular debris and microvesicles. Ultracentrifuging the samples at $100,000\times g$ for 2 h permitted the collection of an exosome-free supernatant. The ultracentrifugation pellet was then washed carefully with PBS and the solution was centrifuged at $100,000\times g$ for 2 h again. The resulting pellet was lysed in Qiazol and the total amount of bkv-miR-B1-5p contained in the exosomes was quantified. There was no statistically significant change in the bkv-miR-B1-5p total amount of the ultracentrifugation supernatant compared to the initial conditioned medium ($p = 0.643$, Figure 3a). In contrast, the mean exosomal fraction of bkv-miR-B1-5p was $2.97\ \log_{10}$ less important than in the total conditioned medium ($p = 0.0497$). This first experiment thus highlighted that only 1% of extracellular bkv-miR-B1-5p is included in exosomes.

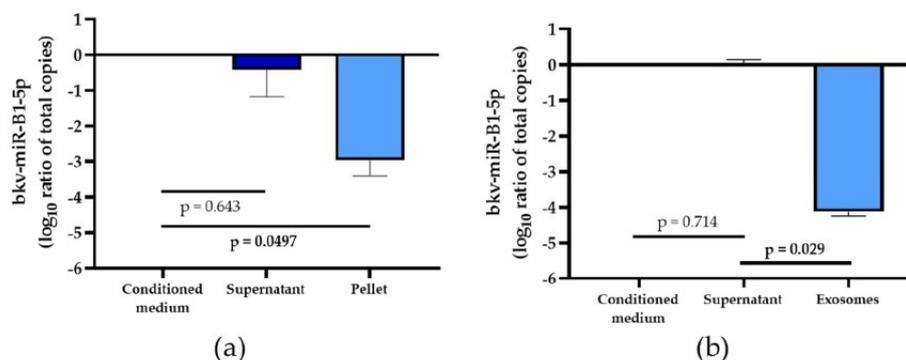


Figure 3. Log10 ratio of total bkv-miR-B1-5p amounts in the extracellular environment of BKPyV-infected Vero cells. Colored bars represent mean, and error bars represent the standard deviation of 3 independent experiments. *p* values were obtained by a Mann–Whitney test for both (a) and (b) experiments. (a) Log10 ratio of total bkv-miR-B1-5p amount in conditioned medium, supernatant and pellet resulting from a 100,000× *g* ultracentrifugation for 2 h at 4 °C; (b) Log10 ratio of total bkv-miR-B1-5p amount in conditioned medium, supernatant and exosome eluate resulting from μMACS Exosome Isolation Kit Pan, human (Miltenyi®).

To further explore this repartition, we used a specific exosome isolation assay based on immunocapture technology in order to isolate the exosomes from a 30X concentrate after 10 kDa molecular weight cutoff (MWCO) ultrafiltration of the conditioned medium. Like the previous observations, we observed a very low proportion of extracellular bkv-miR-B1-5p in exosomes (Figure 3b). In fact, we observed a 4.14 log10 difference in the quantity of this specific BKPyV miRNA in the exosome eluate as compared to the total amount of bkv-miR-B1-5p in the remaining supernatant, which was statistically significant ($p = 0.029$).

These results prove that only a few bkv-miR-B1-5p are found in exosomes and suggest that bkv-miR-B1-5p must be searched in total native samples for higher testing sensitivity, if the exosomal fraction is not specifically targeted.

2.4. Association of bkv-miR-B1-5p with Ago2 Protein

As we showed that most of bkv-miR-B1-5p circulates in the extracellular environment independently of exosomes, the stabilization of the miRNA outside the cell remained unclear. Ago2, a 96 kDa protein, is known to carry circulating miRNA in mammalian extracellular compartments to protect them from nuclease digestion [34,37]. To explore the significance of this phenomenon for bkv-miR-B1-5p, we processed the conditioned medium from BKPyV-infected Vero cells through 100,000× *g* ultracentrifugation and then a sequential ultrafiltration procedure (Figure 4a,b). The supernatant from 100,000× *g* centrifugation of conditioned medium was filtrated through a 300 kDa MWCO membrane. The resulting filtrate was then filtrated through a 50 kDa MWCO membrane. No statistically significant change in the bkv-miR-B1-5p level was observed in the 300 kDa MWCO filtrate compared to the initial conditioned medium. In contrast, we highlighted a 2.76 ± 0.91 log10 copies/mL significant decrease of bkv-miR-B1-5p concentration in 50 kDa MWCO filtrate ($p < 0.01$). This suggests that most of the circulating bkv-miR-B1-5p is associated with proteins of molecular weight between 300 and 50 kDa, which is consistent with binding to Ago2. Hence, we performed immunoprecipitation for Ago2 and then quantified bkv-miR-B1-5p in anti-Ago2 and control immunoprecipitates and supernatants (Figure 4c). In comparison to controls (immunoprecipitation process without anti-Ago2 antibodies), the mean bkv-miR-B1-5p level was reduced by 30.3% in the supernatant

($p < 0.05$) and increased by 31.8% in the immunoprecipitate ($p < 0.05$). Overall, these results indicate that most of the extracellular bkv-miR-B1-5p is associated with proteins of molecular weight between 300 and 50 kDa, with an important proportion bound to Ago2.

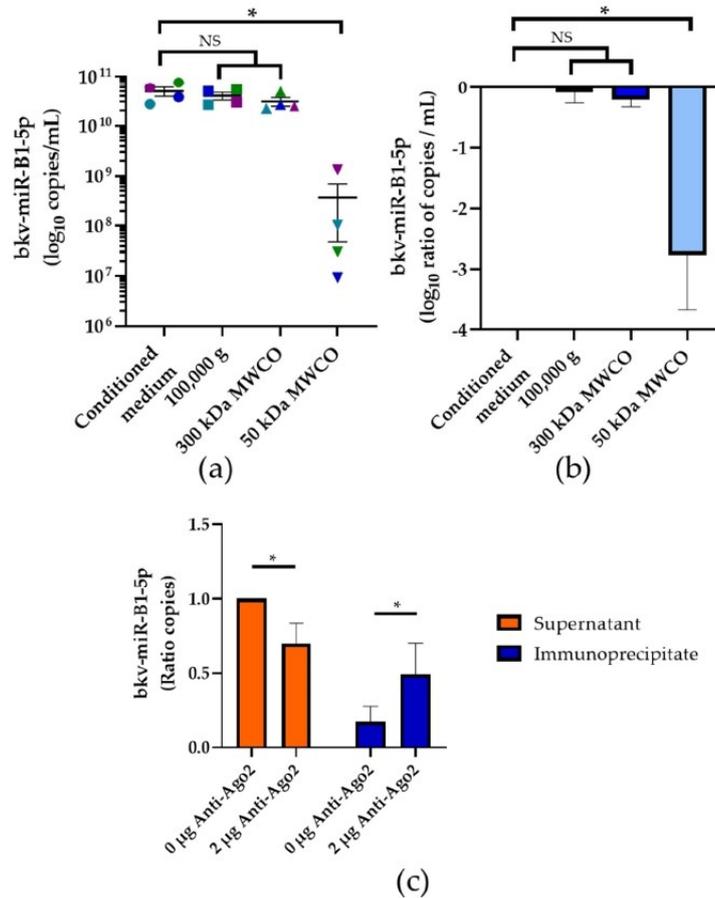


Figure 4. bkv-miR-B1-5p level (a) and log₁₀ ratio (b) in conditioned medium from BKPvV-infected Vero cells, supernatants obtained after centrifugation at 100,000× g for 2 h at 4 °C, and filtrates obtained after filtration through 300 kDa and 50 kDa MWCO membranes. Lines (a) and colored bars (b) represent mean, and error bars represent the standard deviation of four independent experiments. Paired samples are color-matched; (c) Ratio of bkv-miR-B1-5p amount in anti-Ago2 and control supernatant (orange) and immunoprecipitate (blue). Colored bars represent mean and error bars represent the standard deviation of 4 independent experiments. Pairs of samples are color-matched. p values were obtained by a Mann-Whitney test (*: $p < 0.05$).

2.5. bkv-miR-B1-5p to Distinguish Active and Persistent Infections

We have shown recently that the dynamic of bkv-miR-B1-5p level in urine from KTRs is different from the changes in BKPvV DNAuria load during chronic infection [28]. Viral DNA can be detected in the presence of defective viral genomes or neutralized virions [39]. Hence, it was supposed that bkv-miR-B1-5p, specifically transcribed during viral replication, would be a biomarker candidate to distinguish active and persistent infections.

We thus aimed to develop a model to explore and confirm this phenomenon. Trying to reproduce the chronic infection in vivo, we screened 68 urine samples from KTRs, with highly detectable BKPyV DNA, to infect human renal proximal tubular epithelial cells (HRPTEC) based on a model for in vitro BKPyV propagation [40]. The cells were kept in culture for up to 77 days post-infection (DPI) with clinical isolates (CI). The culture medium was collected and changed every week. The efficiency of infection was monitored by qPCR for BKPyV DNA in the collected culture supernatant within the first four weeks of chronic culture. Four cell cultures were still positive for BKPyV DNA after 28 DPI and were kept for a longer time (77 DPI) while the others were stopped. We used the conditioned media collected at different time points of the 77-day-long chronic cultures to infect naïve HRPTEC. TAg immunostaining was performed at 7 DPI and the infectivity rate, representative of the active replication of BKPyV strains derived from CI, was measured (Figure 5a). TAg was significantly revealed only in cells infected with CI2 and CI4 supernatants. Moreover, the TAg expression was not observed with the infection by conditioned media collected before 28 DPI for CI2 and 56 DPI for CI4. To check if the infectivity of the samples was correlated with bkv-miR-B1-5p expression, we measured the concentration of bkv-miR-B1-5p in the conditioned medium from the four cultures chronically infected by CI (Figure 5b). For CI2 and CI4, the bkv-miR-B1-5p level was always higher than CI1 and CI3. The peak bkv-miR-B1-5p level for CI2 was observed at 28 DPI. It was higher and observed sooner than for CI4, the maximum of which was reached at 77 DPI. The kinetic of the bkv-miR-B1-5p level in conditioned medium was thus in line with the dynamic of the infectivity rate. The highest bkv-miR-B1-5p levels for CI1 and CI3 were obtained at 7 DPI and slightly decreased until 77 DPI. Accordingly, these results showed that high bkv-miR-B1-5p expression is associated with the presence of infectious BKPyV virions. Finally, bkv-miR-B1-5p turns out to be a relevant biomarker for predicting active BKPyV replication.

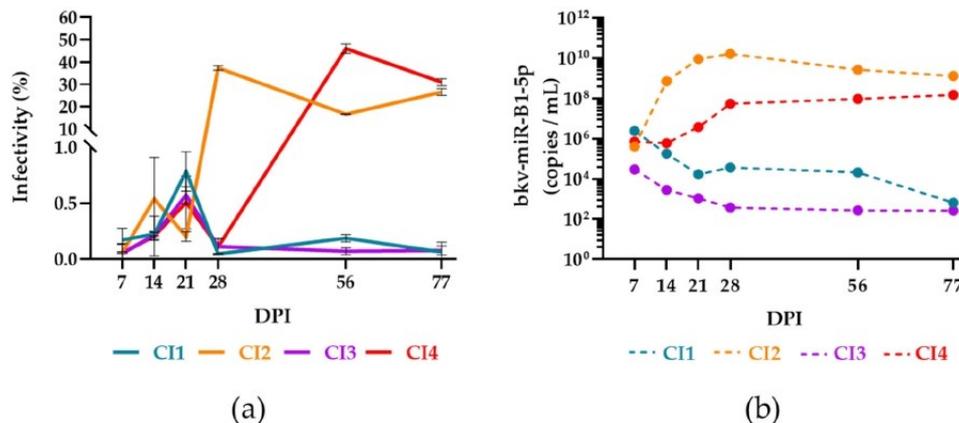


Figure 5. (a) Infectivity of conditioned media recovered from HRPTEC infected with 4 BKPyV clinical isolates (CI) 7 to 77 days post-infection (DPI). Infectivity rate corresponds to the percentage of cells that express BKPyV TAg among observed cells. The lines connect the mean infectivity rates between replicates. Errors bars represent standard deviation from the mean of duplicates. (b) bkv-miR-B1-5p level in conditioned media from HRPTEC infected with 4 BKPyV clinical isolates (CI) 7 to 77 days post-infection (DPI).

3. Discussion

In recent years, miRNAs have taken an important place in the perspective of new tools for diagnosis or prognosis of many pathologies. However, the direct application in clinical practice is still limited. This statement is particularly true for the management of viral diseases [41]. In fact, (RT-)PCR has become the gold standard for diagnosis and monitoring of most viral infections, especially for KTRs. Because of their lack of accuracy and more complex protocols, miRNA-targeting assays do not appear to be a relevant alternative to classical testing targeting viral DNA or RNA, but could be integrated as complementary viral biomarkers into a personalized medicine approach. We recently suggested that BKPyV miRNAs would be useful biomarkers to monitor the infection in KTRs, once the diagnosis is assessed by PCR. Emerging findings on other DNA viruses, such as *Herpesviridae*, confirm the potential of viral miRNAs to distinguish latent and active replication [41–45].

To verify this hypothesis on BKPyV, further evaluation in a large and multicentric cohort is necessary. The high stability of miRNAs in biological fluids, notably urine, has been commonly described [36] but specific knowledge of bkv-miR-B1-5p stability has never been studied. In the present study, we showed that bkv-miR-B1-5p is a suitable biomarker for retrospective studies, in vitro as well as in vivo. In both Vero and HEK-293TT cell BKPyV infection models, the extracellular bkv-miR-B1-5p level was not influenced by multiple freeze–thaw cycles (Figure 1a). We also observed a high stability of bkv-miR-B1-5p in cell lysate and supernatant from infected Vero cells, even after 80 days of room temperature storage (Figure 1b), as it has been described for other miRNAs [34]. The choice of the Vero cell line instead of HEK-293TT cells to evaluate long-term stability was motivated by a higher baseline bkv-miR-B1-5p level that could be more sensitive to observing significant decreases over time. The results may slightly differ between cell lines and could not perfectly reflect physiological concentrations. Moreover, we highlighted a non-significant decrease of the bkv-miR-B1-5p level in cell conditioned media after long-term room temperature storage. Turchinovitch et al. observed a significant diminution of several cellular miRNAs [34], but their analysis was based on relative, not absolute, quantities, which can affect statistical analysis and perception of the results [46]. In vivo, bkv-miR-B1-5p was still detectable after 5 freeze–thaw cycles in all tested urine ($n = 5$; Figure 2). However, this significantly affected the measured concentrations in two urine samples, highlighting the limit of such a *posteriori* study. We chose to test the condition for five, and not less, freeze–thaw cycles because of a lack of biological samples and to observe the more extreme conditions that would happen in laboratories. In fact, biological samples from biobanks are not often thawed many times before analysis. In order to evaluate extreme storage conditions and to compare the results to those observed in vitro, we conserved an aliquot for 80 days at room temperature. Overall, the bkv-miR-B1-5p level decreased in this condition, and the miRNA was undetectable in two urine samples. The biological and clinical characteristics of the five patients, summarized in Table S1, could not explain the observed variations. It must be noted that the remaining urines for patients #4 and #5 were conserved at +4 °C. Interestingly, the bkv-miR-B1-5p also decreased between day 0 and day 80 but remained detectable (Figure S1). Presence of RNase, of which activity is inhibited at +4 °C, could explain this phenomenon. Moreover, the analyses of the different urine samples were independently performed over a year, while room temperature could differ for the distinct patients' urine. Overall, the Mann–Whitney test did not reveal statistical differences between groups. To note, the Wilcoxon matched-pairs signed rank test was also applied and did not reveal significant differences between groups. Though, it was not relevant because the pairing between groups “Day 0” vs. “Day 80 at room temperature” was not significant (Spearman $r = -0.56$; $p = 0.20$). Actually, bkv-miR-B1-5p is highly stable in different matrixes as long as classical storage conditions are respected. Ideally, samples should be stored below -20 °C and not be thawed too many times.

Despite quantifying a significant amount, we found less than 1‰ of total extracellular bkv-miR-B1-5p in exosomes using two methods (Figure 3). This is consistent with previous studies showing that circulating cellular [34] or viral miRNAs [33] are marginally associated with exosomes. This confirms that bkv-miR-B1-5p can be quantified in the unprocessed extracellular milieu without the need for special isolation of exosomes. We showed that most of the circulating bkv-miR-B1-5p is associated with proteins of molecular weight ranging from 50 and 300 kDa (Figure 4a,b). This is consistent with the molecular weight of RNA-binding proteins (RBP), including Ago proteins, which are the major constituents of RISC to interact with miRNAs [37]. Indeed, according to our results, at least 30% of bkv-miR-B1-5p is associated with Ago2 (Figure 4c). This result may be underestimated because the immunoprecipitation method is not basically 100% efficient. Moreover, the remaining part of circulating bkv-miR-B1-5p could be associated with other Ago proteins (Ago1, Ago3, Ago4) [34,37] and/or it may be Ago-free in the miRNA-RBPs complex [47]. This mechanism must be explored in further studies to better understand the BKPyV life cycle, but the results would not affect the bkv-miR-B1-5p potential as a stable and abundant biomarker in the extracellular milieu. Unfortunately, we failed to obtain enough fresh, unprocessed, BKPyV-positive urine to perform these experiments on human samples. Exosomes and Ago2 are known to stabilize urinary miRNAs [48], but this remains to be demonstrated for bkv-miR-B1-5p.

This study is the first one to explore the bkv-miR-B1-5p expression of HRPTEC, which were chronically infected with BKPyV CI. Browsing the literature, very few articles describe efficient methods for the in vitro propagation of BKPyV clinical isolates [40,49–54]. We empirically adapted a published method to develop our model of BKPyV CI screening [40]. The efficiency of the propagation seemed random, independently of clinical or biological characteristics of the patients at the time of urine sampling. Four CI allowed us to reproduce in vitro the chronic infection we observed in the previous clinical study [28]. In fact, two CI showed high and stable bkv-miR-B1-5p expression while the others showed lower and slightly decreasing levels. In our clinical retrospective study, we wondered if bkv-miR-B1-5p could be a better biomarker than BKPyV DNA to depict the intensity of viral infectivity in KTRs [28]. In the present study, based on our cell culture model, we confirmed that the circulating bkv-miR-B1-5p level was higher in samples that could infect other cells. Hence, the use of bkv-miR-B1-5p quantification in urine from BKPyV-infected KTRs would help the monitoring of infection. This could assist nephrologists to better anticipate the control of the infection and more rapidly adapt the therapeutic management, particularly the dosages of immunosuppressants, and limit the risk of immunological complications. However, the cut-off bkv-miR-B1-5p level to accurately distinguish active and persistent infection is still not defined and requires complementary studies.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Cultures

The monkey-derived Vero cell line was obtained from the ATCC (ATCC-CCL-81). The human embryonic kidney HEK-293TT cells, stably transfected with pTIH plasmid containing the coding cDNA for SV40 TAg, were kindly provided by C.B. Buck. Both cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen). HRPTEC immortalized with pLXSN-hTERT retroviral transfection were obtained from Evercyte (Leberstraße, Austria; CHT-003-0002), maintained in a renal epithelial cell basal medium (REGM CC-3191, Lonza, Bale, Switzerland), and supplemented with human epidermal growth factor, 0.5% fetal bovine serum, hydrocortisone, epinephrine, insulin, triiodothyronine, transferrin, and GA-1000 (REGM SingleQuots™ Supplement Pack, CC-4127, Lonza). All cells were cultured in a humidified environment with 5% CO₂ at 37 °C. The protocol for the propagation of CI in HRPTEC was adapted from a previously described method [40].

Briefly, 5.10^4 cells were seeded in each well of 24-well plate with 500 μL of medium. 100 μL of 0.22 μm filtered urine was used to infect the cell culture. The medium was removed and changed after 1 h of incubation. The cells were then kept for long-term culture, changing medium and collecting the supernatant every week.

4.2. Human Samples

Human urine samples were obtained from 73 KTRs followed at the Amiens University Medical Center (Amiens, France). The samples used for the present study were over-ages of the urine samples collected during routine patient management.

Fresh urine samples were collected and aliquoted for conservation at room temperature, +4 $^{\circ}\text{C}$, -20 $^{\circ}\text{C}$, or -80 $^{\circ}\text{C}$, depending on the experiments. The clinical and biological data of the five patients included in the stability experiments are summarized in Table S1. Sixty-eight urine samples from KTRs diagnosed with BKPyV DNAuria were randomly selected for chronic culture of BKPyV clinical isolates.

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Amiens University Medical Center (protocol code PI2021_843_0012, 15 December 2019).

4.3. Physico-Chemical Stability

Two million Vero or HEK-293TT cells were seeded in T75 flasks with 15 mL of medium and then infected with a Dunlop [38] BKPyV stock (MOI = 1), produced as previously described [55]. The supernatant was collected at 72 h, filtered at 0.22 μm and stored for 80 days either at room temperature or at -20 $^{\circ}\text{C}$. The cell layer was lysed with radioimmunoprecipitate assay (RIPA) buffer (20 mM HEPES KOH pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS); 1% deoxycholate (DOC) and 1% Triton X-100) and then diluted 1:10 in phosphate-buffered saline (PBS). The cell lysate was then filtered at 0.22 μm and stored for 80 days, either at room temperature or at -20 $^{\circ}\text{C}$.

Patient urine used in stability studies was stored at room temperature and at -20 $^{\circ}\text{C}$ for 80 days.

Aliquots were prepared at day 0 to have two separate aliquots at -20 $^{\circ}\text{C}$ to allow independent analysis of the effect of single freezing and 5 freeze-thaw cycles from -20 $^{\circ}\text{C}$ to room temperature. Freezing the 200 μL aliquots took approximately 1 h. Thawing the 200 μL aliquots took approximately 30 min.

4.4. miRNA Purification

Cellular and intravesicular miRNAs were extracted from centrifugation pellets or immunoprecipitates. These were lysed with 700 μL of Qiazol (Qiagen, Venlo, Netherlands). Extraction was then performed using the "miRNEasy mini kit" (Qiagen) according to the supplier's recommendations. Eluates were stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ before analysis.

The miRNAs from culture supernatants, centrifugation supernatants or filtrates were extracted from 200 μL of the sample. The extraction was then performed using the miRNEasy Advanced Serum/Plasma Kit (Qiagen) according to the supplier's recommendations.

Extractions from the different kits were performed on the Qiacube automated system (Qiagen).

Cel-miR-39-3p spike-in control, obtained from Qiagen, was added to the samples to either check the quality of the purification or normalize the bkV-miR-B1-5p qPCR results after successive filtrations and or centrifugations.

4.5. miRNA RT-PCR Assay and BKPyV DNA qPCR

The miRNA RT-PCR assays and BKPyV DNA qPCR were performed as previously described [21,28].

4.6. Antibodies and Reagents

The mouse monoclonal anti-AgT antibody (pAb416) was obtained from Abcam (Cambridge, UK). For immunofluorescence experiments, the antibody (1 µg/mL) was diluted 1:1000. Anti-mouse IgG (H + L) antibody conjugated to the Alexa Fluor Plus 488 fluorophore was supplied by ThermoFisher. For anti-Ago2 immunoprecipitations, the rat monoclonal antibody was provided by Millipore (clone 11A9, cat. MABE253).

4.7. Immunostaining

Cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with Triton X-100 (0.5% in cytoskeleton buffer: 10 mM PIPES (piperazine-N-N'-bis(2-ethanesulfonic acid)), 300 mM sucrose, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, and 1 mM egtazic acid). Infected cells were detected by TAg immunostaining. Nuclei were labeled by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunostained cells were observed on a Zeiss Axio Vert.A1 microscope equipped with Colibri 7 LED 298 illumination (Zeiss, Oberkochen, Germany). Fluorescent signals were acquired with the AxioCam 305 (Zeiss). The percentage of infected cells was counted in an automated way using a modified version of the QuantIF macro [56].

4.8. Ultracentrifugation and Ultrafiltration

Two million Vero cells were seeded in T75 flasks with 15 mL of medium and then infected with BKPvV stock (MOI = 1). The supernatant was collected at 72 h post-infection and 8×10^9 copies of cel-miR-39 were added to the supernatant to overcome volume variations related to subsequent manipulations and to allow normalization of results. The supernatant then underwent a succession of differential centrifugations to progressively remove various extracellular elements and purify exosomes according to a previously described protocol [34]: centrifugation at $1200 \times g$ for 3 min at room temperature to remove cells; centrifugation at $14,000 \times g$ for 10 min at room temperature to remove cell debris; filtration at 0.2 µm to remove microvesicles; ultracentrifugation at $110,000 \times g$ for 2 h at 4 °C to remove exosomes (the exosome-free supernatant was stored at 4 °C before further analysis); washing with PBS of the exosome pellet; and ultracentrifugation at $110,000 \times g$ for 2 h at 4 °C of the impure exosome-PBS mixture to remove traces of impurities. The ultracentrifugation supernatant was removed, and the pure exosome pellet was stored at -80 °C in Qiazol (Qiagen) for miRNA quantification.

Ultrafiltrations were performed from infected cell supernatants, centrifugation supernatants, or patient urine. The cartridges used for the filtrations were Vivaspin 20 with polyethersulfone membrane of pore size 10,000 MWCO, 50,000 MWCO, or 300,000 MWCO. Ultrafiltrations were performed according to the supplier's recommendations. The retinates, parts retained by the column, corresponded to a 30X concentration of the starting solutions. Filtrates and retinates were stored at 4 °C if the secondary experiments were performed less than 24 h after ultrafiltration. Otherwise, the samples were stored at -80 °C.

4.9. Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of extracellular miRNAs with anti-Ago2 antibody was performed using the µMACS™ Protein G MicroBeads kit from Miltenyi (Bergisch Gladbach, Germany) according to the supplier's recommendations. The kit included beads, buffers, and columns. The treated samples were 30X ultrafiltration retentates of BKPvV-infected Vero cell culture supernatant. The maximum efficiency for immunoprecipitation was obtained for 50 µL of samples incubated with 2 µg of anti-Ago2 antibody. Immunoprecipitates were recovered by applying 700 µL of Qiazol directly to the column and miRNAs were extracted as previously described.

4.10. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Nonparametric tests (Kruskal–Wallis test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test) were performed. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

5. Conclusions

Bkv-miR-B1-5p, a specific miRNA produced during active BKPyV replication, is a stable biomarker in samples from in vitro experiments and in clinical samples. Marginally associated with the exosomes, most of circulating bkv-miR-B1-5p is bound to proteins, especially Ago2, so the miRNA quantification does not require specific exosome isolation. Bkv-miR-B1-5p level is predictable of viral infectivity, which makes it a potential specific biomarker of active BKPyV replication in KTRs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23137240/s1.

Author Contributions: Conceptualization, B.D. and E.B.; Data curation, B.D. and M.B.; Formal analysis, B.D.; Funding acquisition, S.C.; Investigation, B.D.; Methodology, V.D. and V.M.; Project administration, E.B.; Resources, S.C.; Software, F.H.; Supervision, E.B.; Validation, C.F. and S.C.; Visualization, F.H.; Writing—original draft, B.D.; Writing—review & editing, M.B. and E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Université de Picardie Jules Verne and the Centre Hospitalier Universitaire d’Amiens.

Acknowledgments: This study was supported by the Université de Picardie Jules Verne and the Centre Hospitalier Universitaire d’Amiens.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the or Ethics Committee of Centre Hospitalier Universitaire d’Amiens (protocol code PI2021_843_0012 15 December 2019).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived in line with the French legislation on retrospective studies of routine clinical practice.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hirsch, H.H.; Steiger, J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 611–623. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00770-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00770-9).
- Helle, F.; Brochot, E.; Handala, L.; Martin, E.; Castelain, S.; Francois, C.; Duverlie, G. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* **2017**, *9*, 327. <https://doi.org/10.3390/v9110327>.
- Bressollette-Bodin, C.; Coste-Burel, M.; Hourmant, M.M.; Renaudin, K.; Imbert-Marcille, B.M. Le Virus BK: État Des Connaissances En 2003 et Particularités de l’infection En Transplantation Rénale. *Virologie* **2003**, *7*, 433–444.
- Mori, Y.; Miyamoto, T.; Kato, K.; Kamezaki, K.; Kuriyama, T.; Oku, S.; Takenaka, K.; Iwasaki, H.; Harada, N.; Shiratsuchi, M.; et al. Different Risk Factors Related to Adenovirus- or BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.07.025>.
- Nickeleit, V.; Hirsch, H.H.; Binet, I.F.; Gudat, F.; Prince, O.; Dalquen, P.; Thiel, G.; Mihatsch, M.J. Polyomavirus Infection of Renal Allograft Recipients: From Latent Infection to Manifest Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1080–1089.
- Sharif, A.; Alachkar, N.; Bagnasco, S.; Geetha, D.; Gupta, G.; Womer, K.; Arend, L.; Racusen, L.; Montgomery, R.; Kraus, E. Incidence and Outcomes of BK Virus Allograft Nephropathy among ABO- and HLA-Incompatible Kidney Transplant Recipients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *7*, 1320–1327. <https://doi.org/10.2215/CJN.00770112>.
- Rinaldo, C.H.; Hirsch, H.H. Antivirals for the Treatment of Polyomavirus BK Replication. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2007**, *5*, 105–115. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.1.105>.
- Song, T.-R.; Rao, Z.-S.; Qiu, Y.; Liu, J.-P.; Huang, Z.-L.; Wang, X.-D.; Lin, T. Fluoroquinolone Prophylaxis in Preventing BK Polyomavirus Infection after Renal Transplant: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2016**, *32*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2016.01.004>.

9. Khalil, M.A.M.; Khalil, M.A.U.; Tan, J.; Khan, T.F.T. Fluoroquinolones and BK Virus Nephropathy: A Myth or a Reality. *Indian J. Nephrol.* **2018**, *28*, 257–264. https://doi.org/10.4103/ijn.IJN_251_17.
10. Randhawa, P.S.; Schonder, K.; Shapiro, R.; Farasati, N.; Huang, Y. Polyomavirus BK Neutralizing Activity in Human Immunoglobulin Preparations. *Transplantation* **2010**, *89*, 1462–1465. <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e3181daaaf1>.
11. Bernhoff, E.; Gutteberg, T.J.; Sandvik, K.; Hirsch, H.H.; Rinaldo, C.H. Cidofovir Inhibits Polyomavirus BK Replication in Human Renal Tubular Cells Downstream of Viral Early Gene Expression. *Am. J. Transplant.* **2008**, *8*, 1413–1422. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02269.x>.
12. Rinaldo, C.H.; Gosert, R.; Bernhoff, E.; Finstad, S.; Hirsch, H.H. 1-O-Hexadecyloxypropyl Cidofovir (CMX001) Effectively Inhibits Polyomavirus BK Replication in Primary Human Renal Tubular Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4714–4722. <https://doi.org/10.1128/AAC.00974-10>.
13. Williams, J.W.; Mital, D.; Chong, A.; Kottayil, A.; Millis, M.; Longstreth, J.; Huang, W.; Brady, L.; Jensik, S. Experiences with Leflunomide in Solid Organ Transplantation. *Transplantation* **2002**, *73*, 358–366. <https://doi.org/10.1097/00007890-200202150-00008>.
14. Hardinger, K.L.; Koch, M.J.; Bohl, D.J.; Storch, G.A.; Brennan, D.C. BK-Virus and the Impact of Pre-Emptive Immunosuppression Reduction: 5-Year Results. *Am. J. Transplant.* **2010**, *10*, 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02952.x>.
15. Schaub, S.; Hirsch, H.H.; Dickermann, M.; Steiger, J.; Mihatsch, M.J.; Hopfer, H.; Mayr, M. Reducing Immunosuppression Preserves Allograft Function in Presumptive and Definitive Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Am. J. Transplant.* **2010**, *10*, 2615–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03310.x>.
16. Shen, C.-L.; Wu, B.-S.; Lien, T.-J.; Yang, A.-H.; Yang, C.-Y. BK Polyomavirus Nephropathy in Kidney Transplantation: Balancing Rejection and Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 487. <https://doi.org/10.3390/v13030487>.
17. EDQM International Figures on Donation and Transplantation 2020; Council of Europe and Organización Nacional de Trasplantes. Cover, 2021
18. Hirsch, H.H.; Randhawa, P.S.; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* **2019**, *33*, e13528. <https://doi.org/10.1111/ctr.13528>.
19. Demey, B.; Tinez, C.; François, C.; Helle, F.; Choukroun, G.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Brochet, E. Risk Factors for BK Virus Viremia and Nephropathy after Kidney Transplantation: A Systematic Review. *J. Clin. Virol.* **2018**, *109*, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.002>.
20. Kiberd, B.A. Screening to Prevent Polyoma Virus Nephropathy: A Medical Decision Analysis. *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 2410–2416. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01034.x>.
21. Brochet, E.; Descamps, V.; Handala, L.; Faucher, J.; Choukroun, G.; Helle, F.; Castelain, S.; François, C.; Duverlie, G.; Touzé, A. BK Polyomavirus in the Urine for Follow-up of Kidney Transplant Recipients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *25*, 112.e1–112.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.027>.
22. Broekema, N.M.; Imperiale, M.J. MiRNA Regulation of BK Polyomavirus Replication during Early Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8200–8205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301907110>.
23. Zou, W.; Vue, G.S.; Assetta, B.; Manza, H.; Atwood, W.J.; Imperiale, M.J. Control of Archetype BK Polyomavirus MicroRNA Expression. *J. Virol.* **2020**, *95*, e01589–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01589-20>.
24. Nomburg, J.; Zou, W.; Frost, T.C.; Datta, C.; Vasudevan, S.; Starrett, G.J.; Imperiale, M.J.; Meyerson, M.; DeCaprio, J.A. Long-Read Sequencing Reveals Complex Patterns of Wraparound Transcription in Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* **2022**, *18*, e1010401. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010401>.
25. Li, J.Y.Z.; McNicholas, K.; Yong, T.Y.; Rao, N.; Coates, P.T.H.; Higgins, G.D.; Carroll, R.P.; Woodman, R.J.; Michael, M.Z.; Gleadly, J.M. BK Virus Encoded MicroRNAs Are Present in Blood of Renal Transplant Recipients With BK Viral Nephropathy: BK Virus MicroRNAs in Renal Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 1183–1190. <https://doi.org/10.1111/ajt.12694>.
26. Lagatie, O.; Tritsmans, L.; Stuyver, L.J. The MiRNA World of Polyomaviruses. *Virol. J.* **2013**, *10*, 268. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-268>.
27. Zeng, G.; Wang, Z.; Huang, Y.; Abedin, Z.; Liu, Y.; Randhawa, P. Cellular and Viral MiRNA Expression in Polyomavirus BK Infection. *Transpl. Infect. Dis.* **2019**, *21*, e13159. <https://doi.org/10.1111/tid.13159>.
28. Demey, B.; Descamps, V.; Presne, C.; Helle, F.; François, C.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Brochet, E. BK Polyomavirus MicroRNAs: Time Course and Clinical Relevance in Kidney Transplant Recipients. *Viruses* **2021**, *13*, 351. <https://doi.org/10.3390/v13020351>.
29. Martelli, F.; Mencarini, J.; Rocca, A.; Malva, N.D.; Bartolozzi, D.; Giannechini, S. Polyomavirus MicroRNA in Saliva Reveals Persistent Infectious Status in the Oral Cavity. *Virus Res.* **2018**, *249*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.002>.
30. Pietilä, T.; Nummi, M.; Auvinen, P.; Mannonen, L.; Auvinen, E. Expression of BKV and JCV Encoded MicroRNA in Human Cerebrospinal Fluid, Plasma and Urine. *J. Clin. Virol.* **2015**, *65*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.019>.
31. Kim, M.H.; Lee, Y.H.; Seo, J.-W.; Moon, H.; Kim, J.S.; Kim, Y.G.; Jeong, K.-H.; Moon, J.-Y.; Lee, T.W.; Ihm, C.-G.; et al. Urinary Exosomal Viral MicroRNA as a Marker of BK Virus Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0190068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190068>.
32. Jeppesen, D.K.; Fenix, A.M.; Franklin, J.L.; Higginbotham, J.N.; Zhang, Q.; Zimmerman, L.J.; Liebler, D.C.; Ping, J.; Liu, Q.; Evans, R.; et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **2019**, *177*, 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.

33. Albanese, M.; Chen, Y.-F.A.; Hüls, C.; Gärtner, K.; Tagawa, T.; Mejias-Perez, E.; Keppler, O.T.; Göbel, C.; Zeidler, R.; Shein, M.; et al. MicroRNAs Are Minor Constituents of Extracellular Vesicles That Are Rarely Delivered to Target Cells. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009951. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009951>.
34. Turdinovich, A.; Weiz, L.; Langhein, A.; Burwinkel, B. Characterization of Extracellular Circulating MicroRNA. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>.
35. Arroyo, J.D.; Chevillet, J.R.; Kroh, E.M.; Ruf, I.K.; Pritchard, C.C.; Gibson, D.F.; Mitchell, P.S.; Bennett, C.F.; Pogoso-Agadjan, E.L.; Stirewalt, D.L.; et al. Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating MicroRNAs Independent of Vesicles in Human Plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>.
36. Mall, C.; Rocke, D.M.; Durbin-Johnson, B.; Weiss, R.H. Stability of MiRNA in Human Urine Supports Its Biomarker Potential. *Biomark. Med.* **2013**, *7*, 623–631. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.44>.
37. Zealy, R.W.; Wrenn, S.P.; Davila, S.; Min, K.-W.; Yoon, J.-H. MicroRNA-Binding Proteins: Specificity and Function. *WIREs RNA* **2017**, *8*, e1414. <https://doi.org/10.1002/wrna.1414>.
38. Henriksen, S.; Mittelholzer, C.; Gosert, R.; Hirsch, H.H.; Rinaldo, C.H. Human BK Polyomavirus Plasmid PBKV (34-2) (Dunlop) Contains Mutations Not Found in the Originally Published Sequences. *Genome Announc.* **2015**, *3*, e00046-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00046-15>.
39. Addetia, A.; Phung, Q.; Bradley, B.T.; Lin, M.J.; Zhu, H.; Xie, H.; Huang, M.-L.; Greninger, A.L. In Vivo Generation of BK and JC Polyomavirus Defective Viral Genomes in Human Urine Samples Associated with Higher Viral Loads. *J. Virol.* **2021**, *95*, e00250-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00250-21>.
40. Moriyama, T.; Sorokin, A. BK Virus (BKV): Infection, Propagation, Quantitation, Purification, Labeling, and Analysis of Cell Entry. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2009**, *42*, 26.2.1–26.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2602s42>.
41. Tribollet, L.; Kerr, E.; Cowled, C.; Bean, A.G.D.; Stewart, C.R.; Dearnley, M.; Farr, R.J. MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1197.
42. Bazie, W.W.; Boucher, J.; Traoré, I.T.; Kania, D.; Somé, D.Y.; Alary, M.; Gilbert, C. Vesicular MicroRNA as Potential Biomarkers of Viral Rebound. *Cells* **2022**, *11*, 859. <https://doi.org/10.3390/cells11050859>.
43. Fernández-Moreno, R.; Torre-Cisneros, J.; Cantisán, S. Human Cytomegalovirus (HCMV)-Encoded MicroRNAs: Potential Biomarkers and Clinical Applications. *RNA Biol.* **2021**, *18*, 2194–2202. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1930757>.
44. Talaya, A.; Giménez, E.; Pascual, M.J.; Gago, B.; Piñana, J.L.; Hernández-Boluda, J.C.; Vázquez, L.; García, M.; Serrano, D.; Hernández, M.; et al. An Investigation of the Utility of Plasma Cytomegalovirus (CMV) MicroRNA Detection to Predict CMV DNAemia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Med. Microbiol. Immunol.* **2020**, *209*, 15–21. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00632-7>.
45. Lagatie, O.; Van Loy, T.; Tritsmans, L.; Stuyver, L.J. Viral MiRNAs in Plasma and Urine Divulge JC Polyomavirus Infection. *Virol. J.* **2014**, *11*, 158. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-158>.
46. Kralik, P.; Ricchi, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 108.
47. Janas, M.M.; Wang, B.; Harris, A.S.; Aguiar, M.; Shaffer, J.M.; Subrahmanyam, Y.V.B.K.; Behlke, M.A.; Wucherpfennig, K.W.; Gygi, S.P.; Gagnon, E.; et al. Alternative RISC Assembly: Binding and Repression of MicroRNA–mRNA Duplexes by Human Ago Proteins. *RNA* **2012**, *18*, 2041–2055. <https://doi.org/10.1261/rna.035675.112>.
48. Beltrami, C.; Clayton, A.; Newbury, L.J.; Corish, P.; Jenkins, R.H.; Phillips, A.O.; Fraser, D.J.; Bowen, T. Stabilization of Urinary MicroRNAs by Association with Exosomes and Argonaute 2 Protein. *Non-Coding RNA* **2015**, *1*, 151–166. <https://doi.org/10.3390/ncrna1020151>.
49. Gardner, S.; Field, A.; Coleman, D.; Hulme, B. New Human Papovavirus (B.K.) Isolated from Urine after Renal Transplantation. *Lancet* **1971**, *297*, 1253–1257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4).
50. Moens, U.; Johansen, T.; Johnsen, J.I.; Seternes, O.M.; Traavik, T. Noncoding Control Region of Naturally Occurring BK Virus Variants: Sequence Comparison and Functional Analysis. *Virus Genes* **1995**, *10*, 261–275. <https://doi.org/10.1007/BF01701816>.
51. Rinaldo, C.H.; Hansen, H.; Traavik, T. Human Endothelial Cells Allow Passage of an Archetypal BK Virus (BKV) Strain—a Tool for Cultivation and Functional Studies of Natural BKV Strains. *Arch. Virol.* **2005**, *150*, 1449–1458.
52. Nukuzuma, S.; Takasaka, T.; Zheng, H.-Y.; Zhong, S.; Chen, Q.; Kitamura, T.; Yogo, Y. Subtype I BK Polyomavirus Strains Grow More Efficiently in Human Renal Epithelial Cells than Subtype IV Strains. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 1893–1901. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81698-0>.
53. Nishimoto, Y.; Takasaka, T.; Hasegawa, M.; Zheng, H.-Y.; Chen, Q.; Sugimoto, C.; Kitamura, T.; Yogo, Y. Evolution of BK Virus Based on Complete Genome Data. *J. Mol. Evol.* **2006**, *63*, 341–352. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0092-5>.
54. Schutgens, F.; Rookmaaker, M.B.; Margaritis, T.; Rios, A.; Ammerlaan, C.; Jansen, J.; Gijzen, L.; Vormann, M.; Vonk, A.; Viveen, M.; et al. Tubuloids Derived from Human Adult Kidney and Urine for Personalized Disease Modeling. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 303–313. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0048-8>.
55. Fiore, T.; Martin, E.; Descamps, V.; Brochet, E.; Morel, V.; Handala, L.; Dakroub, F.; Castelain, S.; Duverlie, G.; Helle, F.; et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Involved in Interferon Gamma's Anti-BKPyV Activity in Renal Cells. *Viruses* **2020**, *12*, 865. <https://doi.org/10.3390/v12080865>.
56. Handala, L.; Fiore, T.; Rouillé, Y.; Helle, F. QuantIF: An ImageJ Macro to Automatically Determine the Percentage of Infected Cells after Immunofluorescence. *Viruses* **2019**, *11*, 165. <https://doi.org/10.3390/v11020165>.

Supplementary Material :

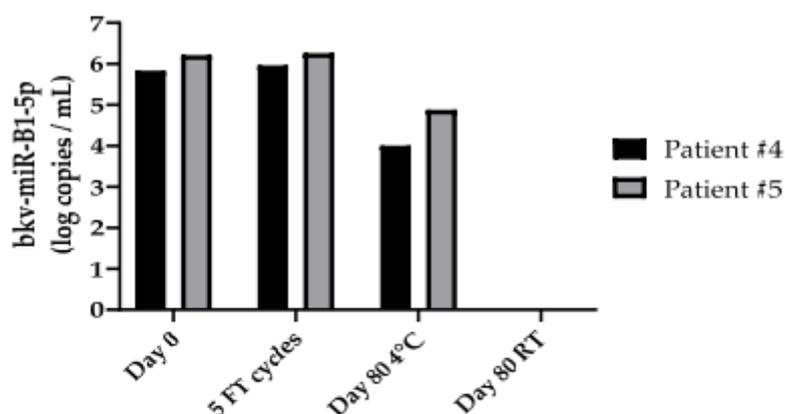


Figure S1. bkv-miR-B1-5p levels in urine from patients diagnosed for BKPyV infection. The measurements were performed at day 0, at day 80 after 5 freeze-thaw cycles, after 80 days of +4°C conservation, or after 80 days of room temperature conservation.

Patients	BKPyV DNA load (log ₁₀ UI/mL)	Days after diagnosis of BKPyV DNAuria	Days after diagnosis of BKPyV DNAemia	Creatinine (μmol/L)	Creatinine clearance (mL/min)
#1	Urine : 8,95 Plasma : 4,42	25	25	120	58
#2	Urine : 8,58 Plasma : NR	0	NR	66	84
#3	Urine : 7,1 Plasma : 3,5	188	112	241	26
#4	Urine : 9,1 Plasma : 5	141	94	359	15
#5	Urine : 9,1 Plasma : 4	150	0	125	53

Table S1. Biological and clinical information of the patients who provided the urines used for bkv-miR-B1-5p stability analysis. NR: not realized.

2. Analyse des urines des patients transplantés rénaux

a. Niveaux d'expression des marqueurs de réplication (AgT, VP1, miARNs matures) du BKPyV au cours de l'infection chronique

89 culots cellulaires obtenus à partir des urines de 31 patients transplantés de rein au CHU Amiens Picardie ont été analysés. Pour chaque patient, les urines avaient été prélevées à différents temps du suivi virologique. Pour 23 patients, l'ADN du BKPyV a été détecté au moins une fois dans les urines au cours du suivi. 8 patients contrôles n'ont jamais été positifs pour l'ADN du BKPyV sur leurs prélèvements au cours du

suivi. Parmi les 89 prélèvements, le bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p, l'ARNm VP1 et l'ARNm AgT ont été détectés respectivement dans 48 (53,9%), 53 (59,6%), 33 (37,1%) et 27 (30,3%) urines. 55 (61,8%) urines étaient positives pour l'ADN du BKPyV. Les résultats des différentes PCR ont été exprimés de manière quantitative en se rapportant à des gammes de standards. Les concentrations ainsi calculées dans le lysat cellulaires ont ensuite été rapportées au volume d'urine utilisé au départ afin d'obtenir un résultat final exprimé en nombre de copies de miARN ou d'ARNm par mL d'urine. Les corrélations des 4 marqueurs avec l'ADNurie BKPyV sont représentées sur la Figure 15 et les résultats de l'analyse de corrélation linéaire sont résumées dans le Tableau 6.

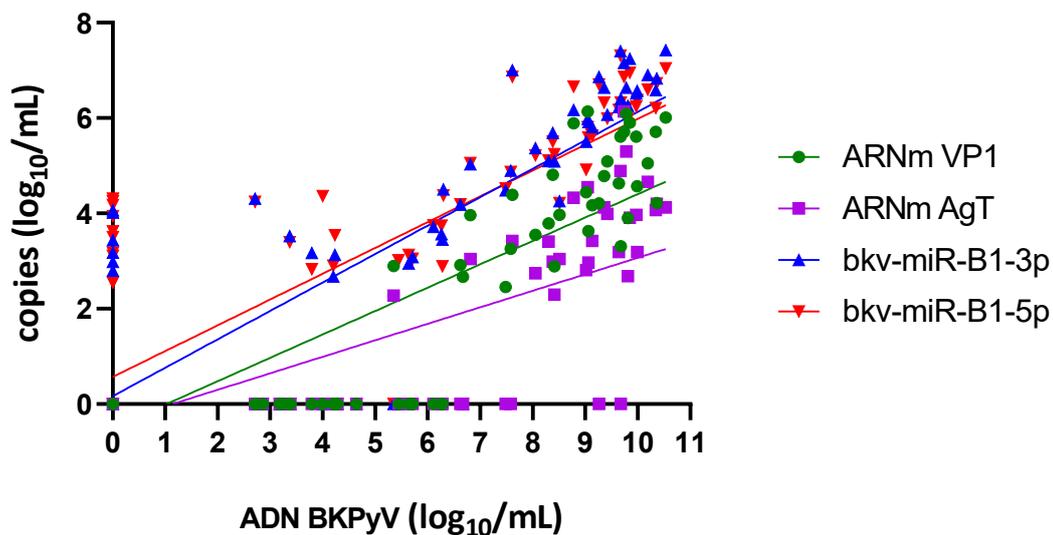


Figure 15: Corrélation entre les différents marqueurs quantifiés dans les culots cellulaires (ARNm VP1, ARNm AgT, bk3p et bk5p) avec la charge virale (ADN BKPyV) mesurée en routine dans les urines au cours du suivi des patients transplantés de rein. Les valeurs des concentrations urinaires d'ARNm VP1, ARNm AgT, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p sont représentées en vert, violet, bleu et rouge, respectivement. Les droites, de couleur associée, correspondent chacune à la droite de corrélation linéaire de Pearson entre les différents marqueurs avec la charge virale urinaire. En raison de la superposition de différents points, certains points ne sont pas visualisables.

	ADN BKPyV vs. ARNm VP1	ADN BKPyV vs. ARNm AgT	ADN BKPyV vs. bkv-miR-B1-3p	ADN BKPyV vs. bkv-miR-B1-5p
Coefficient r de Pearson	0,8685	0,7758	0,8499	0,8117
Intervalle de confiance 95%	0,8060 - 0,9118	0,6769 - 0,8472	0,7796 - 0,8990	0,7262 - 0,8725
R ²	0,7542	0,6019	0,7223	0,6589
Valeur de p	<0,0001 ****	<0,0001 ****	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Nombre de paires XY	89	89	89	89

Tableau 6: Résultat de l'analyse de corrélation linéaire de Pearson entre la concentration en ADN BKPyV et les différents marqueurs (ARNm VP1, ARNm AgT, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p) dans les urines.

Les concentrations de miARNs matures et d'ARNm d'intérêts étaient significativement corrélées à la charge virale mesurée en routine dans les urines (ADNurie BKPyV). La plus forte corrélation a été obtenue avec l'ARNm VP1 ($r^2 = 0,7542$) et la plus faible avec l'ARNm AgT ($r^2 = 0,6019$). La corrélation entre la charge virale urinaire et la concentration en bkv-miR-B1-3p était meilleure que celle avec la concentration en bkv-miR-B1-5p ($r^2 = 0,7223$ contre $r^2 = 0,6589$). Comme illustré sur la Figure 15, nous observons des résultats aberrants pour les différents marqueurs. En effet, alors qu'aucun prélèvement n'était positif en ARNm VP1 ou AgT et négatif en ADN, de nombreux prélèvements étaient négatifs en ARNm malgré une détection d'ADN. En admettant que l'ADN est le marqueur de référence absolu, ces résultats seraient considérés comme des faux négatifs. Cette même discordance a été également retrouvée pour les miARNs. De plus, les résultats des miARNs ont mis en évidence des faux positifs, caractérisés par des prélèvements au niveau desquels le bkv-miR-B1-3p et/ou le bkv-miR-B1-5p était quantifié alors que l'ADN était indétectable. Dans ces cas de faux positifs, la concentration urinaire en miARN n'excédait pas 4,31 log₁₀ copies/mL pour le bkv-miR-B1-5p et 4,06 log₁₀ copies/mL pour le bkv-miR-B1-3p.

Afin d'évaluer la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) des différents marqueurs d'intérêts, les courbes ROC correspondantes ont été construites en comparant les patients selon la positivité (BKU+) ou la négativité

(BKU-) des urines en ADN du BKPyV. La sensibilité et la spécificité permettent de mesurer la performance brute d'un test diagnostique. La sensibilité est définie comme la capacité du test à correctement identifier les individus qui ont la maladie (BKU+). La spécificité est définie comme la capacité du test à correctement identifier les individus qui n'ont pas la maladie (BKU-). Les valeurs prédictives d'un test permettent d'évaluer la performance de la stratégie diagnostique lorsque ce test est pratiqué. La VPP est la proportion des tests positifs qui correspond à de vrais malades. La VPN est la proportion des tests négatifs qui correspond à des non-malades. Les courbes ROC sont représentées sur la Figure 16, et les paramètres calculés sont résumés dans le Tableau 7.

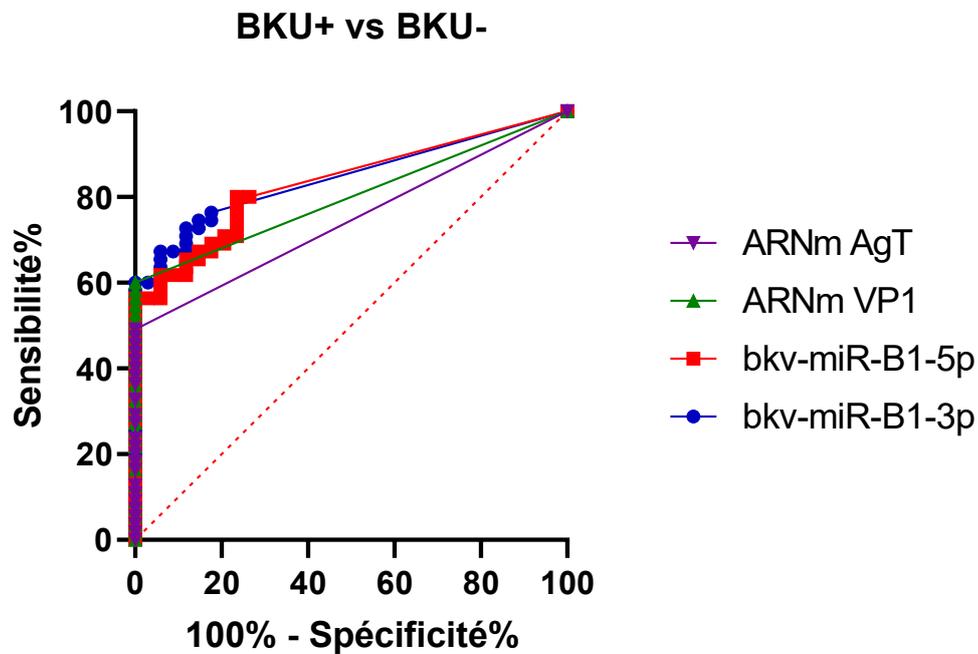


Figure 16 : Courbes ROC des marqueurs urinaires ARNm AgT, ARNm VP1, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p pour distinguer les patients présentant de l'ADN BKPyV dans l'urine (BKU+) ou non (BKU-).

	Bkv-miR-B1-3p	Bkv-miR-B1-5p	ARNm VP1	ARNm AgT
Aire sous la courbe ROC	0,8444	0,8350	0,8000	0,7455
Erreur standard	0,04089	0,04175	0,04602	0,05076
Intervalle de confiance 95%	0,7642 - 0,9245	0,7532 - 0,9169	0,7098 - 0,8902	0,6460 - 0,8449
Valeur de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
Sensibilité	76,36%	80,00%	60,00%	49,09%
Spécificité	82,35%	73,53%	100,00%	100,00%
VPN	68,29%	69,44%	60,71%	54,84%
VPP	87,50%	83,02%	100,00%	100,00%

Tableau 7 : Résumé des paramètres calculés à partir de l'analyse ROC pour distinguer les patients présentant de l'ADN BKPyV dans l'urine (BKU+) ou non (BKU-) à partir des concentrations urinaires en ARNm AgT, ARNm VP1, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p. VPN : Valeur prédictive négative. VPP : valeur prédictive positive.

La performance globale des différents marqueurs pour distinguer les urines positives ou négatives en ADN de BKPyV, représentée par l'aire sous la courbe ROC, était statistiquement satisfaisante pour les 4 marqueurs d'intérêt ($p < 0,0001$). En effet, pour le bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p, l'ARNm VP1 et l'ARNm AgT l'aire sous la courbe ROC était respectivement de 0,8444 ; 0,8350 ; 0,8000 et 0,7455, sachant que l'aire doit être supérieure à 0,5 et le plus proche possible de 1 pour témoigner d'une bonne performance globale. Ainsi, la performance du dosage du bkv-miR-B1-3p était supérieure aux autres marqueurs malgré des résultats similaires. L'ARNm AgT présentait la performance la plus faible, en partie expliquée par de faibles sensibilité (49,09%) et VPN (54,84%), malgré des spécificité et VPP parfaites (100%). L'ARNm VP1 présentait également des spécificité et VPP parfaites (100%) et de meilleures sensibilité et VPN (respectivement 60% et 60,71%). A l'inverse, la quantification des deux miARNs matures dans les urines, qui montrait des résultats faussement positifs comparativement à l'ADN de BKPyV (Tableau 7), était caractérisée par de moins bonne spécificité et VPP que les ARNm de VP1 et d'AgT. En revanche les sensibilité et

VPN étaient bien meilleures, avec un maximum de 80% de sensibilité et une VPN de 69,44% pour le bkv-miR-B1-5p. Au global, le dosage des miARNs du BKPyV dans les urines semblait plus intéressant que la quantification des ARNm de VP1 et AgT, avec une performance plus équilibrée mais non sans limites.

Il a été montré précédemment que le ratio faible des quantités d'ARNm de VP1 par rapport aux quantités d'ARNm d'AgT (ARNm VP1/AgT) était significativement associé à la présence de souches de BKPyV réarrangées (100). Une autre étude avait également mis en lien des niveaux hauts d'expression des miARNs du BKPyV avec le réarrangement du NCCR (80). Dans cette logique, nous avons analysé la corrélation entre les concentrations de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p avec le ratio ARNm VP1/AgT dans les urines provenant de notre population de patients transplantés de rein. Cette analyse n'a pas montré de corrélation significative entre les concentrations de chacun des miARNs du BKPyV et le ratio d'ARNm VP1/AgT. En effet, le coefficient de corrélation de Pearson r^2 était égal à 0,035 ($p = 0,079$) pour le bkv-miR-B1-3p et 0,033 ($p = 0,896$) pour le bkv-miR-B1-5p pour les 89 paires de valeurs. Nous avons supposé que cette analyse de corrélation aurait pu être biaisée par le nombre important d'échantillons pour lesquels le ratio ARNm VP1/AgT était nul, en lien avec la faible sensibilité de détection identifiée précédemment. Cependant, lorsque nous avons renouvelé l'analyse en prenant en compte uniquement les 33 paires de valeurs associées à des ratio VP1/AgT positifs, nous n'avons toujours pas fait apparaître de corrélation significative, ni avec les concentrations en bkv-miR-B1-3p ($r^2 = 0,009$; $p = 0,60$), ni avec les concentrations en bkv-miR-B1-5p ($r^2 = 0,010$; $p = 0,57$). En conclusion, lors de l'analyse transversale de nos résultats, nous n'avons pas montré de relation systématique entre les concentrations en miARNs du BKPyV et le ratio des taux d'expression d'ARNm de VP1/AgT dans les urines de patients transplantés de rein.

L'intérêt principal de notre étude était de pouvoir mesurer les variations de niveau d'expression des différents marqueurs moléculaires du BKPyV au cours du suivi des patients transplantés de rein, de manière longitudinale. Ainsi nous avons analysé

qualitativement la cinétique des concentrations d'ADN, de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et du ratio ARNm VP1/AgT dans les urines des 31 patients de notre population d'étude. Les résultats pour les 8 patients contrôles sont représentés sur la Figure 17, tandis que les résultats des 23 patients en infection active à BKPyV sont regroupés dans la Figure 18.

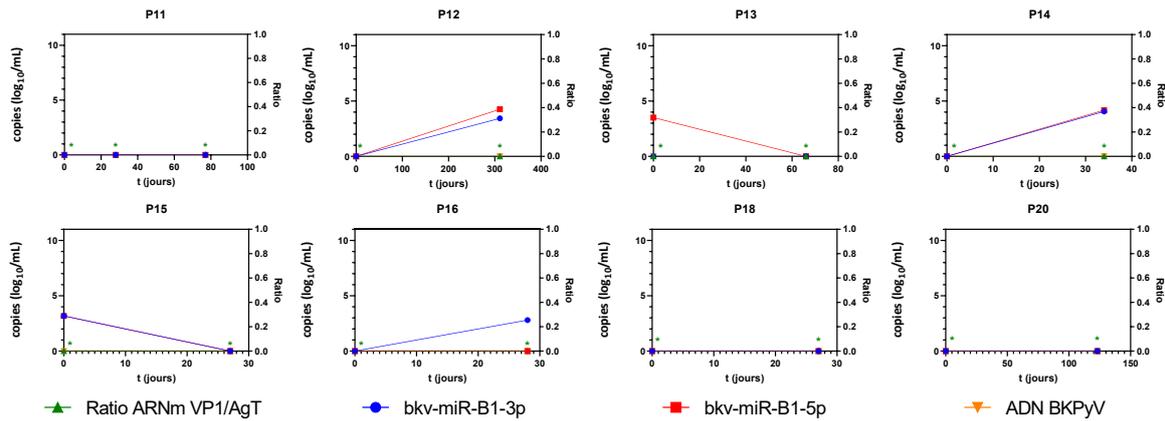


Figure 17: Cinétique au cours du temps post-greffe des concentrations d'ADN, de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et du ratio ARNm VP1/AgT du BKPyV dans les urines de 8 patients transplantés de rein n'ayant pas souffert d'une infection persistante à BKPyV. Les valeurs de ratio ARNm VP1/AgT (en vert) sont rapportées à l'axe des ordonnées de droite. Les valeurs de concentrations urinaires en ADN de BKPyV (en orange), en bkv-miR-B1-3p (en bleu) et en bkv-miR-B1-5p (en rouge) sont rapportées à l'axe des ordonnées de gauche. Les droites reliant les points sont de couleurs associées. Les « * » représentent les ratios ARNm VP1/AgT non calculables en raison d'indélectabilité de l'ARNm VP1 et de l'ARNm AgT.

Au sein des patients contrôles, l'ADN du BKPyV n'a jamais été détecté dans les urines des patients au cours du suivi post-greffe. Ceci explique également l'indélectabilité des ARNm de VP1 et AgT, marqueurs dont la spécificité pour l'ADN est de 100% d'après nos précédents résultats, et donc des ratios ARNm VP1/AgT incalculables pour tous les patients à chaque temps du suivi. En revanche, les bkv-miR-B1-3p et/ou bkv-miR-B1-5p ont pu être détectés en faibles quantités dans 5 urines provenant de 5 patients distincts. Ces détections ponctuelles isolées peuvent donc être le reflet du manque de spécificité des RT-PCR utilisées dans notre étude ou traduire un phénomène d'expression ou de stockage des miARNs viraux dans des cellules non infectées par le BKPyV.

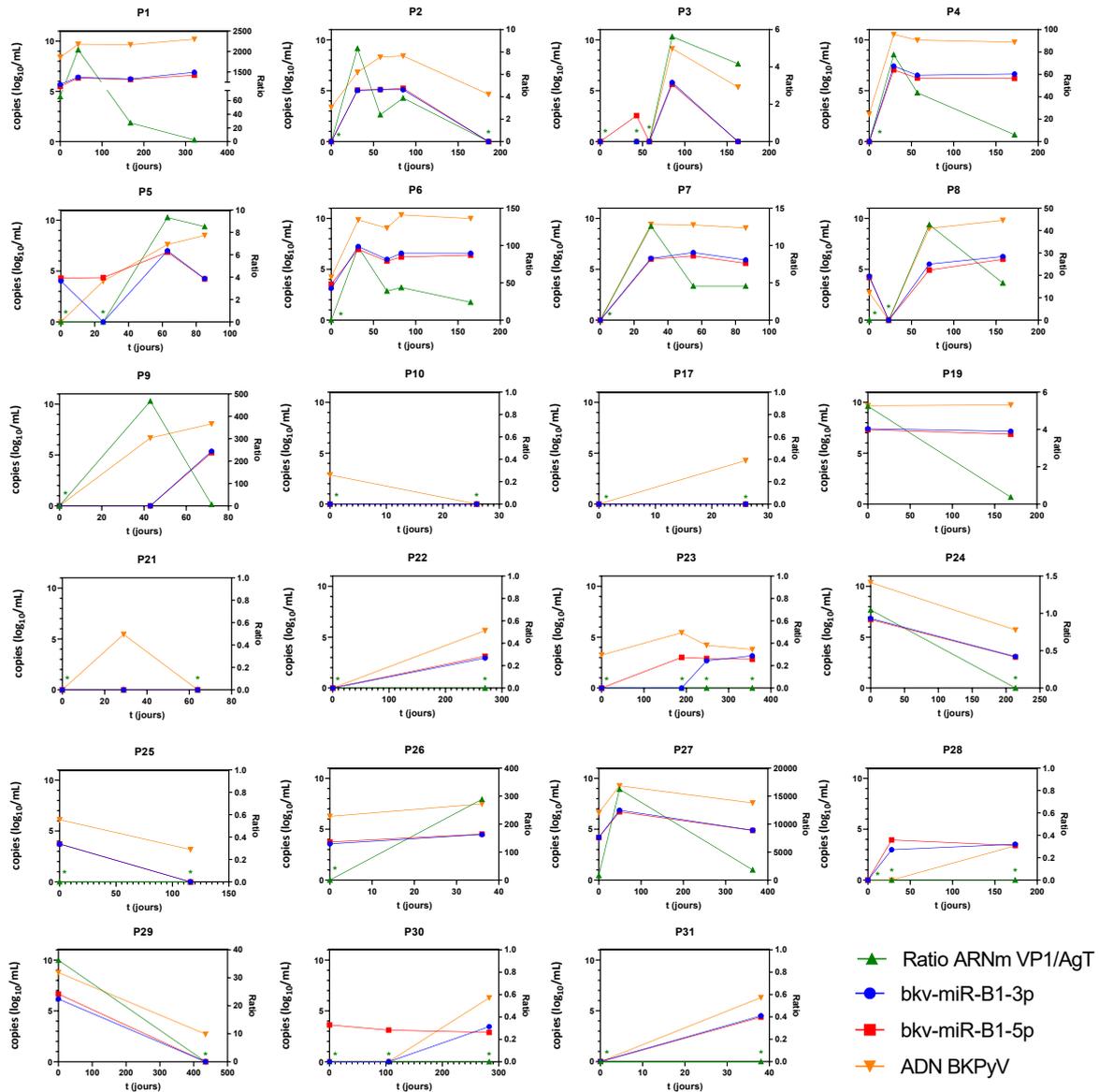


Figure 18: Cinétique au cours du temps post-greffe des concentrations d'ADN, de *bkv-miR-B1-3p*, de *bkv-miR-B1-5p* et du ratio ARNm VP1/AgT du BKPvV dans les urines de 23 patients transplantés de rein ayant souffert d'une infection persistante à BKPvV. Les valeurs de ratio ARNm VP1/AgT (en vert) sont rapportées à l'axe des ordonnées de droite. Les valeurs de concentrations urinaires en ADN de BKPvV (en orange), en *bkv-miR-B1-3p* (en bleu) et en *bkv-miR-B1-5p* (en rouge) sont rapportées à l'axe des ordonnées de gauche. Les droites reliant les points sont de couleurs associées. Les « * » représentent les ratios ARNm VP1/AgT ne sont pas calculables en raison d'indélectabilité de l'ARNm VP1 et de l'ARNm AgT.

L'analyse des résultats des patients ayant présenté une ADNurie au décours de la greffe rénale a été plus complexe, en raison d'une hétérogénéité dans les cinétiques des marqueurs. Pour les patients P10, P17, P21, P22, P28, P30 et P31, l'ADN du BKPvV n'a été détecté qu'une seule fois, avec une charge virale inférieure à 7 log₁₀ copies/mL et l'absence systématique d'ARNm de VP1 et d'AgT. Parmi ces 7 patients, les miARNs du BKPvV n'étaient pas détectables 3 fois, et retrouvés en faibles quantités pour le

patient P31 au même temps que la détection de l'ADN, et plus précocement pour le patient P28 avec une concentration équivalente retrouvée au temps suivant. Le patient P22 présentait cependant des variations d'expression similaires entre l'ADN et les miARNs. Le patient P30 présentait seulement des résultats contradictoires seulement pour le bkv-miR-B1-5p. Il est difficile de comprendre à partir de ce faible échantillonnage si les discordances sont dues à un défaut de performance de la PCR ADN BKPyV ou des RT-PCR miARN.

Les urines du patient P23 contenait des concentrations en ADN de BKPyV et en bkv-miR-B1-5p évoluant semblablement au cours du suivi. Le bkv-miR-B1-3p n'a été détecté que tardivement et les ARNm VP1 et AgT sont restés indétectables tout au long du suivi. Nous avons constaté que, pour les marqueurs détectés, les concentrations étaient relativement faibles, ce qui peut expliquer un défaut de sensibilité pour le bkv-miR-B1-3p et/ou des ARNm VP1 et AgT en cas de niveaux d'expression proches de la limite de détection.

Il a été retrouvé une cinétique similaire des différents marqueurs pour les patients P2, P3, P6, P24, P25, P27 et P29 en accord avec les données de corrélations générales retrouvées précédemment. Cependant, les ARNm de VP1 et AgT n'ont pas été détectés dans les différents échantillons du patient P25. Nous avons constaté pour le patient P5 une détection dans les urines des miARNs à J0 de la greffe malgré une négativité pour l'ADN et pour VP1/AgT. Puis les cinétiques de tous les marqueurs ont repris une évolution semblable, avant une diminution des miARNs et du ratio ARNm VP1/AgT, incompatible avec la poursuite de l'augmentation de l'ADNurie.

Concernant les patient P1, P4 et P19, alors que les concentrations en ADN et en miARNs restaient stables au cours du temps, le ratio ARNm VP1/AgT a atteint son apex en début d'infection avant de décroître brutalement. Ce type de décalage entre la cinétique du ratio ARNm VP1/AgT avec les autres marqueurs a aussi été observé pour les patients P7 et P8. Le patient P9 a semblé présenter ce genre de discordance mais l'absence d'échantillon d'urine correspondant aux temps de suivi consécutifs ne

permet pas de l'affirmer. Ces observations pourraient s'expliquer par une dégradation plus précoce des ARNm, moins stables, comparativement aux miARNs qui resteraient détectables à plus long terme et à des niveaux plus hauts dans les urines.

Le patient P26 présentait l'ADN et les 2 miARNs du BKPyV dans ses urines le jour de la greffe. Les concentrations de ces 3 marqueurs ont légèrement augmenté sur la période des 37 jours suivants. Les ARNm de VP1 et AgT étaient indétectables à J0 avant d'apparaître à J37.

L'ensemble de ces résultats confirment donc l'intérêt potentiel de la quantification des miARNs dans les urines de patients transplantés de rein. Les tests, encore peu performants et non optimisés, ne permettent pas d'entrevoir de perspective d'application concrète en usage médical. La mesure des taux d'expression des ARNm viraux, tels que ceux transcrits depuis les gènes de VP1 et de l'AgT, ne semblent pas appropriés à partir d'échantillons cliniques. La faible stabilité établie des ARNm entraîne trop de risques de biais liés à leur dégradation précoce. De plus, leur quantification dans un liquide biologique nécessite de concentrer des cellules en suspension afin d'augmenter la sensibilité. Or ce procédé alourdit le pré-traitement des échantillons et questionne sur la pertinence biologique et la variabilité inter-échantillons dans la mesure où les urines sont habituellement pauvres en cellules, qui ne proviennent d'ailleurs pas toutes de tissus infectés par le BKPyV. En revanche, contrairement à notre hypothèse de départ, il n'a pas été retrouvé d'association, positive ou négative, entre les niveaux d'expression des miARNs du BKPyV et le ratio des concentrations en ARNm VP1/AgT. Cette absence d'association était retrouvée en analysant de manière globale l'ensemble des résultats, mais aussi en analysant individuellement les différents cas. En effet, les sens de variations des différents marqueurs étaient très hétérogènes avec autant de changements discordants que similaires.

b. Cinétique et intérêt diagnostique de la quantification des miARNs du BKPyV chez les patients transplantés de rein

Les résultats de la partie précédente ne montrant pas d'intérêt particulier à quantifier l'ARNm de VP1 et AgT dans les culots cellulaires provenant d'urines, nous avons décidé de nous focaliser sur la quantification des miARNs bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p. Les miARNs étant sensiblement présents et stables dans les liquides biologiques extra-cellulaires, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode de purification et de quantification des miARNs du BKPyV dans les urines, ne nécessitant pas d'étapes laborieuses et peu standardisables de récupération de culots cellulaires. Cette nouvelle méthode a été utilisée pour analyser de nouveaux prélèvements d'urine, mais aussi de plasma, provenant des patients transplantés rénaux du CHU Amiens-Picardie.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Viruses* en février 2021 (109).

Article

BK Polyomavirus Micro-RNAs: Time Course and Clinical Relevance in Kidney Transplant Recipients

Baptiste Demey^{1,2,*}, Véronique Descamps^{1,2}, Claire Presne³, Francois Helle^{1,2} , Catherine Francois^{1,2}, Gilles Duverlie^{1,2}, Sandrine Castelain^{1,2} and Etienne Brochot^{1,2,*} 

- ¹ Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-80000 Amiens, France; descamps.veronique@chu-amiens.fr (V.D.); francois.helle@u-picardie.fr (F.H.); catherine.francois@u-picardie.fr (C.F.); gilles.duverlie@u-picardie.fr (G.D.); sandrine.castelain@u-picardie.fr (S.C.)
- ² UR UPJV 4294, Agents Infectieux, Résistance et Chimiothérapie (AGIR), Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, F-80000 Amiens, France
- ³ Service de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-80000 Amiens, France; presne.claire@chu-amiens.fr
- * Correspondence: demey.baptiste@chu-amiens.fr (B.D.); etienne.brochot@u-picardie.fr (E.B.)

Abstract: Background: Kidney transplant recipients (KTRs) are exposed to a high risk of BK polyomavirus (BKPyV) replication, which in turn may lead to graft loss. Although the microRNAs (miRNAs) bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p are produced during the viral cycle, their putative value as markers of viral replication has yet to be established. In KTRs, the clinical relevance of the changes over time in BKPyV miRNA levels has not been determined. Methods: In a retrospective study, we analyzed 186 urine samples and 120 plasma samples collected from 67 KTRs during the first year post-transplantation. Using a reproducible, standardized, quantitative RT-PCR assay, we measured the levels of bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p (relative to the BKPyV DNA load). Results: Detection of the two miRNAs had low diagnostic value for identifying patients with DNAemia or for predicting DNAuria during follow-up. Seven of the 14 KTRs with a sustained BKPyV infection within the first year post-transplantation showed a progressive reduction in the DNA load and then a rapid disappearance of the miRNAs. DNA and miRNA loads were stable in the other seven KTRs. Conclusions: After the DNA-based diagnosis of BKPyV infection in KTRs, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels in the urine might be valuable markers for viral replication monitoring and thus might help physicians to avoid an excessive reduction in the immunosuppressive regimen.

Keywords: polyomavirus BK; BKPyV; microRNA; kidney transplantation



Citation: Demey, B.; Descamps, V.; Presne, C.; Helle, F.; Francois, C.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Brochot, E. BK Polyomavirus Micro-RNAs: Time Course and Clinical Relevance in Kidney Transplant Recipients. *Viruses* **2021**, *13*, 351. <https://doi.org/10.3390/v13020351>

Academic Editor: Valeria Pietropaolo

Received: 31 December 2020

Accepted: 22 February 2021

Published: 23 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

BK polyomavirus (BKPyV) is a ubiquitous virus with a high seroprevalence in the general population [1]. After a frequently asymptomatic primary infection (caused by respiratory or oral-fecal transmission), BKPyV continues to replicate inconspicuously in urinary tract tissues. In the event of immunosuppression (as occurs in kidney transplant recipients (KTRs)), the risk of viral replication may increase [2]. Given the absence of preventive or curative antiviral treatment, a reduction in the immunosuppressive regimen decreases the risk of progression to polyomavirus-associated nephropathy (PyVAN) but accentuates the risk of graft rejection. A BKPyV DNA PCR assay is the standard method to diagnose and then monitor viral replication in KTRs [3]. Many studies have highlighted the benefits of BKPyV screening in the urine of KTRs to prevent PyVAN because viruria precedes BKPyV-DNAemia, especially for high-level viruria, when the urine BKPyV DNA load is higher than 7 log₁₀ copies/mL [4]. Once BKPyV-DNAemia is proven, BKPyV DNA monitoring is less relevant in urine than in plasma. Moreover, the presence of BKPyV DNA is not always a sign of active viral replication, and DNA can sometimes

be detected when defective virions are shed. Since KTRs are exposed to risk factors for kidney tissue damage [5], non-replicative BKPyV particles from dying cells might be released in the urine. Furthermore, slowly decreasing DNA concentrations can be detected in the urine for a long time after the diagnosis of BKPyV replication and the reduction in immunosuppression. In the absence of a clear DNA cut-off for a return to the initial immunosuppressive regimen, we need a specific, noninvasive marker of BKPyV replication so that full immunosuppression can be rapidly restored once the infection is under control.

Over the past few years, micro-RNAs (miRNAs, typically comprising 20–22 nucleotides) have emerged as promising diagnostic or prognostic markers for several diseases, including viral infections [6]. miRNAs can regulate protein expression by either binding directly to mRNA or by inhibiting the translational process through an RNA-induced silencing complex. BKPyV generates two mature miRNAs (bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p) during its replicative cycle, whose expression is driven by the Non-Coding Control Region (NCCR) [7]. The two miRNAs' roles in the BKPyV life cycle are not well understood. Both miRNAs can induce the cleavage of BKPyV large tumor antigen (TA_g) mRNA, which results in the autoregulation of viral replication. bkv-miR-B1-3p is also involved in escaping the immune response by targeting ULBP3 [8–10]. In vivo, BKPyV miRNAs have been found in various biological fluids, including urine, serum, plasma, and cerebrospinal fluid [11]. It has been reported that the BKPyV miRNA urine level is correlated with the BKPyV DNA load in KTRs. Moreover, BKPyV miRNAs may be useful non-invasive diagnostic markers for PyVAN [12]. However, data on BKPyV miRNAs in vivo are still scarce and are not easily comparable because the biological matrices (exosomes, cell pellets, or native urine) and the standardization methods differ from one study to another.

At present, the management of BKPyV infections in KTRs is based on periodic monitoring and early diagnosis. Then, the patient's treatment is adapted in order to prevent irreversible tissue damage by PyVAN. DNA can be found in tissues and fluids even when viruses are inactive whereas miRNAs need an active viral cycle to be generated. Given that miRNAs might be more specific than DNA for viral replication, we hypothesized that measuring bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels in urine and/or plasma might help to track BKPyV infection changes over time in KTRs. Previous studies have measured BKPyV miRNA loads at single time points but not their changes over the course of the infection. Using standard literature methods, we developed an easy-to-use, reproducible RT-PCR assay to quantify BKPyV miRNA levels in urine and plasma.

In the present retrospective study, we measured BKPyV miRNAs in 186 urine samples obtained at various time points post-transplantation from 43 KTRs. The aim of the study was to determine thresholds of bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p amounts which could be used to predict, diagnose and monitor BKPyV replication in KTRs.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Cohort

The study population comprised all the patients ($n = 67$) having undergone kidney transplantation between 5th July 2017, and 5th July 2018, at the Amiens University Medical Center (Amiens, France). The other main inclusion criteria were age 18 or older and regular follow-up at the medical center during the first year post-transplantation. Patients who experienced graft failure (transplant removal or requirement for dialysis) or who died during the follow-up period were excluded. Nineteen patients showed BKPyV DNA in urine during this period (hereafter referred to as "BKU cases"); of these, 17 had progressed to proven BKPyV-DNAemia ("BKP cases"). Twenty-four of the 48 patients with no BKPyV DNA detected during the first-year post-transplantation were randomly selected as controls. The present retrospective study was based on prospectively collected, de-identified biological samples and clinical information for the 43 selected KTRs (19 BKU cases and 24 controls). A total of 186 urine samples and 120 plasma samples were analyzed. The investigators who assayed the pairs of concomitantly collected urine and plasma samples for BKPyV miRNAs were blinded to the patients' medical history and the BKPyV-

DNAemia results. Regardless of case classification, the patients were categorized at each time point as U–P– (undetectable BKPyV DNA in urine and plasma), U+P+ (DNA in both the urine and plasma), or U+P– (DNA just in the urine). The samples were specimen overages obtained during standard care for KTRs at the Amiens University Medical Center. Demographic and clinical information was extracted from the medical center’s electronic medical records. In line with the French legislation on retrospective studies of routine clinical practice, approval by an institutional review board was not required. However, the study was registered with the French National Data Protection Commission (Commission nationale de l’informatique et des libertés (Paris, France)).

2.2. Nucleic Acid Extraction

Viral DNA was extracted from 200 μ L of urine or plasma. 5 μ L of a specific internal inhibition control (IC) was added to the lysis buffer and simultaneously purified with viral DNA by using specific protocol B in the NucliSENS easyMAG system (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France). The extracted DNA was eluted with 50 μ L of elution buffer and frozen at -80 °C before use.

miRNAs were extracted from 400 μ L of urine or plasma with miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The cel-miR-39 (miRBase accession number: MI0000010) was used as an IC and the standard for result normalization. cel-miR-39 (reference: MC10956) was obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). 5.6×10^8 copies of cel-miR-39 were added to each sample, as recommended by the manufacturer. The nucleic acids were extracted with a Qiacube device (Qiagen), according to the manufacturer’s protocol. The miRNAs were eluted with 30 μ L of RNase-free water, and the solution was frozen at -80 °C before use.

2.3. Real-Time PCR Assay for BKPyV DNA

BKPyV DNA was amplified and quantified with a RealStar BKV PCR Kit (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany), as described previously [13].

2.4. miRNA RT-PCR Assay

All the kits, standards and thermocyclers used for the miRNA RT-PCR assays were supplied by Applied Biosystems.

Reverse transcription (RT): TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit was used to reverse-transcribe BKPyV miRNAs and an IC, according to the manufacturer’s instructions. RT primers for miRNAs were provided with specific TaqMan MicroRNA Assays: 006801_mat for bkv-miR-B1-3p, 007796_mat for bkv-miR-B1-5p, and 000200 for cel-miR-39. For each miRNA and each sample, RT was performed with 5 μ L of miRNA-enriched eluate and 10 μ L of RT mix (prepared as recommended by the manufacturer). RT reactions were performed with a Veriti thermocycler, in accordance with the kit’s instructions. Complementary DNA (cDNA) specimens were frozen at -20 °C before use.

Real-time PCR: the reaction mix contained 1 μ L of TaqMan MicroRNA Assay probes, 10 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix, 7 μ L of RNase-free water, and 2 μ L of cDNA specimen. Real-time PCRs were performed in 96-well plates with the ABIPRISM 7900HT Sequence Detection System, as indicated in the TaqMan MicroRNA Assays manual. Signals were measured and analyzed using SDS 2.4.1 software (Applied Biosystems). Quantities in eluate were calculated from the cycle threshold (Ct) results, relative to standards diluted in the concentration range 3×10^1 to 3×10^7 molecules/microliter. The standards were the synthetic oligonucleotide sequences of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p and cel-miR-39 (respectively UGCUUGAUCCAUGUCCAGAGUC, AUCUGAGACUUGGGAAGAGCAU and UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG; catalog numbers: MC14566, MC14356, and MC10956). The limit of detection for BKPyV miRNA in clinical samples was set to 1500 copies per reaction (i.e., 3.6 log₁₀ copies per mL of the clinical sample), which corresponds to the minimal quantity of miRNA detected with reproducible signals after extraction and RT-PCR of 400 μ L of a standard solution. The results were first normalized

as the “quantity of cel-miR-39 in the miRNA-enriched eluate/standard quantity added before extraction (5.6×10^8 copies)” ratio and then expressed as the number of copies (or \log_{10} copies) per mL of urine or plasma.

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Correlations between parameters were studied with Pearson’s test. The student’s t-test was carried out if the data were normally distributed; if not, a non-parametric Kruskal–Wallis test was performed. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated according to the Wilson/Brown method. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Case-Control Analysis

The included patients were aged between 27 and 76 (median age: 55; mean age: 53.95), and the male:female ratio was 1.69:1. Analysis of the 186 urine specimens collected from the 43 KTRs revealed that BKPyV miRNAs were often not detected in the urine even when DNA was found: 29 of the 67 DNA-positive specimens tested negative for both miRNAs. In contrast, small quantities of BKPyV miRNAs were frequently observed in the immediate post-transplantation period (day 0 to 15), while the BKPyV DNA PCR assay was negative. Clinical data for controls, “BKU” cases (who showed BKPyV DNA in urine samples during the follow-up) and “BKP” cases (for whom BKPyV infection progressed to DNAemia) are summarized in Table 1. There was no statistically significant intergroup difference between cases and controls with regard to age, sex ratio, induction therapy (basiliximab vs. antithymocyte globulin) or maintenance treatment (tacrolimus vs. cyclosporine). Noteworthy, early detection of BKPyV miRNAs in urine between day 0 and day 15 post-transplantation was not associated with a higher risk of subsequent DNAuria (odds ratio (OR) [95% confidence interval (CI)] = 1.688 [0.507–6.376]) or DNAemia (OR [95% CI] = 1.143 [0.318–4.4351]) (not represented in Table 1).

Table 1. Clinical data for kidney transplant recipients (KTRs).

Patients	Controls	Cases		p Value	
		BKU	BKP	Controls vs. BKU	Controls vs. BKP
n (total = 43)	24	19	17		
Age (mean \pm SEM)	52.29 \pm 2.66	56.05 \pm 3.30	58.00 \pm 3.28	0.375	0.182
Male:female sex ratio	1.4	2.17	2.4	0.542	0.52
Induction therapy Basiliximab (vs. ATG)	16 (vs. 8)	9 (vs. 10)	8 (vs. 9)	0.23	0.335
Maintenance therapy Tacrolimus (vs. Cyclosporine)	21 (vs. 3)	19 (vs. 0)	17 (vs. 0)	0.242	0.254

Controls: patients without a diagnosis of BKPyV replication during the follow-up. BKU: patients with BKPyV DNAuria during the follow-up. BKP: patients with proven BKPyV-DNAemia during the follow-up (all of whom were included in the BKU group). SEM: standard error of the mean.

3.2. Urine BKPyV miRNA Levels Are Less Accurate than DNA Levels as Marker of DNAemia

To date, PyVAN prevention is based on testing urine samples for high-level viraemia [3]. This non-invasive screening option had a high negative predictive value. A viral load higher than $7 \log_{10}$ copies/mL in the urine discriminated between patients with vs. without proven BKPyV-DNAemia [4]. To the best of our knowledge, the diagnostic value of using a BKPyV miRNA RT-PCR test to assay urine samples has not previously been evaluated. We analyzed bkV-miR-B1-3p, bkV-miR-B1-5p and BKPyV DNA concentrations in urine as a function of the corresponding plasma DNA status (patients: U+P+; or controls: U+P-)

at the time of sampling and then plotted the associated ROC curves (Figure 1). The area under the curve (AUC) was high and statistically significant for both bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p (0.7928, $p < 0.001$; 0.7091, $p = 0.015$, respectively). bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels showed similar specificity, but bkv-miR-B1-3p was more sensitive as a marker of DNAemia. Compared to bkv-miR-B1-5p, bkv-miR-B1-3p average level was higher and might explain the better sensitivity performance to predict BKPyV-DNAemia. However, the BKPyV miRNA levels were less able than the urine DNA level (AUC = 0.9367, $p < 0.001$) to distinguish between patients with vs. without BKPyV-DNAemia (Table S1). The RT-PCR results showed that urine bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p concentrations were higher in KTRs with BKPyV-DNAemia (U+P+) than in KTRs without (U+P-) (Figure S1A). As expected, the urine levels of BKPyV DNA, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p were correlated with the plasma BKPyV DNA level (Figure S1B). Hence, quantification of bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p in urine is less useful than BKPyV DNA loads for the diagnosis of BKPyV-DNAemia and the prevention of PyVAN.

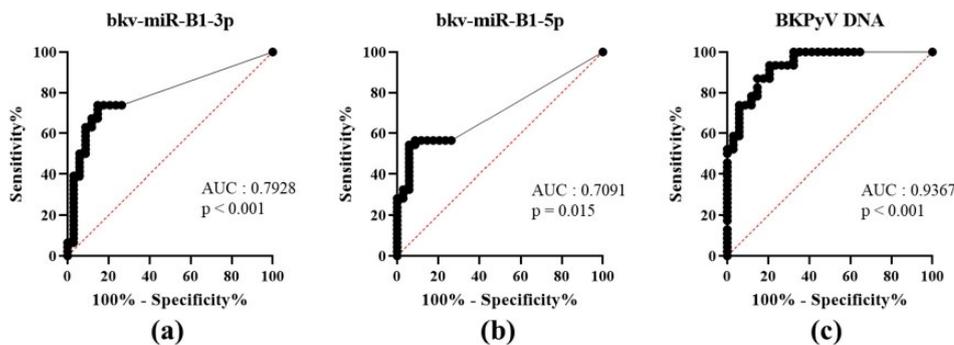


Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curves for urine levels of bkv-miR-B1-3p (a), bkv-miR-B1-5p (b) and BKPyV DNA (c) in KTRs with (patients) vs. without (controls) BKPyV DNAemia at the time of sampling. AUC: area under the curve.

3.3. BKPyV miRNAs: Changes over Time Following Kidney Transplantation

The 43 KTRs of the study cohort had provided samples on a regular basis throughout the first 12 months post-transplantation. Fourteen of the 19 BKU cases were diagnosed with sustained BKPyV infection (two or more consecutive detections of BKPyV-DNA) during this period. Firstly, we quantified the patients' urine and plasma levels of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p, and BKPyV DNA at different time points (Figure 2). Overall, the changes over time were similar for miRNAs and DNA, and the two concentrations peaked at the same time. Furthermore, bkv-miR-B1-3p was detected more readily than bkv-miR-B1-5p in urine: the bkv-miR-B1-3p concentration was always higher than the bkv-miR-B1-5p concentration, and bkv-miR-B1-3p was sometimes present when bkv-miR-B1-5p was not (at month 3 for patient 26, for example). In contrast, more plasma samples were positive for bkv-miR-B1-5p (21 out of 57) than for bkv-miR-B1-3p (15 out of 57). Interestingly, the urine levels of BKPyV miRNAs fell rapidly (sometimes to zero) in the 7 patients who presented a slight decrease in the DNA load after immunosuppression reduction (P8, P22, P26, P27, P35, P37 and P42) (Figure 2A). In these cases, BKPyV DNA cleared slowly and was detected long after the miRNAs had disappeared. For example, P22 clearly showed a rapid fall to zero of urine miRNA levels 3 months after BKPyV infection diagnosis and immunosuppression reduction. Meanwhile, gold standard plasma DNA qPCR remained positive 6 months and slowly decreased. The profiles of the curves for P8, P27 and P42 differed marginally from the others. BKPyV-DNAemia seemed to appear at month 6 post-transplantation when BKPyV-DNAuria regressed, and miRNAs disappeared for P8. This might be explained by a missing plasma sample before the 6th month, when plasmatic BKPyV-DNA level was higher than 1 log₁₀ copies/mL. BKPyV-DNAuria and BKPyV-DNAemia barely declined

through time for P27 and P42 but BKPyV-DNA load was negative in plasma at month 14 (data not shown). As for P8, we hypothesized that a missing higher DNA load peaked in plasma within these periods but could not be observed. For 7 other BKU cases, DNA and miRNA loads in urine remained stable and kinetics were parallel (Figure 2B). Singular kinetics were found for P26: a low bkv-miR-B1-3p level was detected at the same time as the highest DNA loads in urine and plasma. After this time, BKPyV miRNAs were undetectable but DNA persisted in urine and plasma until month 15 (time point not shown on Figure 2B), which explained P26 classification as one of the 7 stable patients. Low miRNA level, below the limit of detection, was a presumed rationale. For the other 5 BKU patients, BKPyV DNAuria was diagnosed during the 12th-month post-transplantation and could not be included in the primary analysis of sustained BKPyV infections during the 1-year follow-up period. We were therefore able to obtain urine specimens collected 1 to 4 months after the first detection of BKPyV. Four of the 5 patients presented a low DNA load and no bkv-miR-B1-3p (Figure S3). These extended experiments thus confirmed our primary observations. Ultimately, we found that the time course of miRNA levels differed from that of DNA in most KTRs with sustained BKPyV replication. Given that miRNAs are more specific markers of active replication than viral DNA, we suggest that miRNA monitoring might be more useful than DNA to track the BKPyV replication standstills after immunosuppressant dose reduction in KTRs.

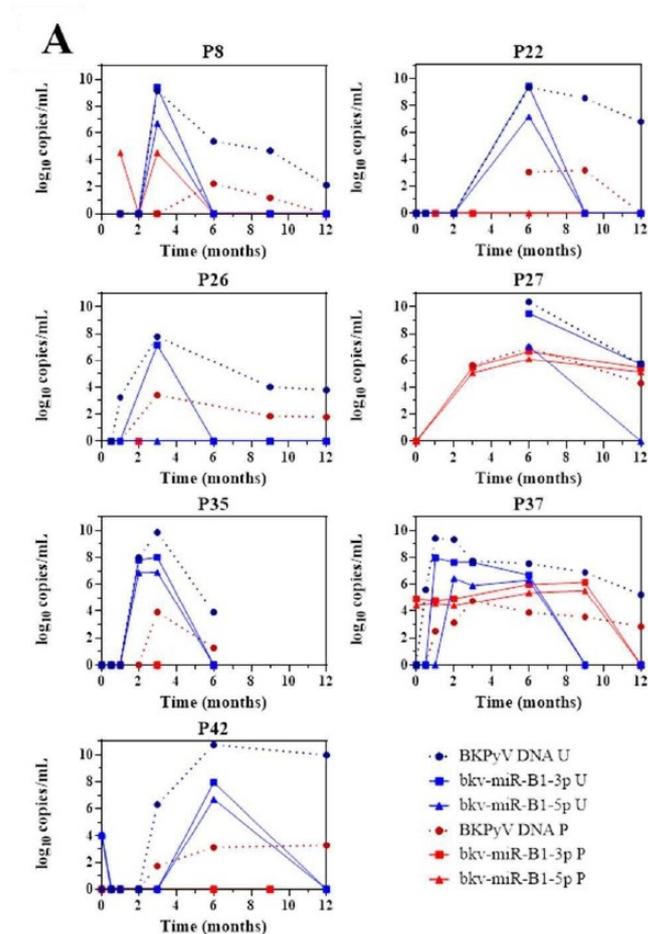


Figure 2. Cont.

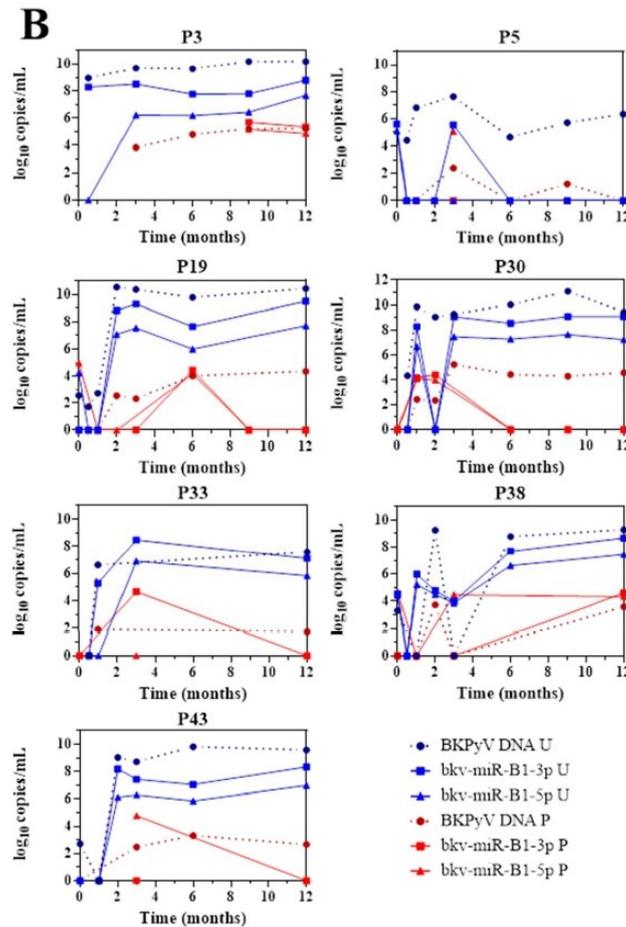


Figure 2. Changes over time of BKPyV markers (DNA, bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p) in urine (U) and plasma (P) among 14 patients who developed BKPyV infection during the year after kidney transplantation. (A) Patients with a fall in the DNA load after immunosuppressant dose reduction. (B) Patients with a stable DNA load after immunosuppressant dose reduction.

4. Discussion

The roles of bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p in the pathophysiology of BKPyV infection are not well understood, and so the interpretation of their presence and levels in vivo is challenging. Previous research highlighted the presence of BKPyV miRNAs in specific matrices (exosomes, cell pellets from urine, or plasma) but focused on precise stages of the disease (BKPyV-DNAemia or PyVAN) [8,14–16]. Here, we developed a standardized method to easily measure BKPyV miRNA concentrations in non-preprocessed biological fluids, in order to evaluate the analytes’ diagnostic and prognostic value. The analysis of whole urine and whole plasma was preferred to the analysis of enriched exosomal fractions to avoid bias. In fact, the literature does not contain any data about the percentage of extracellular BKPyV miRNAs included in exosomes. Surprisingly, we were not confronted with the false—positive RT-PCRs (Ct > 35 for control reactions with no template) previously described for the same assay kit [11,12]. We retrospectively analyzed 186 urine samples and 120 plasma samples collected from 43 KTRs over the course of the first 12 months post-transplantation. This constituted the largest cohort of specimens and patients assessed for BKPyV miRNAs. As mentioned in the Introduction, the objective of the present study

was to evaluate changes over time in bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p RT-PCR results during the first 12 months post-transplantation and thus throughout the different stages of BKPyV replication. Like Huang et al., we found that the urine miRNA concentrations were higher in patients with proven BKPyV-DNAemia than in patients without [12]. We also confirmed that the bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels in urine correlated with BKPyV DNA levels in urine and plasma. While Huang et al. did not detect BKPyV miRNAs in plasma; we observed bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p in respectively 15 and 21 of the 57 plasma samples from the 14 patients with sustained BKPyV replication. We found that plasma BKPyV DNA levels correlated with plasma bkv-miR-B1-3p levels but not with plasma bkv-miR-B1-5p levels (Figure S2). This observation mainly results from three positive bkv-miR-B1-5p RT-PCR assays in plasma samples from patients without DNAemia. We were not able to determine whether these were true or false positives. On one hand, a false-positive RT-PCR test might be caused by the presence of interferents in the plasma. On the other hand, a negative miRNA RT-PCR test in a plasma sample from a viremic patient might be due to insufficient sensitivity or to declining viral replication. As we suggest that BKPyV miRNA and DNA levels provide different information about the infection, our experiments cannot solve this problem for the moment.

We noticed that with regard to urine samples, 46% of the KTRs were positive for BKPyV miRNAs but negative for viral DNA during the first two weeks post-transplantation. This period follows induction therapy and features the highest doses of immunosuppressive maintenance therapy—providing a “breeding ground” for viruses like BKPyV. We hypothesized that BKPyV miRNAs might be valuable markers of viral replication and thus might enable early diagnosis. However, the detection of bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p in urine before day 15 post-transplantation was not associated with a higher risk of subsequent BKPyV DNAuria.

We next compared the urine BKPyV miRNA and DNA levels with the plasma DNA levels. This enabled us to compare urine miRNA screening with urine DNA screening—one of the most common means used to prevent PyVAN in KTRs. Urine miRNA screening was less efficient than urine DNA screening to diagnose DNAemia, with sensitivities of 73.3%, 55.6% and 100% for bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p, and BKPyV DNA, respectively. However, the specificity was above 80% for both bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p—even at low miRNA concentrations. Better BKPyV miRNA purification and RT-PCR is required before this method can be considered as a replacement for BKPyV DNA screening in urine.

As already mentioned in the literature, BKPyV miRNA assays might be of value for monitoring BKPyV infections [12]. The presence of miRNAs reflects gene expression, whereas the presence of DNA might correspond to the clearance of defective virions or the passive shedding of latently infected cells into the urine. TA_g or VP1 mRNAs were also candidates for replication monitoring but they are less resistant in the extracellular environment. miRNA quantification is more practical because it requires fewer preprocessing steps and can be performed on the sample used for DNA analysis [17,18]. At present, the only treatment for BKPyV replication in a KTR is an immunosuppressant dose reduction, which increases the risk of graft rejection. Physicians lack a specific marker of a controlled infection and thus the opportunity to restore a full immunosuppressive regimen. Our results highlighted that of the 14 patients who showed sustained BKPyV replication before the 12th-month post-transplantation, seven controlled the replication: the BKPyV DNA level fell progressively after the dose reduction. All seven patients cleared BKPyV miRNAs quickly, which might indicate that viral replication had already stopped. Four of the other five BKU cases showed similar changes over time but the observation period was shorter and the changes (based on just two measurement time points) were not as well-defined. Martelli et al. reported similar variations over-time for the BKPyV DNA load and exosomal bkv-miR-B1-5p levels in urine samples from multiple sclerosis patients, depending on NCCR rearrangements [16]. Even for the seven patients with stable DNA loads through time, none of the included KTRs developed a proven PyVAN in the present study. The missing samples and restricting information about treatment adjustment limited

our analyses of changes over time for BKPyV markers. Further prospective studies focusing on peaks and troughs in BKPyV markers, and NCCR rearrangements through time in a larger cohort of KTRs might provide more robust evidence. In the future, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p might constitute predictive markers of a slowing or standstill in viral replication, in addition to gold-standard BKPyV DNA qPCR assay. Therefore, BKPyV miRNAs might be interesting indicators to evaluate the infection prognosis. If so, this would help physicians to limit the duration of immunosuppressant dose reduction, even when the BKPyV DNA titer is still high.

An important issue of BKPyV miRNA screening is the identical structure between bkv-miR-B1-3p and jcv-miR-J1-3p, a mature miRNA produced by JC Polyomavirus (JCPyV). Given that bkv-miR-B1-3p was more often detected than bkv-miR-B1-5p in urine of KTRs, we checked in the samples whether JCPyV DNA was also detectable. We only found JC polyomavirus DNA in two samples (both from the same patient); it was associated with urine bkv-miR-B1-3p concentrations of 7.8 and 6.3 log₁₀ copies/mL while bkv-miR-B1-5p and BKPyV DNA were undetectable. Thus, bkv-miR-B1-3p should not be screened if not associated with bkv-miR-B1-5p RT-PCR assay. Moreover, simultaneous shedding of JCPyV and BKPyV DNA in urine is rare [19]. After the initial diagnosis of BKPyV infection based on viral DNA detection, a combined bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p monitoring would not be affected by false-positive results and interpretation issues caused by a presumed simultaneous JCPyV infection. Nevertheless, the discordance between bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels in a sample could be caused by the inconsistent performance of the two RT-PCR assays, as for P19 and P30. An enhancement of sensitivity performance of bkv-miR-B1-5p RT-PCR assay is needed to make it a specific and valuable single marker of active BKPyV replication. In fact, the low sensitivity of bkv-miR-B1-5p RT-PCR might induce false negative results which could be misinterpreted as a shutdown BKPyV replication. There is a probability that concerned the results for P27 at month 12.

Recent research has clarified the diagnostic utility of miRNAs for BKPyV replication in KTRs. The value for PyVAN diagnosis has already been described. Here, we studied the value of BKPyV miRNAs for early diagnosis and specific monitoring of active viral replication. Our results revealed urine bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p levels are potential markers of viral replication in KTRs, but currently have low diagnostic value. However, these markers might enable a more rapid re-establishment of the full immunosuppressive regimen after BKPyV control and might thus prevent graft rejection. Given that BKPyV can be cultured *in vitro* for several weeks, long-term culture experiments might confirm our present *in vivo* observations in a large cohort of KTRs; [20]. The quantification of miRNAs and DNA in cells and conditioned media might help to characterize the changes over time in these markers and thus confirm the phenomena observed in the present clinical study.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/2/351/s1>, Figure S1: Urine levels of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p and BKPyV DNA when BKPyV DNA was also found in plasma (U+/P+) at the same time or not (U+/P-), Figure S2: Correlation between the plasma BKPyV DNA load and the plasma concentration of bkv-miR-B1-3p or bkv-miR-B1-5p, Figure S3: Changes over time in levels of BKPyV markers in urine (U; DNA, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p) and plasma (P; DNA) for 4 KTRs who developed BKPyV replication 12 months post-transplantation Table S1: Sensitivity and specificity analyses for urine levels of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p and BKPyV DNA in KTRs with (patients) or without (controls) BKPyV DNAemia at the time of sampling.

Author Contributions: Conceptualization, B.D. and E.B.; data curation, C.P.; formal analysis, B.D.; funding acquisition, S.C.; investigation, B.D.; methodology, V.D.; project administration, G.D. resources, C.F.; software, F.H.; supervision, E.B.; validation, C.P., G.D. and S.C.; visualization, F.H.; writing—original draft, B.D.; writing—review and editing, E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Université de Picardie Jules Verne and the Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens (protocol code PI2021_843_0012, 15 December 2019).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived in line with the French legislation on retrospective studies of routine clinical practice.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Egli, A.; Infanti, L.; Dumoulin, A.; Buser, A.; Samaridis, J.; Stebler, C.; Gosert, R.; Hirsch, H.H. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis.* **2009**, *199*, 837–846. [[CrossRef](#)]
- Demey, B.; Tinez, C.; François, C.; Helle, F.; Choukroun, G.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Brochet, E. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. *J. Clin. Virol.* **2018**, *109*, 6–12. [[CrossRef](#)]
- Hirsch, H.H.; Randhawa, P.S.; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* **2019**, *33*, e13528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brochet, E.; Descamps, V.; Handala, L.; Faucher, J.; Choukroun, G.; Helle, F.; Castelain, S.; François, C.; Duverlie, G.; Touzé, A. BK polyomavirus in the urine for follow-up of kidney transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hultström, M.; Becirovic-Agic, M.; Jönsson, S. Comparison of acute kidney injury of different etiology reveals in-common mechanisms of tissue damage. *Physiol. Genom.* **2017**, *50*, 127–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gilad, S.; Meiri, E.; Yogev, Y.; Benjamin, S.; Lebanony, D.; Yerushalmi, N.; Benjamin, H.; Kushnir, M.; Cholakh, H.; Melamed, N.; et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sullivan, C.S.; Grundhoff, A.T.; Tevethia, S.; Pipas, J.M.; Ganem, D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **2005**, *435*, 682–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tian, Y.-C.; Li, Y.-J.; Chen, H.-C.; Wu, H.-H.; Weng, C.-H.; Chen, Y.-C.; Lee, C.-C.; Chang, M.-Y.; Hsu, H.-H.; Yen, T.-H.; et al. Polyomavirus BK-encoded microRNA suppresses autoregulation of viral replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *447*, 543–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Broekema, N.M.; Imperiale, M.J. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8200–8205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bauman, Y.; Nachmani, D.; Vitenshtein, A.; Tsukerman, P.; Drayman, N.; Stern-Ginossar, N.; Lankry, D.; Gruda, R.; Mandelboim, O. An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host Microbe* **2011**, *9*, 93–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pietilä, T.; Nummi, M.; Auvinen, P.; Mannonen, L.; Auvinen, E. Expression of BKV and JCV encoded microRNA in human cerebrospinal fluid, plasma and urine. *J. Clin. Virol.* **2015**, *65*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huang, Y.; Zeng, G.; Randhawa, P.S. Detection of BKV encoded mature MicroRNAs in kidney transplant patients: Clinical and biologic insights. *J. Clin. Virol.* **2019**, *119*, 6–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Descamps, V.; Martin, E.; Morel, V.; François, C.; Helle, F.; Duverlie, G.; Castelain, S.; Brochet, E. Comparative Evaluation of Three Nucleic Acid-Based Assays for BK Virus Quantification. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 3822–3827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, J.Y.Z.; McNicholas, K.; Yong, T.Y.; Rao, N.; Coates, P.T.H.; Higgins, G.D.; Carroll, R.P.; Woodman, R.J.; Michael, M.Z.; Gleadle, J.M. BK Virus Encoded MicroRNAs Are Present in Blood of Renal Transplant Recipients With BK Viral Nephropathy. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 1183–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, M.H.; Lee, Y.H.; Seo, J.-W.; Moon, H.; Kim, J.S.; Kim, Y.G.; Jeong, K.-H.; Moon, J.-Y.; Lee, T.W.; Ihm, C.-G.; et al. Urinary exosomal viral microRNA as a marker of BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0190068. [[CrossRef](#)]
- Martelli, F.; Wu, Z.; Delbue, S.; Weissbach, F.; Giulioli, M.; Ferrante, P.; Hirsch, H.; Giannecchini, S. BK Polyomavirus MicroRNA Levels in Exosomes Are Modulated by Non-Coding Control Region Activity and Down-Regulate Viral Replication When Delivered to Non-Infected Cells Prior to Infection. *Viruses* **2018**, *10*, 466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dadhania, D.; Snopkowski, C.; Ding, R.; Muthukumar, T.; Lee, J.; Bang, H.; Sharma, V.K.; Seshan, S.; August, P.; Kapur, S.; et al. Validation of noninvasive diagnosis of BK virus nephropathy and identification of prognostic biomarkers. *Transplantation* **2010**, *90*, 189–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Astegiano, S.; Bergallo, M.; Terlizzi, M.E.; Sidoti, F.; Gambarino, S.; Messina, M.; Costa, C.; Segoloni, G.P.; Cavallo, R. Combined measurement of serum DNA and urine VP1 messenger RNA in monitoring BK virus replication in kidney graft recipients. *Transplant. Proc.* **2011**, *43*, 1052–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Cheng, X.S.; Bohl, D.L.; Storch, G.A.; Ryschkewitsch, C.; Gaudreault-Keener, M.; Major, E.O.; Randhawa, P.; Hardinger, K.L.; Brennan, D.C. Inhibitory Interactions between BK and JC Virus among Kidney Transplant Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 825–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hanssen Rinaldo, C.; Hansen, H.; Traavik, T. Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain—A tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. *Arch. Virol.* **2005**, *150*, 1449–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Material :

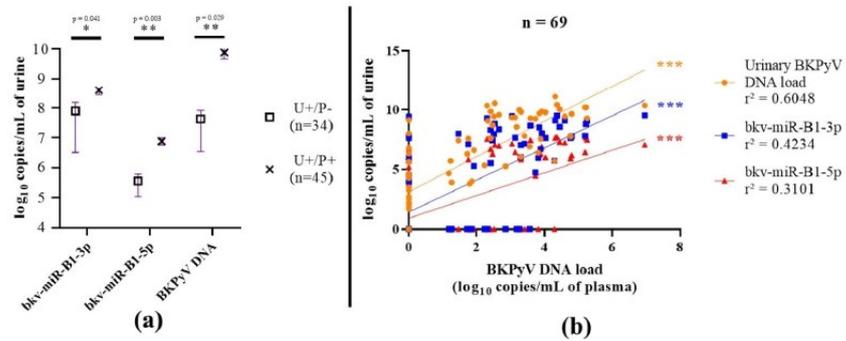


Figure S1. (a): Urine levels of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p and BKPyV DNA when BKPyV DNA was also found in plasma (U+/P+) at the same time or not (U+/P-). (b): Correlation between the plasma BKPyV DNA load and the urine concentration of three BKPyV markers (DNA, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p). *** indicates statistical significance with $p < 0.001$.

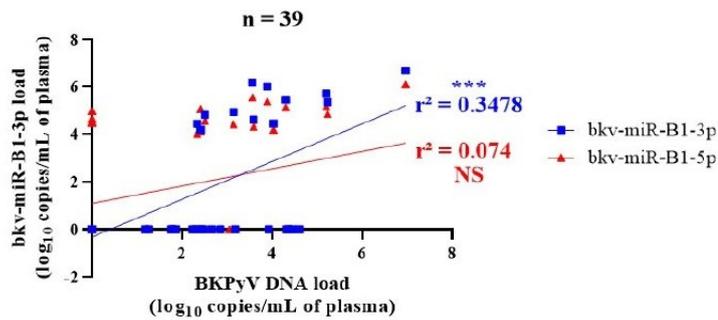


Figure S2. Correlation between the plasma BKPyV DNA load and the plasma concentration of bkv-miR-B1-3p or bkv-miR-B1-5p. *** indicates statistical significance with $p < 0.001$. NS: not significant.

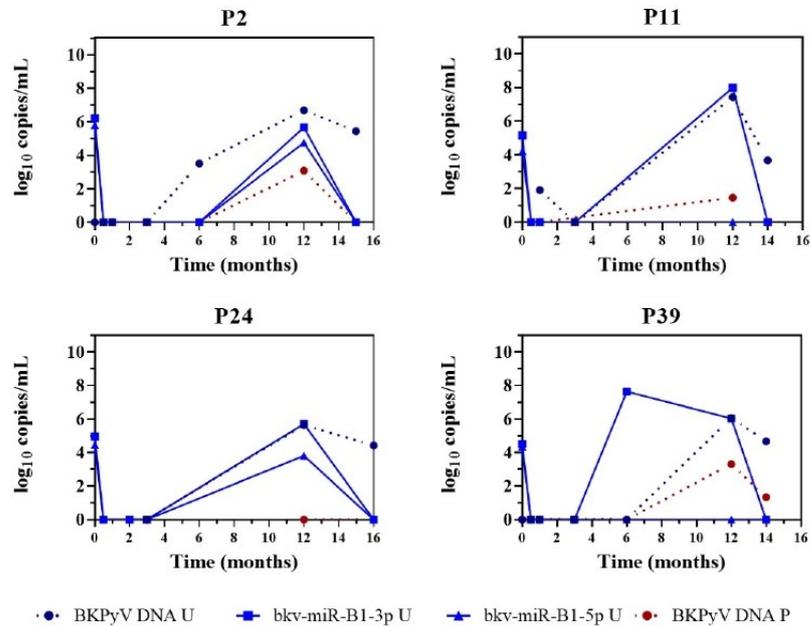


Figure S3. Changes over time in levels of BKPyV markers in urine (U; DNA, bkv-miR-B1-3p and bkv-miR-B1-5p) and plasma (P; DNA) for 4 KTRs who developed BKPyV replication 12 months post-transplantation.

		BKPyV marker		
		<i>bkv-miR-B1-3p</i>	<i>bkv-miR-B1-5p</i>	<i>BKPyV DNA</i>
Maximum sensitivity	Sensitivity	73.3 %	55.56 %	100 %
	Specificity	85.3 %	91.2 %	4.46
	Urine level (log copies/mL)	4.65	4.46	3.65
Maximum specificity	Sensitivity	6.67 %	28.9 %	51.1 %
	Specificity	100 %	100 %	100 %
	Urine level (log copies/mL)	9.42	6.88	9.18
Maximum likelihood ratio	Sensitivity	62.2 %	53.3 %	73.3 %
	Specificity	91.2 %	94.1 %	94.1 %
	Urine level (log copies/mL)	6.02	5.53	6.86

Table S1. Sensitivity and specificity analyses for urine levels of bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p and BKPyV DNA in KTRs with (patients) or without (controls) BKPyV DNAemia at the time of sampling.

3. Fonctionnalité croisée des miARNs du JCPyV dans la réplication du BKPyV

L'analyse d'expression du jcv-miR-J1-5p dans les urines de patients transplantés de rein a été réalisée à partir des 186 urines provenant de 47 individus qui ont servi de support pour l'étude décrite précédemment en partie II.2.b. Le miARN jcv-miR-J1-5p a été détecté chez 10 patients. Un seul de ces patients a présenté une urine positive à jcv-miR-J1-5p sur 3 prélèvements d'urines, les autres patients n'étant positifs que ponctuellement. Dans ces 3 urines, l'ADN de BKPyV était présent et les miARNs bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p étaient détectées mais non quantifiables. 6 patients ont présenté une RT-PCR jcv-miR-J1-5p positive au cours du premier mois post-transplantation et 5 d'entre eux n'ont pas développé de réplication de BKPyV au cours du suivi (Tableau 8A). Cependant, ces résultats ne permettent pas d'affirmer que la présence de jcv-miR-J1-5p dans les urines lors du mois qui suit une greffe de rein ait un effet protecteur envers les infections à BKPyV. En effet, comme résumé en Tableau 8B, l'Odds Ratio est égal à 0,1217 [IC95% = 0,0099 – 1,157] ($p = 0,072$ selon le test d'exactitude de Fisher). De plus, le jcv-miR-J1-5p a été détecté au cours d'une réplication de BKPyV chez 4 patients mais la présence de jcv-miR-J1-5p ne semble pas entraîner de diminution ou d'augmentation franche de la charge virale urinaire de BKPyV (Figure 19). La présente étude et ses résultats limités ne permettent donc pas de mettre en évidence un intérêt de la RT-PCR jcv-miR-J1-5p pour évaluer le pronostic des infections à BKPyV chez les patients transplantés de rein. De plus, la détection du jcv-miR-J1-5p dans les urines de patients est probablement sous-estimée du fait d'un problème majeur de spécificité du test par RT-PCR. En effet, un signal d'amplification était détecté même en absence de template ce qui nous a contraint à fixer notre limite de détection à une valeur plus haute que les autres miARNs. De ce fait, nous n'avons pris en compte que des échantillons contenant des fortes quantités de jcv-miR-J1-5p et nous avons probablement exclu des échantillons en contenant de plus faibles quantités.

Tableau A	Tableau B	
		Patients BKU+ dans l'année suivant la greffe
Détection de jcv-miR-J1-5p dans le premier mois suivant la greffe	1	5
Absence de détection de jcv-miR-J1-5p dans le premier mois suivant la greffe	23	14
	Sensibilité	0,0417
	Spécificité	0,7368
	VPP	0,1667
	VPN	0,3784
	Odds ratio	0,1217
	IC95% de l'OR	0,009981 à 1,157
	Valeur de p	0,072

Tableau 8 : (A) Tableau de contingence de la détection ou non de jcv-miR-J1-5p au cours du premier mois suivant la greffe chez les patients transplantés de rein développant une infection urinaire à BKPyV (BKU+) ou non (BKU-). (B) Tableau récapitulatif des statistiques relatives au tableau (A). VPP : Valeur Prédicative Positive. VPN : Valeur Prédicative Négative. OR : Odds Ratio. IC95% : intervalle de confiance à 95%.

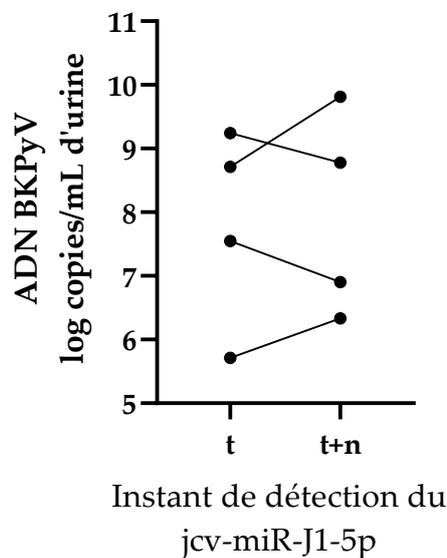


Figure 19 : Evolution de la quantité d'ADN de BKPyV présent dans les urines des patients transplantés de rein entre l'instant de détection du jcv-miR-J1-5p dans les urines (instant t) et le prélèvement d'urine recueilli à l'instant suivant (t+n).

A défaut d'identifier un rôle des miARNs du JCPyV sur les infections à BKPyV chez les patients transplantés de rein, nous avons choisi d'explorer la fonctionnalité du jcv-miR-J1-5p sur des cultures cellulaires dans lesquelles est propagée l'infection à BKPyV. Pour cela, nous avons infecté des cellules de lignée RPTEC-hTERT1 avec la souche Dunlop du BKPyV. L'infection a ensuite été évaluée à 48h post-inoculation par différentes techniques : biologie moléculaire ciblant l'ADN et l'ARNm AgT du BKPyV, Western Blot recherchant les protéines AgT totales, et immunofluorescence dirigée contre l'AgT pour quantifier le pourcentage de cellules infectées. A partir de ce modèle

de cellules infectées par le BKPyV, différentes conditions ont été testées en exposant au préalable les cellules à des mimics de bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p *via* transfection. Un contrôle de transfection, appelé Mock dans les figures, consistait à transférer un miARN portant un fluorophore et permettait d'évaluer l'efficacité du processus de transfection. Ce miARN contrôle a été utilisé pour les expériences préalables de cytotoxicité qui n'ont pas montré de toxicité du processus de transfection à 48h post-traitement, indépendamment des quantités d'agent de transfection utilisées (2 ou 4 μ L d'Interferin®(OZYME)) ou de la concentration finale en miARN dans le milieu de culture (50 ou 100 nM) (Figure 20A). A 72h en revanche, un léger effet cytotoxique non significatif était retrouvé pour 100 nM de miARN et 2 μ L d'Interferin®. Plus de 10% de cytotoxicité était retrouvé pour 100 nM de miARN et 4 μ L d'Interferin® comparativement à la condition contenant 4 μ L d'Interferin® mais sans miARN ($p = 0,01$), comme illustré sur la Figure 20B.

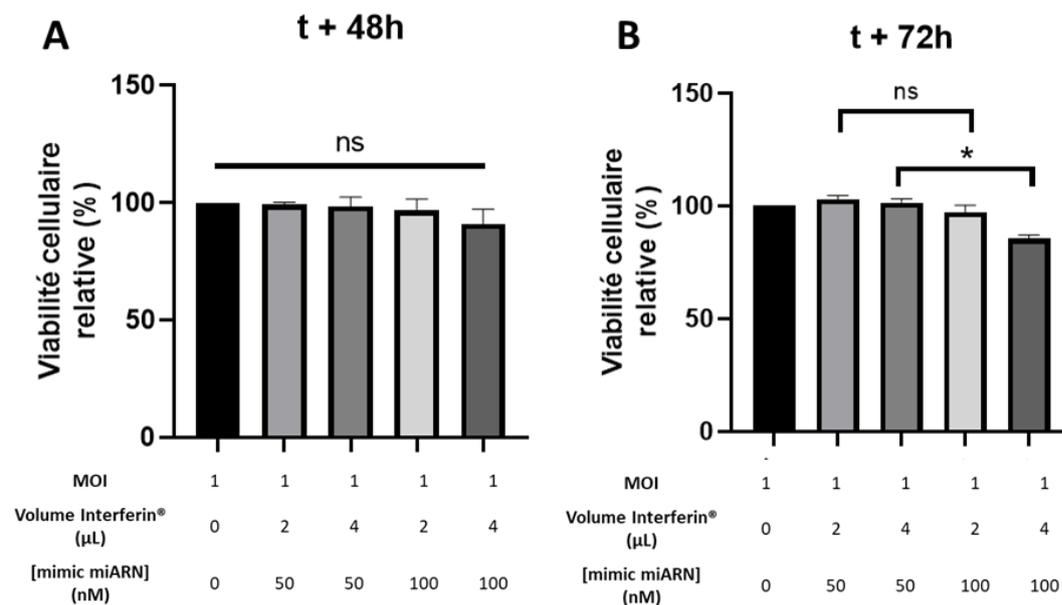


Figure 20: Viabilité cellulaire relative de cellules RPTEC-hTERT1 infectées par le BKPyV (MOI = 1) après transfection par mimic de miARN à l'aide du réactif Interferin (OZYME) à t + 48h (A) et à t + 72h (B), comparativement à des cellules infectées non transférées. MOI : multiplicité d'infection. Ns : non significatif. * : $p < 0,05$. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicat. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

Ainsi, pour minimiser le risque de biais d'effet antiviral lié à la cytotoxicité au cours de nos expériences, nous n'avons retenu que le protocole de transfection à base

de 2 μ L d'Interferin® pour une concentration finale à 50 nM de miARN dans le milieu de culture cellulaire, avec analyse de l'effet au bout de 48h. L'efficacité de la transfection a été évaluée par microscopie à fluorescence a été évaluée en marquant les noyaux de cellules RPTEC-hTERT1 à l'aide du DAPI et en observant le miARN contrôle de transfection marqué par le fluorophore Cy3. Cette vérification a été faite à la fois sur des cellules infectées par le BKPyV et sur des cellules non infectées (Figure 21). Malgré une intensité de signal pouvant varier d'une cellule à l'autre, nous avons constaté une répartition homogène du miARN contrôle sur l'ensemble du tapis cellulaire. De plus, nous avons observé une colocalisation importante des marquages Cy3 (du miARN contrôle) et FITC (de l'AgT du BKPyV) dans les puits de cellules infectées. Il est possible que la perméabilisation des cellules par l'agent de transfection ait pu favoriser l'infectivité du virus par la suite. Ce phénomène permet cependant de renforcer notre analyse puisque notre modèle permettait d'exposer fortement les cellules infectées aux miARNs d'intérêt.

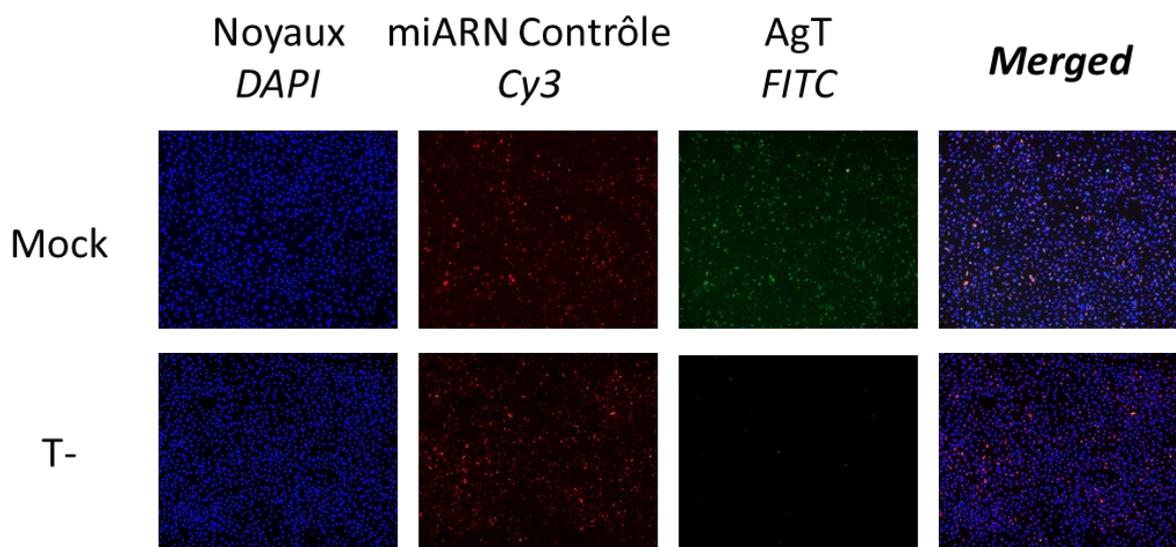


Figure 21: Images de microscopie à fluorescence après immunomarquage de cellules RPTEC-hTERT1. Les images représentent, de gauche à droite, le marquage des noyaux par le DAPI, la présence de miARN contrôle de transfection couplé au fluorophore Cy3, la présence d'AgT du BKPyV sur le canal FITC, et la superposition des 3 images (*Merged*). L'expérience a été réalisée sur des cellules RPTEC-hTERT1 transfectées par le miARN contrôle puis infectées par le BKPyV à MOI = 1 (Mock), ou transfectées et non infectées (T- : témoin négatif). Les images proviennent d'une expérience représentative.

L'effet de la transfection à 50 nM des miARNs du bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p sur l'infection à BKPyV a d'abord été évalué par biologie moléculaire. Pour chaque condition, à t + 48h post-traitement, les surnageants de culture ont été récupérés, les cellules ont été lavées 3 fois par du PBS, puis lysés dans un tampon adapté afin d'extraire les acides nucléiques. Les ARNm de l'AgT ont été quantifiés pour chaque condition puis le résultat a été normalisé à la quantité de transcrite de GAPDH, puis exprimé relativement à la condition Mock correspondant aux cellules transfectées par le miARN contrôle et infectées de la même manière que les conditions tests. Comme illustré sur la Figure 22A, en accord avec la littérature, nous avons retrouvé un effet du bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p à 50 nM sur la quantité d'ARNm d'AgT, sur la base de 7 expériences indépendantes. Ainsi, la surexpression de bkv-miR-B1-3p et de bkv-miR-B1-5p diminuait significativement en moyenne de 11,67% ($p = 0,021$) et 22,73% ($p = 0,009$), respectivement, la quantité d'ARNm d'AgT par rapport aux cellules non sur-exposées aux miARNs de *Polyomaviridae*. Pour la première fois, nous avons observé le même effet pour 50 nM de jcv-miR-J1-5p, miARN spécifique du JCPyV mais de séquence proche du bkv-miR-B1-5p, avec une diminution moyenne significative de 23,45% ($p = 0,009$) du taux d'expression d'ARNm de l'AgT par les cellules infectées par le BKPyV. De plus, il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les 3 miARNs de *Polyomaviridae* testés, à t+48h et pour une concentration à 50 nM, sur le taux d'expression d'ARNm d'AgT. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet de la transfection de 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p ou de jcv-miR-J1-5p sur la quantité normalisée d'ADN de BKPyV intra-cellulaire ou extracellulaire (Figures Figure 22B et Figure 22C). L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'un effet direct des 3 miARNs sur le clivage de l'ARNm de l'AgT du BKPyV dans les cellules infectées et non à un blocage de la réplication

virale précoce puisque la quantité de génome viral n'est pas affectée.

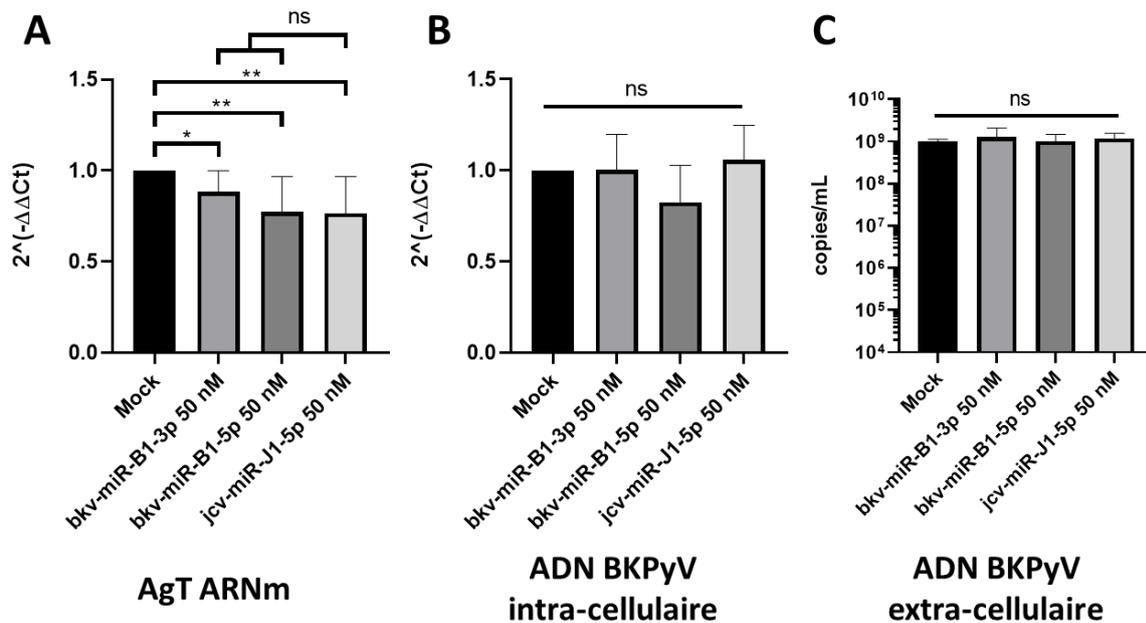


Figure 22: Expression relative en ARNm de l'AgT (A) et en ADN intra-cellulaires (B), ainsi que la charge virale par millilitre de surnageant de culture en ADN extra-cellulaire (C) du BKPv de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPv à hauteur d'une MOI = 1. La condition Mock correspond à des cellules exposées à 50 nM d'un miARN contrôle puis infectées par le BKPv à hauteur d'une MOI = 1. L'expression relative a été normalisée à partir des quantités d'ARNm de GAPDH puis rapportées au résultat de la condition Mock selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les graphiques représentent les moyennes et les déviations standards de 7 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite confirmé que l'effet répressif du bkv-miR-B1-3p, du bkv-miR-B1-5p et du jcv-miR-J1-5p sur l'ARNm de l'AgT entraînait également une diminution de l'expression protéique. A partir du même protocole que pour les analyses de biologie moléculaire, les protéines totales des cellules cultivées sous les différentes conditions ont été récupérées puis séparées par migration sur gel de SDS-Page. L'immunomarquage a ensuite été réalisé pour l'Actine et l'AgT du BKPv. La révélation a permis d'observer une expression homogène de l'Actine selon les différentes conditions (Figure 23A), renforçant nos conclusions précédentes sur la faible cytotoxicité de la méthode et la robustesse de nos analyses comparatives. Comme précédemment retrouvé au niveau moléculaire, l'expression protéique de l'AgT était fortement diminuée à t + 48h lorsque les cellules étaient préalablement traitées par 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et de jcv-miR-J1-5p avant infection par le BKPv (Figure 23B). De plus, l'effet n'était pas seulement retrouvé sur

l'isoforme de l'AgT migrant à 80 kDa, mais aussi sur les autres formes d'AgT et notamment le tAgT. Il est même intéressant de constater que le jcv-miR-J1-5p a un effet répresseur fort sur les formes d'AgT à plus haut poids moléculaire, mais faible sur le tAgT. Au contraire, le bkv-miR-B1-5p réprime faiblement l'expression protéique des formes à haut poids moléculaire d'AgT mais éteint presque totalement l'expression du tAgT. Enfin, l'effet du bkv-miR-B1-3p est relativement homogène sur toutes les formes d'AgT. L'AgT n'était plus que faiblement isolé pour toutes les conditions de traitement comparativement à la condition contrôle. Il est probable que le site de clivage et/ou de liaison de l'ARNm de l'AgT ciblé par chacun des miARNs joue un rôle dans les conséquences ici retrouvées au niveau protéique.

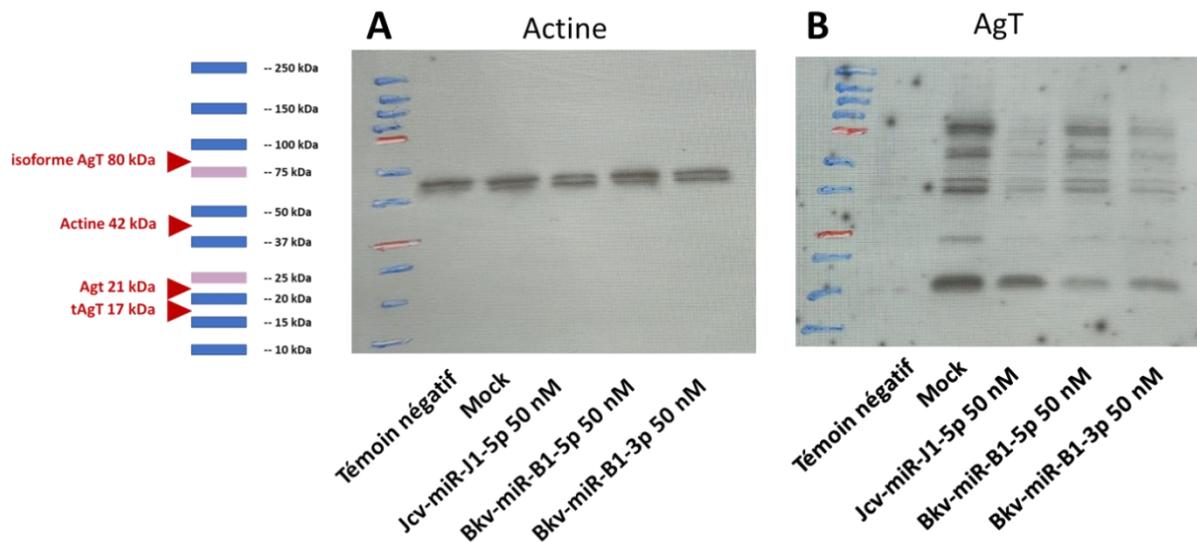


Figure 23: Analyse par Western Blot de l'expression protéique de l'Actine (A) et de l'AgT du BKPyV (B) par des cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. Les protéines ont été récupérées à t+48h post-traitement. La condition Mock correspond à des cellules exposées à 50 nM d'un miARN contrôle puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. Le témoin négatif correspond à des cellules cultivées dans les mêmes conditions mais n'ayant ni été transfectées, ni infectées. Les révélations présentées sont issues d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

Toujours selon le même protocole, l'expression de l'AgT a été mesurée par immunofluorescence sur les cellules adhérentes. Encore une fois, nous avons constaté un signal de fluorescence qualitativement moins important sur les cellules exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et de jcv-miR-J1-5p avant infection par le BKPyV (Figure 24), comparativement aux cellules contrôles.

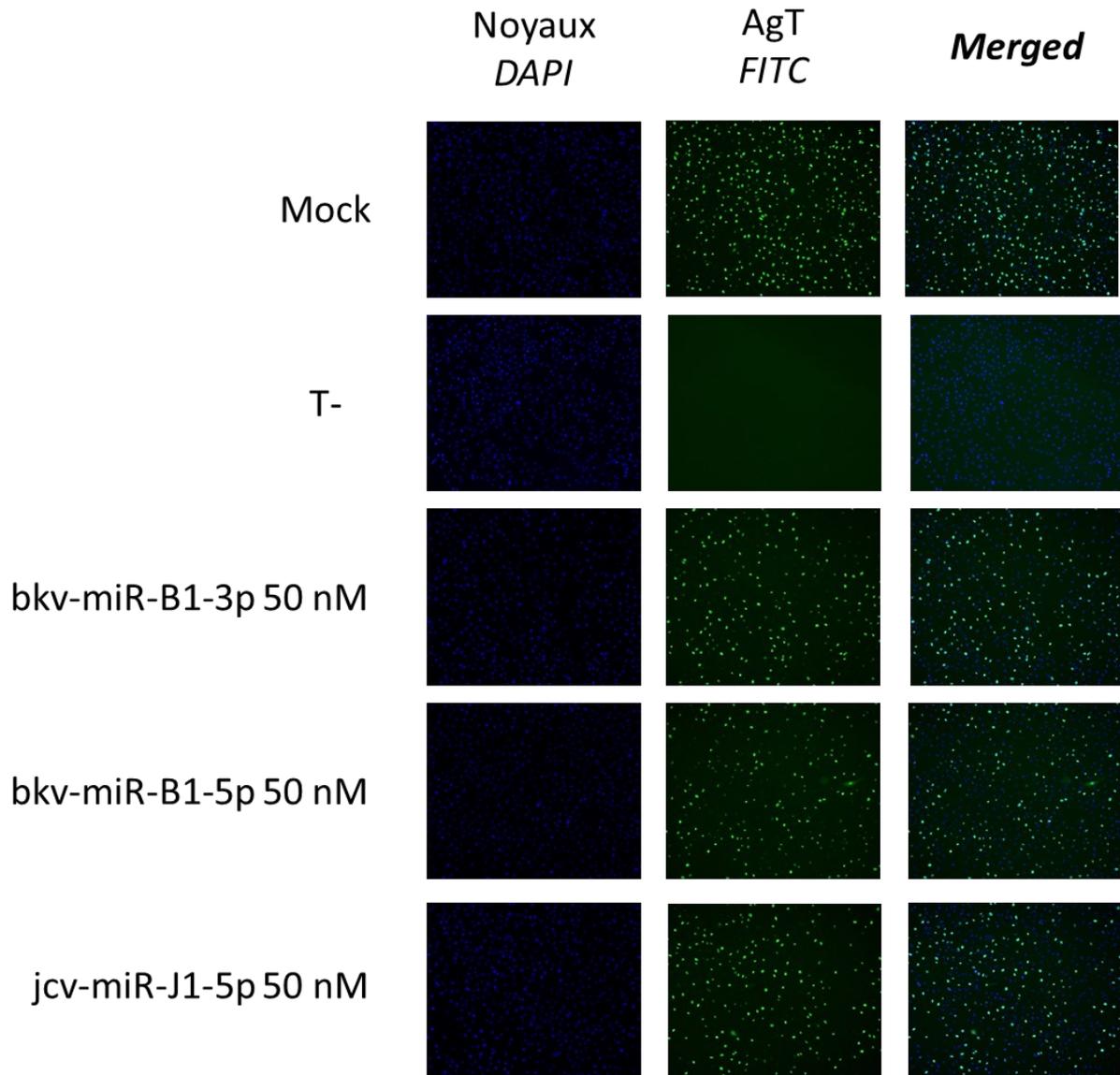


Figure 24: Images de microscopie à fluorescence après immunomarquage de cellules RPTEC-hTERT1. Les images représentent, de gauche à droite, le marquage des noyaux par le DAPI, la présence d'AgT du BKPyV sur le canal FITC, et la superposition des 2 images (Merged). L'expérience a été réalisée sur des cellules RPTEC-hTERT1 transfectées par le miARN contrôle puis infectées par le BKPyV à MOI = 1 (Mock), transfectées et non infectées (T- : témoin négatif), ou transfectées avec une mélange enrichissant le milieu extracellulaire de 50 nM de miARN (bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p ou jcv-miR-J1-5p) avant infection par le BKPyV (MOI = 1). Les images proviennent d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes.

Plus particulièrement, à l'aide d'une macro ImageJ (105), nous avons quantifié de manière semi-automatique le nombre de cellules exprimant l'AgT par rapport au nombre de cellules totales, à partir du nombre de noyaux cellulaires marqués au DAPI. Le résultat des calculs permettait ainsi de déterminer le pourcentage moyen de cellules infectées par le BKPyV. Que l'analyse soit faite sur le pourcentage absolu (Figure 25A) ou relatif à la condition contrôle (Figure 25B), nous avons mis en évidence, à partir de

3 expériences indépendantes avec mesures en triplicat, une diminution significative du pourcentage de cellules infectées par le BKPyV en cas de préexposition à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p et de jcv-miR-J1-5p. En moyenne, le pourcentage absolu de cellules infectées diminuait de 22,2%, 26,8% et 20,7% pour le bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p et le jcv-miR-J1-5p, respectivement ($p < 0,001$). Afin de limiter le biais de reproductibilité inter-expériences, la même analyse a été effectuée à partir des pourcentages d'infection relatifs à la condition contrôle. Il a été ainsi retrouvé de la même manière une diminution de l'infection de 38,9%, 41,6% et 32,1% pour le bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p et le jcv-miR-J1-5p, respectivement ($p < 0,001$). Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre l'effet du jcv-miR-J1-5p et ceux des 2 miARNs matures du BKPyV. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un potentiel effet antiviral des miARNs des *Polyomaviridae* sur le BKPyV, et particulièrement celui du jcv-miR-J1-5p qui n'était jusqu'alors pas décrit dans la littérature.

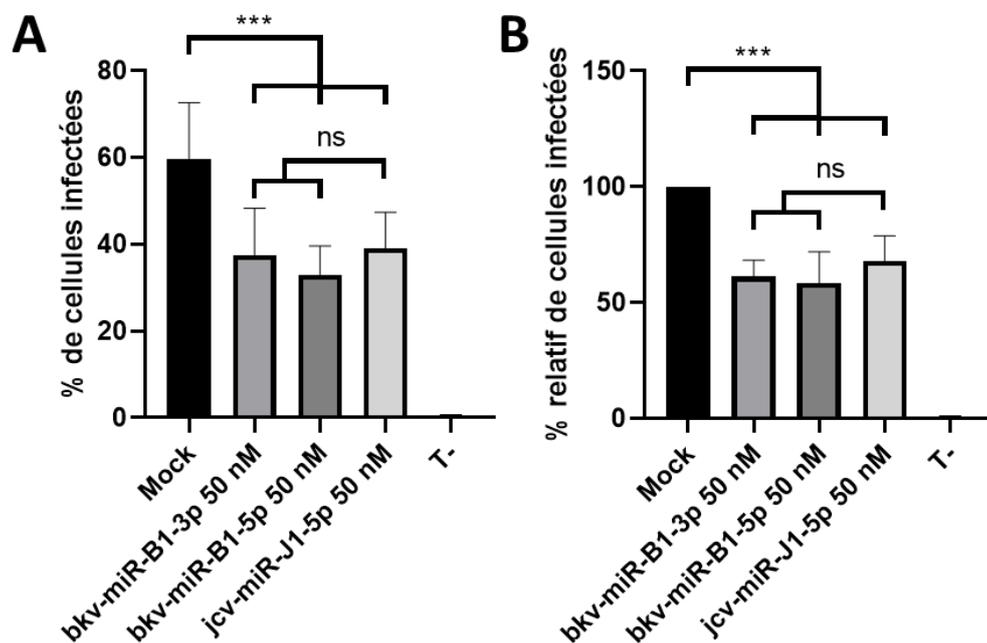


Figure 25: Pourcentage absolu (A) et relatif (B) de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. La condition Mock correspond à des cellules exposées à 50 nM d'un miARN contrôle puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. Les pourcentages de cellules infectées ont été calculés de manière semi-automatique à l'aide d'une macro ImageJ à partir de la détection par immunomarquage de l'AgT du BKPyV par un couple d'anticorps spécifiques et des noyaux cellulaires marqués au DAPI. Les graphiques représentent les moyennes et les déviations standards de 3 expériences indépendantes. Les mesures de chaque condition étaient réalisées en triplicat.

Enfin, les surnageants de culture des précédentes expériences ont été collectés pour infecter de nouvelles cellules RPTEC-hTERT1 et évaluer l'infektivité des culture produites. Les surnageants tests ont été dilués au 1/6^e dans du milieu frais et l'effet de la réinfection a été mesuré après 72h de culture. Aucune variation significative n'a été retrouvée entre les infectivités des surnageants provenant de cellules infectées traitées par 50 nM de bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p et le jcv-miR-J1-5p par rapport aux surnageants provenant des cellules Mock (Figure 26). Alors que nous avons montré des effets antiviraux des miARNs des *Polyomaviridae* au niveau de l'infection primaire, il ne semble donc pas y avoir d'effet sur les infections secondaires sans nouveau traitement. Ces résultats sont cependant à pondérer du fait de la faible capacité de tous les surnageants, même ceux provenant des cellules Mock, à être infectieux sur les cultures secondaires. En effet, sur l'ensemble des 3 expériences, l'infektivité n'a jamais dépassé les 3% alors que l'infection primaire permettait d'obtenir jusqu'à 60% de cellules infectées.

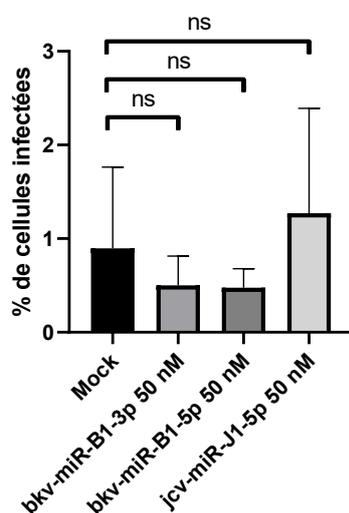


Figure 26: Pourcentage absolu de cellules RPTEC-hTERT1 exposées à des surnageants de culture de cellules exposées à 50 nM de bkv-miR-B1-3p, de bkv-miR-B1-5p, ou de jcv-miR-J1-5p puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. La condition Mock correspond à des cellules exposées à des surnageants de culture de cellules exposées à 50 nM d'un miARN contrôle puis infectées par le BKPyV à hauteur d'une MOI = 1. Les pourcentages de cellules infectées ont été calculés de manière semi-automatique à l'aide d'une macro ImageJ à partir de la détection par immunomarquage de l'AgT du BKPyV par un couple d'anticorps spécifiques et des noyaux cellulaires marqués au DAPI. Les graphiques représentent les moyennes et les déviations standards de 3 expériences indépendantes. Les mesures de chaque condition étaient réalisées en triplicat.

En conclusion, à partir du modèle de culture virale pratiqué au laboratoire, nous avons confirmé l'effet antiviral des miARNs du BKPyV, le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p, sur sa propre réplication. Surtout, nous avons mis en évidence pour la première fois l'effet antiviral du jcv-miR-J1-5p, miARN spécifique du JCPyV, sur la réplication du BKPyV. Cet effet passe par une probable capacité de clivage de l'ARNm de l'AgT du BKPyV, associée à une inhibition traductionnelle, qui entraîne un effet antiviral en cas d'exposition préalable à une infection primaire. Ces résultats nécessitent cependant des explorations complémentaires pour comprendre le mécanisme exact de clivage de l'ARNm de l'AgT mais aussi pour déterminer si cet effet est également retrouvé lors du traitement *a posteriori* de cellules déjà infectées par le BKPyV.

IV. DISCUSSION

Les travaux présentés ci-dessus ont permis d'étudier les miARNs des *Polyomaviridae* de manière fondamentale mais aussi transversale en appliquant nos réflexions sur des échantillons de liquides biologiques humains. Avant toute chose, il a été nécessaire de mettre au point et valider la technique de RT-PCR quantitative vis-à-vis des miARNs d'intérêt, et valider cette méthode pour l'appliquer à différentes matrices telles que des surnageants de culture, des lysats cellulaires ou des liquides biologiques humains (urine, plasma). Différents kits de purification des miARNs sont disponibles sur le marché mais nous avons opté pour une méthode d'extraction semi-automatisée sur l'appareil Qiacube et un kit d'extraction (miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit, Qiagen). Cette solution a l'avantage de semi-automatiser la purification d'acides nucléiques et donc permettre une standardisation de la méthode, limitant les biais de répétabilité et de reproductibilité sur cette étape de l'analyse. Avec la perspective de pouvoir appliquer notre méthode à l'analyse d'échantillons cliniques, il nous paraissait nécessaire de respecter les normes de qualité exigées en biologie

médicale. Au-delà de limiter les étapes manuelles, il était également important de réduire le risque d'erreur lors des manipulations restantes. Le kit d'extraction « miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit » repose sur une étape préliminaire de précipitation et non de séparation biphasique à l'aide d'un solvant organique. L'extraction organique était majoritairement pratiquée avec les kits d'extraction de miARNs utilisés dans les précédentes études en rapport avec la quantification de miARNs de *Polyomaviridae* dans les échantillons cliniques (81,87,96,98,99). L'extraction organique permet de séparer, après centrifugation, la phase aqueuse contenant les miARNs d'une phase organique contenant les protéines et autres impuretés. Cependant, les 2 phases étant finement séparées, la récupération de la phase aqueuse est délicate et expose à une contamination de la phase aqueuse par les impuretés de la phase organique. Qiagen a opté pour une étape de précipitation avec le kit d'extraction « miRNeasy Serum/Plasma Advanced » qui simplifie la récupération de la phase aqueuse purifiée, en rendant le procédé moins technique et plus reproductible. De plus, la manipulation de solvants organique est très réglementée et limitée (110,111) en biologie médicale et rendrait plus difficilement compatibles ces techniques à la pratique de routine clinique. Pour les expérimentations à partir de culture cellulaire, cependant, les purifications de miARNs associées aux culots cellulaires, culots d'exosomes ou encore immunoprécipités étaient réalisées au moyen du kit « miRNeasy mini kit » (Qiagen). Celui-ci permettait également d'être semi-automatisé sur la plateforme Qiacube mais reposait sur une extraction par chloroforme, rendant plus délicate et moins précise la manipulation.

Nous avons décidé d'utiliser le cel-miR-39 comme contrôle interne, qui présente différents intérêts. Le cel-miR-39 est un miARN totalement absent du corps humain et nous affranchit de toute réaction non spécifique lorsque nous l'utilisons pour analyser des échantillons de patients. Il est introduit en quantité connue au moment de la lyse lors de l'extraction ce qui permet de contrôler le rendement de l'extraction et valider la série de RT-PCR sur les échantillons de patients. Il était important de pouvoir

contrôler l'efficacité de l'extraction puisque le kit est optimisé pour les matrices sérum/plasma et non l'urine, même si l'extraction d'autres liquides tels que l'urine est possible selon le fournisseur. La littérature faisait état d'utilisation de miARNs intrinsèques tels que le RNU44 pour les urines (93), le miR-16 pour les exosomes (97) ou le SNORD11 pour les cellules (92). Cependant, l'utilisation de miARN intrinsèque ne garantit pas une normalisation juste des résultats puisque leurs quantités dans les liquides biologiques peuvent varier indépendamment du paramètre mesuré. Le RNU44 est un miARN excrété dans les urines mais dont l'expression est altérée dans certains cancers (112). Le miR-16 peut être utile lors de l'étude des exosomes cependant la constance de production des exosomes et la stabilité des exosomes dans les fluides biologiques demeurent incertaines. En effet, la présence des miARNs dans les vésicules extracellulaires a récemment été analysée par Jeppesen *et al.* Les auteurs ont montré la variabilité de répartition des miARNs dans les vésicules extracellulaires et le manque de spécificité du miR-16 (70). Enfin, un miARN cellulaire tel que le SNORD11 est dépendant de la cytologie urinaire, elle-même influencé par différentes conditions intrinsèques à l'état pathologique du patient et aux conditions de recueil, d'acheminement et de traitement de l'échantillon avant analyse. Ainsi, l'utilisation du cel-miR-39 comme contrôle interne parallèlement à celle de standards de cibles analysées permet de s'affranchir des variations intra- et interindividuelles, et à normaliser de manière homogène tous les résultats.

La calibration de la méthode de quantification a été réalisée à partir de standards de concentration connue. La concentration en miARNs dans l'extrait d'ARN a donc pu être déterminée à partir de l'équation de la droite de calibration. La quantité de contrôle interne retrouvée sert ensuite à normaliser selon le rendement d'extraction. Les standards ont également servi pour les essais préalables de spécificité. Les standards concentrés à 5,48 log copies/ μ L de chaque miARN étudié, c'est-à-dire bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p, jcv-miR-J1-5p et cel-miR-39, ont été analysés avec les techniques de RT-PCR ciblant les autres miARNs. La RT-PCR bkv-miR-B1-3p ne détecte pas de manière faussement positive les miARNs bkv-miR-B1-5p, jcv-miR-J1-

5p ou cel-miR-39. Il en est de même pour les RT-PCRs bkV-miR-B1-5p et cel-miR-39 vis-à-vis des autres miARNs. En revanche, la RT-PCR jcv-miR-J1-5p a rendu un signal vis-à-vis du bkV-miR-B1-3p, du bkV-miR-B1-5p et du cel-miR-39, mais de la même manière qu'avec un échantillon « blanc » contenant uniquement de l'eau. La non-spécificité de la RT-PCR jcv-miR-J1-5p avait déjà été décrite au-delà de 32 Ct, Pietilä *et al.* les rendant positives dans tous les échantillons testés (96), et nous avons retrouvé les mêmes données. Ce signal « bruit de fond » a nécessairement restreint nos analyses et nous a conduit à considérer négatifs de nombreux résultats sur les échantillons cliniques, par défaut de sensibilité puisque le seuil de positivité que nous avons choisi était haut, plus que pour les autres miARNs (32 Ct pour le jcv-miR-J1-5p contre 35 Ct pour les autres). Une comparaison de différentes techniques de RT-PCR est nécessaire pour construire une étude permettant de mieux évaluer l'intérêt de la quantification du jcv-miR-J1-5p dans les urines des patients transplantés de rein. Applied Biosystems® a développé récemment un nouveau système de RT-PCR : le « TaqMan Advanced miRNA Assay », évolution du « TaqMan miRNA Assay » que nous avons utilisé. Celui-ci garantit de meilleures performances en termes de sensibilité et de spécificité qu'il nous faudrait évaluer dans le cadre de nos études. Le système permet aussi de réaliser une RT aléatoire, annoncée sans perte de spécificité par le fabricant, pouvant permettre de réaliser différentes PCRs à partir d'un seul produit de RT. La méthode que nous avons utilisée nécessitait des RTs et des PCRs distinctes pour chaque miARN. Théoriquement, le système « Advanced » apporterait donc une amélioration des performances mais aussi un gain de temps non négligeable. Cependant, une récente étude portant sur la quantification de miR-371a dans des biopsies liquides de patients atteints de tumeur testiculaire a montré des performances inférieures pour le « TaqMan Advanced miRNA Assay » comparativement au kit de RT-PCR « classique » (113). Il serait impératif de réaliser ce type de comparaison vis-à-vis de nos différents miARNs d'intérêt (bkV-miR-B1-3p, bkV-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p) afin de déterminer la solution de choix pour la quantification de chacune de ces molécules.

La méthode employée a permis de détecter le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p à hauteur de 150 copies/mL. Elle ne constitue pas la méthode la plus sensible décrite dans la littérature puisqu'un autre protocole permet de descendre jusque 100 copies par réaction sur les urines (87), voire 50 copies pour les culots cellulaires (98). Nos essais nous indiquent cependant que les résultats sont peu reproductibles à des quantités aussi faibles et, inférieures à 1500 copies/mL de prélèvement initial, l'intensité des signaux demeure variable entre les répliques de PCR. Pour les quantifications dans les urines totales rapportées dans la partie III.2.b du manuscrit et publiées dans un journal international (109) nous avons choisi le seuil de 1500 copies/mL comme limite de quantification. Ce seuil était celui statistiquement déterminé à partir des gammes de standards pour les valeurs assurant un coefficient de corrélation $r^2 \geq 0,95$, contrainte maximale habituellement tolérée en biologie médicale. Bien qu'il soit possible que des résultats faiblement positifs aient été considérés négatifs à tort, nous sommes assurés d'obtenir des résultats quantitatifs avec une précision importante. L'objectif premier de ce travail étant d'évaluer l'intérêt du dosage quantitatif des miARNs des *Polyomaviridae* dans les échantillons cliniques, il était ainsi préférable de mesurer précisément les quantités présentes au cours des infections, plutôt que détecter un faible nombre de copies des miARNs sans pouvoir connaître leur quantité réelle ni avoir l'assurance qu'il ne s'agissait pas de faux positifs. En effet, nos essais de spécificité ont concerné les miARNs analysés dans l'étude mais il existe une multitude d'autres miARNs dans les urines (114) pouvant hypothétiquement croiser en RT-PCR. D'autres auteurs avaient d'ailleurs décrit des réactions de RT-PCR bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p positives à environ 35 Ct en moyenne pour les « blancs » de réaction (98,99), alors que nous n'avons jamais rencontré ce phénomène. Ces mêmes auteurs avaient donc soulevé le problème de risque de faux positifs qu'il faut absolument écarter, surtout lorsqu'il s'agit de déterminer si les miARNs du BKPyV constituent un marqueur précoce et spécifique de répllication active du virus. A noter, la RT-PCR bkv-miR-B1-5p que nous avons

développé était plus sensible que la RT-PCR bkv-miR-B1-3p, comme décrit dans la littérature (81,98).

Au-delà de la spécificité et de la sensibilité intrinsèques de la méthode de biologie moléculaire permettant de quantifier les miARNs, il est indispensable de connaître et comprendre les propriétés physico-chimiques des marqueurs d'intérêt pour définir la meilleure stratégie d'analyse pour les différents types de liquides biologiques (milieux de culture cellulaires ou biofluides humains). Ces connaissances doivent prendre en compte les paramètres pouvant influencer les résultats de l'analyse au décours immédiat du recueil mais aussi ceux pouvant avoir un impact sur l'analyse rétrospective d'échantillons ayant été conservés à long terme dans des collections d'échantillons et des biobanques. Ces dernières années, les miARNs ont pris une place importante dans le développement de nouveaux outils pour le diagnostic ou le pronostic de nombreuses pathologies. Cependant, leur application directe en pratique clinique est encore limitée. Ce constat est particulièrement vrai pour la prise en charge des maladies virales (115). En effet, la (RT-)PCR est devenue la méthode de référence pour le diagnostic et le suivi de la plupart des infections virales, notamment pour les patients immunodéprimés comme les transplantés de rein. En raison de leur manque de précision et de leurs protocoles plus complexes, les tests ciblant les miARNs ne semblent pas être une alternative pertinente aux tests classiques ciblant l'ADN ou l'ARN viral, mais pourraient être intégrés comme biomarqueurs viraux complémentaires dans une approche de médecine personnalisée. Pour prendre l'exemple du Cytomegalovirus, des études ont montré que certains de miARNs encodés par le virus voyaient leur expression altérée dans certaines pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires ou les cancers (116). Sur le versant purement orienté diagnostic microbiologique des infections à CytomégaloVirus, de récents travaux ont mis en évidence un intérêt de la quantification des miARNs du CMV pour distinguer les infections productives (lytiques) des infections latentes non pathologiques (117). Malgré quelques publications sur le sujet, l'intérêt des miARNs des *Polyomaviridae* pour la pratique clinique en pathologie humaine reste à démontrer.

Idéalement, des études prospectives, mono- et multicentriques, sur des cohortes de patients permettraient de répondre à ces interrogations mais elles sont souvent longues et coûteuses. Les études rétrospectives à partir de collections d'échantillons cliniques est donc une solution alternative plus facilement envisageable dans un premier temps. Cependant, la stabilité des miARNs des *Polyomaviridae* n'a jamais été étudiées spécifiquement et nous ne disposons pas d'éléments permettant de sciemment interpréter les résultats de RT-PCR réalisées rétrospectivement sur des liquides biologiques. En particulier, en cas d'instabilité à long terme entraînant une dégradation de ces miARNs, nous aurions pu être confrontés à des résultats que nous aurions considérés à tort comme négatifs. De manière générale, la stabilité des miARNs dans les liquides biologiques, notamment l'urine, est bien connue (44). Nous avons confirmé que le bkv-miR-B1-5p était adapté pour l'analyse rétrospective d'échantillons provenant de patients ou d'expériences *in vitro*. Sur des modèles d'infections utilisant des lignées cellulaires différentes (cellules Vero simienne ou HEK293TT humaines), nous n'avons pas observé de variation de détection du bkv-miR-B1-5p après plusieurs cycles de congélation-décongélation. De plus, le bkv-miR-B1-5p persistait aux mêmes quantités détectables malgré 80 jours de stockage à température ambiante des échantillons de lysat cellulaire ou de milieu de culture, comme cela avait déjà été identifié pour des miARNs cellulaires humains (107). Cette étude de stabilité à long terme en condition pouvant être considérée comme « extrême » pour des échantillons devant être analysés par biologie moléculaire n'a été réalisé que sur un type de lignée cellulaire, les cellules Vero. Ce choix était motivé par la permissivité importante de ces cellules pour l'infection à BKPyV, aboutissant à une production plus importante de bkv-miR-B1-5p. Ainsi, nous aurions perçu de manière plus sensible les variations de concentrations en miARNs si elles avaient été altérées. Cependant, ce résultat pourrait différer entre les lignées cellulaires et ne pas refléter exactement les mécanismes physiologiques au cours de l'infection chez l'Homme. De plus, nous avons malgré tout observé une diminution des niveaux de bkv-miR-B1-5p dans le surnageant de culture après conservation 80 jours à température ambiante.

Cette variation n'était pas statistiquement significative d'après notre analyse des concentrations absolues de bkv-miR-B1-5p. Turchinovitch *et al.* avaient observé une différence significative pour le même type d'expérience à propos de miARNs cellulaires mais leur analyse reposait sur une comparaison des concentrations relatives, donc à partir de ratio compris entre 0 et 1 (107). Ce type d'analyse peut biaiser les analyses statistiques et la perception des résultats (118). En effet, dans notre cas, la concentration en bkv-miR-B1-5p a diminué en moyenne de 65% sur les 3 expériences indépendantes mais cette variation représente seulement en moyenne 0,56 log₁₀ copies/mL de différence sur des concentrations absolues de l'ordre de 7 log₁₀ copies/mL en moyenne. *Ex vivo*, le bkv-miR-B1-5p était toujours détectable dans les 5 urines de patients infectés par le BKPyV, malgré 5 cycles de congélation-décongélation. Cependant, pour 2 des 5 urines testés, la concentration détectée était affectée significativement, illustrant les limites possibles des études *a posteriori*. Nous avons choisi de comparer les concentrations en bkv-miR-B1-5p dans l'urine après 5, mais pas moins, cycles de congélation-décongélation par manque de matériel biologique. Ce choix de 5 cycles était motivé par un protocole courant d'étude de stabilité qui permet de l'évaluer en conditions limites (44). En effet, les échantillons conservés dans les collections et les biobanques peuvent rarement être utilisés autant de fois car les quantités conservées sont souvent entièrement consommées lors des premières utilisations. Dans la même logique que l'analyse des échantillons provenant d'expériences *in vitro*, nous avons aussi étudié la stabilité extrême du bkv-miR-B1-5p urinaire en cas de stockage à long terme à température ambiante. Dans ces conditions, la concentration en bkv-miR-B1-5p diminuait globalement pour tous les échantillons et devenait même indétectable pour 2 patients. Les caractéristiques clinico-biologiques (pathologie, fonction rénale, charge virale BKPyV, etc.) disponibles pour ces patients ne permettaient pas d'expliquer cette situation. Il est cependant important de souligner que les surplus d'échantillons urinaires, qui avaient été conservés à +4°C pendant la période de 80 jours, présentaient des concentrations de bkv-miR-B1-5p, certes faibles, mais toujours détectables. Il est donc possible que ces deux urines étaient riches en

RNAse, enzyme capable de dégrader les molécules d'ARN et de miARN mais dont l'activité est inhibée à +4°C comparativement à une température ambiante, ce qui pourrait expliquer le phénomène observé. En définitive, le bkv-miR-B1-5p apparaît comme une molécule stable dans les différentes matrices étudiées, autant *in vitro* que *ex vivo*, tant que les conditions habituelles de conservations d'échantillons biologiques sont respectées. Les échantillons devant subir une analyse des quantités de bkv-miR-B1-5p devraient donc idéalement être conservés à -20°C ou moins, et ne pas subir trop de cycles de congélation-décongélation.

Cette étude a permis de transposer au bkv-miR-B1-5p des connaissances connues sur les propriétés d'autres miARNs, mais nous n'avons pu analyser qu'un faible nombre d'urines, sans nous attarder sur toutes les conditions de conservation et d'utilisation des échantillons possible. Il nous était en effet difficile d'obtenir de bons échantillons d'urine compatible avec l'analyse. Il nous fallait des urines fraîches provenant de patients excréant du BKPyV dans les urines. Or, le statut d'infection des patients prélevés au CHU Amiens est difficilement prédictible puisque les patients habituellement négatifs peuvent se révéler positifs à tout moment, et les patients connus pour être infectés peuvent contrôler l'infection entre la précédente consultation et le jour de recueil. De plus, pour ce protocole, il fallait récupérer les urines fraîches qui n'avait pas déjà subis de congélation. Au laboratoire de Virologie du CHU Amiens, les échantillons sont habituellement immédiatement pris en charge pour les analyses prescrites et le surplus est aliquoté et congelé. Il nous fallait donc être très réactifs pour récupérer les urines fraîches, disponibles en quantité suffisantes pour réaliser les analyses de routine prescrite et nos recherches, potentiellement incluables et rapidement réaliser la RT-PCR bkv-miR-B1-5p initiale du t_0 de l'analyse. En fonction de la positivité de cette dernière, nous pouvions alors réaliser l'aliquotage et le stockage (à -20°C ou à température ambiante) nécessaires au protocole d'étude de stabilité, ce qui a grandement contraint le nombre d'urines incluses.

Au cours des études précédentes qui portaient sur la quantification des miARNs du BKPyV, différentes stratégies de purification à partir de matrices variables avaient

été utilisées (Tableau 1). Sont décrits dans la littérature des résultats obtenus à partir d'urines natives (93,96) ou spécifiquement à partir des fractions exosomales (87,97) et cellulaires (98), sans que le choix de la matrice soit explicitement justifié. En fonction des propriétés des miARNs du BKPyV dans le milieu extracellulaire et les liquides biologiques, les résultats des quantités de miARNs détectés et leur interprétation peuvent alors dépendre de la stratégie adoptée. Dans la perspective d'appliquer la mesure des taux de miARNs des *Polyomaviridae* en pratique clinique en tant que nouvel outil de diagnostic *in vitro*, ces points doivent impérativement être maîtrisés. En effet, dans le cadre de développement d'examen de biologie médicale, les conditions (pré-)analytique doivent être optimales et parfaitement définies pour répondre aux exigences réglementaires (marquage CE, normes de certifications, etc.). Nous avons donc étudié spécifiquement la répartition du bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire afin de fournir un support d'information en vue d'une éventuelle application en pathologie humaine, mais également dans le cadre de la recherche fondamentale. Au cours de ce travail de thèse, des purifications d'exosomes provenant de cultures de cellules infectées par le BKPyV ont été réalisées en utilisant deux techniques. La première consistait à isoler les exosomes par ultracentrifugation différentielle. Cette méthode est relativement accessible et peu coûteuse mais elle est longue (six heures en moyenne dans notre laboratoire), nécessite de nombreuses manipulations, et est limitée quant à la qualité et la pureté de l'enrichissement en exosomes dans la fraction finale (119). Nous avons donc utilisé en complément une méthode de purification par immunocapture, plus spécifique et facile à réaliser, en moins de deux heures (120). Cette technique nécessite cependant des équipements et des réactifs spécifiques et coûteux. Indépendamment de la technique utilisée, nous avons retrouvé moins de 1‰ de la quantité extracellulaire de bkv-miR-B1-5p au sein des exosomes, malgré une concentration absolue non négligeable (de l'ordre de 10^3 à 10^4 copies / mL lorsque les résultats sont rapportés au volume initial). Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de la littérature, indiquant que les miARNs cellulaires (107) et viraux (121) sont associés marginalement avec les exosomes en

comparaison à l'ensemble des molécules présentes dans le milieu extracellulaire. Nos résultats confirment qu'il est possible de quantifier le bkv-miR-B1-5p dans le milieu extracellulaire sans avoir besoin d'isoler au préalable les exosomes. Afin d'augmenter la sensibilité de la quantification du miARN, il est même plus pertinent de travailler sur le liquide biologique sans pré-traitement. En revanche, il faut souligner qu'il est tout de même possible de détecter en quantité significative le bkv-miR-B1-5p dans les vésicules extracellulaires. Ainsi, il est également possible de réaliser des études spécifiques des miARNs du BKPyV contenus dans les vésicules extracellulaires, même si ceux-ci sont présents en relativement faibles quantités.

Puisque le bkv-miR-B1-5p extracellulaire est essentiellement à l'extérieur des vésicules, nous avons cherché à déterminer s'il était plutôt libre ou associé à des protéines. Il s'est avéré que ce miARN semblait quasi-exclusivement (>99%) associé à des protéines de poids moléculaire compris entre 50 et 300 kDa. Cette observation est concordante avec la propriété commune des miARNs à interagir avec des protéines se liant aux ARNs (« RNA-binding proteins », RBP) telles que les protéines de la famille Ago, constituants majeurs des complexes RISC (122). En particulier, nous avons constaté qu'au moins 30% des molécules de bkv-miR-B1-5p présentes dans le surnageant de cellules infectées par le BKPyV étaient associées à la protéine Ago2. Ce résultat peut sous-estimer l'interaction bkv-miR-B1-5p/Ago2 puisque la méthode d'immunoprécipitation utilisée n'est pas efficace à 100% et que le rendement de protéines captées par les billes couplées aux anticorps n'est pas parfait. Il est également possible que la fraction de bkv-miR-B1-5p non isolée lors de l'immunoprécipitation soit en tout ou partie associée à d'autres protéines de la famille Ago (Ago1, Ago3, Ago4) (107,122) et/ou à des complexes contenant des RBP de manière indépendante des protéines Ago (123). Ce mécanisme doit être exploré dans des études ultérieures pour mieux comprendre le cycle de vie du BKPyV et le devenir de ses miARNs, mais les résultats n'affecteraient pas le potentiel du bkv-miR-B1-5p en tant que biomarqueur stable et abondant dans le milieu extracellulaire. L'ensemble des résultats précédemment discutés sur l'association du bkv-miR-B1-5p avec les vésicules et les

protéines extracellulaires proviennent d'expérimentations artificielles, à partir de cultures de cellules infectées par le BKPyV. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir suffisamment d'urine fraîche, non traitée et positive au BKPyV pour réaliser ces expériences sur des échantillons humains, comme cela avait été possible pour les études de stabilité. Comme précédemment énoncé, l'obtention d'urines éligibles était fastidieuse. Pour réaliser les purifications d'exosomes et les immunoprécipitations, des contraintes supplémentaires s'imposait puisque de grands volumes d'urines (>10 mL) étaient nécessaires. Ce type de collection d'échantillon clinique n'a malheureusement pas été réalisable pendant la période de l'étude. Les exosomes et Ago2 sont connus pour stabiliser les miARNs urinaires (124), mais cela reste à démontrer pour le bkvmiR-B1-5p.

La détection ou non des miARNs du BKPyV a déjà été évaluée dans plusieurs situations pathologiques du transplanté de rein (ADNémie, néphropathie) par différentes études (81,92,93,95-99). Cependant, ces analyses ont été effectuées transversalement et ne permettent de décrire des niveaux d'expression qu'à un instant donné. De plus, les taux de miARNs du BKPyV dans les liquides et tissus biologiques étaient rarement comparés aux autres marqueurs servant communément à évaluer l'infection (ADN viral, ARNm et protéines de VP1 et de l'AgT). Jusqu'alors, nous disposions de peu d'informations sur l'évolution des quantités de miARNs du virus présentes dans les échantillons provenant de patients par rapport à la dynamique globale de l'infection et de ses indicateurs habituels. En ce sens, nous avons mesuré les quantités de miARNs exprimées dans les urines de patients transplantés de rein, tout en replaçant ces résultats dans le suivi longitudinal de l'infection en post-greffe. Dans un premier temps, nous souhaitons mettre le niveau d'expression des miARNs du BKPyV en regard des quantités d'ARNm de VP1 et de l'AgT. Puisque la transcription des miARNs dépend du mécanisme d'expression des gènes tardifs par le NCCR, que les réarrangements du NCCR apparaissent au cours de l'infection prolongée, et que ces réarrangements favorisent l'expression des gènes précoces au dépend des gènes

tardifs, notre hypothèse était de pouvoir observer une corrélation entre les concentrations urinaires de miARNs et le ratio ARNm de VP1 / AgT au cours du suivi des patients présentant une infection active persistante.

L'objectif secondaire de l'étude était de contextualiser la place des différents marqueurs d'infection à BKPyV (bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p, ARNm VP1 et ARNm AgT) en temps de marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques au sein du suivi virologique des patients transplantés de rein. Les ARNm générés par l'infection virale sont présents en faibles quantités et peu stables dans l'environnement extracellulaire, car rapidement dégradés par les RNAses circulantes (41,42). Pour nous affranchir de cette contrainte, nous avons choisi de travailler sur culots de cellules urinaires, permettant de préserver autant que possible la détection des ARNm. Cette méthode était cependant contraignante et non sans limites. Le recueil des urines fraîches pour rapidement isoler les cellules était fastidieux. Les cellules sont peu stables dans les urines, avec une dégénérescence apparaissant dès 2 heures et des résultats faussés à 24 heures après recueil (125,126). Il est possible d'ajouter le tube de recueil en borate de sodium pour augmenter la stabilité des cellules (127) mais cela n'a pas pu être réalisé au cours de notre protocole puisque ce pré-traitement entraîne un risque d'inhibition des réactions de PCR (128). La collection d'échantillons nécessitait donc une attention et une réactivité particulières, sans permettre la mise en place d'une procédure standardisée et homogène entre les différents prélèvements puisque le délai de prise en charge était variable. De plus, de nombreux facteurs peuvent influencer la cytologie urinaire : inflammation, pathologie tumorale, infection, etc. (129,130). Nous ne disposions malheureusement pas d'outils pour objectiver le nombre de cellules en suspension au moment du recueil et normaliser les résultats de RT-PCR à la cytologie.

Au total 89 échantillons provenant de 31 patients transplantés de rein ont été recueillis pour cette étude à propos des miARNs du BKPyV. Il s'agissait alors du plus important effectif jamais étudié dans ce contexte, le second effectif en terme de taille étant la cohorte de 67 échantillons provenant d'« [au moins 17 patients] » dans l'article

de Pietilä *et al.* en 2015 (96). L'effectif était composé de 23 patients diagnostiqués pour une infection à BKPyV au cours du suivi post-transplantation. Pour suivre la dynamique de variation des marqueurs au cours de l'infection, plusieurs prélèvements par patient suivi étaient nécessaires, ce qui a limité le nombre de patients incluables et n'a pas permis de les inclure aléatoirement. 8 patients dits « contrôles » ont été inclus pour évaluer la spécificité des quantifications des marqueurs au sein d'une population n'ayant pas présenté d'ADNurie BKPyV. Les RT-PCR dirigées contre les miARNs et les ARNm du BKPyV étaient réalisées à partir de culots cellulaires non standardisés par rapport à la cytologie. Afin de comparer les résultats des différents échantillons nous avons donc rapporté les quantités détectées au volume d'urine centrifugé initialement. Les résultats définitifs pouvaient ainsi être exprimés en nombre de copies de miARN ou d'ARNm par millilitre d'urine. Pour les 4 marqueurs (ARNm VP1, ARNm AgT, bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p), les concentrations étaient corrélées à l'ADNurie BKPyV. La corrélation la plus forte était observée pour l'ARNm VP1 et la moins forte pour l'ARNm AgT.

Les discordances peuvent être causées par des limites de sensibilité ou de spécificité, mais aussi être en lien avec les échantillons sélectionnés et la dynamique de l'infection. En effet, sous l'influence des réarrangements génomiques du virus, ces deux gènes ne sont pas transcrits à même niveaux aux différents temps de l'infection (100). Les discordances de l'ADNurie en rapport avec le niveau d'expression des ARNm viraux pourraient ainsi s'expliquer. En revanche, la différence de niveau d'expression entre le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p au cours du temps pendant l'infection n'a pas été décrit, alors que nous avons observé une moins bonne corrélation des concentrations de bkv-miR-B1-5p, en comparaison du bkv-miR-B1-3p, avec l'ADNurie. Nos résultats pourraient donc signifier que les mécanismes d'expression du bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p seraient altérés indépendamment dans la maladie à BKPyV, ou ils pourraient simplement témoigner d'un écart de performance entre les techniques de quantification de ces marqueurs. Nos analyses ont porté sur une comparaison avec l'ADN, considéré comme marqueur de référence aujourd'hui

dans le diagnostic des infections à BKPyV. Cependant, il n'est pas totalement spécifique de la maladie à BKPyV provoquant la NBKPyV, observée uniquement lorsque les charges virales sont très importantes et pendant une durée prolongée. D'après nos résultats, nous pourrions supposer que les ARNm et les miARNs sont indétectés malgré des ADNurie positives dans les cas où l'infection est non répliquative et que l'ADN provient de virions défectifs. En ce sens, le bkv-miR-B1-5p étant plus spécifique du BKPyV que le bkv-miR-B1-3p (retrouvé également en cas de répliquative du JCPyV), certaines des discordances observées entre les marqueurs pourraient également s'expliquer, notamment lorsque les quantités d'ADN détectées sont faibles. La détection des ARNm de VP1 et de l'AgT étaient prédictifs d'une présence d'ADN viral dans 100% des cas, prouvant la spécificité de ces marqueurs vis-à-vis de l'infection. En revanche, leur valeur prédictive négative était médiocre. La détection de bkv-miR-B1-3p et de bkv-miR-B1-5p dans les urines se sont avérés très concordants avec la détection d'ADN de manière générale. La spécificité vis-à-vis de l'ADN était moins bonne que celles des ARNm, mais acceptable. Les miARNs matures présentaient en plus des sensibilités de l'ordre de 80%, avec un maximum de VPN de presque 70% pour le bkv-miR-B1-5p détecté à partir des culots urinaires pour éliminer une infection à BKPyV. Reste à déterminer si les 30% d'ADNuries BKPyV restantes, non discriminées par la détection de bkv-miR-B1-5p, sont dus à une limite sensibilité de la recherche de bkv-miR-B1-5p (faussement négative) ou à une mauvaise spécificité de l'ADN du BKPyV pour témoigner de l'infection répliquative (faux positif). Il peut être également noté que les bkv-miR-B1-3p et/ou bkv-miR-B1-5p ont pu être détectés en faibles quantités dans 5 urines négatives en ADN de BKPyV provenant de 5 patients distincts. Ces détections ponctuelles isolées peuvent donc être le reflet du manque de spécificité des RT-PCR utilisées dans notre étude ou, moins probablement, traduire un phénomène d'expression ou de stockage des miARNs viraux dans des cellules non infectées par le BKPyV. Comme les RT-PCR bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p présentent une moins bonne sensibilité que la PCR dirigée contre l'ADN du BKPyV, il

semble peu probable que la discordance provienne d'un résultat faussement négatif de la PCR ADN BKPyV.

Comme nous l'avons démontré, les miARNs viraux sont stables dans le temps (108) et il a été montré pour d'autres infections virales que les miARNs générés dans des cellules infectées peuvent être adressés en faibles quantités à d'autres cellules, infectées ou non (59,79,121). Il existe donc une possibilité qu'à la suite d'une réplication ponctuelle que nous n'avons pas observée, des miARNs aient été produits et stockés dans certaines cellules de l'arbre urinaire, puis relargués plus tard indépendamment d'une réplication virale et de l'excrétion urinaire d'ADN libre ou de virions du BKPyV. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la détection en faible quantité de miARN du BKPyV dans les urines en l'absence d'ADN viral.

En mettant en relation les quantités de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p urinaires avec le ratio ARNm VP1/AgT, nous n'avons pas pu confirmer l'hypothèse d'une corrélation entre l'expression de ces transcrits de gènes tardifs et précoces conditionnée par les réarrangements du NCCR observés au cours de l'infection et la génération de miARNs matures. Il a été montré précédemment que le ratio faible des quantités d'ARNm de VP1 sur AgT était significativement associé à la présence de souches de BKPyV réarrangées (100). Une autre étude avait également mis en lien des niveaux hauts d'expression des miARNs du BKPyV avec le réarrangement du NCCR (80). Nous aurions donc du pouvoir identifier une corrélation entre les concentrations de miARNs et le ratio ARNm VP1/AgT, ce qui n'a pas semblé être le cas. La limite de notre étude a cependant été l'impossibilité de réaliser pour chacun des échantillons un séquençage du NCCR pouvant témoigner de l'éventuelle apparition de réarrangements. Ce type d'expérimentation aurait permis d'analyser plus en profondeur nos résultats et d'identifier les types de réarrangements répondant ou non à l'hypothèse de départ. La connaissance des statuts sérologiques vis-à-vis du BKPyV et ses différents génotypes au moment de la greffe et leur évolution au cours du suivi post-greffe permettraient également de mieux comprendre la dynamique de l'infection

(131). Notre laboratoire a récemment développé une méthode de sérologie standardisée qui pourrait être appliquée à cette cohorte (132).

Les résultats de quantifications des ARNm de VP1 et de l'AgT urinaires n'ayant pas été concluants, même à partir de culots cellulaires, la stratégie de quantification des miARNs des *Polyomaviridae* dans les urines des patients a été adaptée. Puisque ces molécules sont stables et facilement détectables à partir d'échantillons congelés, nous avons élargi notre étude rétrospective afin d'inclure plus de patients et plus d'échantillons. Ceci nous permettait de nous affranchir du processus de recueil prospectif contraignant des culots cellulaires à partir d'urines fraîches et de travailler simplement à partir des excédents d'échantillons de routine conservés dans la biobanque du laboratoire.

Ainsi, 186 urines et 120 plasmas provenant de 43 patients transplantés de rein au CHU Amiens-Picardie entre 2017 et 2018 ont été inclus pour l'étude. Cette cohorte constituait la plus grande cohorte de patients et d'échantillons cliniques jamais analysée au regard des quantités de miARNs de *Polyomaviridae* émises dans les urines. Au-delà de la taille globale de l'échantillonnage, le nombre important de prélèvements disponibles nous a permis de décrire plus précisément la cinétique d'évolution des marqueurs du BKPyV au cours de l'année suivant la greffe puisque de nombreux prélèvements étaient disponibles pour chaque patient. L'objectif principal était d'évaluer l'intérêt prédictif, diagnostique et pronostique de la quantification des miARNs du BKPyV par rapport à la dynamique de l'infection. Comme Huang *et al.* l'avaient observé (98), les concentrations de miARNs viraux urinaires étaient plus élevées dans le groupe de patients présentant une ADNémie à BKPyV par rapport aux patients sans répllication évidente du BKPyV ou simplement viruriques. Nous avons également confirmé que les taux de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p urinaires étaient corrélés aux concentrations d'ADN BKPyV dans les urines et le plasma. Les miARNs du BKPyV plasmatiques étaient difficilement détectables chez les patients analysés dans d'autres études (81,98). Même si aucun des patients inclus dans notre étude n'a développé de NBKPyV, le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p ont respectivement été

détectés dans 15 et 21 des 57 plasmas appartenant à 14 patients qui avaient souffert d'une répliation soutenue du BKPyV. Les quantités de bkv-miR-B1-3p, mais pas celles de bkv-miR-B1-5p, dans le plasma étaient corrélées à celles de l'ADN BKPyV. Cette discordance s'explique par la surprenante détection de bkv-miR-B1-5p dans le plasma de patients qui n'étaient pas encore ADNémiques. Nous pouvons supposer que dans ce type de situation, le bkv-miR-B1-5p pourrait être émis plus précocement que l'ADN dans la circulation sanguine. L'échantillonnage limité de l'étude n'a pas permis d'explorer plus en détail cette hypothèse pour la confirmer ou l'infirmier. Broekema *et al.* avait montré qu'au tout début de la répliation du BKPyV dans les cellules infectées l'expression des miARNs encodés par le BKPyV précédait la répliation du génome dans les cellules épithélial tubulaires rénales humaines (80), ce qui serait en accord avec notre hypothèse. En lien avec cette observation, il a également été constaté que les miARNs du BKPyV étaient fréquemment détectés dans les urines des transplantés au cours des 2 semaines suivant la greffe, en dépit de l'indétectabilité de l'ADN viral. La période qui suit l'induction du traitement comporte les plus hautes doses d'immunosuppression d'entretien. Ces premières semaines post-transplantation sont donc propices à l'apparition d'infection opportunistes et à la répliation du BKPyV. Il a alors été supposé que les miARNs du BKPyV pourraient constituer des marqueurs pertinents pour la prédiction ou le diagnostic précoce de la répliation virale. Cependant, la détection de bkv-miR-B1-3p et/ou de bkv-miR-B1-5p dans les urines avant les 15 premiers jours suivant la greffe n'étaient pas significativement associées à un risque accru de développer une virurie ou une ADNémie BKPyV. Pour éliminer d'éventuels résultats faussement positifs, la connaissance des statuts sérologiques des patients et leur donneur de rein respectifs pourrait encore une fois être d'une aide significative. Au total, l'étude n'a pas permis d'identifier d'intérêt des miARNs encodés par le BKPyV pour prédire la répliation future du virus. Comme énoncé précédemment, la cohorte étudiée ne comprenait pas de patients ayant développé de NBPv et nous n'avons donc pas pu évaluer le risque d'apparition de cette complication en cas de détection précoce des miARNs du BKPyV.

Afin d'évaluer l'intérêt diagnostique de ces biomarqueurs, nous avons comparé les concentrations de miARNs et d'ADN du BKPyV dans les urines des patients pour diagnostiquer une ADNémie. Le prélèvement urinaire est non invasif ce qui facilite le recueil tout en participant à l'épargne sanguine des patients. Il a déjà été montré que la détection d'ADN viral à des concentrations supérieures à $7 \log_{10}$ copies/mL permettait à la fois d'identifier les patients virémiques mais également d'anticiper le diagnostic puisque la virurie précède toujours la virémie (22,24). Il était donc essentiel de comparer la valeur en pratique clinique de la quantification des miARNs viraux urinaires par rapport à l'ADNurie, marqueur reconnu et compris dans les recommandations internationales pour le suivi virologique. Il s'est avéré que le screening des bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p dans les urines était moins efficace que la recherche d'ADN viral pour diagnostiquer l'ADNémie. Les sensibilités étaient respectivement de 73,3%, 55,6% et 100% pour le bkv-miR-B1-3p, le bkv-miR-B1-5p et l'ADN urinaires. Cependant, la spécificité était d'environ 80% pour chaque miARN, même à des faibles concentrations. En l'état, les miARNs ne permettraient pas de supplanter l'ADN du BKPyV en tant que marqueur non invasif pour le diagnostic d'ADNémie. Cependant notre limite de sensibilité pour les RT-PCRs de miARN est bien inférieure à celle des kits commerciaux pour la recherche d'ADN, pouvant descendre à moins de 200 copies/mL d'urine (133). Une amélioration de nos protocoles de purification des acides nucléiques et de la sensibilité intrinsèque de la RT-PCR pourrait corriger le problème.

Nous n'avons pas fait de comparaison des différents types d'extraction ni des différents kits commerciaux existants pour la purification des miARNs. Cependant, il semble que le kit utilisé présente de très bonnes performances par rapport aux autres solutions du marché (134). De même, le système utilisé pour la RT-PCR n'a pas été comparé à d'autres solutions. Différentes plateformes, disponibles via différents fabricants existent et doivent être comparées pour déterminer le protocole optimal pour l'utilisation espérée en clinique. Nous avons choisi la méthode classique de qPCR qui s'adapterait le mieux à la pratique courante hospitalière. Il nous faudrait désormais

comparer les kits des différents fournisseurs. Une supériorité du kit miRCURY (Exiqon, Vedbaek, Danemark) par rapport aux kits basés sur la technologie TaqMan a par exemple été identifiée pour les miRNAs peu abondants (135). Les autres solutions impliqueraient une adaptation importante du fonctionnement du laboratoire par rapport au suivi virologique classique. En effet les techniques reposant sur les puces à ARN, le séquençage haut-débit, ou l'amplification isotherme nécessitent du matériel spécifique et du personnel formé à ces méthodes moins répandues (136). Elles présentent donc des désavantages qui peuvent ne pas compenser leur éventuel gain de précision pour la quantification des miARNs (Tableau 9). Cependant une technologie qui se répand de plus en plus dans les laboratoires pourrait rapidement marquer un tournant dans la quantification des miARNs. En effet, la « digital droplet PCR » (ddPCR) présente de nombreux avantages dans cette application. Le principal avantage de la ddPCR par rapport à la RT-qPCR est sa sensibilité réduite aux inhibiteurs de la PCR et sa capacité à effectuer une quantification absolue, éliminant ainsi le besoin de références endogènes ou de courbes de calibrage standard (137). Par rapport à la RT-qPCR, la plupart des études ont également démontré une sensibilité, une précision et une reproductibilité similaires ou améliorées de la ddPCR (138,139), même pour des miARNs viraux (140), avec une très bonne corrélation entre les deux techniques. De plus, la performance des chimies utilisés par les différents fabricants sont comparables en ddPCR (137), ce qui favorise la comparabilité entre les études. Un équipement spécifique est cependant nécessaire pour utiliser cette technologie et nous ne disposons pas de ce matériel actuellement au laboratoire pour réaliser les études nécessaires.

Technologie	Avantages	Limites
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode de référence actuelle en matière de sensibilité et de spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de couverture à l'échelle du génome
Microarray	<ul style="list-style-type: none"> • Réactifs disponibles dans le commerce 	<ul style="list-style-type: none"> • Sondes spécifiques • Équipement spécialisé

Technologie	Avantages	Limites
	<ul style="list-style-type: none"> • Couverture à l'échelle du génome 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de reproductibilité entre les plates-formes • Normalisation difficile des données
Séquençage nouvelle génération (NGS)	<ul style="list-style-type: none"> • Couverture à l'échelle du génome • Plusieurs échantillons peuvent être exécutés en parallèle • Favorise la découverte de nouveaux miARN • Peut détecter les polymorphismes 	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de données compliquée et non normalisée • Coût • Equipement spécifique
ddPCR	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification absolue • Interprétation facilitée des résultats • Moins sensible aux inhibiteurs de PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipement spécialisé • Sondes spécifiques
Amplification isotherme	<ul style="list-style-type: none"> • Pas besoin d'équipement de thermocyclage • Peut améliorer les méthodes existantes de qPCR, de microArray et de NGS 	<ul style="list-style-type: none"> • Les inconvénients sont spécifiques à la technique (voir ci-dessous)
<ul style="list-style-type: none"> • Amplification exponentielle 	<ul style="list-style-type: none"> • Haute sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut nécessiter une enzyme de spécifique, ce qui complique la conception
<ul style="list-style-type: none"> • Amplification circulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 amorce • Peut être optimisé pour l'amplification linéaire ou exponentielle 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite 2 enzymes (polymérase et ligase) • Dénaturation initiale non effectuée à température ambiante
<ul style="list-style-type: none"> • Amplification du signal par nucléase spécifique de duplex 	<ul style="list-style-type: none"> • Haute spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • L'enzyme n'est pas facilement disponible
<ul style="list-style-type: none"> • Réaction en chaîne d'hybridation 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de polymérase 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplification linéaire uniquement
Technologie proche infrarouge	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'autofluorescence • Photoblanchiment minimal 	<ul style="list-style-type: none"> • Les sondes en lanthanide ne sont pas encore disponibles dans le commerce et doivent être optimisées

Technologie	Avantages	Limites
	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de traitement fastidieux de l'échantillon avant ou après le test 	

Tableau 9 : Technologies existantes pour la quantification des miARNs (adapté de Moody et al.) (136)

A ce jour, la seule possibilité d'intervention thérapeutique avec preuve d'efficacité pour l'infection à BKPyV chez les transplantés de rein est la réduction de l'immunosuppression (22). Malheureusement, cette stratégie augmente le risque de complication immunitaire dont le rejet de greffe. Une fois que l'ADNémie voire la néphropathie est diagnostiquée lors de l'infection à BKPyV, les médecins manquent d'un marqueur permettant de suivre l'évolution de l'infection et adapter le traitement immunosuppresseur dès le contrôle de l'infection. Il est possible de suivre l'ADNémie mais certains patients peuvent rester positifs pendant de nombreux mois, sans évolution défavorable de la clinique. Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude ont mis en évidence un profil d'évolution différent des concentrations urinaires en miARN du BKPyV en fonction du devenir de l'infection. Pour les 7 patients (sur 14 au total) ayant contrôlé l'infection dans les 12 premiers mois du suivi post-greffe, l'ADN du BKPyV dans les liquides biologiques diminuait lentement au décours de l'adaptation du traitement immunosuppresseur. Pour l'ensemble de ces 7 patients, les miARNs du BKPyV disparaissaient beaucoup plus rapidement, suggérant précocement un arrêt de la réplication virale. Des résultats similaires étaient observés pour 4 autres patients qui ont développé tardivement une réplication du BKPyV et pour lesquels la cinétique des marqueurs était moins précise. Martelli *et al.* avaient rapporté des variations dans le temps similaires pour les concentrations urinaires exosomales de bkv-miR-B1-5p pour des patients atteints de sclérose en plaque, sous la dépendance des réarrangements du NCCR (87). A l'inverse, les 7 patients qui ont présenté une réplication persistante du BKPyV, avec des concentrations stables en ADN viral dans le plasma et les urines, ont continué à émettre à niveaux constants les

miARNs dans les urines. Ainsi, nous avons supposé que les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p pourraient être des biomarqueurs plus intéressants pour le suivi de l'infection que l'ADN viral, une fois le diagnostic de répllication à BKPyV posé à partir de la PCR ADN habituelle, et la thérapie immunosuppressive adaptée. Le bkv-miR-B1-5p est théoriquement le marqueur de choix dans ce contexte, car spécifique du BKPyV, contrairement au bkv-miR-B1-3p pouvant également être généré lors de la répllication du JCPyV. Cependant, nos résultats ont montré des discordances ponctuelles entre les RT-PCRs bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p qui n'étaient pas systématiquement expliquées par une répllication du JCPyV marquée par la présence d'ADN de JCPyV dans les urines. Alors que les évaluations de performances intrinsèques des RT-PCRs bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p étaient en faveur du bkv-miR-B1-5p, il a plutôt été constatée une meilleure sensibilité de la RT-PCR bkv-miR-B1-3p à partir des échantillons cliniques. Nous suggérons donc une recherche simultanée des deux miARNs pour éviter les erreurs d'interprétation tant que nous ne disposons pas de plus de données. Des études prospectives et multicentriques sont nécessaires pour confirmer nos résultats.

Dans le but de confirmer notre hypothèse consistant à caractériser la répllication du BKPyV par la quantité de miARN émis dans le milieu extracellulaire, un modèle de culture cellulaire chronique de HRPTEC infectées par des souches de BKPyV isolées à partir d'échantillons cliniques a été développé au sein du laboratoire. La lignée cellulaire utilisée correspond à des cellules humaines rénales proximales tubulaires immortalisées. Elles sont donc physiologiquement très adaptées au modèle d'infection du BKPyV et présentent l'avantage d'être plus facilement cultivables que des cellules primaires. Les contraintes de culture (milieu de conditionnement, facteurs de croissance, temps de division) sont cependant les mêmes que pour des cellules primaires. Le coût et le temps nécessaires à leur manipulation limitent donc leur utilisation. En parcourant la littérature, peu d'articles décrivent des méthodes efficaces pour la propagation d'isolats cliniques de BKPyV (8,11,141-144). Les méthodes étaient souvent empiriques et nous avons constaté qu'elles n'étaient pas très

reproductibles. Nous avons nous-mêmes adapté empiriquement un des protocoles existants pour développer notre modèle. De nombreuses urines de patients positives à ADN du BKPyV ont été filtrées sur des membranes de 0,45 µm pour éliminer les débris cellulaires et les éventuelles bactéries contaminantes. Ces urines ont ensuite été additionnées au milieu de culture cellulaire des HRPTEC. L'efficacité de la propagation de l'infection virale a semblé aléatoire et indépendante de critères cliniques (fonction rénale, traitements immunosuppresseurs, pathologies associées, délai post-greffe) ou biologiques (ADNémie et ADNurie BKPyV, concentration plasmatique en créatinine) du patient au moment du recueil de l'urine. Au total, seuls 4 isolats cliniques nous ont permis de reproduire une infection chronique à BKPyV comme celles que nous avons observé précédemment (109). En effet, 2 cultures d'isolats cliniques étaient caractérisées par une expression de bkv-miR-B1-5p importante et stable au cours du temps, alors que les 2 autres présentaient des taux faibles qui décroissaient rapidement. En utilisant les surnageants de ces cultures chroniques de cellules infectées pour infecter de nouvelles cellules naïves, nous avons confirmé que seuls les surnageants provenant de cultures très riches en bkv-miR-B1-5p étaient infectieux. Dans l'article qui comporte ces résultats (108), nous n'avons pas montré la cinétique de la concentration d'ADN BKPyV dans le surnageant de culture. Nous observions une tendance qui aurait pu permettre de distinguer les 2 types d'infection mais l'écart de niveau d'expression était plus étroit que pour le bkv-miR-B1-5p (notamment entre les isolats cliniques C1 et C4). Il aurait été donc moins précis de prédire l'infectiosité des surnageants. Ces résultats permettent d'illustrer l'intérêt de la quantification du bkv-miR-B1-5p dans les liquides biologiques, notamment l'urine, pour déterminer si l'infection à BKPyV est activement répliquative avec production de virions infectieux. Ainsi, en absence de détection du bkv-miR-B1-5p, ou à des quantités inférieures à un seuil restant à déterminer, le clinicien pourrait disposer d'un marqueur objectif de contrôle de l'infection à BKPyV et adapter le traitement immunosuppresseur plus précocement pour prévenir les complications auto-immunes. Ce modèle pourrait être optimisé pour explorer plus profondément la

dynamique de l'infection comme nous l'avons fait pour les différents biomarqueurs. En effet, il serait possible de mettre en culture des urines positives en ADN de BKPyV et plus ou moins positives pour les miARNs du BKPyV pour déterminer si la réplication est toujours active ou non. Ces expérimentations permettraient d'apporter plus d'arguments pour supporter l'hypothèse que nous avons émise. Elles nécessiteraient cependant des coûts importants pour la quantification de l'ADN et des miARNs du BKPyV, et pour la culture chronique des HRPTEC. De plus, ce modèle repose sur une culture chronique et implique une période d'étude conséquente. Il est important de noter que malgré la filtration des urines et l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu de culture cellulaire, les contaminations bactériennes des cultures cellulaires additionnées en urines humaines sont fréquentes et limitent encore plus les protocoles expérimentaux à grande échelle.

Le dernier objectif de ce travail de thèse était d'investiguer l'effet croisé des miARNs des *Polyomaviridae* entre les différentes espèces. Les homologies très fortes entre les miARNs du BKPyV et ceux du JCPyV et l'épidémiologie humaines des infections causées par ces deux virus justifiaient de s'intéresser particulièrement à elles. La cohorte de patients et d'échantillons cliniques utilisés pour étudier la dynamique du bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p a donc été mise à profit pour caractériser l'émission du jcv-miR-J1-5p dans les urines de transplantés de rein au décours de la greffe. Concernant la recherche de jcv-miR-J1-5p urinaires, nous supposons que la présence de ce miARN témoignerait d'une activité répliquative du JCPyV au niveau de l'appareil urinaire. Celle-ci aurait *a fortiori* entraîné la transcription de jcv-miR-J1-3p, identique structurellement au bkv-miR-B1-3p, et aurait favorisé la régulation négative de la réplication d'une infection BKPyV débutante ou en cours. Lors de la réplication du BKPyV nous avons constaté que l'expression de miARNs étaient globalement corrélée à la réplication génomique de l'ADN virale. Nous supposons que les quantités générées sont alors relativement trop faibles par rapport à la quantité de particules virales en activité pour réellement permettre une régulation

négative efficace de la réplication virale *via* une répression de l'expression de l'AgT, pourtant démontrée *in vitro* (80). En revanche, la réplication asymptomatique du JCPyV constituerait une source exogène de miARNs régulateurs, notamment le jcv/bkv-miR-J1/B1-3p, excédant largement les quantités d'ARNm de l'AgT générées par la réplication précoce du BKPyV. Dans ce contexte, l'expression de l'AgT serait réprimée et la réplication du BKPyV serait limitée. La détection des miARNs du JCPyV, notamment le jcv-miR-J1-5p spécifique de l'espèce virale, aurait été de bon pronostic quant à la survenue d'une maladie à BKPyV. La technique de RT-PCR que nous avons utilisée a malheureusement présenté trop de limites en termes de spécificité, ne nous ayant pas permis de réaliser l'analyse telle qu'elle était prévue. La technique que nous avons utilisée a cependant pu mettre en évidence du jcv-miR-J1-5p chez près d'un quart de nos patients (10/43). Comme pour les résultats des dosages de bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p qui peuvent être confrontés aux sérologies anti-BKPyV, ces résultats mériteraient d'être comparés aux statuts sérologiques JCPyV des donneurs et receveurs de rein pour confirmer qu'il s'agit bien d'une manifestation de la réplication du JCPyV lors de l'immunosuppression et non de détection aspécifique. De plus, le jcv-miR-J1-5p était essentiellement retrouvé précocement (dans le premier mois post-greffe) et chez les patients n'ayant pas développé d'infection à BKPyV par la suite. La taille de la population étant restreinte, l'analyse statistique n'a pas pu montrer de résultat significatif quant à l'effet protecteur de la réplication précoce de JCPyV au décours rapide de la greffe vis-à-vis du risque d'infection à BKPyV. Nous remarquons cependant une tendance encourageante (Odds Ratio = 0,1217 [IC95% = 0,0099 – 1,157], $p = 0,072$ selon le test d'exactitude de Fisher) devant être explorée sur une cohorte plus large et avec une technique de RT-PCR plus performante. En revanche, la présence de jcv-miR-J1-5p et la probable réplication du JCPyV pendant une infection à BKPyV ne semble pas réguler négativement l'infection à BKPyV. Cette observation a été faite sur seulement 4 patients et en nous basant sur la quantité d'ADN de BKPyV. Nous avons néanmoins pu décrire un cas de patient positif à jcv-miR-J1-5p dans les urines pour lequel nous pouvons observer une variation quantitative de bkv-

miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p et ADN de BKPyV par la suite. En effet, pour les deux miARNs les quantités retrouvées ont diminué en passant respectivement de 7,42 à 7,04 log copies/mL et de 6,29 à 5,85 log copies / mL entre M3 (temps pour lequel le jcv-miR-J1-5p est positif) et M6, alors que la quantité d'ADN de BKPyV avait augmenté (de 8,71 à 9,81 log copies/mL d'urine) après l'apparition de jcv-miR-J1-5p dans les urines. Ce cas isolé, associé aux limites techniques rencontrées, rendent l'interprétation des résultats hasardeuse. Après optimisation de la RT-PCR jcv-miR-J1-5p, nous pourrions étudier plus largement les événements associés à l'émission du jcv-miR-J1-5p dans les urines des patients transplantés, particulièrement au sein de la cohorte de patient nous ayant permis de caractériser l'épidémiologie des infections à BKPyV et JCPyV qui touchent les patients du CHU-Amiens. En effet, cette étude a permis d'identifier les greffés de rein répliquant le JCPyV au cours du suivi, alors que cette donnée est habituellement inconnue en raison du caractère inoffensif de la réplication de ce virus chez ce type de patients. Il serait donc possible d'analyser exhaustivement l'ensemble des cas ayant été suivis dans notre centre sur une grande période (entre 2013 et 2020).

Puisque la stratégie de l'étude clinique des interactions BKPyV-JCPyV par le biais de leur miARNs s'est révélée défailante, un modèle *in vitro* a été développé au laboratoire. Il consistait à transfecter les miARNs de ces virus dans des cellules RPTEC-hTER1 puis de les infecter avec des particules infectieuses de BKPyV. En premier lieu, l'objectif était de confirmer sur notre modèle l'effet déjà démontré de l'apport excessif du bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p pour inhiber la réplication virale (80,93). Nous avons ensuite démontré que le jcv-miR-J1-5p, par un mécanisme encore non élucidé, avait la même propriété pour réprimer l'expression de l'AgT du BKPyV ce qui a pour conséquence une inhibition de la réplication virale. Les particularités et avantages de notre modèle étaient multiples par rapport aux précédentes études. D'abord, il reposait sur des cellules humaines rénales tubulaires proximales constituant un support physiologiquement plus proche de l'infection *in vivo*. De plus, nous avons opté pour un apport limité de mimics de miARNs (50 nM) réduisant l'effet « off-target » non spécifique qui peut survenir à des plus fortes concentrations, comme à celle de 100

nM pratiquée dans l'étude de Tian et *al.* (93). Cette concentration en mimics dans le mélange de transfection avait d'ailleurs un effet cytotoxique sur les cultures cellulaires lors de nos essais de viabilité. Enfin, nous utilisons des particules virales complètes, et non des plasmides rapporteurs de l'AgT du BKPyV, pour simuler au mieux l'infection. La multiplicité d'infection utilisée était volontairement plus importante que dans la littérature (MOI = 1 contre 0,01 précédemment décrit (80)) pour s'assurer d'une propagation suffisante de l'infection à BKPyV et compléter les connaissances déjà établies en montrant que l'effet était également observable pour des MOI plus fortes. Nous ne disposons pas de mimics de miARNs des *Polyomaviridae* marqués pour émettre de la fluorescence. Il n'a donc pas été possible de contrôler précisément l'efficacité de chaque type de transfection spécifiquement. En revanche, nous avons utilisé un miARN générique marqué par le fluorophore Cy3 qui a montré une homogénéité et un excellent rendement pour la transfection. Il a même été constaté que les cellules transfectées semblaient plus sensibles à l'infection puisque le marquage Cy3 était fréquemment colocalisé avec le marquage FITC de l'immunomarquage de l'AgT lorsque les cellules étaient infectées par le BKPyV. Il est possible que la perméabilisation des cellules par l'agent de transfection ait pu favoriser l'entrée des particules virales préférentiellement dans ces cellules plutôt que les cellules adjacentes moins exposées à l'agent de transfection. Ce phénomène n'a pas été exploré plus en détails au cours de l'étude mais mérite des investigations supplémentaires. En effet, les mécanismes d'entrée du BKPyV sont méconnus (5,16) et une meilleure connaissance de ceux-ci permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques ou optimiser les modèles de propagation virale *in vitro*, en particulier pour la culture d'isolats cliniques de BKPyV.

L'exposition des cellules infectées au jcv-miR-J1-5p permettait de diminuer significativement les quantités d'ARNm de l'AgT retrouvées, comme pour le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p. Le processus aboutissant à cet effet est cependant non connu. Il peut résulter d'un phénomène siARN-like du jcv-miR-J1-5p pour dégrader l'ARNm et/ou d'une limitation de la traduction virale de l'ARNm en protéine AgT.

Dans les deux cas, l'AgT étant un facteur de transcription favorisant la réplication du génome, la diminution de son expression devrait entraîner une réduction de la réplication virale. Cette conséquence n'a pas été observée en analysant la quantité d'ADN viral intra- et extracellulaires. Il est possible que le délai post-infection était trop court pour observer un quelconque effet de ce type. Cependant, nos essais de cytotoxicité montraient une diminution de la viabilité cellulaire à 72h en appliquant notre modèle. Une analyse à ce temps pourrait donc être biaisé par l'effet cytotoxique de la transfection. Nous avons également pu observer une inhibition de l'expression protéique de l'AgT en cas d'exposition au jcv-miR-J1-5p, de la même manière qu'avec le bkv-miR-B1-3p et le bkv-miR-B1-5p. Il n'est cependant encore pas possible de déterminer si cette observation est liée à une dégradation directe de l'ARNm ou d'un processus traductionnel. Il est intéressant de constater que l'effet du jcv-miR-J1-5p sur les différentes formes de l'AgT variait par rapport aux effets du bkv-miR-B1-3p et du bkv-miR-B1-5p. Ces résultats suggèrent que les appariements du jcv-miR-J1-5p avec les ARNm de l'AgT, de l'Agt et du tAgT du BKPyV sont différents de ceux des miARNs matures du BKPyV (bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p). Une étude *in silico* des appariements compatibles, en rapport avec les séquences nucléotidiques des différentes molécules, pourraient donner des pistes de réflexion sur les éléments de séquences indispensables au processus. Elles pourraient alors être explorées selon notre modèle en utilisant des mimics et des virus mutés pour identifier et confirmer ces suppositions. De plus, la part des différents mécanismes n'a pas pu être explorée. En effet, nous ne connaissons pas le processus majoritaire ni l'intensité de chacun d'entre eux. Pour les miARNs humains, il est admis que 10-20% de la répression génique via les miARNs est causé par le phénomène siARN-like, et 50% par blocage de la traduction (67,68). Dans nos expériences nous avons effectivement constaté une dégradation de 10-20% des ARNm AgT causée par les bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p, mais nous n'avons pas pu quantifier précisément l'inhibition de l'expression des protéines. Cependant, celle-ci semble être relativement importante (de

l'ordre de 30% pour les 3 miARNs d'après l'analyse de la densité de pixel par ImageJ), en conformité avec les connaissances de la littérature sur d'autres miARNs.

Enfin, nous avons montré que la pré-exposition des cellules aux miARNs du BKPyV et du JCPyV permettait de diminuer significativement l'infection à BKPyV. C'est la première fois que cette propriété antivirale est décrite pour le jcv-miR-J1-5p. Alors que l'effet antiviral des bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p était décrit, ces molécules sont aussi connues pour favoriser l'échappement immunitaire de l'infection du BKPyV. En raison de cette dualité, il serait donc potentiellement risqué de les utiliser comme antiviral dans l'infection. En revanche, le jcv-miR-J1-5p pourrait avoir un effet antiviral sur le BKPyV indépendant de l'échappement immunitaire. Cet effet n'est cependant pas exclu puisque si le jcv-miR-J1-5p est suffisamment homologue au bkv-miR-B1-5p pour inhiber l'expression de l'AgT il peut également l'être pour avoir les mêmes effets sur le système immunitaire et la machinerie cellulaire. Avant de considérer le jcv-miR-J1-5p comme une réelle molécule anti-BKPyV, il faudra donc vérifier cette hypothèse. Nos essais de réinfection n'ont pas été concluants ce qui ne nous permet pas d'affirmer que le jcv-miR-J1-5p diminue la génération de particules infectieuses de BKPyV, de même que pour les bkv-miR-B1-3p et bkv-miR-B1-5p. En effet, l'utilisation des surnageants des cellules pré-exposées aux miARNs de *Polyomaviridae* puis infectées par le BKPyV pour infecter des cellules naïves s'est révélé peu efficace dans toutes les conditions. Le pourcentage de cellules infectées secondairement était trop faible pour permettre une analyse fiable. De plus, nous avons étudié l'effet antiviral uniquement en pré-exposant les cellules aux mimics de miARNs avant d'infecter. Le but était de modéliser une réplication préalable du JCPyV qui générerait des miARNs limitant la réplication subséquente du BKPyV. L'effet antiviral du jcv-miR-J1-5p au cours d'une infection à BKPyV déjà établie et intense reste à déterminer.

Au cours de ces travaux, seules les interactions BKPyV – JCPyV ont été investiguées puisque ce sont les virus les plus souvent analysés chez les patients transplantés de rein. Il pourrait être intéressant d'étendre nos analyses aux autres *Polyomaviridae*, et

particulièrement les HPyVs. Quels pourraient être les effets antiviraux des miARNs du BKPyV et du JCPyV sur d'autres polyomavirus impliqués en pathologie humaine ? A ce jour, seul le Merkel Cell Polyomavirus a été décrit pour générer un miARN mature : le MCV-miR-M1-5p. Contrairement au BKPyV et au JCPyV, ce miARN a très peu d'homologie avec les bkv-miR-B1-3p, bkv-miR-B1-5p et jcv-miR-J1-5p. Il est donc peu probable de pouvoir transposer nos résultats à cette espèce virale. Pour les autres HPyVs, tels que les HPyV6 et 7 impliqués dans des pathologies tumorales (145), il faudrait préalablement décrire leurs miARNs avant d'envisager des études d'interactions inter-espèces via les miARNs.

V. CONCLUSION

L'étude des propriétés du bkv-miR-B1-5p, spécifique du BKPyV, dans le milieu extracellulaire a démontré son importante stabilité, probablement en lien avec son association forte avec la protéine Ago2 et une relativement faible présence dans les vésicules extracellulaires. Une analyse longitudinale à partir de nombreuses urines de patients transplantés de rein a permis de montrer l'intérêt des miARNs du BKPyV pour le suivi de l'infection, comparativement à d'autres marqueurs (ADN et ARNm) du virus. En revanche, leur place en tant que marqueur diagnostique reste limitée. Une modélisation *in vitro* de l'infection chronique de cellule rénales proximales tubulaires à partir de souches de BKPyV issues de patients infectés a confirmé que les quantités de bkv-miR-B1-5p extracellulaire étaient corrélées à la réplication et l'infectivité des virions. Enfin, après avoir confirmé les résultats de la littérature sur le rôle autorégulateur de réplication des miARNs du BKPyV, nous avons prouvé de manière inédite que le jcv-miR-J1-5p, spécifique du JCPyV, avait également la propriété d'inhiber la réplication du BKPyV *in vitro*. Ainsi, nous disposons de nouveaux éléments permettant de considérer les miARNs des *Polyomaviridae* parmi les marqueurs disponibles dans le diagnostic *in vitro*, mais aussi comme potentiels antiviraux.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* sept 2011;156(9):10.1007/s00705-011-1008-x.
2. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol.* juin 2017;98(6):1159-60.
3. DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol.* avr 2013;11(4):264-76.
4. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, et al. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure.* 5 avr 2016;24(4):528-36.
5. Helle F, Brochot E, Handala L, Martin E, Castelain S, Francois C, et al. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses.* 03 2017;9(11).
6. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant MM, Renaudin K, Imbert-Marcille BM. Le virus BK : état des connaissances en 2003 et particularités de l'infection en transplantation rénale. *Virologie.* 1 nov 2003;7(6):433-44.
7. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature.* juin 2005;435(7042):682-6.
8. Moens U, Johansen T, Johnsen JL, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes.* 1995;10(3):261-75.
9. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol.* août 2007;79(8):1199-207.
10. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med.* 14 avr 2008;205(4):841-52.
11. Hanssen Rinaldo C, Hansen H, Traavik T. Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain--a tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. *Arch Virol.* juill 2005;150(7):1449-58.
12. Broekema NM, Imperiale MJ. Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. *Virology.* 20 janv 2012;422(2):235-41.

13. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol.* avr 2012;13(4):339-40.
14. Henriksen S, Hansen T, Bruun JA, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J Virol.* 15 nov 2016;90(22):10398-413.
15. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transplant Infectious Disease.* 2006;8(2):62-7.
16. Handala L, Blanchard E, Raynal PI, Roingeard P, Morel V, Descamps V, et al. BK polyomavirus hijacks extracellular vesicles for en bloc transmission. *Journal of Virology* [Internet]. 2 janv 2020 [cité 3 juin 2020]; Disponible sur: <https://jvi.asm.org/content/early/2020/01/02/JVI.01834-19>
17. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* oct 2003;3(10):611-23.
18. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, et al. Different Risk Factors Related to Adenovirus- or BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* mars 2012;18(3):458-65.
19. Silva RL da. Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *Braz J Infect Dis.* 1 mai 2011;15(3):276-84.
20. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* mai 1999;10(5):1080-9.
21. Demey B, Tinez C, François C, Helle F, Choukroun G, Duverlie G, et al. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. *J Clin Virol.* 2018;109:6-12.
22. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* sept 2019;33(9):e13528.
23. Kiberd BA. Screening to Prevent Polyoma Virus Nephropathy: A Medical Decision Analysis. *American Journal of Transplantation.* 2005;5(10):2410-6.
24. Brochot E, Descamps V, Handala L, Faucher J, Choukroun G, Helle F, et al. BK polyomavirus in the urine for follow-up of kidney transplant recipients. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1 août 2018 [cité 11 sept 2018];0(0). Disponible sur: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(18\)30545-7/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(18)30545-7/fulltext)

25. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* mars 2013;13 Suppl 4:179-88.
26. Rinaldo CH, Hirsch HH. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev Anti Infect Ther.* févr 2007;5(1):105-15.
27. Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK-virus and the impact of pre-emptive immunosuppression reduction: 5-year results. *Am J Transplant.* févr 2010;10(2):407-15.
28. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant.* déc 2010;10(12):2615-23.
29. Shen CL, Wu BS, Lien TJ, Yang AH, Yang CY. BK Polyomavirus Nephropathy in Kidney Transplantation: Balancing Rejection and Infection. *Viruses.* mars 2021;13(3):487.
30. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant.* juill 2008;8(7):1413-22.
31. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus BK Replication in De Novo Kidney Transplant Patients Receiving Tacrolimus or Cyclosporine: A Prospective, Randomized, Multicenter Study. *Am J Transplant.* janv 2013;13(1):136-45.
32. Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4714-22.
33. Williams JW, Mital D, Chong A, Kottayil A, Millis M, Longstreth J, et al. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. *Transplantation.* 15 févr 2002;73(3):358-66.
34. Song TR, Rao ZS, Qiu Y, Liu JP, Huang ZL, Wang XD, et al. Fluoroquinolone prophylaxis in preventing BK polyomavirus infection after renal transplant: A systematic review and meta-analysis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* 1 mars 2016;32(3):152-9.
35. Khalil MAM, Khalil MAU, Tan J, Khan TFT. Fluoroquinolones and BK Virus Nephropathy: A Myth or a Reality. *Indian J Nephrol.* 2018;28(4):257-64.
36. Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation.* 27 juin 2010;89(12):1462-5.

37. Blackard JT, Davies SM, Laskin BL. BK polyomavirus diversity—Why viral variation matters. *Reviews in Medical Virology*. n/a(n/a):e2102.
38. Kane JR, Fong S, Shaul J, Frommlet A, Frank AO, Knapp M, et al. A polyomavirus peptide binds to the capsid VP1 pore and has potent antiviral activity against BK and JC polyomaviruses. *Elife*. 21 janv 2020;9.
39. Kovacs S. A First-in-Human Study of MAU868, a Novel Neutralizing Antibody Against BK Virus. In ASH; 2020 [cité 18 août 2022]. Disponible sur: <https://ash.confex.com/ash/2020/webprogram/Paper136210.html>
40. Hultström M, Becirovic-Agic M, Jönsson S. Comparison of acute kidney injury of different etiology reveals in-common mechanisms of tissue damage. *Physiological Genomics*. 20 déc 2017;50(3):127-41.
41. Ding R, Medeiros M, Dadhania D, Muthukumar T, Kracker D, Kong JM, et al. Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation*. 15 oct 2002;74(7):987-94.
42. Astegiano S, Bergallo M, Terlizzi ME, Sidoti F, Gambarino S, Messina M, et al. Combined measurement of serum DNA and urine VP1 messenger RNA in monitoring BK virus replication in kidney graft recipients. *Transplant Proc*. mai 2011;43(4):1052-4.
43. De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, Guérin R, Ménard C, Bambace N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem*. juill 2013;46(10-11):846-60.
44. Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in Medicine*. 1 août 2013;7(4):623-31.
45. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CDS, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, et al. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev*. juill 2012;25(3):471-506.
46. White MK, Gordon J, Khalili K. The Rapidly Expanding Family of Human Polyomaviruses: Recent Developments in Understanding Their Life Cycle and Role in Human Pathology. *PLoS Pathog* [Internet]. 14 mars 2013 [cité 14 janv 2020];9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597531/>
47. Trowbridge PW, Frisque RJ. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol*. juin 1995;1(2):195-206.
48. Kim HS, Henson JW, Frisque RJ. Transcription and Replication in the Human Polyomaviruses. In: *Human Polyomaviruses* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2002 [cité 5 juin 2020]. p. 73-126. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471221945.ch6>

49. Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, et al. Age-Specific Seroprevalence of Merkel Cell Polyomavirus, BK Virus, and JC Virus. *Clin Vaccine Immunol.* 1 oct 2011;18(10):1737-43.
50. Aksami AJ, Major EO, Ghatak NR, Sidhu GS, Parisi JE, Guccion JG. Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy by Brain Biopsy with Biotin Labeled DNA:DNA In situ Hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1 sept 1987;46(5):556-66.
51. Major EO. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Immunomodulatory Therapies. *Annual Review of Medicine.* 2010;61(1):35-47.
52. Bloomgren G, Subramanyam M, Lee S, Sandrock A. Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *n engl j med.* 2012;11.
53. Steiner I, Berger JR. Update on Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 1 déc 2012;12(6):680-6.
54. Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 juin 1989;27(6):1174-9.
55. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *Journal of Clinical Virology.* 1 juill 2009;45(3):249-54.
56. Delbue S, Comar M, Ferrante P. Review on the role of the human Polyomavirus JC in the development of tumors. *Infectious Agents and Cancer.* 3 févr 2017;12(1):10.
57. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 3 déc 1993;75(5):843-54.
58. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* févr 2008;9(2):102-14.
59. Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. *PLOS Pathogens.* 20 déc 2012;8(12):e1003018.
60. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* nov 2004;432(7014):231-5.
61. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol.* janv 2010;17(1):17-23.
62. Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural Basis for microRNA Targeting. *Science.* 31 oct 2014;346(6209):608-13.

63. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*. 23 juill 2004;15(2):185-97.
64. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLOS Biology*. 15 févr 2005;3(3):e85.
65. O’Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 3 août 2018;9:402.
66. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 23 janv 2009;136(2):215-33.
67. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 12 août 2010;466(7308):835-40.
68. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 4 sept 2008;455(7209):64-71.
69. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*. 5 sept 2008;3(9):e3148.
70. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 04 2019;177(2):428-445.e18.
71. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. avr 2011;13(4):423-33.
72. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 mars 2011;108(12):5003-8.
73. Baulande S, Criqui A, Duthieuw M. Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *Med Sci (Paris)*. 1 mars 2014;30(3):289-96.
74. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. nov 2010;56(11):1733-41.
75. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science*. 30 avr 2004;304(5671):734-6.
76. Zou W, Vue GS, Assetta B, Manza H, Atwood WJ, Imperiale MJ. Control of Archetype BK Polyomavirus MicroRNA Expression. *Journal of Virology* [Internet]. 22 déc 2020 [cité 22 avr 2021];95(2). Disponible sur: <https://jvi.asm.org/content/95/2/e01589-20>

77. Adami GR, Marlor CW, Barrett NL, Carmichael GG. Leader-to-leader splicing is required for efficient production and accumulation of polyomavirus late mRNAs. *J Virol.* janv 1989;63(1):85-93.
78. Theiss JM, Günther T, Alawi M, Neumann F, Tessmer U, Fischer N, et al. A Comprehensive Analysis of Replicating Merkel Cell Polyomavirus Genomes Delineates the Viral Transcription Program and Suggests a Role for mcv-miR-M1 in Episomal Persistence. *PLoS Pathog.* 28 juill 2015;11(7):e1004974.
79. Seo GJ, Fink LHL, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol.* oct 2008;82(20):9823-8.
80. Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *PNAS.* 14 mai 2013;110(20):8200-5.
81. Li JYZ, McNicholas K, Yong TY, Rao N, Coates PTH, Higgins GD, et al. BK Virus Encoded MicroRNAs Are Present in Blood of Renal Transplant Recipients With BK Viral Nephropathy. *American Journal of Transplantation.* 2014;14(5):1183-90.
82. Lagatie O, Tritsmans L, Stuyver LJ. The miRNA world of polyomaviruses. *Virol J.* 28 août 2013;10:268.
83. Yang JF, You J. Regulation of Polyomavirus Transcription by Viral and Cellular Factors. *Viruses.* oct 2020;12(10):1072.
84. Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* nov 1983;35(1):79-87.
85. Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, Gosert R, Schaffner W, Hirsch HH. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *J Virol.* mars 2015;89(6):3396-411.
86. Bethge T, Ajuh E, Hirsch HH. Imperfect Symmetry of Sp1 and Core Promoter Sequences Regulates Early and Late Virus Gene Expression of the Bidirectional BK Polyomavirus Noncoding Control Region. *J Virol.* 15 nov 2016;90(22):10083-101.
87. Martelli F, Wu Z, Delbue S, Weissbach F, Giulioli M, Ferrante P, et al. BK Polyomavirus MicroRNA Levels in Exosomes Are Modulated by Non-Coding Control Region Activity and Down-Regulate Viral Replication When Delivered to Non-Infected Cells Prior to Infection. *Viruses.* 30 août 2018;10(9):466.
88. Chen CJ, Cox JE, Kincaid RP, Martinez A, Sullivan CS. Divergent MicroRNA Targetomes of Closely Related Circulating Strains of a Polyomavirus. *J Virol.* oct 2013;87(20):11135-47.
89. Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, Grundhoff A, Lukacher AE, Benjamin TL, et al. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology.* 25 avr 2009;387(1):157-67.

90. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, et al. An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host & Microbe*. 17 févr 2011;9(2):93-102.
91. Zhang S, Sroller V, Zanwar P, Chen CJ, Halvorson SJ, Ajami NJ, et al. Viral MicroRNA Effects on Pathogenesis of Polyomavirus SV40 Infections in Syrian Golden Hamsters. *PLOS Pathogens*. 6 févr 2014;10(2):e1003912.
92. Zeng G, Wang Z, Huang Y, Abedin Z, Liu Y, Randhawa P. Cellular and viral miRNA expression in polyomavirus BK infection. *Transpl Infect Dis [Internet]*. oct 2019 [cité 5 juin 2020];21(5). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tid.13159>
93. Tian YC, Li YJ, Chen HC, Wu HH, Weng CH, Chen YC, et al. Polyomavirus BK-encoded microRNA suppresses autoregulation of viral replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 mai 2014;447(3):543-9.
94. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*. 17 oct 2003;115(2):199-208.
95. Martelli F, Giannecchini S. Polyomavirus microRNAs circulating in biological fluids during viral persistence. *Reviews in Medical Virology*. 2017;27(3):e1927.
96. Pietilä T, Nummi M, Auvinen P, Mannonen L, Auvinen E. Expression of BKV and JCV encoded microRNA in human cerebrospinal fluid, plasma and urine. *Journal of Clinical Virology*. avr 2015;65:1-5.
97. Kim MH, Lee YH, Seo JW, Moon H, Kim JS, Kim YG, et al. Urinary exosomal viral microRNA as a marker of BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. Busson P, éditeur. *PLoS ONE*. 21 déc 2017;12(12):e0190068.
98. Huang Y, Zeng G, Randhawa PS. Detection of BKV encoded mature MicroRNAs in kidney transplant patients: Clinical and biologic insights. *Journal of Clinical Virology*. 1 oct 2019;119:6-10.
99. Virtanen E, Seppälä H, Helanterä I, Laine P, Lautenschlager I, Paulin L, et al. BK polyomavirus microRNA expression and sequence variation in polyomavirus-associated nephropathy. *Journal of Clinical Virology*. mai 2018;102:70-6.
100. Addetia A, Phung Q, Bradley BT, Lin MJ, Zhu H, Xie H, et al. In Vivo Generation of BK and JC Polyomavirus Defective Viral Genomes in Human Urine Samples Associated with Higher Viral Loads. *J Virol*. 24 mai 2021;95(12):e00250-21.
101. Cheng XS, Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, et al. Inhibitory Interactions between BK and JC Virus among Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. mai 2011;22(5):825-31.

102. Signorini L, Dolci M, Favi E, Colico C, Ferraresso M, Ticozzi R, et al. Viral Genomic Characterization and Replication Pattern of Human Polyomaviruses in Kidney Transplant Recipients. *Viruses*. nov 2020;12(11):1280.
103. Rossi AP, Anderson KL, Brennan DC. JC polyoma virus and kidney disease. *Kidney International*. 1 mai 2014;85(5):1242.
104. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *Journal of Virology* [Internet]. 15 janv 2004 [cité 4 févr 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.78.2.751-757.2004>
105. Handala L, Fiore T, Rouillé Y, Helle F. QuantIF: An ImageJ Macro to Automatically Determine the Percentage of Infected Cells after Immunofluorescence. *Viruses*. févr 2019;11(2):165.
106. Descamps V, Helle F, Louandre C, Martin E, Brochot E, Izquierdo L, et al. The kinase-inhibitor sorafenib inhibits multiple steps of the Hepatitis C Virus infectious cycle in vitro. *Antiviral Research*. 1 juin 2015;118:93-102.
107. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 1 sept 2011;39(16):7223-33.
108. Demey B, Bentz M, Descamps V, Morel V, Francois C, Castelain S, et al. BK Polyomavirus bkv-miR-B1-5p: A Stable Micro-RNA to Monitor Active Viral Replication after Kidney Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*. janv 2022;23(13):7240.
109. Demey B, Descamps V, Presne C, Helle F, Francois C, Duverlie G, et al. BK Polyomavirus Micro-RNAs: Time Course and Clinical Relevance in Kidney Transplant Recipients. *Viruses*. 23 févr 2021;13(2):351.
110. Titre Ier : Risques chimiques (Articles L4411-1 à L4412-2) - Légifrance [Internet]. [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072050/LEGISCTA00006160782/#LEGISCTA000006160782
111. LEFEBVRE V., GIMENEZ C., BROCHARD P. Risque chimique dans les laboratoires de biologie moléculaire - Article de revue - INRS [Internet]. 2001 [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC%2081>
112. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer*. 29 mars 2011;104(7):1168-77.
113. Sequeira JP, Lobo J, Constâncio V, Brito-Rocha T, Carvalho-Maia C, Braga I, et al. DigiMir Test: Establishing a Novel Pipeline for MiR-371a Quantification Using Droplet Digital PCR in Liquid Biopsies From Testicular Germ Cell Tumor Patients. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2022 [cité 7 juill 2022];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.876732>

114. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Scian MJ, King AL, Cathro H, et al. The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. *Kidney International*. 1 janv 2014;85(2):439-49.
115. Tribolet L, Kerr E, Cowled C, Bean AGD, Stewart CR, Dearnley M, et al. MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cité 18 mai 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01197>
116. Fernández-Moreno R, Torre-Cisneros J, Cantisán S. Human cytomegalovirus (HCMV)-encoded microRNAs: potential biomarkers and clinical applications. *RNA Biology*. 2 déc 2021;18(12):2194-202.
117. Lee JS, Kim S, Kim S, Ahn K, Min DH. Fluorometric Viral miRNA Nanosensor for Diagnosis of Productive (Lytic) Human Cytomegalovirus Infection in Living Cells. *ACS Sens* [Internet]. 2 févr 2021 [cité 9 févr 2021]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01843>
118. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017 [cité 24 mai 2022];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00108>
119. Coughlan C, Bruce K, Burgy O, Boyd TD, Michel CR, Garcia-Perez JE, et al. Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation: A Comparison of Techniques for Downstream Analyses. *Curr Protoc Cell Biol*. sept 2020;88(1):e110.
120. Koliha N, Wiencek Y, Heider U, Jüngst C, Kladt N, Krauthäuser S, et al. A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 19 févr 2016;5:10.3402/jev.v5.29975.
121. Albanese M, Chen YFA, Hüls C, Gärtner K, Tagawa T, Mejias-Perez E, et al. MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells. *PLOS Genetics*. 6 déc 2021;17(12):e1009951.
122. Zealy RW, Wrenn SP, Davila S, Min KW, Yoon JH. microRNA-binding proteins: specificity and function. *WIREs RNA*. 2017;8(5):e1414.
123. Janas MM, Wang B, Harris AS, Aguiar M, Shaffer JM, Subrahmanyam YVBK, et al. Alternative RISC assembly: Binding and repression of microRNA–mRNA duplexes by human Ago proteins. *RNA*. nov 2012;18(11):2041-55.
124. Beltrami C, Clayton A, Newbury LJ, Corish P, Jenkins RH, Phillips AO, et al. Stabilization of Urinary MicroRNAs by Association with Exosomes and Argonaute 2 Protein. *Noncoding RNA*. 14 sept 2015;1(2):151-66.
125. Ahmed HG, Tom MA. The Consequence of Delayed Fixation on Subsequent Preservation of Urine Cells. *Oman Med J*. janv 2011;26(1):14-8.

126. Froom P, Bieganiec B, Ehrenrich Z, Barak M. Stability of common analytes in urine refrigerated for 24 h before automated analysis by test strips. *Clin Chem.* sept 2000;46(9):1384-6.
127. Gillespie T, Fewster J, Masterton RG. The effect of specimen processing delay on borate urine preservation. *J Clin Pathol.* févr 1999;52(2):95-8.
128. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology.* 2012;113(5):1014-26.
129. Raab SS, Grzybicki DM, Vrbin CM, Geisinger KR. Urine cytology discrepancies: frequency, causes, and outcomes. *Am J Clin Pathol.* juin 2007;127(6):946-53.
130. Morrow JF, Johnston J, Bostwick DG. CHAPTER 7 - Urine cytology. In: Bostwick DG, Cheng L, éditeurs. *Urologic Surgical Pathology (Second Edition)* [Internet]. Edinburgh: Mosby; 2008 [cité 1 août 2022]. p. 352-78. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323019705500099>
131. Dakroub F, Touzé A, Akl H, Brochot E. Pre-Transplantation Assessment of BK Virus Serostatus: Significance, Current Methods, and Obstacles. *Viruses.* oct 2019;11(10):945.
132. Dakroub F, Touzé A, Sater FA, Fiore T, Morel V, Tinez C, et al. Impact of pre-graft serology on risk of BKPyV infection post-renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 1 avr 2022;37(4):781-8.
133. Hasan MR, Tan R, Al-Rawahi G, Thomas E, Tilley P. Comparative evaluation of laboratory developed real-time PCR assays and RealStar® BKV PCR Kit for quantitative detection of BK polyomavirus. *Journal of Virological Methods.* 1 août 2016;234:80-6.
134. Wright K, de Silva K, Purdie AC, Plain KM. Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma. *Sci Rep.* 21 janv 2020;10(1):825.
135. Jensen SG, Lamy P, Rasmussen MH, Ostenfeld MS, Dyrskjøt L, Ørntoft TF, et al. Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs. *BMC Genomics.* 26 août 2011;12(1):435.
136. Moody L, He H, Pan YX, Chen H. Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening. *Clin Epigenetics.* 24 oct 2017;9:119.
137. Das Gupta S, Nnode-Ekane XE, Puhakka N, Pitkänen A. Droplet digital polymerase chain reaction-based quantification of circulating microRNAs using small RNA concentration normalization. *Sci Rep.* 2 juin 2020;10(1):9012.
138. Campomenosi P, Gini E, Noonan DM, Poli A, D'Antona P, Rotolo N, et al. A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnology.* 18 août 2016;16(1):60.

139. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, Houliind K, Andersen RF, Brasen CL. Quantification of microRNA levels in plasma – Impact of preanalytical and analytical conditions. PLOS ONE. 19 juill 2018;13(7):e0201069.
140. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, et al. Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus. Journal of Clinical Microbiology. févr 2013;51(2):540-6.
141. Moriyama T, Sorokin A. BK Virus (BKV): Infection, Propagation, Quantitation, Purification, Labeling, and Analysis of Cell Entry. Curr Protoc Cell Biol. mars 2009;CHAPTER:Unit-26.2.
142. Gardner SylviaD, Field AnneM, Coleman DulcieV, Hulme B. NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. The Lancet. juin 1971;297(7712):1253-7.
143. Nukuzuma S, Takasaka T, Zheng HY, Zhong S, Chen Q, Kitamura T, et al. Subtype I BK polyomavirus strains grow more efficiently in human renal epithelial cells than subtype IV strains. Journal of General Virology. 1 juill 2006;87(7):1893-901.
144. Nishimoto Y, Takasaka T, Hasegawa M, Zheng HY, Chen Q, Sugimoto C, et al. Evolution of BK Virus Based on Complete Genome Data. J Mol Evol. 1 sept 2006;63(3):341-52.
145. Klufah F, Mobaraki G, Liu D, Alharbi RA, Kurz AK, Speel EJM, et al. Emerging role of human polyomaviruses 6 and 7 in human cancers. Infect Agent Cancer. 17 mai 2021;16(1):35.



Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review



Baptiste Demey^{a,b}, Claire Tinez^{a,b}, Catherine François^{a,b}, François Helle^b, Gabriel Choukroun^c, Gilles Duverlie^{a,b}, Sandrine Castelain^{a,b}, Etienne Brochot^{a,b,*}

^a Department of Virology, Amiens University Medical Center, Amiens, France

^b AGIR Research Unit, EA 4294, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France

^c Department of Nephrology, Amiens University Medical Center, Amiens, France

ARTICLE INFO

Keywords:

BK polyomavirus
Kidney transplantation
Risk factors
Nephropathy

ABSTRACT

In the last 20 years, the management of BK polyomavirus (BKPyV) reactivation in kidney transplant patients has become a true challenge for the transplant community. The only treatment option is based on the early identification of at-risk patients. The number of reported risk factors for BKPyV reactivation has increased markedly in the literature last years, although they are sometimes in an unclear or contradictory manner.

Our purpose is to provide a systematic review and meta-analysis of risk factors for BKPyV viremia and nephropathy described in multivariate analyses.

The PubMed database was searched for prospective or prospectively-based observational studies on risk factors for BKPyV viremia and/or nephropathy. Our qualitative assessment of risk factors was based on the odds ratios and hazard ratios calculated in multivariate regression analyses.

Of the 241 publications screened, 34 were included in the qualitative analysis. In all, 144 and 19 distinct factors were analyzed for BKPyV viremia and for BKPyV nephropathy, respectively. Our evaluation highlighted eight risk factors for BKPyV viremia: a tacrolimus regimen, a deceased donor, a male recipient, a history of previous transplant, age at transplantation, ureteral stent use, delayed graft function, and acute rejection episodes increased the risk of BKV viremia to varying extents. Tacrolimus and acute rejection episodes were also associated with a higher incidence of BKPyV nephropathy.

BKPyV reactivation is a serious complication after renal transplantation. With a view to combating this problem, existing data should be published in full, and new prospective international multicenter studies should be performed.

1. Introduction

In recent years, BK polyomavirus (BKPyV) infection has emerged as a major problem in kidney transplant recipients. About 90% of the latter are seropositive for BKPyV [1]. The virus reactivates periodically with urinary shedding but remains asymptomatic in immunocompetent adults. The immunosuppressive therapy used to prevent rejection after solid organ transplantation allows viral infections to emerge. In particular, BK virus can reactivate after kidney transplantation, and may induce progressive disease in three successive stages: viremia, viremia, and then (if viral replication persists) nephropathy. The current lack of effective prophylactic or curative treatments obliges physicians to closely monitor clinical and laboratory parameters, in an attempt to detect reactivation as early as possible [2]. Since the 2000s, many factors have been shown to potentially increase the risk of BKPyV infection in kidney transplant recipients [3]. These factors can be

used to guide the patient's care and adapt the monitoring as a function of the risk. Depending on the study, the risk analysis has been based on BKPyV viremia, viremia, nephropathy, the treatment, or combination of these. However, the contradictory nature of the literature data on risk factors identified at the different stages of the disease is barely considered in clinical practice [4]. Although a parameter might be reported as a risk factor in one study, it might be irrelevant (or only significant for a different stage of the infection) in another. Moreover, most of the literature studies are descriptive, and seek to identify significant clinical or laboratory characteristics by applying an overly simple statistical test (e.g. Student's t-test). For some reason, few studies have featured multivariate analyses that are commonly used to assess the association between multiple risk factors and to eliminate confounding variables. The objective of the present study was to provide a systematic review of the risk factors for BKPyV viremia and nephropathy in kidney transplant patients, on the basis of multivariate analyses.

* Corresponding author at: Laboratoire de Virologie Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens Avenue René Laënnec, Salouel F-80054 Amiens cedex 1, France. E-mail address: etienne.brochot@u-picardie.fr (E. Brochot).

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.002>

Received 26 July 2018; Received in revised form 13 September 2018; Accepted 8 October 2018
1386-6532/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Method

This systematic review was reported in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [5] guidelines. The protocol was not registered at the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO).

2.1. PICOS

The study was performed using the following PICOS parameters:

- Population: kidney transplant recipients.
- Intervention: kidney transplantation.
- Comparison: patients who developed BKPyV viremia and/or nephropathy following renal transplantation, versus patients who did not.
- Outcomes: BKPyV viremia and/or nephropathy.
- Studies: prospective cohort studies and studies based on prospectively recorded databases with at least 12 months of follow-up.

2.2. Inclusion and exclusion criteria

Only studies published in international, peer-review journals were included. To be included in a qualitative analysis, the studies had to be based on databases evaluating risk factors for the development of BKPyV infection (viremia and/or nephropathy) following kidney transplantation. Studies lacking a multivariate regression analysis were excluded.

2.3. Search strategy

The PubMed database was searched on September 30th, 2017, with the following search terms: (BK virus) AND ((risk factors) OR (epidemiologic factors) OR (predictive factors)) AND ((renal) OR (kidney)). The search strategy was devised and implemented by BD and CT. There were no restrictions on the publication year but the search was

restricted to full-text articles published in English.

To cover the search strategy's limitations, the reference lists of reviews found in the search were also examined for relevant publications. The publications' eligibility was assessed by BD and CT. Once a publication's eligibility for inclusion was confirmed, the full text was obtained and analyzed in detail.

2.4. Definitions of outcome measures

A risk factor for BKPyV infection was defined as a preoperative, per-transplantation or post-transplantation patient-related factor that is thought to increase the risk of onset of BKPyV viremia and/or nephropathy.

In the present study's qualitative analysis, we considered risk factors for BKPyV viremia to be factors that (i) had been studied in at least two multivariate analyses and (ii) were statistically significant ($p < 0.05$) in at least one multivariate analysis. In the present study, factors that were significant in a univariate analysis but never in a multivariate analysis were not considered as risk factors.

A significant result in a single multivariate analysis was the sole criterion for risk factors for BKPyV nephropathy (BKPyVN); Inclusion in at least two multivariate analyses was not required.

BKPyV viremia was defined here as the detection of a BKPyV viral load in blood, regardless of the latter's magnitude.

2.5. Risk factors

In our assessment for BKPyV viremia, we found that 144 distinct factors had been analyzed statistically (Fig. 1). The publications described 33 factors that significantly increased the risk of BKPyV viremia onset in a multivariate analysis, and 8 that significantly decreased the risk of onset. Eight of the 33 positive risk factors were significant in at least one multivariate analysis and had been studied in at least one other multivariate analysis (regardless of their statistical significance in the latter).

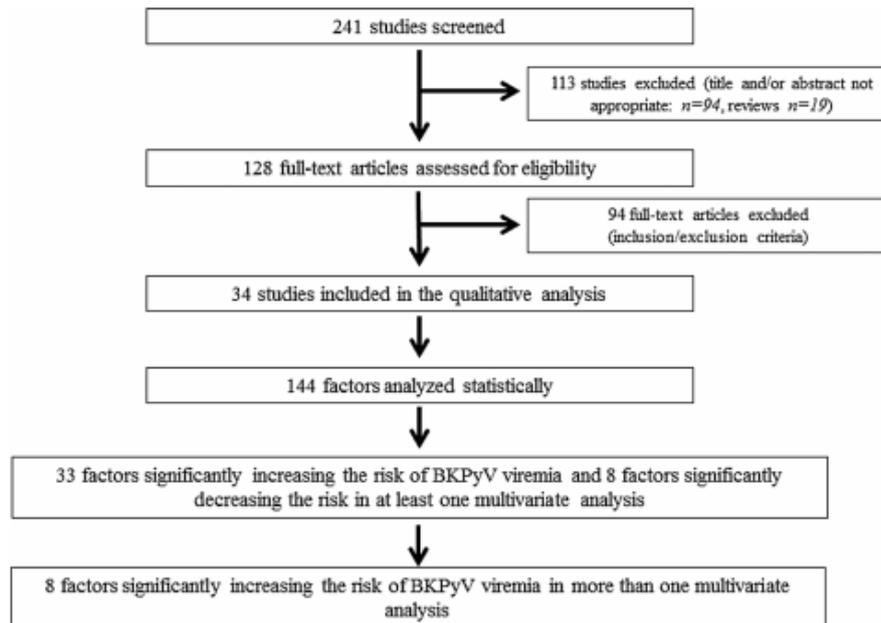


Fig. 1. Study selection process for the qualitative analysis.

Nineteen distinct factors were analyzed statistically for BKPyVN. All 19 factors significantly increased the risk of BKPyVN in a multivariate analysis. Four of these factors had been analyzed in a second analysis.

3. Results

3.1. Studies included

We reviewed 34 prospective cohort studies and studies based on

prospectively recorded databases. A total of 13135 patients had been evaluated, and 1923 of these (14.6%) presented BKPyV viremia. Six studies featured a multivariate analysis of risk factors for BKPyVN; a total of 2821 patients had been evaluated, and 149 of these presented BKPyVN (5.3%).

The identified risk factors fell into various classes: the immunosuppressive regimen, donor or recipient characteristics, surgery, post-transplantation outcomes, viral serology, and the time course of BKPyV viremia.

Table 1

The effect of tacrolimus use (relative to cyclosporine A) in multivariate analyses for the onset of BKPyV viremia. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Immunosuppressive regimen : tacrolimus (vs cyclosporine A)					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/total population)	Viremic patients exposed to tacrolimus	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[8]	102/998	64/102	HR 0.68 (0.44-1.07)	0.094	
[6]	22/265	NR	OR 5.27 (1.2-23.16)	0.027	
[7]	38/229	32/38	HR 2.9 (1.1-8.1)	0.032	
[10]	71/251	49/71	OR 0.99 (0.91-1.25)	0.19	
[9]	41/553	32/41	OR 0.71 (0.24-2.05)	0.53	
[32]	111/407	84/111	HR 0.76 (0.48-1.23)	0.264	

Table 2

Relative effects of donor/recipient characteristics in multivariate analyses for the onset of BKPyV viremia. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Deceased donor					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/total population)	Viremic patients exposed to a cadaveric graft	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[13]	57/349	41/57	OR 1.96 (1.05-3.81)	0.03	
[10]	71/251	56/71	OR 0.78 (0.17-3.49)	0.743	
[7]	38/229	26/38	HR 2.1 (0.9-4.6)	0.071	
[14]	22/84	16/22	RR 3.2 (1.12-9.3)	NR	
[9]	41/553	32/41	OR 2.47 (0.73-8.31)	0.14	
[12]	29/183	10/29	OR 3.65 (1.42-9.39)	< 0.001	
[16]	42/487	35/42	OR 2.49 (1.05-5.89)	0.038	

Male Recipient					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/total population)	Male viremic patients	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[8]	102/998	78/102	HR 2.38 (1.46-4.09)	< 0.001	
[15]	42/487	35/42	OR 2.49 (1.05-5.89)	0.038	
[10]	71/251	64/71	OR 1.42 (0.99-1.98)	0.033	
[9]	41/553	30/41	OR 1.77 (0.79-3.85)	0.24	
[32]	111/407	73/111	HR 1.04 (0.68-1.6)	0.842	
[12]	20/174	15/20	OR 3.47 (1.11-10.86)	0.03	

Recipient Age					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/total population)	Mean age (SD) of patients (viremic/non viremic)	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[17]	93/600	53 (15) / 49 (16)	OR 1.02 (1-1.04)	0.0163	
[8]	102/998	48 (18) / 49 (17)	HR 0.77 (0.26-2.4)	0.65	
[18]	71/145	53.4 (13.2) / 50.4 (14.6)	OR 1.03 (0.99-1.05)	0.067	
[32]	111/407	54 (11.5) / 53 (11.7)	HR 1 (0.99-1.05)	0.665	
[19]	89/403	55.25 (13) / 54.32 (13.9)	OR 1.01 (0.988-1.02)	0.574	

History of previous transplant					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/total population)	Viremic patients with at least one previous transplantation	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[20]	48/352	9/48	OR 2.74 (1.05-7.15)	0.039	
[10]	71/251	20/71	OR 1.53 (0.62-4.42)	0.07	
[32]	111/407	11/111	HR 1.36 (0.68-2.68)	0.384	

Table 3
Relative effect of ureteral stent use in multivariate analyses for the onset of BKPyV viremia. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Surgery: ureteral stent					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/ total population)	Viremic patients exposed to ureteral stent	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[22]	23/198	10/23	HR 3 (NR)	0.018	
[17]	93/600	NR	OR 1.65 (1.05-2.6)	0.0315	
[21]	171/1318	76/171	HR 1.36 (1.05-2.6)	0.024	
[19]	89/403	44/89	OR 1.92 (1.04-3.74)	0.044	

Table 4
Relative effects of post transplantation outcomes in multivariate analyses for the onset of BK Virus viremia. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Delayed graft function					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/ total population)	Viremic patients exposed to risk factor	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[23]	36/135	14/35	OR 3.38 (1.38-8.24)	0.129	
[10]	71/251	24/71	OR 0.737 (0.49-1.09)		
Acute rejection					
Reference	Prevalence of BKPyV viremia (viremic patients/ total population)	Viremic patients exposed to risk factor	Relative effect (95%CI)	p value	Distribution of relative effects
[24]	163/609	21/163	HR 2.01 (1.096-3.685)	0.02	
[20]	48/352	11/48	OR 3.79 (1.5-9.58)	0.005	
[8]	102/998	44/102	HR 0.96 (0.58-1.56)	0.89	
[10]	71/251	50/71	OR 0.92 (0.85-1.02)	0.02	
Hüssig et al. 2014	49/152	NR	OR 2.3 (1.09-4.8)	NR	
[14]	22/84	4/22	RR 1.74 (1 included)	NR	

3.2. Immunosuppressive regimens

When considering the various immunosuppressive regimens, only the administration of tacrolimus was classified as a risk factor in our systematic review. This factor was included in six multivariate analyses [6–10,32] (Table 1), and was found to significantly increase the risk of BKPyV viremia in two of these (5.27- and 2.9-fold, respectively). The hazard ratio (HR) was not statistically significant in the study with the largest sample size.

3.3. Donor/recipient characteristics

Four risk factors were related to pre-operative donor or recipient characteristics (Table 2). The corresponding studies showed strong associations between BKPyV viremia on one hand and deceased donor condition [7,9,10,12–14] and male recipient gender on the other [12,15,8–10,16,32]. Despite clear trends, half of the results were not significant. Of the five articles [17,8,18,19,32], only Kayler et al. reported a low but statistically significant odds ratio (OR: 1.02; $p = 0.016$) for the recipient's age. Jacobi et al. found that previous transplantation was predictive of BKPyV viremia (OR [95% confidence interval (CI)] = 2.74 [1.05-7.15] [20] but this factor was not significant in two other studies [10,32].

3.4. Surgery

The four multivariate analyses of the use of a ureteral stent during surgery generated significant risk ratios ranging from 1.36 to 3, with narrow CIs [17,21,19]. However, Brennan et al. did not report the CI [22] (Table 3).

3.5. Post-transplantation outcomes

Following kidney transplantation, two outcomes were associated with a higher risk of BKPyV reactivation, although a causal relationship was not determined (Table 4). Firstly, Mindlova et al. showed that delayed graft function was associated with an increased risk of BKPyV viremia (OR [95%CI] = 3.38 [1.38–8.24]) [23]. However, this was not confirmed in a larger cohort [10]. Furthermore, univariate analyses in six studies evidenced a higher incidence of viremia in patients who experienced at least one episode of acute rejection during follow-up [24,25,8,10,14,20]. In three publications, this finding was still significant in a multivariate analysis.

3.6. BKPyV nephropathy

In the present systematic review, we noted that only six studies

Table 5
Summary of predictive factors for biopsy-proven BKPyVN identified in multivariate analyses. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Category	Risk factor identified	BKPyVN cases / Total population	Relative effect (95%CI)	p value	Reference
Immunosuppressive regimens	Mofetil mycophenolate	39/880	HR 3.5 (1.6-7.5)	0.0013	[27]
	Tacrolimus (TAC)	39/880	HR 3.3 (1.5-7.6)	0.0038	[27]
		9/227	HR 1.64 (0.44-6.11)	NR	[26]
	TAC level one month before the biopsy	33/99	OR 1.28 (1.01-1.62)	0.04	[30]
	TAC level three months before the biopsy	33/99	OR 1.4 (1.1-1.8)	0.009	[30]
	Mean TAC level over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.3 (1.02-1.7)	0.03	[30]
	Prednisone dose three months before the biopsy	33/99	OR 1.2 (1.04-1.36)	0.009	[30]
	Mean prednisone dose over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.22 (1.04-1.4)	0.02	[30]
	Intravenous methylprednisolone 1000 mg once daily for 3 days	12/407	HR 23.52 (4.57-120.99)	< 0.001	[32]
	Polyclonal antibody induction	25/542	OR 11.04 (2.94-41.52)	0.0004	[29]
		39/880	HR 6.6 (2.3-18.9)	0.0005	[27]
	Donor/recipient characteristics	ABO incompatibility	11/62	OR 2.32 (NR)	0.04
African-American recipient		31/666	HR 2.89 (1.36-6.14)	0.006	[28]
Recipient age		31/666	HR 1.04 (1-1.07)	0.048	[28]
		12/407	HR 0.98 (0.92-1.03)	0.424	[32]
Surgery	Cold ischemia time	9/227	HR 1.18 (1.04-1.35)	0.009	[26]
Viral serology	Donor BKPyV seroactivity	12/407	HR 2.89 (1.33-6.29)	0.007	[32]
Post-transplantation outcomes	Acute rejection (≥ 1 episode)	31/666	HR 3.18 (1.42-7.12)	0.005	[28]
		9/227	HR 4.05 (0.99-16.53)	0.051	[26]
	Acute rejection (rejection score)	39/880	HR 5.1 (1.8-14.6)	0.0021	[27]
	31/666	HR 2.72 (1.19-6.24)	0.018	[28]	
Time course of BKPyV viremia	CMV infection	8/163	OR 113.25 (17.22-744.6)	< 0.001	[24]
	First positive BKPyV viremia > 185,000 copies/mL BKPyV peak viral load of 223,000 copies/mL at any time	8/163	OR 70.5 (8.08-615)	0.0001	[24]

performed a multivariate analysis of risk factors for BKPyVN. In each analysis, at least one determining factor was nevertheless significantly associated with BKPyVN. A total of 19 different risk factors were described (Table 5). Tacrolimus immunosuppression, polyclonal antibody induction, recipient age, and acute rejection episodes were each evaluated in more than one study. Like BKPyV viremia, tacrolimus immunosuppression (HR [95%CI] = 3.3 [1.5-7.6]) [26,27], recipient age (HR [95%CI] = 1.04 [1-1.07]) [28,32] and acute rejection episodes (HR [95%CI] = 3.18 [1.42-7.12]) [26,28] significantly increased the risk of BKPyVN in one of the two studies. Interestingly, polyclonal antibody induction greatly increased the risk of BKPyVN, with an OR [95%CI] of 11.04 [2.94-41.52] in one study [29] and an HR [95%CI] of 6.6 [2.3-18.9] in another [26]. With regard to treatments, a mofetil mycophenolate regimen [27], tacrolimus blood levels [30] and prednisone exposure [30,32] increased the risk of BKPyVN. Donor-recipient ABO incompatibility multiplied the probability of BKPyVN development by a factor of 2.32 [31]. Along with donor BKPyV seropositivity (HR [95%CI] = 2.89 [1.33-6.29] [32], African-American ethnicity might be a predictive recipient characteristic for BKPyVN (HR [95%CI] = 2.89 [1.36-6.14] [28]. The graft's cold ischemia time was reported to enhance the onset of BKPyVN (HR [95%CI] = 1.18 [1.04-1.35]) [26]. Cytomegalovirus infection during follow-up was also related to a higher risk of BKPyVN (HR [95%CI] = 2.72 [1.19-6.24]) [28]. Lastly, Elfadawy et al. showed that initial BKPyV viremic load above 185,000 copies per ml and a peak BKPyV viremic load of reaching 223,000 copies per ml at any time were strong predictive factors for BKPyVN (ORs = 113.25 and 70.5, respectively) [24].

4. Discussion

The present review found that tacrolimus regimen, deceased donor, male recipient and acute rejection episodes were most frequently included in multivariate analyses, with 6 studies each. We found two highly significant results for tacrolimus, and three for the other variables. Along with the statistical significance of the multivariate analyses, it is important to remember that the factor has to be significant ($p < 0.05$ or $p < 0.1$) in a univariate analysis if it is to be included in a logistic regression analysis. Hence, these four factors appear to be the most robust risk factors for

BKPyV viremia. Moreover, tacrolimus and acute rejection were also associated with a greater probability of developing BKPyVN. These findings support (at least in part) our comment in the introduction part because in the absence of treatment, BKPyVN corresponds to the natural course of the disease after BKPyV viremia in kidney transplant recipients. The use of a ureteral stent use after transplantation was found to be a constant risk factor for BKPyV viremia, with statistical significance in all four multivariate studies. Thus, the present review enabled us to define a panel of five variables that could be used to predict the development of BKPyV infection - especially viremia - after kidney transplantation.

Although recipient age met the criteria for inclusion in our qualitative review, only one study reported a statistically significant OR [95%CI]. The effect of age on BKPyV viremia was very weak, with an OR of 1.02 ($p = 0.016$); in routine clinical practice, this might not be enough to accurately detect an at-risk patient.

Previous transplantation was reported to be predictive of BKPyV viremia in one of three studies. However, the study did not specify the reasons for previous graft failure. An earlier BKPyV infection might have skewed the statistics and might explain the contradictory conclusions of the other studies.

Delayed graft function was examined in two studies, which reported contrasting conclusions. However, it is not clear whether the studies measured exactly the same outcome. Vu et al. did not define the outcome, and Mindlova defined the outcome as the need for hemodialysis in the week following kidney transplantation. Further cohort studies might be able to establish whether or not delayed graft function parameter is a risk factor for BKPyV viremia.

Very few studies identified predictive factors for BKPyVN; this is why we decided to analyze all the risk factors reported in a single multivariate analysis (rather than the two or more analyses required for risk factors for BKPyV viremia). Given the low frequency of BKPyVN, the studies included in the present review had smaller sample sizes and thus lacked statistical power. Interestingly, Manitpitikul et al. studied a cohort within which one in four of the patients presented with BKPyVN [30]. This proportion is much higher than the prevalence usually reported (1-10%) [15,16] and could have led to bias.

The present review focused on variables that have been studied several times in multivariate analyses. However, we also found risk

factors that were highly significant in a single publication. These factors included Asian ethnicity [13], HLA B24 or B25 matching [12], BKPyV seropositivity [32], the duration of diabetes prior to transplantation, [23] and ABO incompatibility; [31] these factors could also be considered when seeking to evaluate the likelihood of BKPyV reactivation following kidney transplantation. Further evaluation in prospective cohort studies is needed to confirm these factors' influence on BKPyV reactivation. We remain doubtful with regard to Vu et al.'s report of statistically significant ORs whose CI encompassed the value of 1 in a study of interferon lambda polymorphisms [10].

Unfortunately, we were unable to perform a quantitative analysis of risk factors for BKPyV viremia. The definitions of outcomes varied from one study to another, which explains the large number of factors identified (144). Given that some studies reported ORs and others reported HRs, we were unable to calculate pooled risk ratios. This limitation was exacerbated by a lack of results tables and information on demographic factors.

Despite our best efforts, a fully objective evaluation of risk factors for BKPyV viremia and nephropathy has yet to be performed. We were able to clarify some points, although contradictory results persist. These contradictions are probably due to differences between monitoring protocols and PCR thresholds, which alter the sensitivity with which infections can be detected.

The present review focused on BKPyV viremia, i.e. the stage at which treatment can be initiated. Although BKPyVN is the true cause of graft loss, it might be avoidable if BKPyV viremia is quickly contained. The medical profession is increasingly well informed and cautious about the BKPyV issue; hence, BKPyVN tends to be less common these days, and viremia is the main warning sign. It would therefore be interesting to more evaluate the risk factors for BKPyV viremia above a threshold of 7 log₁₀ copies/mL [32], given that (i) viremia is the earliest manifestation of infection, and (ii) this threshold is critical for the transition to viremia [15,16].

Until a specific treatment is found, BKPyV will remain an insoluble problem. With a view to prevention in the meantime, it is essential to identify potentially modifiable factors that favor infection. The present systematic review highlighted the most relevant risk factors for BKPyV viremia after kidney transplantation. However, we suggest that the transplantation community should (i) establish consensual definitions of the most frequently evaluated outcomes, and (ii) standardize the statistical methods used. Lastly, international studies and consortia may help to definitively identify the factors that increase the risk of developing a BKPyV infection after kidney transplantation.

Author contribution statement.Docx

BD, SC and EB conceived of the presented idea
 BD, CT and EB wrote the manuscript with support from
 BD, CF and FH performed the analytic calculations and performed statistical analysis
 GC supervised the project
 All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Funding

not applicable.

Competing of interest

No conflict of interest.

References

- J.M. Kean, S. Rao, M. Wang, R.L. Garcea, Seroepidemiology of human polyomaviruses, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000563.
- A. Dall, S. Hariharan, BK virus nephritis after renal transplantation, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. C/JASN* 3 (2008) S68–S75.
- Phuong-thu Pham, J. Schaenman, Phuong-chi Pham, Bk virus infection following kidney transplantation: an overview of risk factors, screening strategies, and therapeutic interventions, *Curr. Opin. Organ Transplant.* 19 (2014) 401–412.
- D.R.J. Kuypers, B. Bammens, K. Claes, P. Evenepoel, Y. Vanrenterghem, Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for Bk virus nephropathy: the need for true drug exposure measurements, *Transplantation* 89 (2010) 1296–1297.
- D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D.G. Altman, T.P. Group, Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *PLOS Med.* 6 (2009) 1–6, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- M. Hasegawa, T. Ito, K. Saigo, N. Akutsu, M. Maruyama, K. Otsuki, H. Aoyama, I. Matsumoto, T. Asano, H. Kitamura, T. Kenmochi, Association of DNA amplification with progress of BK polyomavirus infection and nephropathy in renal transplant recipients, *Transplant. Proc.* 46 (2014) 556–559.
- G. Huang, L. Zhang, X. Liang, J. Qiu, R. Deng, J. Li, G. Chen, Y. Dong, L. Chen, Risk factors for BK virus infection and BK virus-Associated nephropathy under the impact of intensive monitoring and pre-emptive immunosuppression reduction, *Transplant. Proc.* 46 (2014) 3448–3454.
- K. Masutani, T. Ninomiya, P. Randhawa, HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia, *Nephrol. Dial. Transplant.* 28 (2013) 3119–3126, <https://doi.org/10.1093/ndt/gft298>.
- E.B. Moura, S.V. Petzhold, A.R. Amaral, L.M. Deboni, P.H.C.D. França, E.B. Moura, S.V. Petzhold, A.R. Amaral, L.M. Deboni, P.H.C.D. França, Evaluation of the pre-disposition and clinical impact of BK virus replication in kidney transplant patients, *An. Acad. Bras. Ciênc.* 89 (2017) 675–684.
- D. Vu, P. Sakharkar, T. Shah, R. Naraghi, Q. Yasir, I. Hutchinson, D. Min, Association of interferon gamma Gene polymorphisms with Bk virus infection among Hispanic renal allograft recipients, *Transplantation* 97 (2014) 660–667, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318284232d>.
- S.E. Dogan, Z.K. Celebi, S. Akturk, S. Kutlay, A. Tuzuner, K. Keven, S. Sengul, Prevalence and risk factors of BK viremia in patients with kidney transplantation: a single-center experience from Turkey, *Transplant. Proc.* 49 (2017) 532–536.
- R.J. Knight, L.W. Gaber, S.J. Patel, J.M. Devos, L.W. Moore, A.O. Gaber, Screening for Bk viremia reduces but does not eliminate the risk of Bk nephropathy: a single-center retrospective analysis, *Transplant. J.* 95 (2013) 949–954, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318284232d>.
- A.Z. Santoveña, C.G. Meseguer, S.M. Mejía, Á.A. Mèlgar, C.F. Camblor, M.M. Hijosa, A.P. Carrión, L.E. Román, BK virus infection in pediatric renal transplantation, *Transplant. Proc.* 47 (2015) 62–66.
- H.H. Hirsch, P. Randhawa, 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) (2013) 179–188, <https://doi.org/10.1111/ajt.12110>.
- H.H. Hirsch, F. Vincenti, S. Friman, M. Tuncer, F. Citterio, A. Wiecek, E.H. Scheuermann, M. Klinger, G. Russ, M.D. Pescovitz, H. Prestele, Polyomavirus BK replication in De Novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study, *Am. J. Transplant.* 13 (2013) 136–145, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04320.x>.
- L. Kayler, I. Zendejas, D. Schaïn, J. Magliocco, Ureteral stent placement and BK viremia in kidney transplant recipients, *n.d. Transp. Infect. Dis.* 15 (2018) 202–207, <https://doi.org/10.1111/tid.12051>.
- G. Thölkling, C. Schmidt, R. Koch, K. Schuette-Nuetgen, D. Pabst, H. Wolters, I. Kabar, A. Hüsing, H. Pavenstädt, S. Reuter, B. Suwelack, Influence of tacrolimus metabolism rate on BKV infection after kidney transplantation, *Sci. Rep.* 6 (2016), <https://doi.org/10.1038/srep32273>.
- J.T. Wingate, J. Brandenberger, A. Weiss, L.G. Scovel, C.S. Kuhr, Ureteral stent duration and the risk of BK polyomavirus viremia or bacteriuria after kidney transplantation, *n.d. Transp. Infect. Dis.* 19 (2018) e12644, <https://doi.org/10.1111/tid.12644>.
- J. Jacobi, A. Prignitz, M. Büttner, K. Kom, A. Weidemann, K.F. Hilgers, K. Heller, J. Velden, A. Knöll, B. Wullich, C. May, K.-U. Eckardt, K.U. Amann, BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants: Risk factors and potential role of mTOR inhibition, *BMC Nephrol.* 14 (2013) 207, <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-207>.
- J.G. Mallakkal, D.C. Brennan, C. Goss, T.A. Horwedel, H. Chen, D.K. Fong, N. Agarwal, J. Zheng, K.B. Schechtman, V.R. Dharnidharka, Ureteral stent placement and immediate graft function are associated with increased risk of BK viremia in the first year after kidney transplantation, *Transp. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 30 (2017) 153–161.
- D.C. Brennan, I. Agha, D.L. Bohl, M.A. Schnitzler, K.L. Hardinger, M. Lockwood, S. Torrence, R. Schuessler, T. Roby, M. Gaudreault-Keener, G.A. Storch, Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction, *n.d. Am. J. Transplant.* 5 (2018) 582–594, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00742.x>.
- M. Mindlova, P. Boucek, F. Saudek, J. Skibova, T. Jedinakova, K. Lipar, M. Adamec, H.H. Hirsch, Prevalence and risk factors of polyomavirus BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center, *n.d. Clin. Transplant.* 26 (2018) 267–274, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2011.01488.x>.
- N. Elfadawy, S.M. Flechner, X. Liu, J. Schold, T.R. Srinivas, E. Poggio, R. Fatica, R. Avery, S.B. Mossad, Cmv viremia is associated with a decreased incidence of BkV reactivation after kidney and kidney-pancreas transplantation, *Transplant. J.* 96 (2013) 1097–1103, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318284232d>.
- A. Hlilic, M. Roos, A. Eter, W. Bossart, N. Müller, M. Schiesser, R.P. Wüthrich, T. Fehr, Association of BK viremia with human leukocyte antigen mismatches and acute rejection, but not with type of calcineurin inhibitor, *n.d. Transp. Infect. Dis.* 16 (2018) 44–54, <https://doi.org/10.1111/tid.12153>.

- [26] C.-Y. Hsiao, H.L. Pilmore, L. Zhou, J.R. de Zoysa, Outcomes of renal transplant recipients with BK virus infection and BK virus surveillance in the Auckland region from 2006 to 2012, *World J. Nephrol.* 5 (2016) 497–506, <https://doi.org/10.5527/wjn.v5.i6.497>.
- [27] O. Prince, S. Savić, M. Dickenmann, J. Steiger, L. Bubendorf, M.J. Mihatsch, Risk factors for polyoma virus nephropathy, *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 1024–1033, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn671>.
- [28] N. Theodoropoulos, E. Wang, S. Penugonda, D.P. Ladner, V. Stosor, J. Leventhal, J. Friedewald, M.P. Angarone, M.G. Ison, BK virus replication and nephropathy after alemtuzumab-induced kidney transplantation, *Am. J. Transplant.* 13 (2018) 197–206, <https://doi.org/10.1111/ajt.1600-6143.2012.04314.x>.
- [29] J.M. Smith, V.R. Dhamidharka, L. Talley, K. Martz, R.A. McDonald, BK virus nephropathy in pediatric renal transplant recipients: an analysis of the North American pediatric renal trials and collaborative studies (NAPRTCS) registry, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (2007) 1037–1042, <https://doi.org/10.2215/CJN.04051206>.
- [30] W. Maniatisitkul, C. Drachenberg, E. Ramos, R. Munivenkatappa, B. Philosophe, D. Klassen, A. Haririan, Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study, *Transplantation* 88 (2009) 83–88, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181aa8d93>.
- [31] A. Sharif, N. Alachkar, S. Bagnasco, D. Geetha, G. Gupta, K. Womer, L. Arend, L. Racusen, R. Montgomery, E. Kraus, Incidence and outcomes of BK virus allograft nephropathy among ABO- and HLA-incompatible kidney transplant recipients, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 7 (2012) 1320–1327, <https://doi.org/10.2215/CJN.00770112>.
- [32] E. Brochet, V. Descamps, L. Handala, J. Faucher, G. Choukroun, F. Helle, S. Castelain, C. François, G. Duverlie, A. Touzé, BK polyomavirus in the urine for follow-up of kidney transplant recipients, *Clin. Microbiol. Infect. 0* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.027>.

Résumé :

Le polyomavirus BK (BKPyV) est un virus à forte prévalence dont l'infection initiale entraîne une propagation à différents tissus, puis une persistance, généralement de manière asymptomatique. En cas d'immunosuppression, comme lors du traitement après une greffe de rein, une réactivation virale pouvant évoluer vers une néphropathie voire une perte du greffon peut être observée. Il n'existe aucun traitement préventif ou curatif efficace à ce jour, nécessitant une recherche intense sur des nouveaux marqueurs diagnostique et pronostic de l'infection, et également sur des candidats médicaments. Comme d'autres virus, le BKPyV est capable de générer des micro-ARNs (miARNs), les bkv-miR-B1-5p et bkv-miR-B1-3p, dont la régulation de l'expression est très particulière. Différentes études ont montré le rôle de ces miARNs pour l'autocontrôle négatif de la réplication virale, mais aussi dans l'échappement immunitaire, alimentant la controverse autour de leur fonctionnalité réelle. A ce jour, beaucoup de zones d'ombre persistent quant à la structure, la fonction et le mécanisme de libération des miARNs du BKPyV. De plus, le polyomavirus JC (JCPyV, autre membre de la famille des *Polyomaviridae*) possède aussi deux miARNs : jcv-miR-J1-5p et jcv-miR-J1-3p, ce dernier étant commun avec le BKPyV. Le JCPyV et le BKPyV présentent un tropisme similaire au niveau des cellules rénales et urothéliales. Des données rapportent la réplication du BKPyV et du JCPyV chez les transplantés de rein, mais rarement des deux virus à la fois, suggérant une possible compétition entre ces virus qui ferait intervenir la fonction inhibitrice des miARNs viraux.

Le but de cette thèse était donc de détecter et déterminer la cinétique d'excrétion des miARNs des *Polyomaviridae* dans les liquides biologiques en cas d'infection, élucider leur mécanisme de libération et leur stabilité dans le milieu extracellulaire, et étudier leur influence sur la réplication virale du BKPyV. L'ensemble de ces éléments permettrait de cerner le potentiel des miARNs des *Polyomaviridae* en tant que marqueur diagnostique ou pronostic, mais aussi en tant qu'antiviral, dans l'infection à BKPyV.

L'étude des propriétés du bkv-miR-B1-5p, spécifique du BKPyV, dans le milieu extracellulaire a démontré son importante stabilité, probablement en lien avec son association forte avec la protéine Ago2 et une relativement faible présence dans les vésicules extracellulaires. Une analyse longitudinale à partir de nombreuses urines de patients transplantés de rein a permis de montrer l'intérêt des miARNs du BKPyV pour le suivi de l'infection, comparativement à d'autres marqueurs (ADN et ARNm) du virus. En revanche, leur place en tant que marqueur diagnostique reste limitée. Une modélisation *in vitro* de l'infection chronique de cellule rénale proximale tubulaire à partir de souches de BKPyV issues de patients infectés a confirmé que les quantités de bkv-miR-B1-5p extracellulaire étaient corrélées à la réplication et l'inféctivité des virions. Enfin, après avoir confirmé les résultats de la littérature sur le rôle autorégulateur de réplication des miARNs du BKPyV, nous avons prouvé de manière inédite que le jcv-miR-J1-5p, spécifique du JCPyV, avait également la propriété d'inhiber la réplication du BKPyV *in vitro*. Ainsi, nous disposons de nouveaux éléments permettant de considérer les miARNs des *Polyomaviridae* parmi les marqueurs disponibles dans le diagnostic *in vitro*, mais aussi comme potentiels antiviraux.

Mots clés : virus BK, polyomavirus, microARN, transplantation rénale

Abstract:

BK polyomavirus (BKPyV) is a highly prevalent virus whose initial infection leads to dissemination to different tissues and then persistence, usually asymptotically. In case of immunosuppression, such as during treatment after kidney transplantation, viral reactivation may occur, which may lead to nephropathy or even graft loss. There is no effective preventive or curative treatment to date, necessitating intense research into new diagnostic and prognostic markers of the infection, and also into drug candidates. Like other viruses, BKPyV is able to generate microRNAs (miRNAs), bkv-miR-B1-5p and bkv-miR-B1-3p, whose expression is regulated in a very specific way. Different studies have shown the role of these miRNAs in the negative self-control of viral replication, but also in immune escape, fueling controversy about their actual functionality. To date, many gray areas remain regarding the structure, function and releasing mechanism of BKPyV miRNAs. In addition, polyomavirus JC (JCPyV, another member of the *Polyomaviridae* family) also exhibits two miRNAs: jcv-miR-J1-5p and jcv-miR-J1-3p, the latter being common with BKPyV. JCPyV and BKPyV show similar tropism in renal and urothelial cells. There is evidence of replication of BKPyV and JCPyV in kidney transplant patients, but rarely of both viruses at the same time, suggesting a possible competition between these viruses involving the inhibitory function of viral miRNAs.

The aim of this thesis was therefore to detect and determine the kinetics of excretion of *Polyomaviridae* miRNAs in biological fluids in case of infection, to elucidate their mechanism of release and their stability in the extracellular medium, and to study their influence on the viral replication of BKPyV. All of these elements would help to identify the potential of *Polyomaviridae* miRNAs as diagnostic or prognostic markers, but also as antiviral agents, in BKPyV infection.

The study of the properties of the BKPyV-specific bkv-miR-B1-5p in the extracellular environment demonstrated its high stability, probably related to its strong association with the Ago2 protein and a relatively low presence in extracellular vesicles. A longitudinal analysis of numerous urine samples from kidney transplant patients showed the value of BKPyV miRNAs for monitoring infection, compared to other markers (DNA and mRNA) of the virus. However, their place as a diagnostic marker remains limited. *In vitro* modeling of chronic infection of proximal tubular kidney cells using BKPyV strains from infected patients confirmed that the amounts of extracellular bkv-miR-B1-5p correlated with virion replication and infectivity. Finally, after confirming the results of the literature on the autoregulatory role of BKPyV miRNAs in replication, we proved the groundbreaking property of JCPyV-specific jcv-miR-J1-5p to inhibit BKPyV replication *in vitro*. Thus, we have new elements to consider *Polyomaviridae* miRNAs among the available markers in *in vitro* diagnostics, but also as potential antivirals.

Keywords: BK virus, polyomavirus, microRNA, kidney transplant