



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 10 octobre 2011

par Muriel HOARAU

née le 20 avril 1984 à Saint-Denis (974)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Le virus BK en transplantation rénale

Etude rétrospective 2005 - 2009
Suivi prospectif premier semestre 2010

Membres du Jury

Président	Monsieur Christophe GANTZER	Professeur en pharmacie
Juges	Monsieur Luc FRIMAT	Professeur en médecine
	Monsieur Marc LADRIERE	Docteur en médecine
	Mademoiselle Axelle PAQUIN	Docteur en pharmacie
	Madame Véronique VENARD	Docteur en pharmacie

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ✉	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN ✉	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☞	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☞	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☞ En attente de nomination

*Discipline du Conseil National des Universités :

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

AU PRESIDENT ET DIRECTEUR DE JURY,

Monsieur Le Professeur Christophe GANTZER,

*Vous avez accepté de présider ce jury de thèse.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

A NOS JUGES,

Monsieur Le Professeur Luc FRIMAT,

*Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury.
Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.*

Monsieur Le Docteur Marc LADRIERE,

*Vous avez participé à la mise en place de l'étude prospective de ce travail.
Nous vous remercions pour votre aide et pour avoir accepté de juger ce travail.*

Mademoiselle Le Docteur Axelle PAQUIN,

*Vous m'avez encouragée et habilement conseillée dans la rédaction de ce manuscrit.
Soyez-en vivement remerciée.*

Madame Le Docteur Véronique VENARD,

*Vous m'avez accueillie pendant deux semestres de mon internat de biologie médicale.
Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail avec rigueur et attention.
Vous avez toujours su être à mon écoute et me conseiller.
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

A Guillaume,

Mon Amour ; un grand merci pour tout, pour ta présence au quotidien et tout l'amour que tu me donnes.

A Antoine,

Tu es le rayon de soleil de mes journées.

A papa et maman,

Un grand merci pour le soutien que vous m'avez apporté et l'amour dont vous m'avez entourée. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Je vous dédie cette thèse.

A ma sœur, Valérie,

Ma petite sœur, devenue grande, complice de mes rires et de mes pleurs. A tous nos nombreux moments partagés et en te remerciant pour notre grande complicité.

A ma grand-mère, Mamie Marcelle,

Vois en ce travail la concrétisation d'une nouvelle génération de pharmacien.

A mon grand-père, Papi Roger, décédé le 14 août dernier,

Lorsque tu as feuilleté cette thèse, j'ai vu de la fierté dans tes yeux de papi. Ton absence laisse un grand vide mais tu resteras présent à tout jamais dans nos cœurs.

A mes grands-parents, Mamie Monique et Papi Marcel,

Partis trop tôt ; de là haut, je sais que vous veillez sur moi.

A Stéphanie et Lise, Laurent et Jean-Christophe, Auxence et Louis,

Pour ces belles années d'internat partagées et pour les beaux moments qui attendent nos petits garçons.

A l'ensemble des techniciennes du laboratoire de Virologie,

Pour votre aide dans la réalisation de ce travail, votre gentillesse au cours de ces deux semestres effectués au laboratoire de Virologie.

A Hélène Jeulin,

Pour tes précieux conseils, tes connaissances partagées et nos agréables moments passés au laboratoire de Virologie.

A l'ensemble de mes co-internes

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction	- 1 -
I. Partie I : Généralités sur le virus BK.....	- 3 -
A. Historique et classification	- 3 -
1. Historique	- 3 -
2. La famille des <i>Polyomaviridae</i>	- 4 -
B. Structure du virus BK.....	- 5 -
1. Le génome viral.....	- 5 -
2. Les protéines virales.....	- 6 -
C. Histoire naturelle de l'infection.....	- 8 -
1. Tropisme viral – liaison du virus BK au récepteur	- 8 -
2. Réplication virale, les différentes étapes.....	- 9 -
a) Entrée du virus dans la cellule.....	- 9 -
b) Migration nucléaire	- 10 -
c) Réplication du génome viral	- 10 -
3. Latence virale	- 11 -
D. Epidémiologie	- 12 -
1. Séroprévalence	- 12 -
2. Distribution mondiale des génotypes	- 13 -
3. Mode de transmission.....	- 16 -
E. Physiopathologie de l'infection par le virus BK	- 17 -
1. Chez l'immunocompétent	- 17 -
2. Chez l'immunodéprimé.....	- 18 -
a) Chez le transplanté rénal	- 19 -
b) Chez le greffé médullaire	- 23 -
c) Autres transplantations.....	- 24 -
3. Virus BK et néoplasie	- 24 -
F. Le diagnostic d'une infection par le virus BK et la surveillance	- 26 -
1. Clinique	- 26 -
2. Cytologie urinaire.....	- 27 -
3. Virologie.....	- 28 -
a) Diagnostic indirect	- 28 -
b) Diagnostic direct	- 28 -
G. La prise en charge des infections par le virus BK.....	- 38 -
1. Evolution de la néphropathie.....	- 38 -
2. Réduction de l'immunosuppression	- 39 -
3. Traitements spécifiques.....	- 39 -

a) En première intention	- 40 -
b) En deuxième intention.....	- 40 -
4. Retransplantation après exérèse du greffon	- 41 -
5. Discussion	- 41 -
H. Conclusion.....	- 42 -
II. Etudes sur le virus BK menées au CHU de Nancy	- 44 -
Introduction	- 44 -
A. Etude rétrospective du 01/01/2005 au 31/12/2009.....	- 45 -
1. Introduction	- 45 -
2. Problématique et objectifs de l'étude	- 46 -
3. Matériels et méthodes.....	- 47 -
a) Population étudiée	- 47 -
b) Définitions	- 47 -
c) Echantillons biologiques	- 48 -
d) Marqueurs.....	- 49 -
e) Déroulement de l'analyse au laboratoire.....	- 49 -
4. Résultats	- 52 -
5. Description des résultats.....	- 53 -
a) Présence de virus BK dans les urines et/ou dans le sang	- 53 -
b) Patients faisant l'objet d'une étude plus approfondie	- 54 -
c) Evolution comparée de ces patients et conclusion des cas cliniques	- 61 -
6. Discussion	- 61 -
7. Limites.....	- 71 -
8. Conclusion.....	- 72 -
B. Etude prospective de suivi du virus BK au cours du premier semestre 2010	- 73 -
1. Problématique et objectifs de l'étude	- 73 -
2. Matériels et méthodes.....	- 73 -
a) Population étudiée	- 73 -
b) Mise en place du suivi de ces patients.....	- 74 -
c) Critères d'inclusion ou d'exclusion.....	- 74 -
d) Description de la population	- 75 -
e) Marqueurs.....	- 75 -
f) En pratique	- 76 -
3. Résultats	- 76 -
a) Suivi des patients de l'étude prospective premier semestre 2010	- 76 -
b) Incidence de la néphropathie associée au virus BK	- 81 -
c) Cinétique des charges virales urinaires et sanguines	- 81 -
d) Comparaison des urines de 24 heures par rapport aux urines fraîches	- 83 -
4. Discussion	- 84 -
a) Protocole de suivi des patients ayant eu une transplantation rénale.....	- 84 -
b) Urines fraîchement émises ou urines de 24 heures	- 87 -
c) Positivité dans le sang ou dans l'urine - Cinétique	- 87 -
d) Incidence de la néphropathie associée au virus BK	- 89 -

e)	Suivi par charge virale sanguine ou urinaire	- 90 -
f)	Intérêts-Inconvénients du suivi urinaire	- 91 -
g)	Intérêts-Inconvénients des charges virales sanguines	- 92 -
5.	Conclusion.....	- 92 -
C.	Discussion générale.....	- 93 -
1.	Suivi de la charge virale : urines ou sang.....	- 93 -
2.	Intérêt des « <i>decoy cells</i> »	- 94 -
3.	Chronologie générale de l'infection à virus BK.....	- 94 -
4.	Traitement des patients dont la biopsie objective une néphropathie à virus BK -	94 -
5.	Algorithme de suivi du virus BK au CHU de Nancy	- 96 -
6.	Intérêt du suivi prospectif.....	- 97 -
D.	Perspectives et conclusion.....	- 99 -

Liste des figures

Figure 1 : Particules de virus BK dans les urines.....	- 4 -
Figure 2 : Organisation du génome du virus BK	- 6 -
Figure 3 : Structure du virion de la famille des <i>Polyomaviridae</i>	- 7 -
Figure 4 : Entrée du virus BK dans la cellule	- 9 -
Figure 5 : Cycle de multiplication virale.....	- 11 -
Figure 6 : Séroprévalence du virus BK en fonction de l'âge.....	- 13 -
Figure 7 : Distribution des sous-types de virus BK dans le monde	- 15 -
Figure 8 : Distribution des sous-groupes du sous-type I dans le monde.....	- 16 -
Figure 9 : Déterminants et modulateurs dans l'apparition d'une néphropathie	- 20 -
Figure 10 : Modèle proposé de survenue d'une cystite hémorragique	- 21 -
Figure 11 : Mécanisme des lésions associées au virus BK au niveau tubulaire rénal.....	- 22 -
Figure 12 : Type et prévalence des infections à virus BK chez les transplantés rénaux.....	- 26 -
Figure 13 : Virus BK dans l'urine par microscopie électronique (x152 000 et 280 000)...	- 29 -
Figure 14 : Effet cytopathogène du virus BK sur des cellules embryonnaires de rein	- 30 -
Figure 15 : Effet cytopathogène du virus BK	- 30 -
Figure 16 : « <i>Decoy cells</i> » (Coloration de Papanicolaou, x60 et x400).....	- 31 -
Figure 17 : « <i>Decoy cells</i> »	- 32 -
Figure 18 : « <i>Decoy cells</i> » en contraste de phase.....	- 33 -
Figure 19 : Histologie d'une biopsie rénale présentant une néphropathie à virus BK	- 35 -
Figure 20 : Biopsies chez un patient transplanté rénal avec réactivation à virus BK	- 36 -
Figure 21 : Présence du virus BK en immunohistochimie.....	- 37 -
Figure 22 : Transplantations rénales réalisées au CHU de Nancy entre 2005 et 2010	- 45 -
Figure 23 : Répartition des patients de l'étude rétrospective par classe d'âge.....	- 48 -
Figure 24 : Exemples de résultats obtenus avec la gamme plasmidique	- 51 -
Figure 25 : Courbe de fluorescence d'une PCR virus BK négative	- 51 -
Figure 26 : Courbe de fluorescence d'une PCR virus BK positive	- 51 -
Figure 27 : Courbe d'amplification de la PCR virus BK positive	- 52 -
Figure 28 : Quantification de la charge virale positive	- 52 -
Figure 29 : Suivi du virus BK en post transplantation pour Monsieur E.	- 56 -
Figure 30 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur D.	- 58 -
Figure 31 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur S.	- 59 -
Figure 32 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur L.	- 60 -
Figure 33 : Algorithme des résultats de l'étude rétrospective.....	- 62 -
Figure 34 : Description des résultats en trois groupes.....	- 63 -
Figure 35 : Virus BK et cinétique	- 67 -
Figure 36 : Répartition des patients de l'étude prospective	- 74 -
Figure 37 : Histogramme de répartition des patients de l'étude prospective.....	- 75 -
Figure 38 : Résultats de l'étude prospective (en nombre de patients)	- 80 -
Figure 39 : Résultats complets de l'étude prospective	- 81 -
Figure 40 : Cinétique des charges virales sanguines et urinaires du patient U7	- 82 -
Figure 41 : Comparaison de différents protocoles de suivi du virus BK	- 86 -
Figure 42 : Proposition d'algorithme de suivi du virus BK en post transplantation rénale.	- 97 -

Liste des tableaux

Tableau I : Nombre de transplantations rénales réalisées au CHU de Nancy	- 45 -
Tableau II : Caractéristiques des amorces et de la sonde utilisées	- 50 -
Tableau III : Conditions d'amplification.....	- 50 -
Tableau IV : Composition du mélange réactionnel.....	- 50 -
Tableau V : Principaux résultats de l'analyse rétrospective	- 53 -
Tableau VI : Tableau comparatif des patients avec virémie et signes de néphropathie.....	- 55 -
Tableau VII : Evolution comparée de ces patients (s = semaines).....	- 61 -
Tableau VIII : Pourcentage de positivité du virus BK	- 64 -
Tableau IX : Bibliographie comparée en termes de positivité	- 65 -
Tableau X : Patients de la cohorte et seuil prédictif de néphropathie	- 69 -
Tableau XI : Revue exhaustive de la littérature	- 70 -
Tableau XII : Résultats généraux	- 76 -
Tableau XIII : Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans les urines.....	- 77 -
Tableau XIV : Résultats des patients du groupe urines avec virurie.....	- 78 -
Tableau XV : Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans le sang.....	- 79 -
Tableau XVI : Résultats des virémies en cas de virurie positive	- 80 -
Tableau XVII : Comparaison des urines fraîches et urines de 24 heures.....	- 83 -
Tableau XVIII : Description des patients du groupe urine en trois groupes.....	- 88 -
Tableau XIX : Cinétique de l'infection par le virus BK pour le patient U7	- 89 -
Tableau XX : Comparaison statistique entre ADNurie, « <i>decoy cells</i> » et ADNémie.....	- 90 -

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNémie	Présence d'ADN dans le sang
ADNurie	Présence d'ADN dans l'urine
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
BHN	B Hors Nomenclature
BKémie	Présence d'ADN du virus BK dans le sang
BKurie	Présence d'ADN du virus BK dans l'urine
BKV	Virus BK
BKVAN	Néphropathie associée au virus BK
CD	Cluster of Differentiation
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMV	Cytomégalovirus
CV	Charge Virale
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylène Diamine Tetra Acétique
HLA	Human Leucocyte Antigen
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
J	Jour
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KIV	Virus KI
M	Mois
NCCR	Région de contrôle non codante
ND	Non Détectable
NK	Natural Killer
ORI	Origine de réplication
PAS	Acide périodique de Schiff
POL	Polymérase
PCR	Polymerase Chain Reaction
s	Semaine
SGT	Sang total
SV40	Virus simien 40
TCR	Région de contrôle de la transcription
UF	Unité fonctionnelle
UR	Urines
VP1,2,3	Protéines virales de capside
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
WUV	Virus WU

INTRODUCTION

Introduction

Le virus BK, petit virus de la famille des *Polyomaviridae*, a été découvert en 1970 dans les urines d'un patient transplanté rénal qui présentait une sténose urétérale [Gardner *et al.*, 1971]. Le virus BK est un virus ubiquitaire, dont la séroprévalence varie entre 60 et 100 % en fonction des études épidémiologiques menées dans différents pays. Peu de publications concernaient ce virus dans les années 1980, mais elles se sont depuis multipliées avec l'utilisation de puissantes molécules immunosuppressives et l'apparition de néphropathies associées à ce virus. En effet, le virus BK est notamment capable de persister au niveau de l'épithélium rénal [Heritage *et al.*, 1981].

Bien que la plupart des infections à virus BK chez le sujet immunocompétent soient asymptomatiques, de rares cas de cystites hémorragiques, d'ulcérations et de sténoses urétérales ont été décrits.

Le pouvoir pathogène du virus BK s'exprime essentiellement chez les transplantés rénaux, chez qui l'immunodépression induite par les traitements immunosuppresseurs favorise la réactivation virale. Dans les années 1990 avec l'utilisation de puissants traitements immunosuppresseurs, le virus BK est devenu un pathogène émergent en transplantation rénale de par la néphropathie qu'il est capable d'induire et le risque de perte du greffon.

Après la publication de recommandations internationales en 2009 [KDIGO, 2009], ce travail s'est intéressé aux modalités de suivi du virus BK au CHU (Centre Hospitalo Universitaire) de Nancy. A cet escient, dans un premier temps, une étude rétrospective a été réalisée entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2009 afin d'évaluer la prévalence de la néphropathie et de la comparer aux données de la littérature. Dans un second temps, une étude prospective menée au cours du premier semestre de l'année 2010 compare deux modalités différentes de suivi du virus BK chez les patients ayant eu une transplantation rénale.

PARTIE I : GENERALITES SUR LE VIRUS BK

I. Partie I : Généralités sur le virus BK

A. Historique et classification

1. Historique

Le virus BK tient son nom des initiales du premier patient chez qui il a été isolé en 1970. Ce patient, âgé de trente neuf ans, a été admis au St. Mary's Hospital à Londres, en mai 1970 pour une pyélonéphrite chronique dans le contexte d'une insuffisance rénale terminale. Des investigations urologiques ont montré une néphropathie chronique confirmée par biopsie. Le patient avait subi une transplantation rénale à partir d'un rein provenant de son frère. Les suites opératoires avaient été simples. L'immunosuppression avait été maintenue par de la prednisone et de l'azathioprine. Le patient a été hospitalisé à nouveau en octobre 1970 pour une douleur au niveau du greffon rénal et une anurie. La clairance de la créatinine a diminué pendant cette période de 100 mL par minute à neuf mL par minute. L'exploration a révélé une fibrose et une ischémie urétérale. Une anastomose urétéro-urétérale a été réalisée en utilisant l'uretère droit. Les suites opératoires ont été simples.

Au niveau de la cytologie urinaire, ont été mises en évidence dans la première urine examinée des cellules portant des inclusions mais celles-ci étaient moins nombreuses dans les échantillons suivants et absentes de l'urine seize jours après l'intervention. L'examen des urines par microscopie électronique a montré un grand nombre de particules virales avec un diamètre moyen de 43,6 nm (figure 1, page 4). Ces particules étaient identiques à celles du sous-groupe des polyoma appartenant au groupe des *papovavirus*.

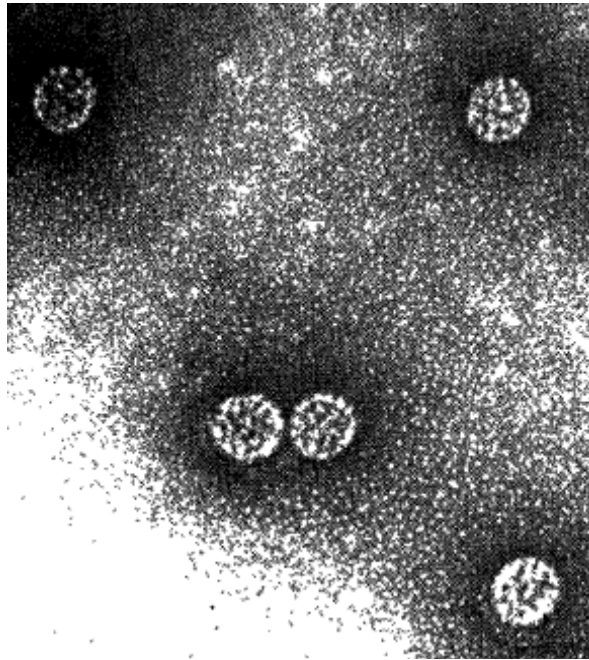


Figure 1 : Particules de virus BK dans les urines

D'après [Gardner *et al.*, 1971]

Un effet cytopathogène a été observé dix-huit jours après inoculation des cultures de cellules Véro par les urines. L'infection décrite serait due à une réactivation du virus latent. L'immunosuppression était probablement un facteur d'établissement de l'infection.

L'épidémie de néphropathie à virus BK des années 1990 résulte de l'arrivée de puissantes molécules immunosuppressives comme le tacrolimus, le sirolimus ou le mycophénolate mofétil. [Gardner *et al.*, 1971 - Drachenberg *et al.*, 2003 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Nishimoto *et al.*, 2006 - Randhawa *et al.*, 2006 - Jiang *et al.*, 2009 - Kean *et al.*, 2009 - Thoulouzan *et al.*, 2010]

2. La famille des *Polyomaviridae*

Le virus BK appartient à la famille des *Polyomaviridae*, groupe des *Polyomavirus*. Son autre appellation est le *polyomavirus* de l'homme de type un. Les *polyomavirus* sont des virus à ADN non enveloppés de petite taille au sein du groupe des *papovavirus* qui comprend également les papillomavirus.

La famille des *Polyomaviridae* comporte actuellement cinq *polyomavirus* humains et seize *polyomavirus* non humains, caractérisées par une étroite spécificité d'espèce [Krumholz *et al.*, 2009]. Tous ont des capsides icosaédriques de taille voisine, composées de trois

protéines virales de capsid (VP1, VP2, VP3). Cinq *polyomavirus* humains ont été identifiés : le virus BK (agent de cystites hémorragiques et de néphropathies), le virus JC (responsable de leucoencéphalite multifocale progressive), le virus KI et le virus WU (liens possibles avec des affections respiratoires), et le *polyomavirus* associé au carcinome des cellules de Merkel. Deux *polyomavirus* de singe ont été identifiés : le SV40 et le LPV *polyomavirus* lymphotropic [Azzi *et al.*, 1996 - Major *et al.*, 2001 - Nishimoto *et al.*, 2006 - Jiang *et al.*, 2009].

B. Structure du virus BK

Le virus BK est un virus nu, constitué d'une capsid icosaédrique à symétrie cubique de 45 nm de diamètre. Le génome viral, est composé d'un ADN bi caténaire, circularisé et super enroulé d'environ 5300 paires de base. De par l'absence d'enveloppe, ils sont résistants aux solvants, et de façon plus relative à l'inactivation par la chaleur. La résistance à la dessiccation favorise leur survie dans le milieu extérieur. [Mammette *et al.*, 2002 - Huraux *et al.*, 2003]

1. Le génome viral

Le génome viral est un ADN bi caténaire, circulaire, surenroulé de 5300 paires de bases qui comporte trois régions. Les trois régions du génome sont les suivantes (figure 2, page 6) :

- la région régulatrice non codante, appelée également NCCR (NCCR : non coding control region ou région de contrôle non codante) ou TCR (transcription control region ou région de contrôle de la transcription). Cette région comprend l'ORI (origine de réplication), les promoteurs des gènes précoces et tardifs et la région activatrice. Elle se situe entre les régions précoces et tardives [Seif *et al.*, 1979].

- la région précoce comporte la portion du génome transcrite, elle est exprimée dès l'entrée du virus dans la cellule et code des protéines exprimées au début du cycle de multiplication. Les gènes précoces codent deux protéines de régulation, les antigènes T et t, dont l'expression persiste pendant toute la durée du cycle.

- la région tardive est la portion du génome traduite après l'étape de réplication génomique en sens inverse de la région précoce. Elle code les protéines de capsid VP1 (362 acides aminés), VP2 (351 acides aminés) et VP3 (232 acides aminés) et une protéine non structurale appelée agnoprotéine (66 acides aminés) [Krumbholz *et al.*, 2008].

Le génome des *Polyomavirus* est très stable ; il existe un important pourcentage d'homologie entre eux. Les virus BK et JC, strictement humains, présentent 72 % d'homologie de séquence. Chacun d'entre eux partage 70 % d'homologie avec le SV40, d'origine simienne [Hirsch *et al.*, 2003]. Néanmoins, il existe aussi une diversité génomique, tant dans la région non codante de régulation que dans les régions codantes. [Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Drachenberg *et al.*, 2003 - Huraux *et al.*, 2003 - Fioriti *et al.*, 2005]

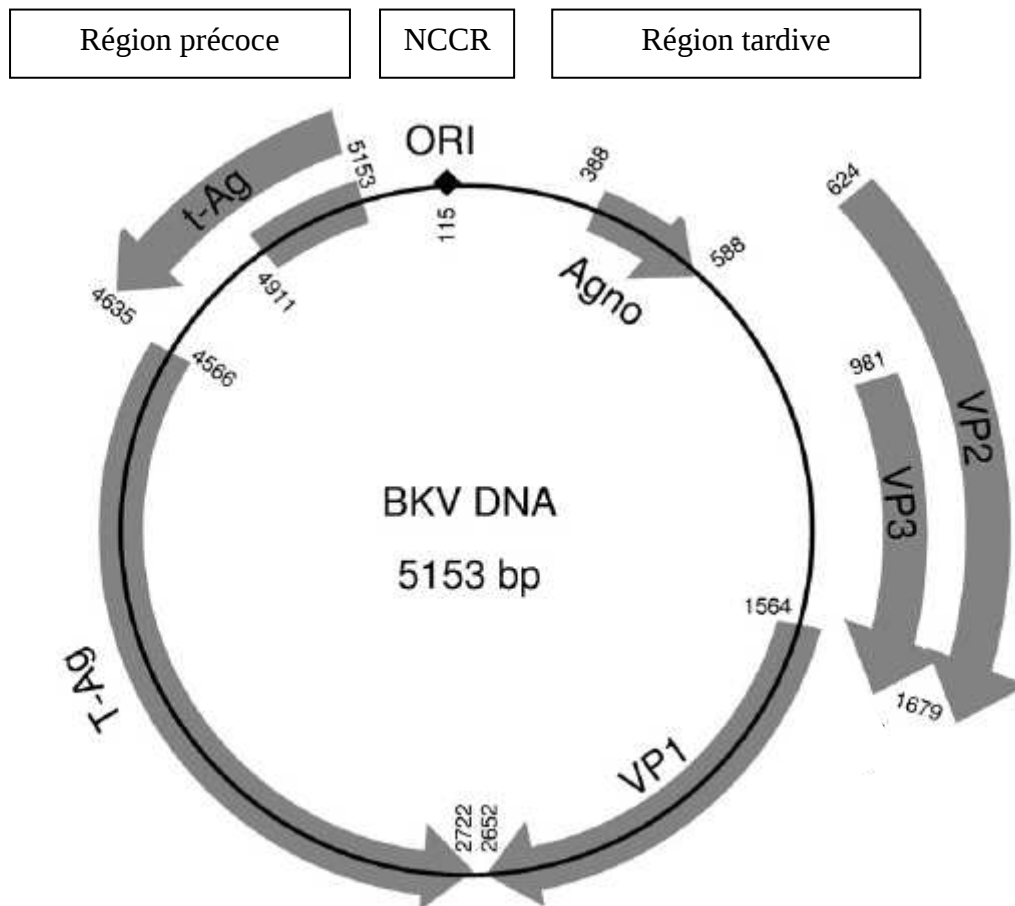


Figure 2 : Organisation du génome du virus BK

D'après [Krumbholz *et al.*, 2008], Agno = agnoprotéine, ORI = origine de réplication, t-Ag = antigène t, T-Ag = Antigène T, VP1-2-3 = protéines virales de capsid

2. Les protéines virales

La capsid virale est constituée de trois protéines : VP1, protéine majeure de capsid, et deux protéines mineures de capsid, VP2 et VP3. Leur assemblage forme un icosaèdre constitué de soixante douze capsomères pentamériques. Chaque pentamère se compose de

cinq protéines VP1 et d'une protéine centrale VP2 ou VP3. La capside contient la molécule d'ADN complexée avec des histones cellulaires, l'ensemble formant une structure de type chromatinién évoquant un mini chromosome (figure 3) [Bressollette-Bodin *et al.*, 2003].

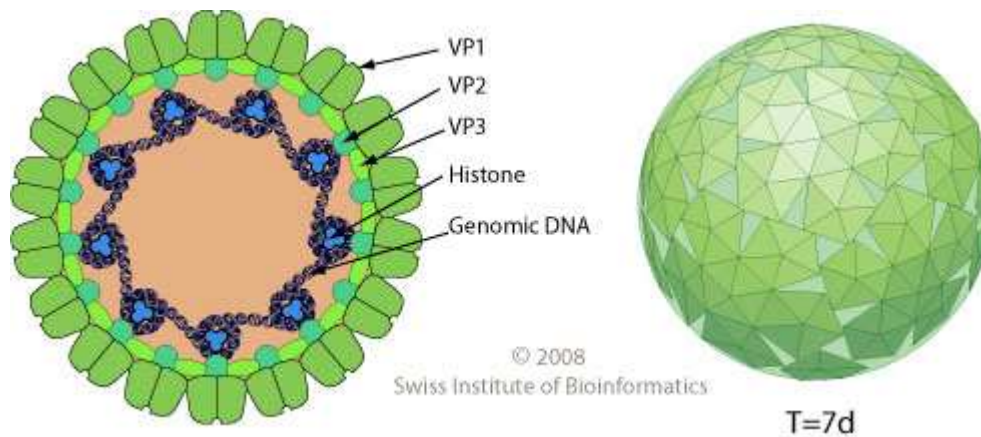


Figure 3 : Structure du virion de la famille des *Polyomaviridae*

(http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/148.html)

Le gène de la protéine VP1 présente un polymorphisme génétique important qui permet de classer les souches de virus BK en quatre génotypes distincts (I à IV) [Krumholz *et al.*, 2008]. La région non codante NCCR présente également des variations génotypiques permettant de distinguer les souches natives ou «archétypes» des souches réarrangées, dénommées «variants», car ayant subi des modifications de type insertion ou délétion [Bressollette Bodin *et al.*, 2003 – Huraux *et al.*, 2003]. Le rôle éventuel de ces variants dans la virulence de certaines souches virales reste encore à préciser. Il semblerait que ces variations seraient le reflet de l'aptitude du virus BK à s'adapter à de nouveaux environnements cellulaires [Johnsen *et al.*, 1995].

L'antigène T, protéine de 695 acides aminés, possède de multiples fonctions. Il agit au niveau de la régulation de la réplication et de la croissance cellulaire. Il interagit également avec pRb et p53, deux protéines régulant l'apparition de tumeurs [White *et al.*, 2004].

L'antigène t est une protéine riche en cystéine, de 172 acides aminés. Les 82 acides aminés de sa partie amino terminale sont identiques avec l'antigène T car issus de l'épissage alternatif d'un ARN pré messager commun. Moins bien connu, il semble avoir des fonctions

multiples au cours du cycle de réplication et favorise notamment la progression du cycle cellulaire [Bressollette-Bodin *et al.*, 2003].

La fonction de l'agnoprotéine est encore mal identifiée à ce jour [Huraux *et al.*, 2003].

C. Histoire naturelle de l'infection

Les *polyomavirus* se multiplient *in vitro* presque exclusivement dans les cellules de leur hôte naturel, l'homme, en raison de la spécificité d'hôte du virus. Le plus souvent, chez l'hôte, cette multiplication est restreinte à un tissu voire à des cellules spécialisées de ce tissu. Le tropisme *in vivo* du virus BK s'exerce vers les cellules épithéliales de diverses origines mais surtout vers les cellules tubulaires rénales avec un tropisme rénal très marqué et vers les cellules endothéliales.

Dans les cellules qui ne correspondent pas au tropisme du virus BK, l'infection est incomplète et s'arrête au stade de synthèse des antigènes précoces, la réplication virale est alors arrêtée sans conséquence ultérieure pour la cellule [Bressollette Bodin *et al.*, 2003].

Le modèle proposé pour le cycle de multiplication du virus BK s'inspire des modèles connus pour le virus simien SV40. Ces virus dépendent entièrement de la machinerie cellulaire pour les étapes de transcription et de réplication ; leur cycle de multiplication est intranucléaire.

La transcription se déroule en deux phases, précoce et tardive, séparées par la réplication de l'ADN génomique. Les protéines précoces ont une fonction de régulation. Les protéines tardives qui constituent la capsid, ont un rôle structural et s'assemblent avec l'ADN génomique néoformé dans le noyau.

1. Tropisme viral – liaison du virus BK au récepteur

Le tropisme viral débute par liaison du virus BK à la cellule. La protéine de capsid VP1 joue un rôle majeur dans l'entrée du virus dans la cellule et la liaison du virus BK à son récepteur. Malgré une homologie avec les autres *polyomavirus*, le virus BK diffère par la nature de son récepteur pour l'entrée dans la cellule.

Le virus BK se lie à l'extrémité N terminale de glycoprotéines porteuses d'un motif acide sialique lié en alpha 2,3 au niveau des gangliosides GD1b et GT1b. Le récepteur du virus BK serait donc une glycoprotéine portant des gangliosides à l'extrémité N terminale. L'acide sialique lié en alpha 2,3 est supposé interagir avec la liaison des boucles de la protéine

majeure de capside VP1 [Bressollette-Bodin *et al.*, 2003 - Dugan *et al.*, 2005 - Dugan *et al.*, 2006 - Dugan *et al.*, 2008].

2. Réplication virale, les différentes étapes

Le cycle de réplication virale commence après liaison du virus BK à son récepteur par l'internalisation du virus BK (figures 4 et 5, page 11).

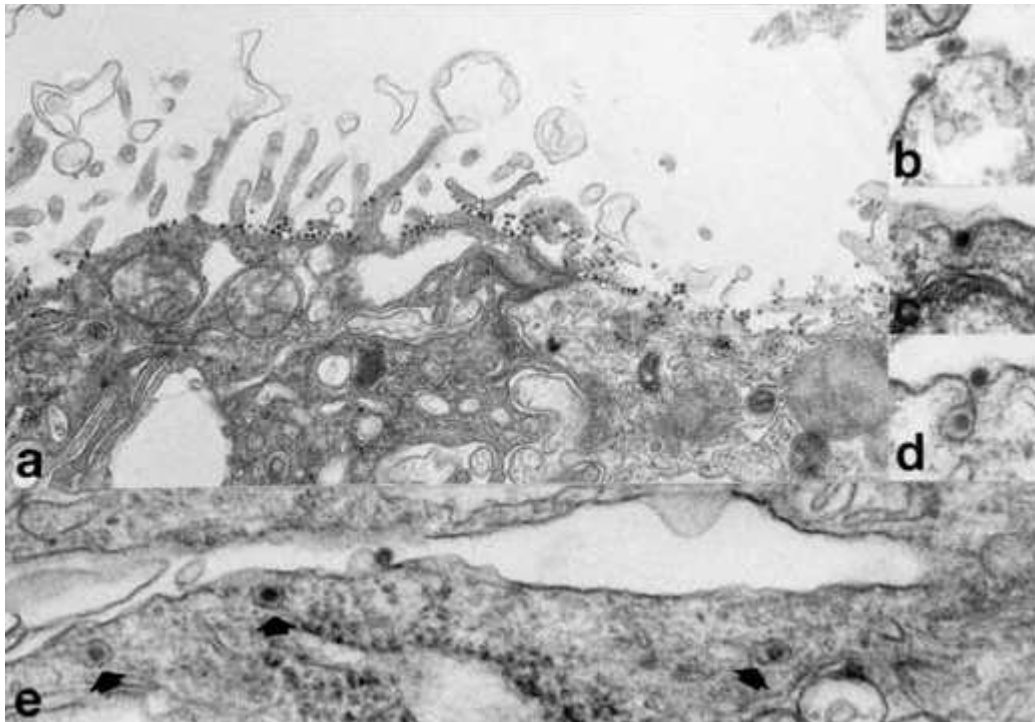


Figure 4 : Entrée du virus BK dans la cellule

D'après [Drachenberg *et al.*, 2003]. a : attachement du virus à la surface de la cellule - b et c : entrée du virion - d : formation d'une vésicule entourant le virion - e : la vésicule se détache de la membrane cellulaire

a) Entrée du virus dans la cellule

L'attachement du virion au récepteur est suivi d'une endocytose cholestérol dépendante. Il s'agit d'un type d'endocytose non spécifique appelée pinocytose ; les vésicules contiennent des gouttelettes de liquide extracellulaire et sont adressées vers les compartiments intracellulaires. L'étape d'internalisation est relativement longue et dure environ quatre heures. Une fois à l'intérieur de la cavéole, la poursuite du cycle de multiplication requiert une étape d'acidification. Le pH acide permet des changements conformationnels de la

capside et le début du désassemblage du virion [Drachenberg *et al.*, 2003 - Dugan *et al.*, 2006 - Jiang *et al.*, 2009].

b) Migration nucléaire

La protéine de capsid VP1 contient des signaux d'adressage nucléaire, permettant la migration des vésicules jusqu'au noyau où leur membrane fusionne avec la membrane nucléaire, au niveau du pore nucléaire. Le processus d'acheminement du virus jusqu'au noyau se fait par fusion avec le réticulum endoplasmique [Dugan *et al.*, 2006].

La décapsidation se poursuit dans la cellule hôte. La capsid du virus commence à se désintégrer huit à douze heures en post-infection. Le pH acide induit des changements conformationnels de cette dernière qui mènent au désassemblage du virion et à la pénétration de la membrane nucléaire [Jiang *et al.*, 2009].

c) Réplication du génome viral

Dans le noyau ont lieu la transcription, la réplication et l'assemblage. L'arrivée du génome viral dans le noyau initie la transcription des gènes viraux et la réplication du génome.

Dès la détection de l'antigène T dans les cellules, une augmentation de la production des enzymes cellulaires est observée. En effet, la présence de l'antigène T entraîne l'expression de promoteurs viraux et cellulaires.

La cellule entre ensuite en cycle de multiplication et l'ADN polymérase (ADN pol) cellulaire est activée. La réplication de l'ADN viral est régulée par la phosphorylation de l'antigène T. L'antigène t inactive des protéines kinases et favorise la progression du cycle cellulaire

Après l'étape de traduction, les protéines de capsid néo synthétisées dans le cytoplasme sont transportées dans le noyau pour l'assemblage des virions. Les interactions capsid - ADN viral - protéines - histones aboutissent à la formation d'un virion entier dont les mécanismes de formation sont mal connus. Les virions néo formés sont transportés dans des vésicules jusqu'à la membrane cellulaire, puis libérés par exocytose [Mammette *et al.*, 2002 - Huraux *et al.*, 2003 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003].

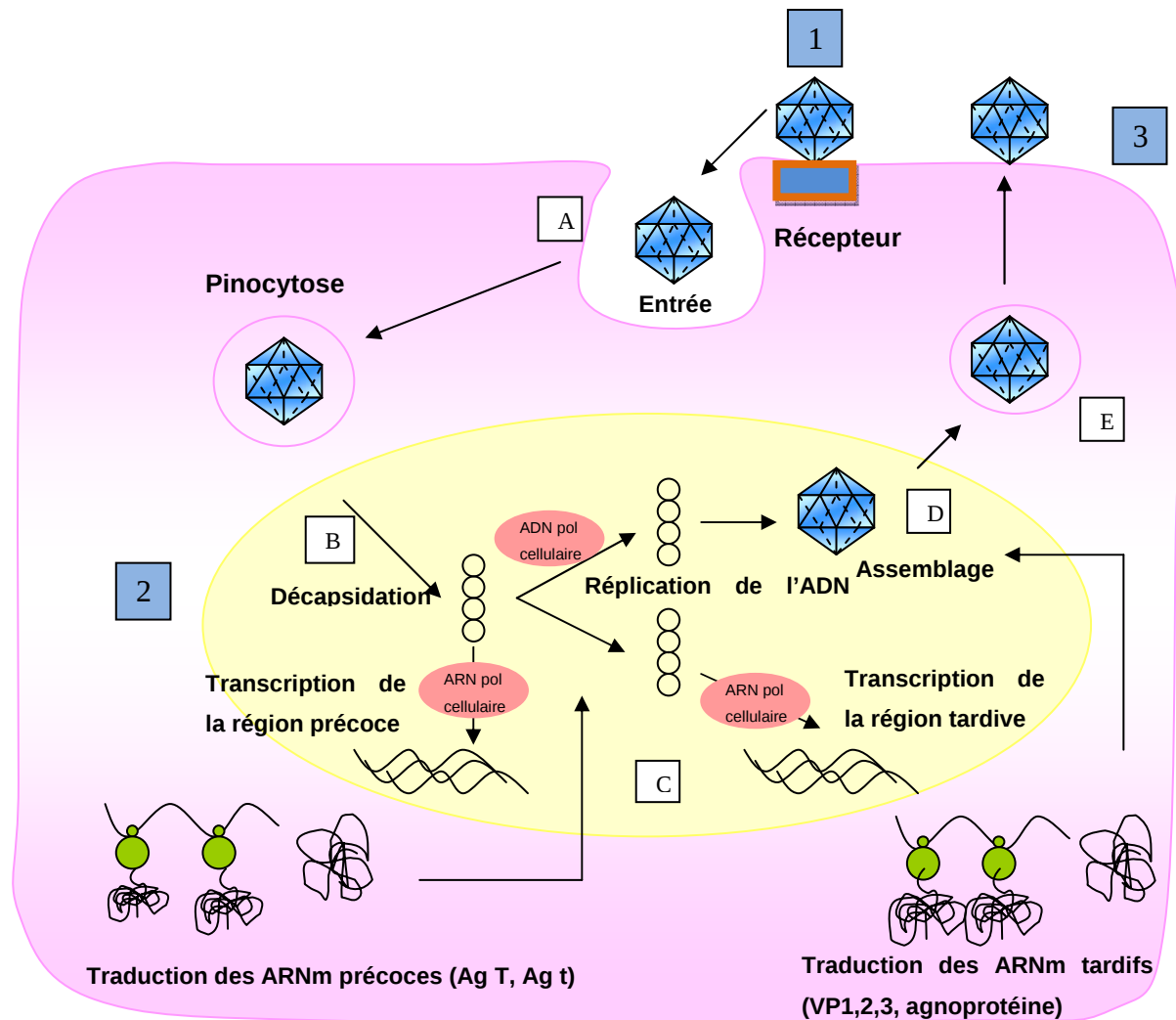


Figure 5 : Cycle de multiplication virale

D'après [Bressollette Bodin *et al.*, 2003]

Si l'on résume le cycle de multiplication du virus BK :

1 Liaison du virus BK au récepteur

2 Réplication virale

A Entrée / pinocytose

B Décapsidation

C Réplication virale avec étapes de transcription et de traduction

D Assemblage

E Excrétion virale

3 Latence virale

3. Latence virale

Les *polyomavirus* tout comme les virus Herpès sont connus pour établir des latences ou des infections persistantes. La latence du virus a lieu essentiellement dans les cellules tubulaires rénales. Le virus BK est capable de rester latent à l'intérieur de la cellule cible de

l'épithélium rénal sous une forme non répliquative ou avec une répliquation minimale, selon un mécanisme proche de celui de la famille des *Herpesviridae*. A l'état latent, le génome du virus BK peut rester sous forme épisomale non intégré dans les cellules cibles de l'épithélium tubulaire rénal [Bressollette-Bodin *et al.*, 2003].

Le rein est le principal organe de latence du virus ; le cerveau, les cellules leucocytaires du sang circulant sont des sites de latence controversés et seraient plutôt associés à la dissémination du virus.

Des phases de réactivation virales bénignes asymptomatiques peuvent avoir lieu chez les sujets immunocompétents.

Par ailleurs, la détection de l'ADN de VP1 dans les cellules du sang serait plutôt associée à une réinfection ou à une réactivation [Dolei *et al.*, 2000] ; ceci s'explique en considérant que l'infection par le virus BK a lieu pendant l'enfance [Reploeg *et al.*, 2001 - Ling *et al.*, 2003 - Jiang *et al.*, 2009].

D. Epidémiologie

Le virus BK est un virus de répartition ubiquitaire dont la séroprévalence est élevée. Le seul réservoir connu pour ce virus est l'homme.

1. Séroprévalence

La quasi-totalité des primo infections dues au virus BK survient au cours de l'enfance et sont asymptomatiques. Le virus BK serait acquis un peu plus tôt par les enfants en collectivité que par les enfants gardés à domicile [Knowles *et al.*, 2006].

En général, aucune différence n'est observée entre les hommes et les femmes. Les anticorps maternels, présents à la naissance, sont perdus durant les premiers mois de vie, ce qui fait qu'entre l'âge de quatre et 11 mois, seuls cinq pour cent des enfants ont des anticorps anti virus BK. Par la suite, la séroprévalence augmente. Aux États-Unis, 50 % des enfants entre trois et quatre ans possèdent des anticorps. La séroprévalence atteint presque 100 % vers l'âge de 10-11 ans, puis diminue progressivement pour se situer aux alentours de 70-80 % pour les sujets plus âgés (figure 6, page 13) [Kean *et al.*, 2009]. [Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Hirsch *et al.*, 2003 - Huraux *et al.*, 2003 - Knowles *et al.*, 2006 - Bohl *et al.*, 2008 - Jiang *et al.*, 2009 - Kean *et al.*, 2009]

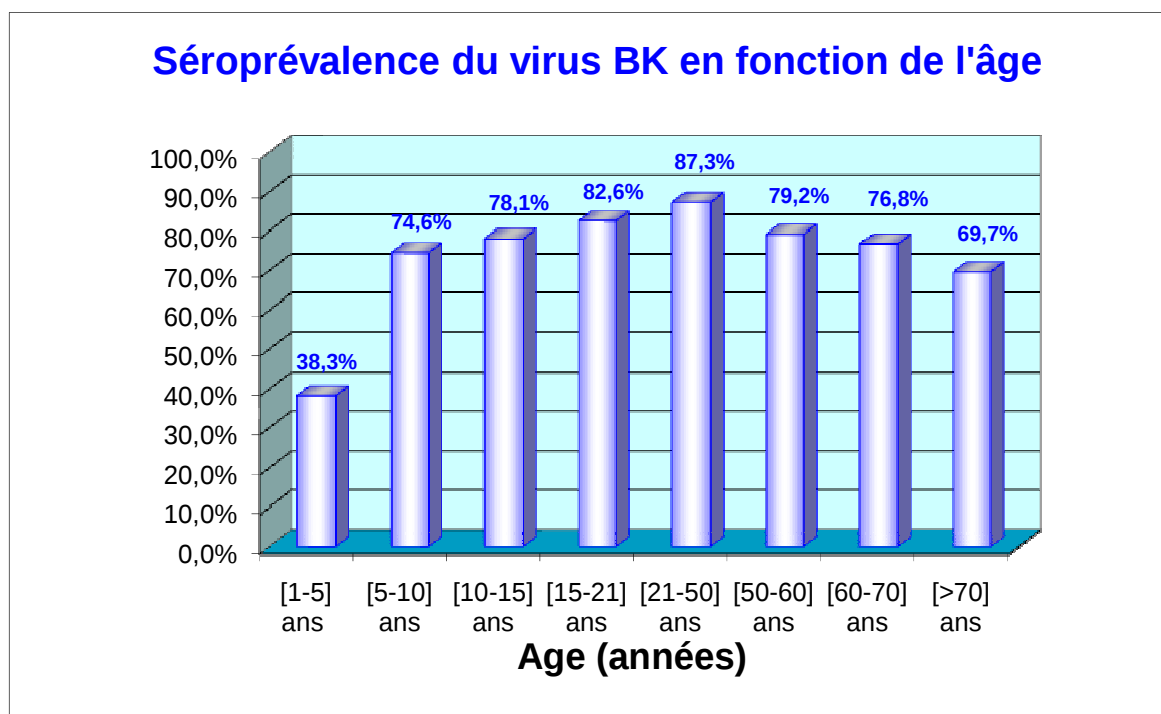


Figure 6 : Séroprévalence du virus BK en fonction de l'âge

D'après [Kean *et al.*, 2009]

2. Distribution mondiale des génotypes

Le virus BK est le seul des *Polyomavirus* classifié en quatre sous-types par des techniques sérologiques et génotypiques [Nishimoto *et al.*, 2006 - Zheng *et al.*, 2007].

Le premier schéma de génotypage proposé par Jin *et al.*, repose sur un très court segment du gène VP1 (nucléotides 1744 à 1812 – acides aminés 61 à 83 : région antigénique variable). Quatre sous-types (I à IV) de virus BK ont ainsi été identifiés [Jin *et al.*, 1993].

Le sous-type I est présent partout dans le monde avec des incidences variant de 46 à 82 %. Il est le plus souvent retrouvé. Le sous-type IV a une distribution essentiellement en Asie à l'exception du Japon, le sous-type IV étant le deuxième sous-type le plus fréquent sur la plupart des continents à l'exception de l'Afrique et du nord-est de l'Asie ; les sous-types II et III sont rarement détectés dans le monde (figure 7, page 15).

En se basant sur des études de variation de la séquence d'ADN, le sous-type I est lui-même divisé en quatre sous-groupes : I/a, I/b-1, I/b-2, I/c, chacun de ces sous-groupes ayant une distribution géographique particulière (figure 8, page 16) [Jin *et al.*, 1993] :

- le I/a ayant une forte prévalence en Afrique,
- le I/b-1 en Asie du Sud-Est,
- le I/b-2 en Europe (populations européennes et américaines : le virus BK accompagnerait l'émigration des européens aux Etats-Unis),
- le I/c au Nord-Est de l'Asie (populations asiatiques)

Le sous-type IV du virus BK pourrait avoir infecté les ancêtres de l'homme en Afrique et ensuite s'être disséminé partout dans le monde en fonction des migrations des populations africaines. L'autre hypothèse est que le sous-type IV pourrait avoir été transmis d'un primate vers des ancêtres asiatiques, et ensuite s'être réparti sur toute la région eurasiennne [Jin *et al.*, 1993].

Le sous-type IV présente six sous-groupes (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1, et IV/c-2). Comme pour le sous-type I, chaque sous-groupe présente une localisation géographique particulière ; tous ces sous-groupes ont une forte prévalence dans les populations de l'Asie du sud-est avec par exemple le sous-type IV/c-2 présent en Asie du Nord-Est et en Europe.

Pour expliquer la répartition géographique du virus BK, l'hypothèse que ce virus a migré comme les populations humaines a été évoquée. Le virus BK pourrait être utilisé comme marqueur en génétique anthropologique. Nishimoto *et al.*, pensent que les clades correspondant aux sous-types I, III et IV ont divergé il y a 4,4 millions d'années [Nishimoto *et al.*, 2006].

Malgré l'importante homologie d'acides aminés entre les sous-types, une différence existe entre le sous-type I et les sous-types II, III et IV, cette différence reposant sur le changement de position d'un acide aminé négativement chargé des positions 75 à 77. Cette variabilité pourrait, dans certains cas, avoir des conséquences sur la structure secondaire et tertiaire de la protéine ; cela altérerait la capacité du virus à interagir avec les cellules de l'hôte [Tremolada *et al.*, 2010]. Il n'a pas été établi que les sous-groupes représentent une différence au niveau clinique car le changement de nucléotide n'est pas associé à un changement d'acide aminé.

Parmi les différents génotypes de virus BK décrits, il n'a pas été observé pour l'instant de lien entre la survenue d'une néphropathie à virus BK et un génotype ou une souche virale

particulière. Le polymorphisme de VP1 influence la croissance du virus en culture et son aptitude à induire un effet cytopathogène. Il serait intéressant d'identifier les séquences primordiales pour la croissance et la pathogénèse, ce qui pourrait faciliter le développement de nouvelles options thérapeutiques [Tremolada *et al.*, 2010]. [Jin *et al.*, 1993 - Baksh *et al.*, 2001 - Nishimoto *et al.*, 2006 - Sharma *et al.*, 2006 - Dugan *et al.*, 2007 - Zheng *et al.*, 2007 - Bohl *et al.*, 2008 - Krumbholz *et al.*, 2008 - Luo *et al.*, 2009 - Zhong *et al.*, 2009]

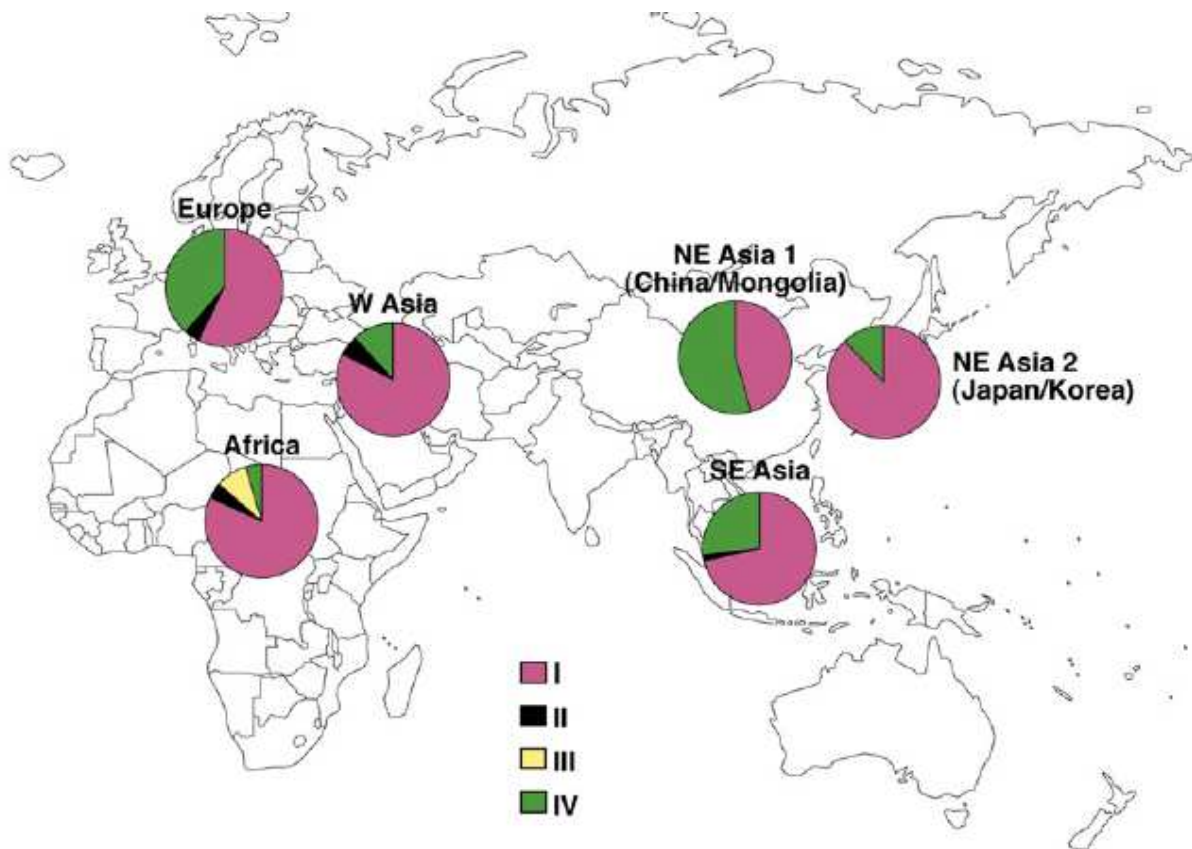


Figure 7 : Distribution des sous-types de virus BK dans le monde

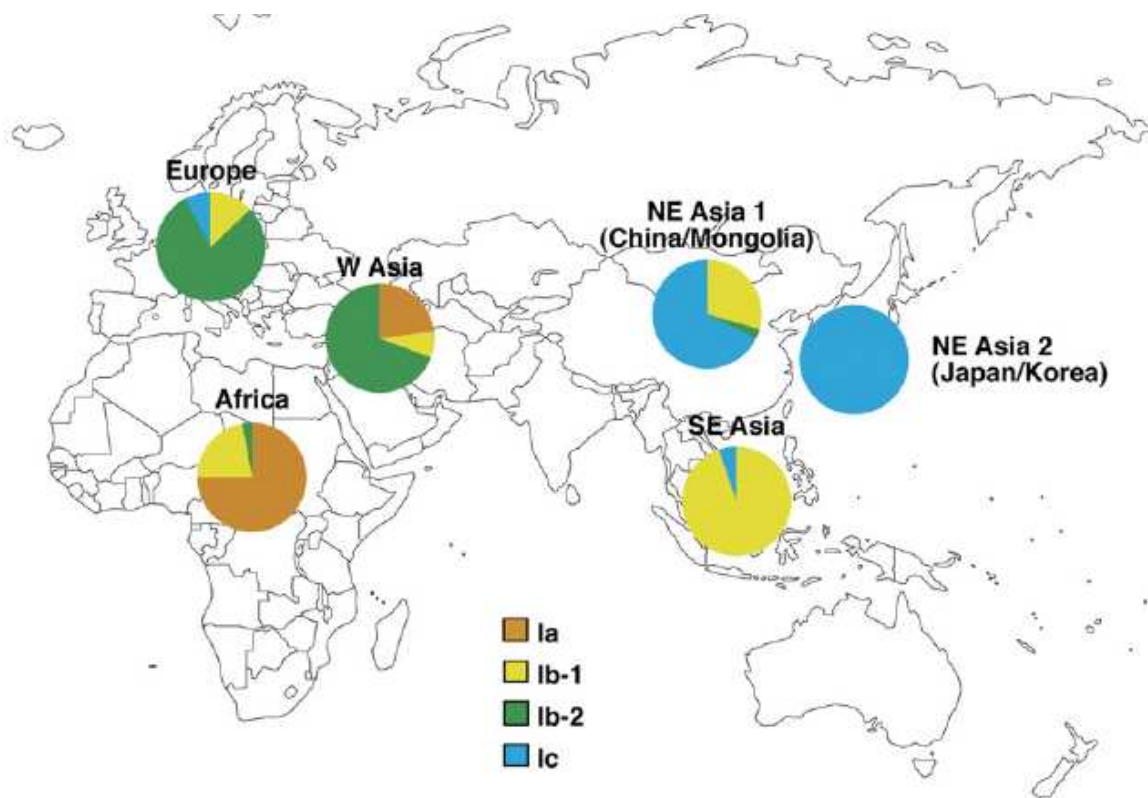


Figure 8 : Distribution des sous-groupes du sous-type I dans le monde

D'après [Zheng *et al.*, 2007]

3. Mode de transmission

Le mode de transmission le plus fréquent et le plus probable du virus BK est une contamination interhumaine par voie respiratoire. L'homme est le seul hôte pour le virus BK. Il n'y a pas de réservoir animal connu [Hirsch *et al.*, 2003].

Ainsi, le mode de transmission le plus fréquemment proposé par les différents auteurs implique les voies respiratoires hautes, ce qui permet d'expliquer la séroprévalence élevée dès le plus jeune âge [Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Leung *et al.*, 2005]. En effet, le virus BK a été retrouvé dans des aspirations naso-pharyngées d'enfants ayant des infections respiratoires [Goudsmit *et al.*, 1982].

La mise en évidence du virus dans d'autres liquides biologiques, en particulier les urines, le liquide séminal et le sang, laisse envisager l'hypothèse d'une transmission par ces voies [Reploeg *et al.*, 2001]. Mais ces modes de transmission restent peu probables et rares. Par ailleurs, l'ADN du virus BK est aussi trouvé dans les leucocytes du sang circulant, ce qui évoque la possibilité que le virus puisse être transmis par les produits de transfusion et les

cellules souches hématopoïétiques, hypothèse encore largement débattue à l'heure actuelle [Chatterjee *et al.*, 2000 – Mannon *et al.*, 2005].

Une possibilité de transmission par voie sexuelle a été évoquée. Néanmoins, l'âge de primo-infection étant antérieur à l'âge de début de l'activité sexuelle, ce mode de transmission paraît peu plausible [Monini *et al.*, 1996].

La transmission par voie transplacentaire a également été suggérée, même si ce mode de transmission semble exceptionnel. L'ADN du virus BK a été recherché dans des tissus fœtaux et maternels pour des fœtus avortés. Les séquences présentent de fortes homologies, ce qui laisse envisager la possibilité d'une transmission verticale, de la mère à l'enfant. Le virus BK serait capable, via le placenta, d'établir des sites de latence chez le fœtus [Boldorini *et al.*, 2010].

La possibilité d'une transmission oro fécale a été également proposée [Knowles *et al.*, 2006]. [Pietropaolo *et al.*, 1998 - Reploeg *et al.*, 2001 - Hirsch *et al.*, 2003 - Huraux *et al.*, 2003 - Randhawa *et al.*, 2006]

E. Physiopathologie de l'infection par le virus BK

1. Chez l'immunocompétent

La primo-infection à virus BK est dans la grande majorité des cas asymptomatique. Elle survient après pénétration du virus au niveau des voies respiratoires, où il peut se multiplier dans les amygdales. Les rares symptômes ayant été associés à ce virus sont de la fièvre et des signes respiratoires hauts non spécifiques [Huraux *et al.*, 2003 - Jiang *et al.*, 2009].

Par la suite, le virus se dirige par voie hématogène vers les organes cibles : le rein, le tractus urinaire [Heritage *et al.*, 1981]. Le site majeur de la persistance virale est l'épithélium du rein (épithéliums de transition, des tubules rénaux, de la capsule de Bowman) et du tractus urinaire. Le génome viral y serait alors sous forme épisomale [Corneille *et al.*, 2011]. La présence de l'ADN du virus BK a également été détectée dans d'autres organes (foie, estomac, poumons, glandes parathyroïdes, nodules lymphoïdes), et en particulier dans le cerveau et les cellules mononuclées sanguines. L'observation d'épisodes d'excrétion virale urinaire, y compris chez les sujets immunocompétents, démontre la capacité de ce virus à se réactiver périodiquement.

Des cas possibles d'infection par le virus BK ont été décrits devant des cystites associées ou non à une hématurie et des syndromes néphrotiques [Corneille *et al.*, 2011]. Le virus BK a également été détecté chez des enfants souffrant d'encéphalite [Behzad-Behbahani *et al.*, 2003].

Les données concernant la réponse immune sont, elles aussi, très limitées. Il a été proposé que l'immunité humorale soit prédominante dans les suites de l'infection aiguë. Les anticorps dirigés contre VP1 sont neutralisants et inhibent l'hémagglutination. À l'inverse, et en raison de l'observation de réactivations virales plus fréquentes chez les sujets présentant un déficit de l'immunité cellulaire, il est probable que la réponse T soit responsable du contrôle de l'infection [Hirsch *et al.*, 2005]. La réactivation du virus chez l'immunocompétent ne s'accompagne d'aucune manifestation clinique majeure malgré la présence du virus BK dans les urines.

La réponse immunitaire innée et acquise vis-à-vis du virus BK a été peu étudiée. La réponse humorale consiste en la production d'immunoglobulines G, d'immunoglobulines M, d'immunoglobulines A incluant des anticorps neutralisants et spécifiques des sous-types dirigés contre les déterminants de la protéine majeure de capsid VP1.

L'immunité humorale et cellulaire expliquerait le statut inflammatoire des sites de réactivation du virus BK avec afflux de polynucléaires neutrophiles, de cellules NK, de lymphocytes T [Hirsch *et al.*, 2003].

Les viruries sont asymptomatiques et peuvent avoir lieu dans la population générale dans 0,3 à six pour cent des cas, chez les femmes enceintes, les personnes âgées, en cas de lupus, de diabète compliqué, de lymphomes, de chimiothérapie, ou de déficience immunitaire [Gardner *et al.*, 1984 - De Mattei *et al.*, 1995 - Hedquist *et al.*, 1999 - Lafon *et al.*, 1998 - Reploeg *et al.*, 2001 - Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Jiang *et al.*, 2009].

2. Chez l'immunodéprimé

La réactivation du virus BK peut survenir dans certaines circonstances, le plus souvent dans un contexte d'immunosuppression souvent cellulaire. Le virus BK est un virus opportuniste qui affecte le greffé médullaire et le transplanté rénal ; il occasionne de graves pathologies rénales décrites ci-dessous. Etant donné les données séro-épidémiologiques du virus BK, ces manifestations cliniques seraient plutôt dues à une réactivation virale qu'à une nouvelle infection.

Les viruries symptomatiques sont présentes en transplantation rénale et en greffe de moelle osseuse et associées à une expression clinique de type cystite hémorragique, sténose urétérale, néphrite interstitielle.

Au stade SIDA, il peut y avoir des pneumopathies interstitielles à virus BK.

a) Chez le transplanté rénal

- Pathologie

La néphropathie à virus BK observée chez les receveurs de greffon rénal est due à la multiplication intense du virus dans les cellules de l'épithélium tubulaire rénal. Elle peut survenir dans des délais variables suivant la transplantation.

- 10 à 60 % des patients transplantés rénaux peuvent avoir une réactivation du virus BK, associée ou non à une dysfonction rénale [Randhawa *et al.*, 2000].
- Les néphropathies à virus BK sont décrites chez un à dix pour cent des transplantations rénales [Hirsch *et al.*, 2003].
- La perte de greffon survient dans plus de 50 % des cas dans les publications initiales [Randhawa *et al.*, 1999 - Ramos *et al.*, 2002].

Ci-après (figure 9, page 20) sont décrits les facteurs évoqués dans la transformation d'une virémie vers une néphropathie à virus BK. Les patients les plus touchés seraient essentiellement de sexe masculin, d'un certain âge. Des facteurs de risque sont inhérents à la transplantation proprement dite avec la durée d'ischémie froide, les mismatch HLA ; d'autres seraient liés au virus BK qui a un tropisme rénal marqué. Cette transformation a lieu dans des contextes particuliers d'immunosuppression et de fragilité (infection, inflammation, immunité humorale)... Le reflux vésico-urétéral, quasi inéluctable en transplantation rénale, aurait un rôle avec le passage systémique au niveau des capillaires péri tubulaires du virus BK.

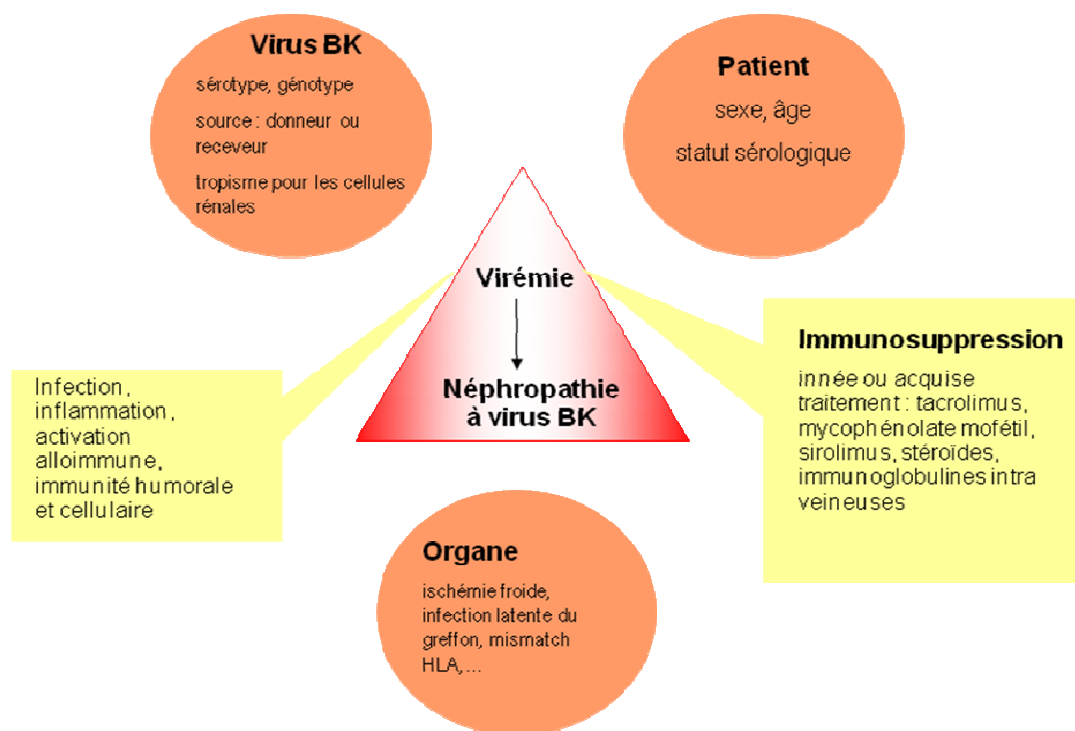


Figure 9 : Déterminants (cercles) et modulateurs dans l'apparition d'une néphropathie consécutive à une virémie à virus BK

D'après [Hirsch *et al.*, 2003 - Hariharan *et al.*, 2006]

La caractéristique la plus frappante de l'infection à virus BK chez les transplantés rénaux est l'absence de fièvre, associée à des myalgies, malaises, leucopénies, anémie, thrombopénie, ou de tout autre symptôme comme pour une infection virale quelconque malgré des charges virales élevées.

Chez les transplantés rénaux, les manifestations cliniques varient d'une virurie asymptomatique à une néphrite avec dysfonction rénale. Le virus BK peut engendrer des hématuries asymptomatiques, des cystites hémorragiques, des sténoses urétérales et des néphrites tubulo-interstitielles. Ces complications résulteraient des effets combinés sur la muqueuse vésicale de la virurie à virus BK et des molécules immunosuppressives utilisées. Récemment, plusieurs observations font état de néphrite tubulo-interstitielle entraînant la perte du greffon rénal associée à la présence de cellules urinaires infectées par le virus BK (« *decoy cells* »). Les « *decoy cells* » sont décrites dans la partie diagnostic ; il s'agit du nom anglais des cellules rénales infectées par le virus BK.

- Origine des pathologies rénales

Tout d'abord, les lésions de l'uro épithélium créent un environnement favorable à la réplication du virus BK (l'immunosuppression favoriserait la réactivation du virus latent et créerait un environnement favorable à la multiplication virale) [Leung *et al.*, 2005]. La réplication du virus BK, non contrôlée en l'absence d'immunité fonctionnelle, conduit aux lésions cytologiques, sous la forme d'excrétion urinaire de « *decoy cells* » et d'hématurie. En post transplantation, le retour d'immunité ou la constitution d'immunité contre le virus BK peut générer des lésions secondaires dans la muqueuse et des hémorragies [Leung *et al.*, 2005] (figure 10).

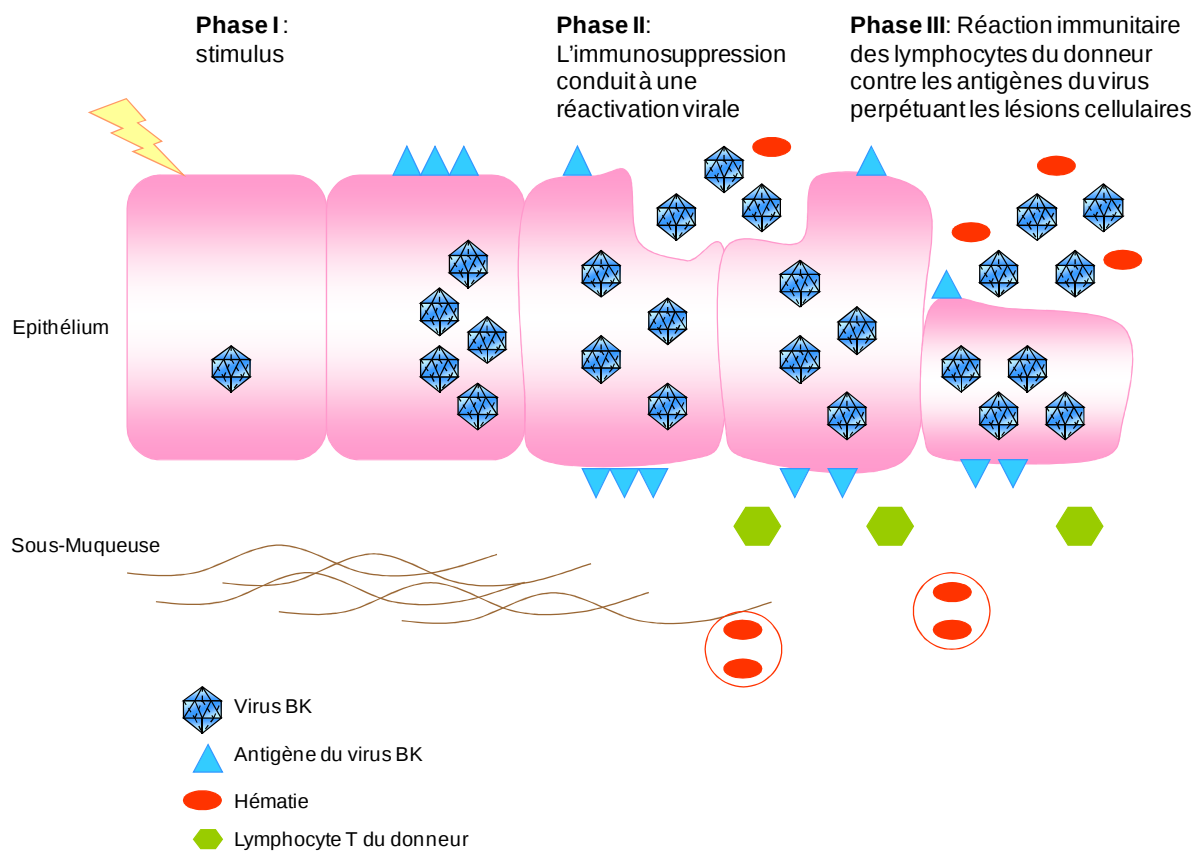


Figure 10 : Modèle proposé de survenue d'une cystite hémorragique

D'après [Leung *et al.*, 2005]

Les lymphocytes T ont un rôle primordial dans l'immunité virale. Il est envisageable que le manque de réponse immune cellulaire face à une charge virale élevée puisse déterminer la survenue d'une néphropathie. Ce déficit de réponse immunitaire cellulaire est observé en cas d'excès de traitement immunosuppresseur. Avant le milieu des années 1990, le virus BK

n'était que rarement impliqué en pathologie chez les transplantés rénaux. A partir de cette période, le mycophénolate mofétil et la tacrolimus ont été introduits comme agents immunosuppresseurs.

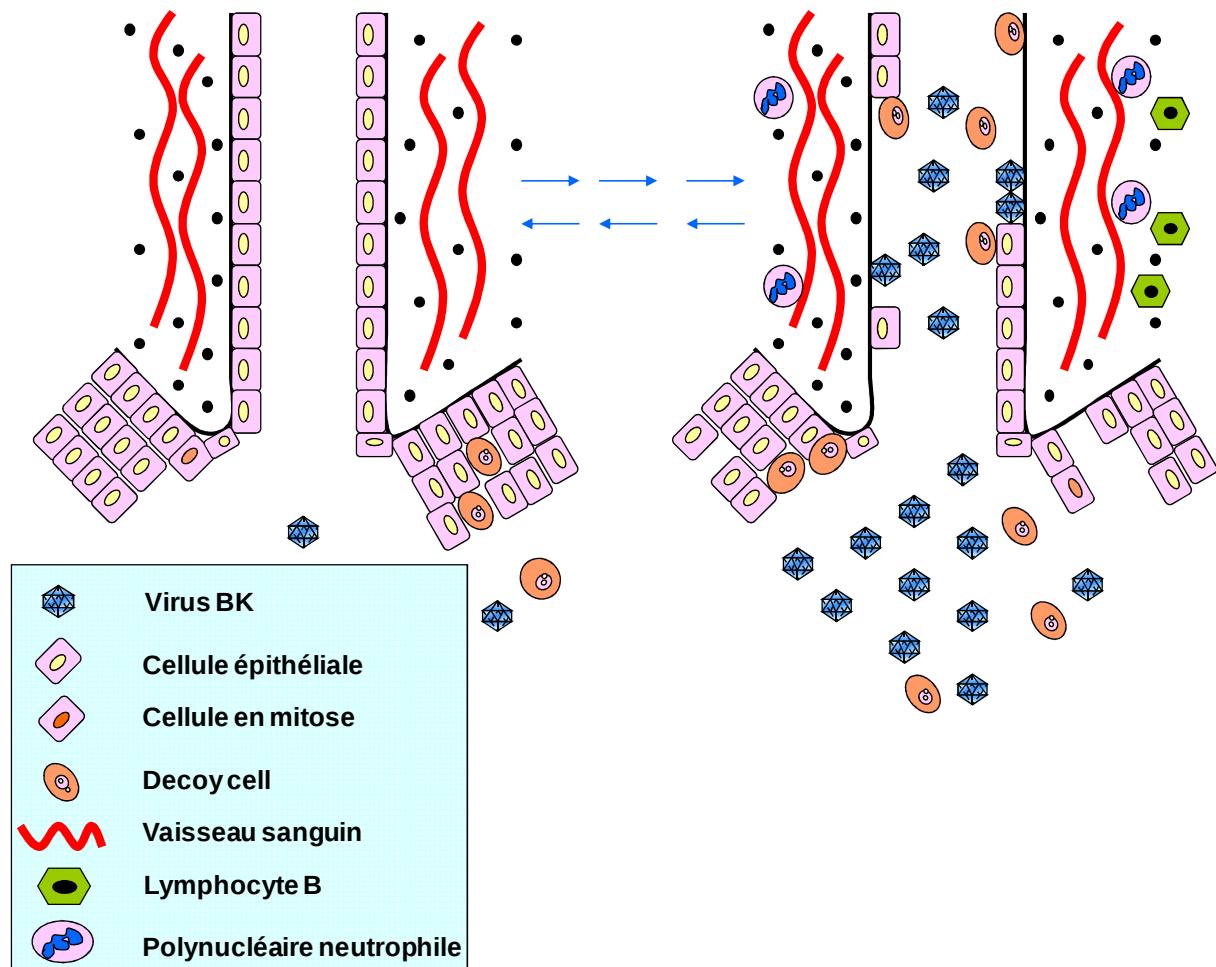


Figure 11 : Mécanisme des lésions associées au virus BK au niveau tubulaire rénal

D'après [Hirsch *et al.*, 2002]

L'évolution de ces néphropathies est catastrophique : l'effet cytopathogène persiste dans 70 % des cas, le greffon est perdu dans 45 % des cas, et même en cas de contrôle de la virémie, une fibrose séquellaire majeure se développe dans 75 % des cas [Randhawa *et al.*, 2000].

Les lésions du virus BK au niveau tubulaire rénal aboutissent à des lésions des cellules de l'épithélium tubulaire rénal et sécrétion de « *decoy cells* » dans les urines (figure 11) [Hirsch *et al.*, 2002].

L'échec d'éradication du virus BK conduit à une aggravation de la fonction rénale. Etant donné que les signes histologiques et la disparition des « *decoy cells* » précèdent la disparition du virus BK du sang, un monitoring par biologie moléculaire pourrait être intéressant jusqu'à ce que l'excrétion du virus soit indétectable ou en-dessous du seuil associé à une néphropathie [Bohl *et al.*, 2007].

b) Chez le greffé médullaire

Chez le greffé médullaire, les manifestations cliniques du virus BK sont à type de cystites. Mais les cystites peuvent avoir diverses étiologies chez le greffé médullaire. Elles peuvent soit survenir avant la greffe (ce sont des cystites transitoires essentiellement liées à la chimiothérapie), soit en période post greffe (ce sont des cystites qui peuvent survenir dans le mois qui suit la sortie d'aplasie sous la dépendance de différents facteurs : l'irradiation, la réaction immunitaire, l'action de différents virus (virus BK, cytomégalovirus, adénovirus), l'intensité de la réaction du greffon contre l'hôte, l'intensité de l'irradiation corporelle).

La cystite hémorragique a une incidence de 10 % en greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les facteurs de causalité sont les procédures de conditionnement comme les oxaphosphorines (cyclophosphamide, ifosfamide), le busulphan, l'étoposide à forte dose et sont également liés à des facteurs propres à la transplantation de cellules souches (les effets urotoxiques du conditionnement, la réactivation virale à virus BK, cytomégalovirus ou adénovirus, les manifestations de rejet du greffon contre l'hôte). Une cystite hémorragique associée au cyclophosphamide peut être distinguée d'une cystite hémorragique due au virus BK par des différences cliniques. La cystite hémorragique liée à l'acroléine, le métabolite urotoxique du cyclophosphamide, a un début précoce (moins d'une semaine après la transplantation) et une durée courte (moins d'une semaine). Au contraire, la cystite hémorragique associée au virus BK débute au moins dix jours (deux à huit semaines) après la transplantation, dure plus longtemps (plus d'une semaine) et est associée à une virurie. Il s'agit d'épisodes tardifs et prolongés [Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Hirsch *et al.*, 2003 - Leung *et al.*, 2005].

Il a été proposé des grades pour la cystite hémorragique à savoir le grade 1 pour une hématurie microscopique, le grade 2 pour une hématurie macroscopique, le grade 3 pour une hématurie macroscopique avec petits caillots et le grade 4 pour une importante hématurie avec

des caillots causant une obstruction du tractus urinaire nécessitant un geste instrumental pour ôter le caillot.

La clinique de la cystite hémorragique est un besoin d'uriner fréquent et urgent dû à une inflammation de la muqueuse. Une douleur au-dessus du pubis et des spasmes peuvent être présents. Le lien entre le virus BK et les cystites hémorragiques a été évoqué dès 1976 quand des particules ressemblant à des *papovavirus* ont été retrouvées dans les urines.

La cause exacte de l'augmentation de la prévalence des néphrites à virus BK reste inconnue de façon précise mais est corrélée avec l'utilisation de puissants traitements immunosuppresseurs et la diminution des rejets aigus ces dernières années [De Mattei *et al.*, 1995 - Hedquist *et al.*, 1999 - Lafon *et al.*, 1998 - Reploeg *et al.*, 2001 - Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Jiang *et al.*, 2009 - Corneille *et al.*, 2011].

c) Autres transplantations

Dans les autres transplantations, les néphropathies associées au virus BK sont rares bien que le traitement immunosuppresseur fragilise l'immunité cellulaire des patients [Corneille *et al.*, 2011]. Cependant, une nouvelle infection exogène peut être à l'origine de ces pathologies rénales chez les immunodéprimés.

3. Virus BK et néoplasie

Les capacités transformantes des *Polyomaviridae in vitro* et le développement possible de néoplasies chez les rongeurs sont connues depuis longtemps. Or, bien que l'ADN du virus BK ait pu être mis en évidence par hybridation *in situ* dans plusieurs types histologiques de tumeurs cérébrales (épendymome, méningiome, glioblastome, neuroblastome, oligodendrogliome...), ainsi qu'occasionnellement dans d'autres tissus (adénome hypophysaire, tumeur pancréatique, sarcomes, carcinome rénal ou urinaire), il n'existe aucune preuve de la responsabilité directe du virus BK dans le développement de ces processus tumoraux [De Mattei *et al.*, 1995 - Hedquist *et al.*, 1999 - Lafon *et al.*, 1998 - Reploeg *et al.*, 2001 - Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Jiang *et al.*, 2009]. A ce jour, il n'y a pas de relation clairement établie entre le virus BK et le développement de tumeurs [Jiang *et al.*, 2009].

Les conséquences de l'interaction entre le virus et la cellule hôte dépendent en premier lieu de l'espèce dont est issue la cellule infectée. Pour les cellules appartenant à l'hôte naturel du virus, à savoir l'homme, l'infection aboutit à la lyse des cellules permissives, associée à la survenue d'un effet cytopathogène. Dans les cellules non permissives, l'infection est abortive et s'arrête au stade de synthèse des antigènes précoces ; la réplication du génome viral est alors bloquée et l'interaction virus/cellule est généralement sans conséquence ultérieure pour la cellule. Dans de rares cas d'essais *in vitro*, il a été montré des altérations morphologiques, une augmentation de la durée de vie et l'apparition d'anomalies chromosomiques. Cependant, les cellules transformées ne présentent pas toutes les caractéristiques des cellules tumorales.

Dans les cellules non humaines, l'interaction est limitée à une infection abortive qui peut aboutir à la transformation cellulaire. Les virions entiers, l'ADN complet ou les fragments génomiques codant pour les antigènes précoces du virus BK sont ainsi capables de transformer *in vitro* des fibroblastes embryonnaires ou des cellules rénales ou cérébrales de rongeurs, de lapin ou de singe. L'ADN viral est soit intégré au génome cellulaire, soit présent sous forme épisomale [Reploeg *et al.*, 2001].

Les mécanismes de l'oncogenèse ont surtout été étudiés pour le SV40, impliquant l'interaction de l'antigène T, synthétisé en excès au cours des infections abortives, avec les protéines p53 et pRb. Dans le cas du virus BK, seule l'interaction avec pRb a été mise en évidence, à un niveau plus faible que pour le SV40. La région précoce du génome du virus BK code en effet deux oncoprotéines virales : l'antigène T et l'antigène t. L'antigène T assure de nombreuses fonctions qui altèrent le métabolisme normal physiologique des cellules, ce qui conduit à une immortalisation et à une transformation néoplasique. Il n'y a pas de preuve formelle que le *polyomavirus* BK joue un rôle direct dans les cancers humains mais il agirait plutôt comme cofacteur dans la pathogenèse de certains cancers.

Enfin, la forte prévalence des infections par le virus BK suggère que le virus BK n'est pas suffisant pour générer des transformations malignes chez le sujet immunocompétent et même chez les patients au statut immunologique compromis ; des facteurs additionnels et/ou des altérations génétiques seraient requis [Harris *et al.*, 1998 - Hirsch *et al.*, 2003 - Fioriti *et al.*, 2005 - Jiang *et al.*, 2009].

F. Le diagnostic d'une infection par le virus BK et la surveillance

Le diagnostic biologique des infections à virus BK était, jusqu'à ces dernières années, peu fréquemment effectué en pratique de routine. L'avènement de techniques rapides de biologie moléculaire et l'observation d'un accroissement de la fréquence des infections en transplantation rénale expliquent un regain actuel d'intérêt pour ce virus. Bohl *et al.* (figure 12), rapportent que le virus BK est présent dans les urines pour 30 à 40 % des patients transplantés rénaux, avec mise en évidence de « *decoy cells* » pour 20 à 30 % d'entre eux et présence du virus au niveau sanguin dans 10 à 20 % des cas. La néphropathie est décrite comme survenant chez 10 % d'entre eux [Bohl *et al.*, 2007].

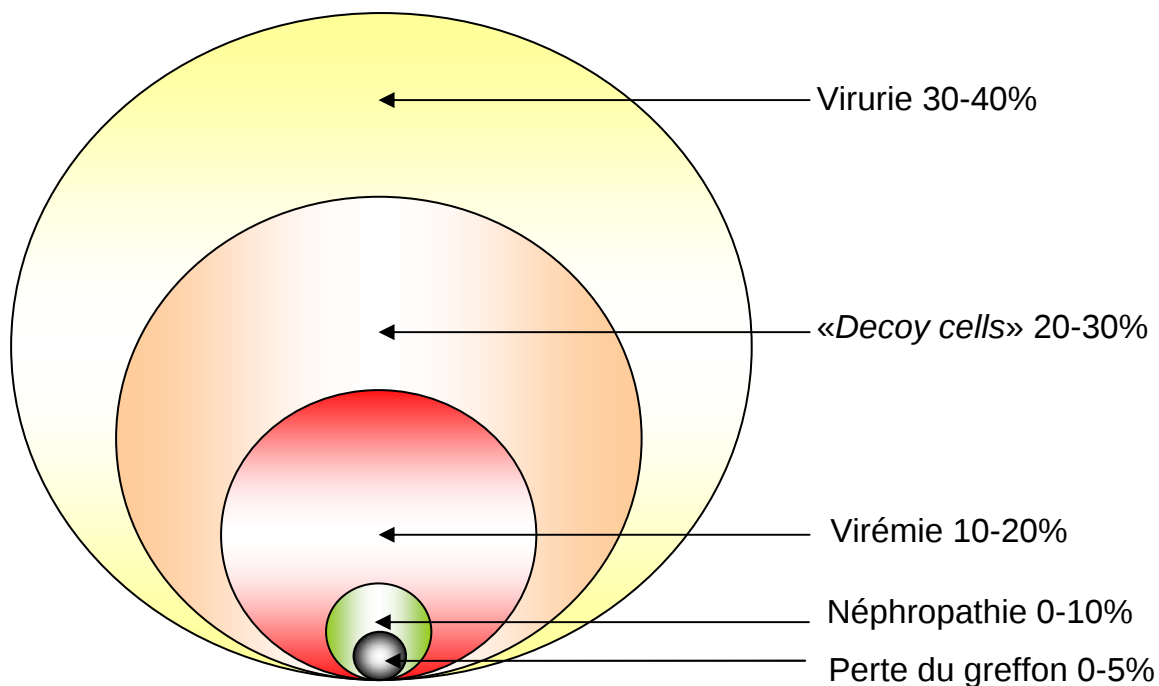


Figure 12 : Type et prévalence des infections à virus BK chez les transplantés rénaux

D'après [Bohl *et al.*, 2007]

1. Clinique

L'excrétion urinaire du virus BK chez les sujets immunocompétents peut être associée à des symptômes au niveau du tractus urinaire. Cependant, le virus n'est en général pas

détecté dans les urines. Selon Jiang *et al.*, 5 % des sujets immunocompétents ont une virurie à virus BK [Jiang *et al.*, 2009].

En revanche, l'excrétion urinaire du virus est présente chez les patients sous traitement immunosuppresseur comme les transplantés rénaux, les greffés de moelle, tout comme les patients cancéreux ou souffrant de maladies auto-immunes.

La virurie à virus BK peut aussi être notée chez les femmes enceintes, le pourcentage d'excrétion augmentant avec l'avancée du terme de la grossesse. Une primo-infection d'une femme enceinte par le virus BK peut entraîner une contamination fœtale ; le virus BK a été retrouvé dans des organes (rein, cerveau) de fœtus avortés et dans le tissu placentaire de grossesses qui se sont déroulées sans anomalies. Les variations physiologiques de la réponse immunitaire peuvent être associées à une excrétion de virus (diminution de la réponse immunitaire avec l'âge), comme c'est le cas chez les personnes de plus de soixante ans, sans pour autant que cette excrétion soit associée à une signification clinique [Andrews *et al.*, 1983 - Huraux *et al.*, 2003 - Drachenberg *et al.*, 2006 - Knowles *et al.*, 2006].

En raison de l'absence de symptôme clinique spécifique, le diagnostic de néphropathie à virus BK nécessite dans tous les cas une confirmation histologique. La persistance de la néphropathie est associée à une dysfonction du greffon dans 10 à 100 % des cas [Coleman *et al.*, 1973 - Hirsch *et al.*, 2002 - Mammette *et al.*, 2002 – Huraux *et al.*, 2003 - Drachenberg *et al.*, 2005 - Leung *et al.*, 2005 - Randhawa *et al.*, 2006 - Dropulic *et al.*, 2008].

2. Cytologie urinaire

Les signes typiques d'une néphropathie à *polyomavirus* consistent en l'apparition d'inclusions nucléaires dans les cellules tubulaires épithéliales, souvent sous la forme de granulations basophiles ou éosinophiles. Les changements cytopathogènes associent un élargissement du noyau à contour irrégulier et une chromatine d'aspect sali. Les cellules tubulaires épithéliales altérées se détachent dans la lumière des tubules, la membrane basale se retrouvant ainsi dénudée. Un infiltrat inflammatoire de lymphocytes, neutrophiles et monocytes est présent dans les néphropathies persistantes à virus BK associé à la fibrose.

Les lésions tubulaires associées au virus ont une conséquence clinique pour les raisons suivantes :

- les cellules infectées sont éliminées dans les urines ce qui les rend détectables à la cytologie urinaire (« *decoy cells* ») ou par biologie moléculaire

- les lésions plus importantes conduisent à une rupture des membranes basales ce qui conduit à une dissémination du virus au niveau sanguin et génère une virémie
- la réaction inflammatoire consécutive à l'infection est sévère et peut être confondue avec un rejet aigu
- les lésions tubulaires peuvent conduire à des changements irréversibles (fibrose interstitielle ou atrophie tubulaire).

3. Virologie

a) Diagnostic indirect

En l'absence de techniques commercialisées, la détection des anticorps est réalisée par des techniques « maison », fondées sur l'inhibition de l'héماغglutination ou technique de dosage immunoenzymatique. En raison de la séroprévalence élevée (90 % pour Randhawa *et al.*) des anticorps anti-*polyomavirus* et de la réponse immunitaire perturbée chez les malades transplantés, les sérologies sont d'application limitée. Ainsi, le diagnostic sérologique ne présente, en dehors des études épidémiologiques, que peu d'intérêt [Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Randhawa *et al.*, 2006].

b) Diagnostic direct

(1) La microscopie électronique

Technique historique pour la détection des *Polyomavirus*, la microscopie électronique n'est actuellement plus utilisée en routine.

Les *Polyomavirus* sont caractérisés par le diamètre de leur capsid. Lorsque les virus sont extracellulaires sous forme libre, l'utilisation conjointe d'anticorps spécifiques, en agrégeant les virus, augmente la sensibilité de cette technique et identifie les virus visualisés. La microscopie électronique (figure 13, page 29) a longtemps été utilisée pour la mise en évidence des *Polyomavirus* sur des coupes de biopsie ou dans les urines. Elle montre de petits virus de 40 à 50 nm de diamètre, monomorphes, intranucléaires, intra cytoplasmiques et extracellulaires, en petits groupes, parfois d'aspect granuleux, pseudo cristalloïde [Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003].

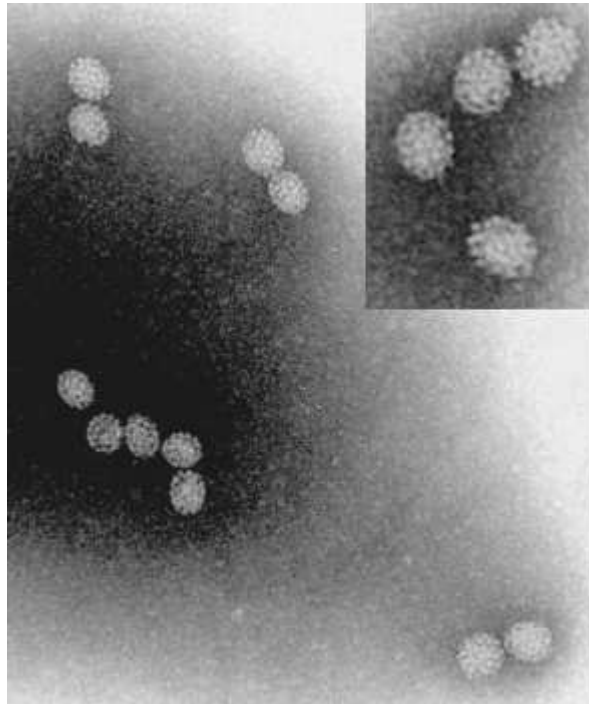


Figure 13 : Virus BK dans l'urine par microscopie électronique (x152 000 et 280 000)

D'après [Hirsch *et al.*, 2003]

(2) Isolement du virus – Culture cellulaire

L'isolement du virus en culture cellulaire peut s'observer avec apparition d'un effet cytopathogène. Celui-ci d'apparition lente, de quelques semaines à un mois est souvent inconstant et d'interprétation délicate.

Les antigènes précoces sont détectés dès la vingt quatrième heure, mais les virions infectieux ne sont mis en évidence que beaucoup plus tardivement. L'effet cytopathogène apparaît en général au bout de deux à trois semaines (figures 14 et 15, page 30). Il est caractérisé par la présence de cellules arrondies, translucides en microscopie à contraste de phase, contenant des vacuoles intra cytoplasmiques et se détachant de la couche cellulaire adhérente après élongation du cytoplasme. La multiplication virale est possible sur cellules fibroblastiques humaines ou sur cellules rénales humaines [Gardner *et al.*, 1971 - Coleman *et al.*, 1973 - Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003]. Son intérêt est limité en routine.

Cette technique présente l'avantage de visualiser un effet cytopathogène mais les inconvénients sont nombreux (nécessité d'avoir des cellules en culture, lecture régulière des cultures, manque de sensibilité de cette technique, délai long, contamination bactérienne des cultures possible).



Figure 14 : Effet cytopathogène du virus BK sur des cellules embryonnaires de rein

Les cellules sont élargies, avec un noyau pycnotique et une elongation du cytoplasme. D'après [Major *et al.*, 2001 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003]

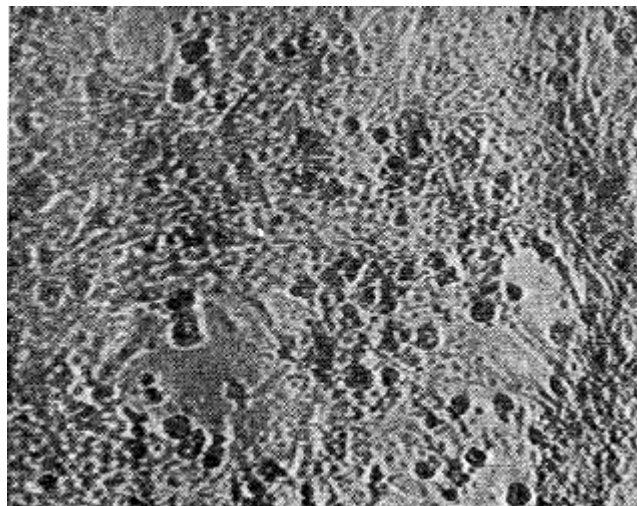


Figure 15 : Effet cytopathogène du virus BK

D'après [Gardner *et al.*, 1971], l'effet cytopathogène observé consiste en un noircissement du cytoplasme et une apparence granulaire des cellules de la monocouche du tapis cellulaire. L'effet cytopathogène est complet avant le délai de 28 jours.

(3) Cytodiagnostic

Les cellules urinaires infectées par le virus BK, appelées « *decoy cells* » en anglais, sont les témoins de l'effet cytopathogène du virus (figures 16 à 18, pages 31 à 33). Ce sont des marqueurs d'activation et de réplication virale qui aboutissent à des modifications morphologiques des cellules urothéliales et rénales. « Decoy » signifie leurre, piège. Les « *decoy cells* » sont des cellules au noyau volumineux, hyperchromiques, homogènes avec un aspect dit en verre dépoli lié à la présence d'inclusions virales nucléaires. Les inclusions virales sont centro-nucléaires. La chromatine a un aspect laqué. Les « *decoy cells* » sont révélées par la coloration de Papanicolaou sur les urines. C'est une méthode sensible (100 %) et spécifique (71 %). La valeur prédictive négative pour la néphropathie à virus BK est de 100 % et la valeur prédictive positive est de 29 % [Hirsch *et al.*, 2002].

La mise en évidence des « *decoy cells* » dans les urines est réalisable rapidement avec un coût peu onéreux. Cependant, sont mises en évidence des cellules augmentées de volume avec inclusions intranucléaires très basophiles, modifications inconstantes et non spécifiques. Seul l'immunomarquage des cellules infectées par des anticorps mono spécifiques permet une identification précise [Nickeleit *et al.*, 1999 - Nickeleit *et al.*, 2000 - Hirsch *et al.*, 2002 - Mammette *et al.*, 2002 - Drachenberg *et al.*, 2005 - Boutonnat *et al.*, 2009 - Thoulouzan *et al.*, 2010].

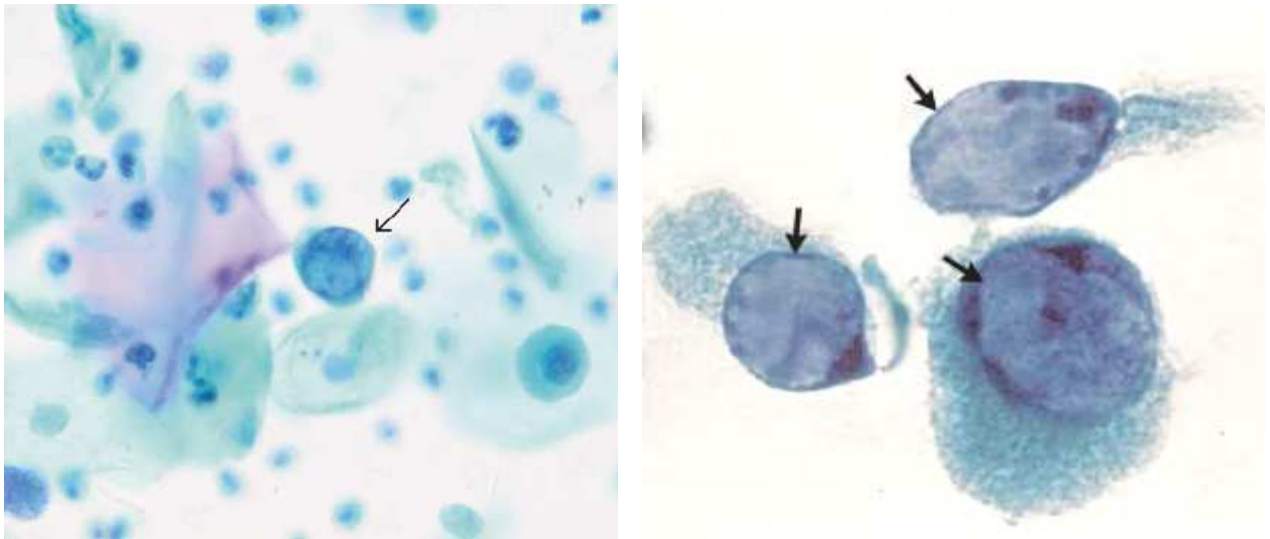


Figure 16 : «*Decoy cells*» (Coloration de Papanicolaou, x60 et x400)

D'après [Nickeleit *et al.*, 2000 - Dropulic *et al.*, 2008]

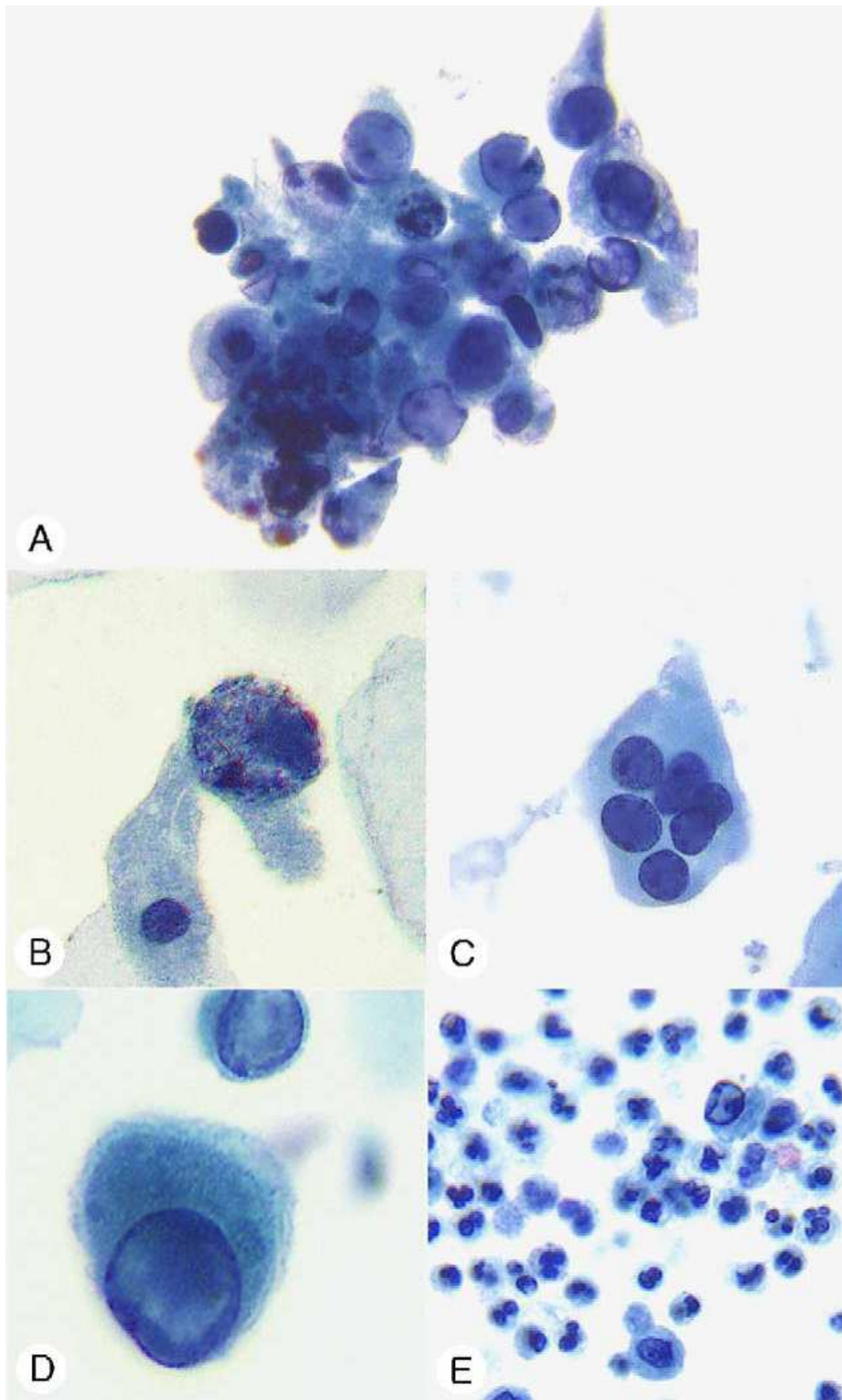


Figure 17 : «Decoy cells»

D'après [Drachenberg *et al.*, 2005] A : «*Decoy cells*» de différentes tailles dans des cellules au degré de préservation variable. B : Noyau augmenté de taille de «*Decoy cell*» avec des changements dégénératifs. C : «*Decoy cell*» avec plusieurs noyaux. D : «*Decoy cell*» typique avec inclusion intranucléaire basophile. E : Modifications aspécifiques dégénératives des cellules épithéliales fréquentes en cas d'inflammation aiguë.

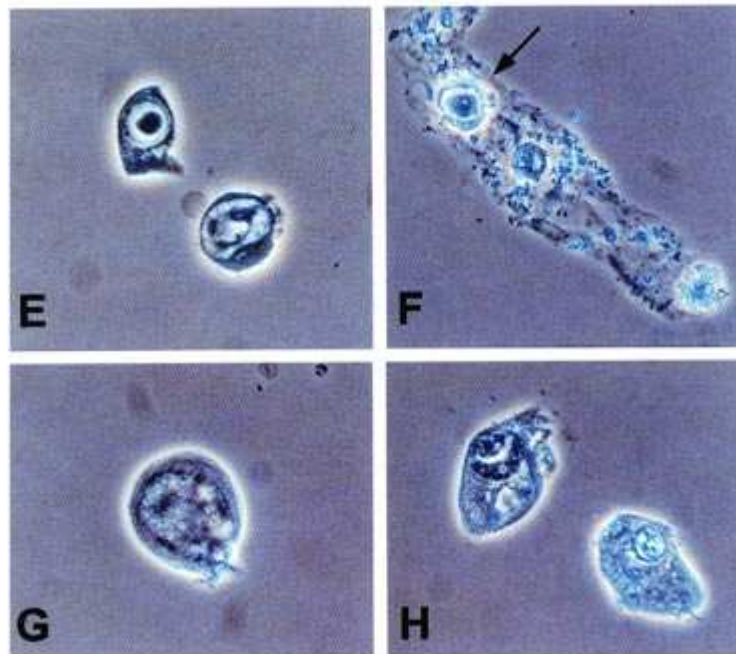


Figure 18 : «*Decoy cells*» en contraste de phase

D'après [Mackenzie *et al.*, 1978 - Hirsch *et al.*, 2002 - Drachenberg *et al.*, 2004 - Hirsch *et al.*, 2009]

(4) Diagnostic histologique

Le diagnostic de néphropathie associée au virus BK repose actuellement sur la ponction biopsie rénale qui est la technique de référence. Les signes sont ceux d'une néphrite tubulo-interstitielle, où les modifications histologiques observées associent :

- des signes d'inflammation interstitielle ou tubulite,
- un infiltrat cellulaire réparti de façon focale autour des tubules,
- des altérations de l'épithélium tubulaire à type de nécrose focale pouvant mettre à nu les membranes basales,
- et surtout la présence d'inclusions intranucléaires évocatrices, dont le type le plus fréquent donne un aspect en verre dépoli (figures 19 et 20, pages 35 et 36)

Le marquage immuno histochimique ou l'hybridation *in situ* dirigés contre un antigène précoce ou une protéine de capsid confirment le diagnostic et éliminent les fréquentes sources d'erreurs (infection à cytomégalo virus, rejet) (figure 21, page 37).

Les changements pathologiques consécutifs à l'infection sont hétérogènes et dus à la distribution multifocale des lésions au cours de l'infection. Les lésions se caractérisent par la présence d'inclusions intranucléaires associées à une tubulite avec nécrose tubulaire et infiltrat interstitiel lympho-plasmocytaire avec des polynucléaires.

Les lésions précoces de la néphropathie sont caractérisées par un parenchyme normal ou légèrement anormal avec des cellules montrant des lésions focalisées. De par la nature focale de cette néphropathie, il peut y avoir de larges zones saines entre les foyers infectés, ce qui peut conduire à un résultat de biopsie faussement négatif.

Au contraire, les lésions tardives de néphropathie surviennent dans un contexte de lésions chroniques au niveau du parenchyme rénal avec atrophie tubulaire, fibrose interstitielle et inflammation chronique. Les effets cytopathogènes typiques du virus BK sont plus difficiles à observer à un stade avancé du fait de l'état atrophique des tubules. La progression de la néphropathie est liée à un élargissement des sites infectés qui peuvent devenir confluent.

A cause de la nature focale de la biopsie et de la possibilité d'erreur d'échantillonnage de 10 à 30 %, le résultat négatif d'une biopsie ne peut exclure totalement le diagnostic de néphropathie à virus BK. En cas de forte suspicion (par exemple virémie persistante et première biopsie négative), la plupart des centres recommandent une nouvelle biopsie.

Il est possible de coupler l'analyse histologique à une analyse par immunohistochimie, les anticorps dirigés contre l'antigène T du virus simien SV40 sont les plus utilisés mais il existe aussi des anticorps dirigés contre VP1 ou l'agnoprotéine [Nickeleit *et al.*, 1999 - Nickeleit *et al.*, 2000 - Drachenberg *et al.*, 2001 - Hirsch *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - Hirsch *et al.*, 2003 - Drachenberg *et al.*, 2004 - Drachenberg *et al.*, 2005 - Leung *et al.*, 2005 - Hariharan *et al.*, 2006 - Nickeleit *et al.*, 2006 - Bohl *et al.*, 2007 - Dropulic *et al.*, 2008 - Hirsch *et al.*, 2009].

L'avantage de la biopsie rénale est qu'elle reste, à l'heure actuelle, l'examen de référence de diagnostic de la néphropathie à virus BK. Les inconvénients de la biopsie sont qu'il s'agit d'un examen invasif. De plus, de par la nature focale de la biopsie, celle-ci peut conduire à un résultat faussement négatif.

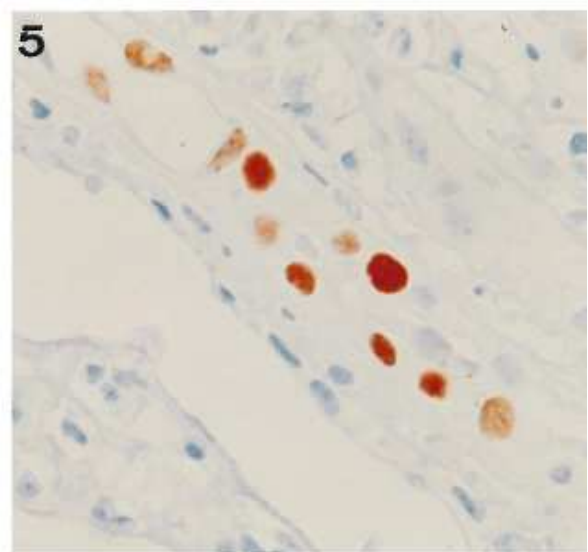
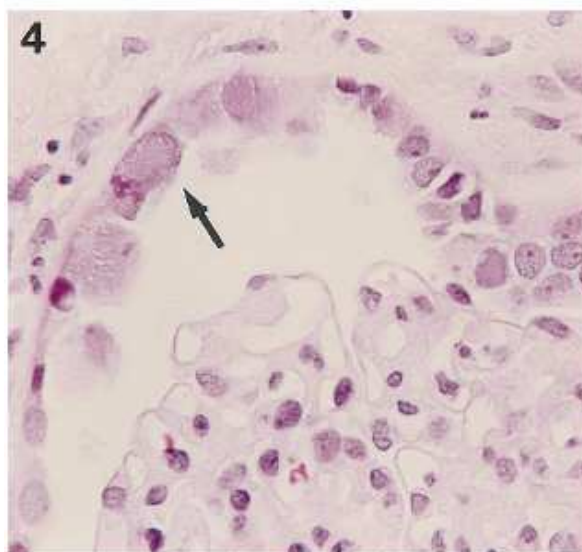
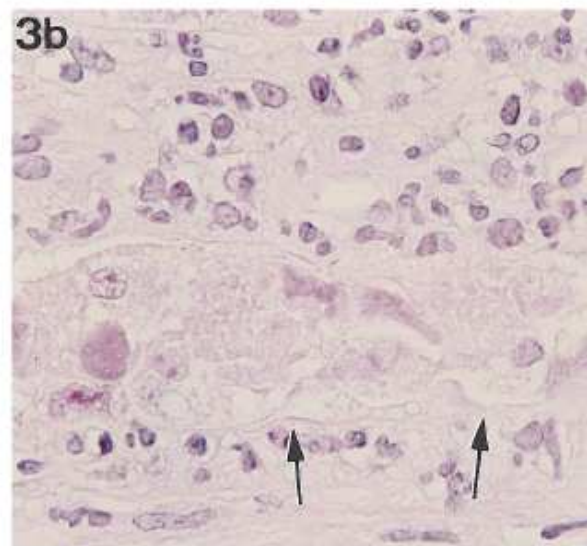
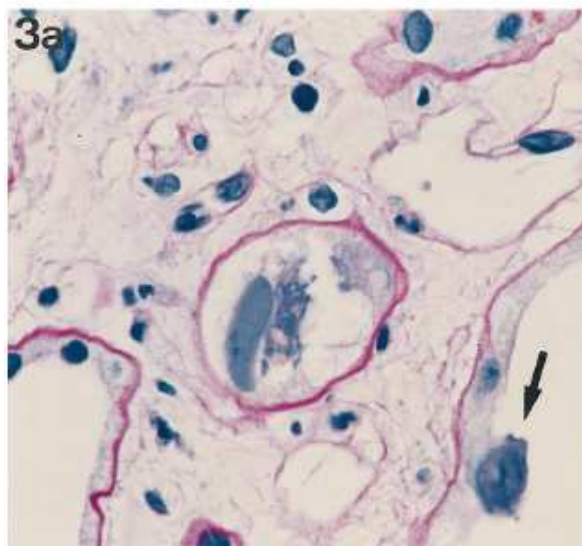
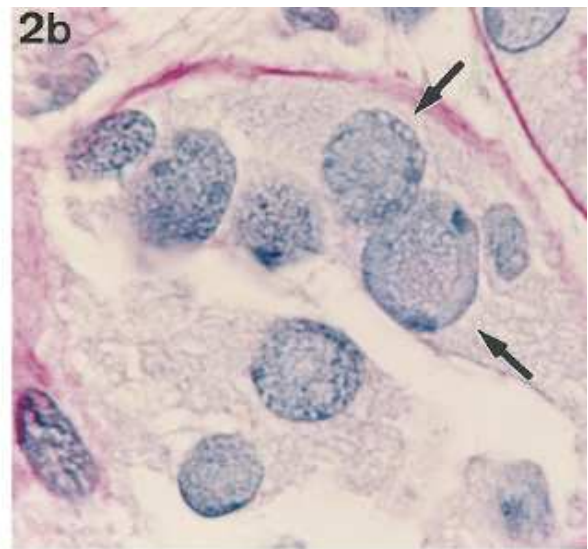
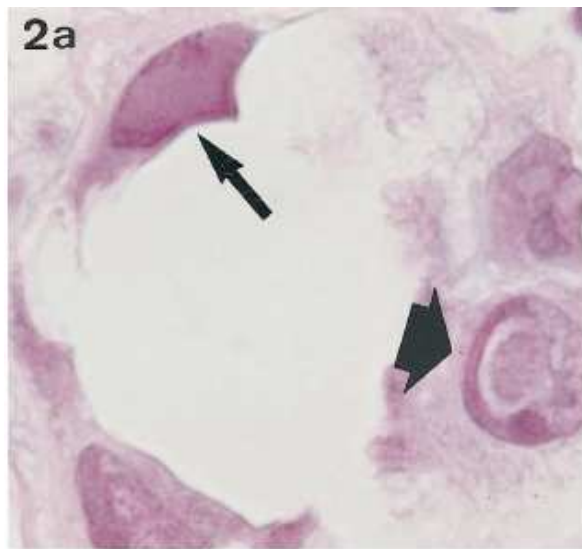


Figure 19 : Histologie d'une biopsie rénale présentant une néphropathie à virus BK

2 : types d'inclusions virales intranucléaires – 2a Inclusions virales d'aspect en verre dépoli et granulations éosinophiles – 2b Granulations finement homogènes

3 : tubules rénaux avec des cellules infectées – 3a une cellule infectée est présente dans la lumière. L'interstitium ne présente qu'une inflammation minimale – 3b Cellules nécrosées avec changements cytopathogènes en dehors de la lumière du tubule. La membrane basale du tubule est dénudée.

4 : inclusions intranucléaires dans les cellules épithéliales pariétales de la capsule de Bowman

5 : *Polyomavirus* détecté par immunohistochimie. Les cellules épithéliales tubulaires montrent une réaction positive en présence d'anticorps spécifiques de l'antigène T du virus simien SV40. D'après [Nickeleit *et al.*, 1999]

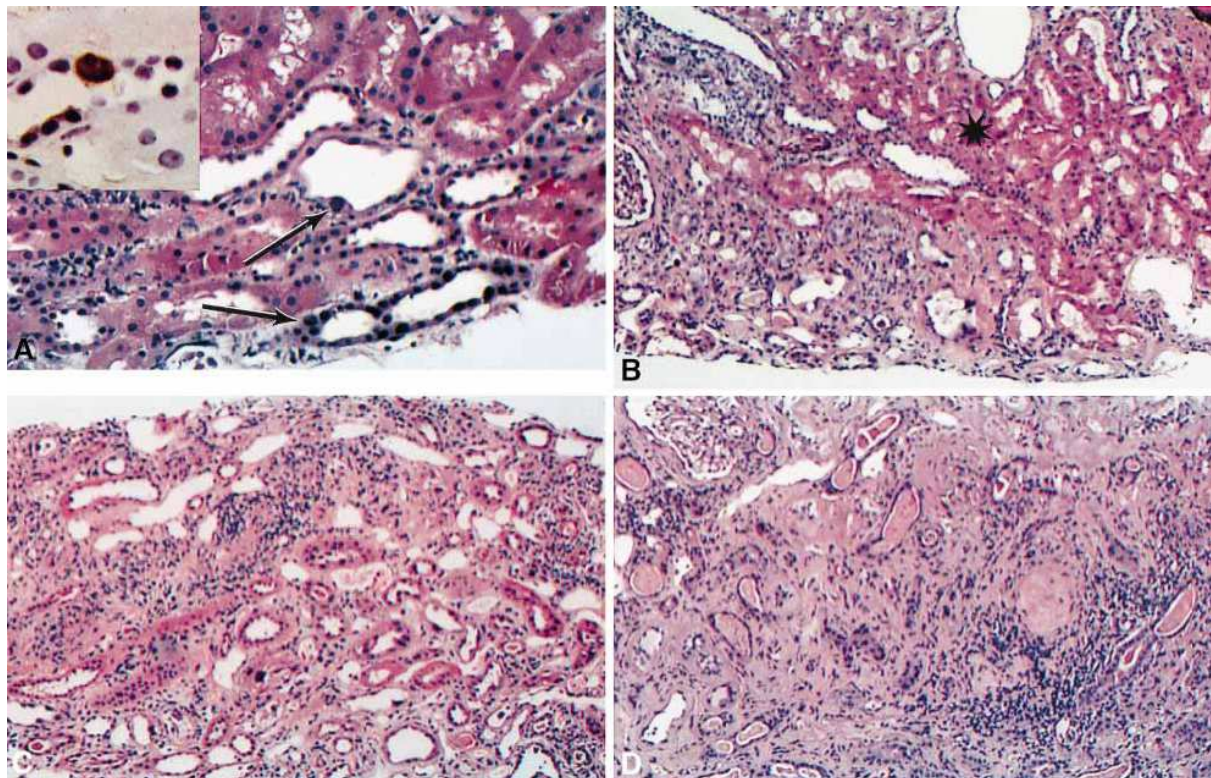


Figure 20 : Biopsies chez un patient transplanté rénal avec réactivation à virus BK douze mois après la transplantation

D'après [Drachenberg *et al.*, 2001]

A : Biopsie initiale qui montre que de rares tubules ont des changements cytopathogènes. Un tubule présente un noyau augmenté de taille ce qui est souligné par le marquage à l'immunoperoxydase.

B : Néphropathie tubulo interstitielle. La partie supérieure de l'image montre un parenchyme sain. La partie inférieure de l'image révèle une inflammation chronique, une atrophie et des changements cytopathogènes viro-induits.

C : La biopsie révèle une néphropathie interstitielle tubulaire. L'atrophie est davantage présente.

D : Sept mois après le diagnostic, la biopsie montre une fibrose interstitielle extensive et une atrophie tubulaire. Il y a des séquelles des changements cytopathogènes.

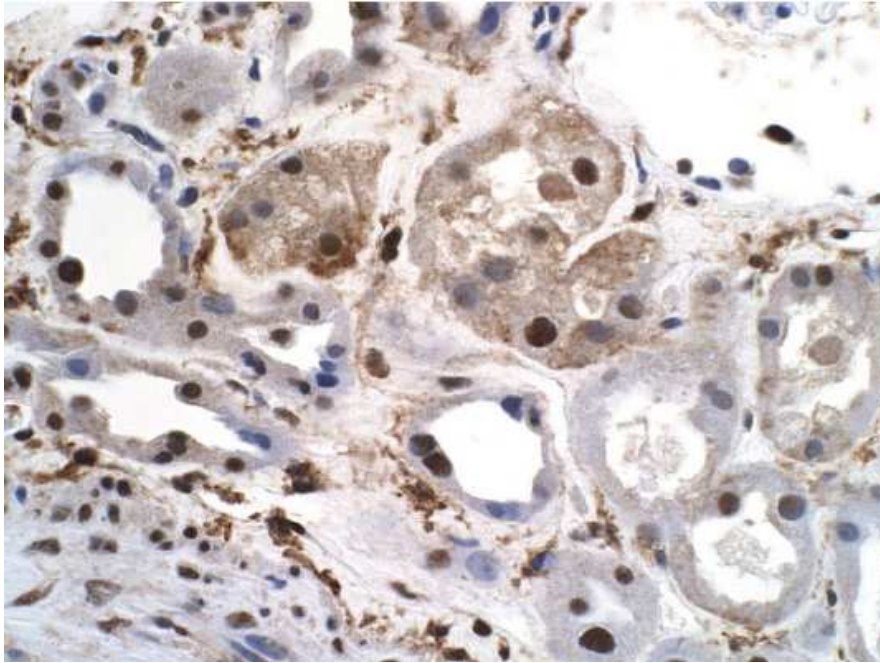


Figure 21 : Présence du virus BK dans les cellules tubulaires rénales en immunohistochimie

D'après [Lekakis *et al.*, 2009]

(5) Biologie moléculaire

L'émergence diagnostique des néphropathies à virus BK en transplantation a coïncidé avec le développement de techniques de biologie moléculaire de plus en plus performantes pour le diagnostic direct en virologie. Celles-ci peuvent être appliquées à la recherche de différentes parties du génome viral dans divers prélèvements (urines, plasma, biopsies). Différentes techniques peuvent également être utilisées pour la détection. Cependant, la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel est la plus utilisée. Elle utilise le principe de base classique de la PCR (amplification cyclique d'un fragment d'ADN) avec pour différence une amplification non pas mesurée en point final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. La PCR en temps réel présente de nombreux avantages : grande sensibilité, spécificité élevée par les sondes, rapidité, reproductibilité, possibilité de quantification en utilisant une gamme plasmidique. L'inconvénient de ce type de technique est son coût. Un autre inconvénient peut être le manque d'efficacité et de flexibilité pour certaines mutations. Les cibles amplifiées peuvent être chacune des régions du génome, à savoir une région de VP1, de NCCR, ou de l'antigène T. C'est la technique utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Nancy.

La quantification est fondée sur l'amplification en parallèle d'une gamme de standard plasmidique. Les performances obtenues sont en général excellentes.

Les résultats obtenus par les différentes équipes restent très hétérogènes, en raison de méthodologies différentes, du faible nombre d'études prospectives et du faible nombre de patients étudiés. Le coût d'une PCR quantitative du virus BK à partir du sang ou des urines est un examen hors nomenclature des actes de biologie médicale, soit un BHN 280 (75,60 euros) [Mammette *et al.*, 2002 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003].

G. La prise en charge des infections par le virus BK

1. Evolution de la néphropathie

Au fur et à mesure du développement de la néphropathie, sont définis des stades histologiques résultant de l'intensité et de la durée de l'exposition au virus. Ils correspondent à une réponse immunitaire du greffon rénal.

Le risque de néphropathie à virus BK en transplantation rénale peut être classifié ainsi :

Niveau 0 : pas de risque

Niveau 1 : possible néphropathie à virus BK (faible risque, analyses supplémentaires et surveillance requise)

Niveau 2 : néphropathie à virus BK présumée (haut risque, biopsie du greffon et surveillance rapprochée requise)

Niveau 3 : néphropathie à virus BK définitive (biopsie affirmant la néphropathie)

Le signe d'appel le plus fréquent est la dégradation de la fonction rénale, mise en évidence par une augmentation des taux plasmatiques de créatinine (Les valeurs usuelles de créatininémie sont comprises entre 7 et 13 mg/L soit 60 et 115 μ mol/L pour l'homme et 5 à 12 mg/L soit 45 et 105 μ mol/L pour la femme).

Pour dépister à un stade précoce l'infection par le virus BK, apparaît ici tout l'intérêt de la recherche du virus BK dans les urines ou dans le sang par biologie moléculaire [Mackenzie *et al.*, 1978 - Coleman *et al.*, 1997 - Hirsch *et al.*, 2002 - Mammette *et al.*, 2002 - Huraux *et al.*, 2003 - Drachenberg *et al.*, 2004 et 2005 - Leung *et al.*, 2005 - Randhawa *et al.*, 2006 - Dropulic *et al.*, 2008 - Hirsch *et al.*, 2009].

L'évolution, en dehors de toute prise en charge thérapeutique, se fait vers une dégradation de la fonction du greffon. Ainsi, dans la série publiée par Randhawa *et al.*, la surveillance histologique de 13 patients pour lesquels le diagnostic de néphrite tubulo-interstitielle avait été posé, a montré chez neuf d'entre eux la persistance de lésions cytopathiques et tubulaires ; parmi ceux-ci, sept ont développé une néphropathie chronique ayant nécessité une néphrectomie [Randhawa *et al.*, 2006].

2. Réduction de l'immunosuppression

La prévention de la néphropathie à virus BK repose sur une meilleure stratégie de surveillance plutôt que sur un traitement à proprement parler de la maladie établie. Dans le traitement de maintien de l'immunosuppression, l'utilisation de tacrolimus en comparaison à la ciclosporine, de mycophénolate mofétil en comparaison à l'azathioprine, a été impliquée comme facteur de risque majeur de virurie, de virémie, et de néphropathie à virus BK. Néanmoins, l'infection par le virus BK ne peut être attribuée à aucun traitement immunosuppresseur seul ou à un facteur de risque unique. L'équilibre entre un traitement immunosuppresseur efficace, non toxique, et la prévention de complications comme la néphropathie à virus BK est un état difficile à obtenir. L'infection à virus BK est reconnue comme étant la conséquence d'un excès d'immunosuppression.

Le traitement des infections à virus BK repose en grande partie sur une réduction précoce des posologies des traitements immunosuppresseurs [Hirsch *et al.*, 2005 - Bechert *et al.*, 2010 - Hardinger *et al.*, 2010].

3. Traitements spécifiques

Le traitement standard d'une cystite hémorragique qu'elle soit associée à une chimiothérapie ou à une infection par le virus BK est d'abord symptomatique avec analgésie, hyperhydratation, diurèse forcée, sondage pour prévenir la formation de caillots et l'obstruction rénale.

Les solutions thérapeutiques sont à ce jour limitées car il n'y a pas d'antiviral spécifique (peu de cibles virales potentielles). Un traitement antiviral peut être envisagé par utilisation de cidofovir, leflunomide, quinolones, ou immunoglobulines intraveineuses. Cidofovir et leflunomide sont les plus utilisés. Les quinolones et les immunoglobulines sont utilisées en deuxième intention.

a) En première intention

Le cidofovir semble être un des traitements les plus intéressants, mais son mécanisme d'action sur les *polyomavirus* reste à élucider. Sa toxicité rénale en limite considérablement l'utilisation chez les transplantés rénaux. Analogue nucléosidique utilisé dans le traitement des rétinites à cytomégalovirus, le cidofovir est la référence thérapeutique contre le virus BK. Il inhibe l'ADN polymérase virale. En ce qui concerne la réplication du virus BK, le mécanisme n'est pas très clair car le virus BK n'a pas de gène de polymérase virale. Plutôt qu'un effet direct sur la réplication, le cidofovir pourrait restaurer les fonctions de p53 et de pRb, cibles de l'antigène T, ce qui permettrait aux cellules infectées par le virus BK d'évoluer en apoptose. Cependant, le cidofovir est néphrotoxique et son utilisation doit être discutée avec le risque d'aggravation de la fonction rénale. Le cidofovir a également été utilisé en association avec une réduction du traitement immunosuppresseur ce qui rend difficile l'évaluation de sa réelle efficacité. Le cidofovir a été utilisé au CHU de Nancy dans le traitement des néphropathies à virus BK [Randhawa *et al.*, 2000 - Bressollette Bodin *et al.*, 2003 - De Clercq *et al.*, 2003 - Huraux *et al.*, 2003 – Vats *et al.*, 2003].

Le leflunomide appartient à la classe des malanonitrilamides. Il s'agit d'un agent immunosuppresseur utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. L'effet immunosuppresseur est exercé par inhibition de l'activité protéine kinase et de la synthèse de pyrimidine. Il a une activité *in vitro* contre le cytomégalovirus, le virus herpès simplex et le virus BK. Le traitement par leflunomide reste limité car il doit être administré en concentrations importantes qui nécessitent une surveillance de la fonction hépatique [Brennan *et al.*, 2005 - Williams *et al.*, 2005 - Randhawa *et al.*, 2006 - Beimler *et al.*, 2007 - Bohl *et al.*, 2007 - Dall *et al.*, 2008 - Dropulic *et al.*, 2008 - Hirsch *et al.*, 2009].

b) En deuxième intention

Les quinolones (acide nalidixique et acide oxolinique, levofloxacin, ciprofloxacine, ofloxacine, gatifloxacine), inhibiteurs de l'ADN gyrase, pourraient interférer avec l'activité hélicase de l'antigène T ; ils ont *in vitro* et *in vivo* une activité contre le virus BK. Les quinolones inhibent l'activité topoisomérase de type II y compris la gyrase et la topoisomérase IV. La réplication du virus BK serait inhibée par inhibition de l'activité hélicase de l'antigène T qui a une fonction similaire à l'ADN gyrase [Thoulouzan *et al.*, 2010].

Les immunoglobulines intraveineuses sont utilisées dans la néphropathie à virus BK pour leurs propriétés immunomodulatrices.

4. Retransplantation après exérèse du greffon

La néphropathie à virus BK réduit considérablement la durée de survie du greffon. Les altérations tubulo-interstitielles des effets directs et indirects du virus et le rejet possible après réduction de l'immunosuppression peuvent conduire à une perte précoce du greffon ou à une dysfonction chronique.

Se pose alors la question en cas d'insuffisance rénale terminale de la mise sous dialyse du patient ou d'une nouvelle transplantation. La néphropathie à virus BK n'est pas une contre-indication à une nouvelle transplantation mais celle-ci peut survenir à nouveau. Ramos *et al.*, rapportent que pour dix patients ayant perdu un greffon après néphropathie associée au virus BK, seul un patient a eu une réactivation de la néphropathie associée au virus BK entraînant une insuffisance rénale lors de la deuxième transplantation. Dans cette étude, tous les patients avaient reçu une immunosuppression identique à celle de la première transplantation [Ramos *et al.*, 2004 - Trofe *et al.*, 2006 - Bohl *et al.*, 2007 - Hirsch *et al.*, 2009].

5. Discussion

En l'absence de traitement antiviral spécifique, le traitement des infections associées au virus BK est encore à ce jour débattu. La réduction de l'immunosuppression est considérée comme une attitude reconnue et efficace [KDIGO, 2009]. Les modalités thérapeutiques actuellement recommandées seront abordées dans la discussion générale de ce travail.

H. Conclusion

Il n'existe actuellement pas de traitement spécifique préventif de la néphropathie associée au virus BK. La prévention consiste ainsi à l'anticipation de la survenue de la néphropathie à virus BK par la recherche d'ADN du virus par PCR quantitative dans le sang ou les urines, l'intensité de la charge virale et les éléments cytopathologiques. Les stratégies de prévention instaurent une réduction du traitement immunosuppresseur de façon préemptive chez les patients avec une virémie ou une virurie. Un suivi post transplantation rigoureux permet de réduire la prévalence de l'infection [Huraux *et al.*, 2003 - Dall *et al.*, 2008 - Hirsch *et al.*, 2009].

Les premiers cas de néphropathie à virus BK chez les transplantés rénaux ont été décrits dans les années 1970. La survenue fréquente de réactivations du virus BK a été mise en évidence en 1984 par Gardner *et al.*, au cours du suivi sérologique prospectif de transplantés rénaux [Gardner *et al.*, 1984]. L'intérêt actuel porté à cette pathologie correspond à une augmentation récente du nombre de cas. En effet, différents centres de transplantation ont décrit une émergence de cette pathologie à partir de 1995. Alors que la présence de virus BK dans les urines, reflet d'une réactivation, est un événement rare chez l'adulte sain immunocompétent, elle est détectée en fonction des publications dans 10 à 45 % des prélèvements en post-transplantation rénale. Le virus peut également être présent de façon concomitante dans le sang. La réactivation virale est le plus souvent précoce, dans les trois mois qui suivent la transplantation, mais elle peut aussi être retardée et apparaître dans les deux ans suivants. Cette réactivation peut se compliquer d'une néphrite interstitielle, dont la fréquence peut atteindre cinq pour cent en post-greffe selon les séries. Chez certains de ces patients, la pathologie à virus BK peut émerger sous la forme de sténose urétérale, de dysfonction du greffon et de perte de greffon irréversible due à la néphropathie. La néphropathie à virus BK observée chez les receveurs de greffon rénal est due à la multiplication intense du virus dans les cellules de l'épithélium tubulaire rénal avec risque de perte de fonction du greffon rénal. Cette pathologie pose de redoutables problèmes diagnostiques, tant il peut être difficile de la distinguer d'un rejet du greffon, dont le traitement est opposé.

PARTIE II : ETUDES SUR LE VIRUS BK
MENEES AU CHU DE NANCY

II. Etudes sur le virus BK menées au CHU de Nancy

Introduction

A l'heure actuelle, en transplantation rénale, les infections virales restent un important facteur de risque de complications. En particulier, s'est posé le problème du virus BK et de sa réactivation en post transplantation. Depuis les années 1970 où il a été découvert et son émergence dans les années 1990, le virus BK fait l'objet d'une attention et d'une surveillance toute particulière en transplantation rénale.

Sous l'action de thérapeutique immunosuppressive, le virus BK, de séoprévalence élevée, se trouve dans des conditions favorables à sa réactivation. L'incidence de la néphropathie à virus BK varie selon les études entre zéro et 12,5 % des patients. Les complications liées au virus BK étaient associées à une perte de greffon dans plus de 50 % des cas dans les publications initiales, mais récemment la perte de greffon a diminué entre 15 et 30 % dans de nombreux centres ayant instauré un suivi étroit du virus BK [Randhawa *et al.*, 1999 - Ramos *et al.*, 2002 - Vasudev *et al.*, 2005].

Les techniques de biologie moléculaire par PCR quantitative en temps réel sont devenues un outil de dépistage et de suivi de la survenue d'une néphropathie chez ces patients particulièrement à risque.

Cette étude sur le virus BK menée au CHU de Nancy est constituée de deux parties.

Dans une première partie, sont présentés les résultats de l'étude rétrospective menée entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2009 chez des patients transplantés rénaux au CHU de Nancy.

Dans une seconde partie, les résultats d'un suivi prospectif d'une année des patients ayant eu une transplantation au premier semestre 2010 sont décrits et analysés.

A. Etude rétrospective chez les patients transplantés rénaux du 01/01/2005 au 31/12/2009

1. Introduction

Le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nancy est le deuxième centre de greffe rénale de donneur vivant en France avec entre 67 et 106 greffes rénales réalisées par an entre 2005 et 2010 (Tableau I et figure 22). L'année 2010 a souffert d'un nombre moins important de transplantations dues à la réduction des activités de prélèvement par diminution des services de réanimation médicale en Lorraine.

Tableau I : Nombre de transplantations rénales réalisées au CHU de Nancy entre 2005 et 2010

Années	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Transplantations rénales	86	85	106	88	85	67

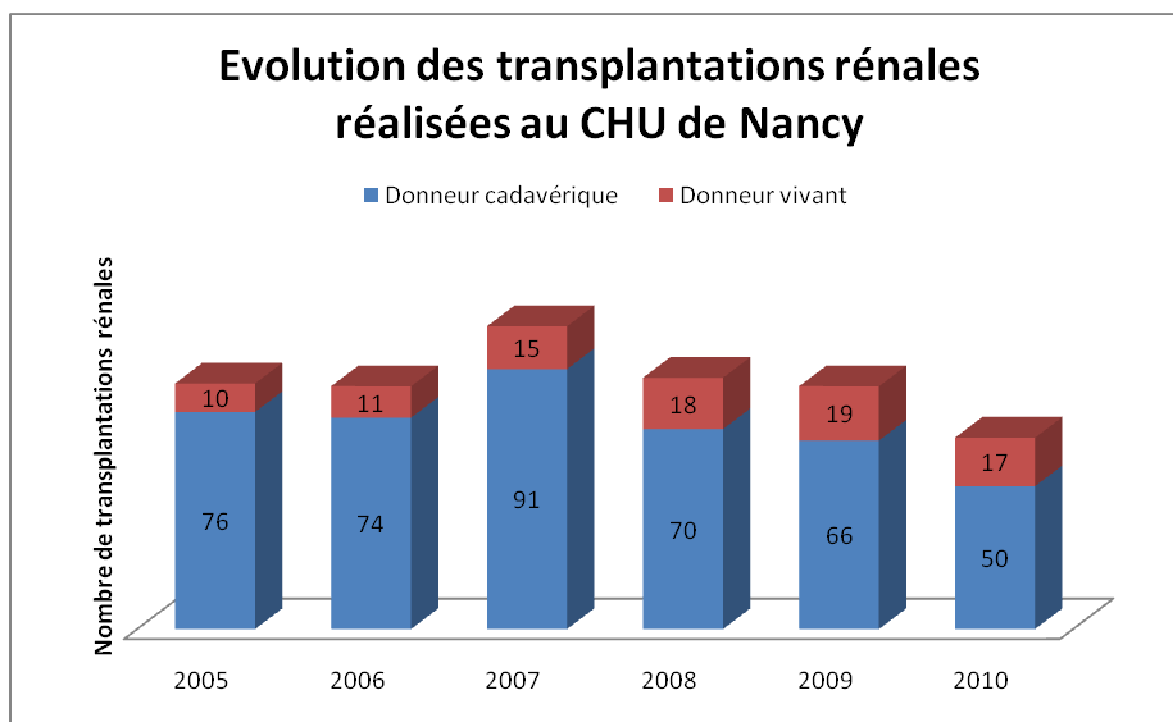


Figure 22 : Transplantations rénales réalisées au CHU de Nancy entre 2005 et 2010

Le traitement immunosuppresseur est indispensable à la survie du greffon. Les objectifs de ce traitement sont à la fois de diminuer le risque de rejet, d'augmenter la durée de survie des greffons et par conséquent d'augmenter la survie des patients tout en minimisant les effets secondaires.

Le risque de réactivation du virus BK concerne ainsi essentiellement les patients greffés rénaux en période post greffe.

2. Problématique et objectifs de l'étude

Quel est l'apport du suivi par biologie moléculaire des patients du service de néphrologie transplantation entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2009 ?

La PCR en temps réel permet de quantifier le nombre de copies du virus BK par millilitre dans le sang total et de mettre en évidence sa présence dans les urines. Il n'y a pas de quantification dans les urines car il faudrait connaître exactement le volume mictionnel afin d'établir un nombre de copies par volume d'urine.

Cette étude rétrospective a différents objectifs, cités ci-dessous :

- Quelles informations apporte le suivi du virus BK mené chez une cohorte de transplantés rénaux entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2009 ?
- Dans cette période, quel a été le pourcentage de virémie et de virurie à virus BK ?
- Quelle a été la prévalence de la néphropathie à virus BK durant la période de l'étude ? Est-elle comparable aux données rapportées dans la littérature ?
- Quelle périodicité de suivi du virus BK faut-il adopter ?
- Quelle est la cinétique de l'infection par le virus BK ?
- Est-il possible d'établir un seuil de virémie au-dessus duquel le risque de néphropathie est considérable ?

Les objectifs secondaires de cette étude sont :

- La comparaison des délais de détection du virus BK dans le sang et les urines chez des patients ayant développé une néphropathie associée au virus BK
- L'évolution des patients ayant développé une néphropathie

3. Matériels et méthodes

a) Population étudiée

De façon rétrospective, l'ensemble des patients du service de néphrologie ayant eu une recherche de virus BK par biologie moléculaire que ce soit dans les urines ou dans le sang, entre le 1er janvier 2005 et le 31 décembre 2009, a été analysé.

Les services prescripteurs ont été identifiés selon leurs unités fonctionnelles (UF) : UF 1093 Néphrologie Transplantation, UF 1099 Néphrologie Hôpital de Jour, UF 1090 Néphrologie, UF 1091 Néphrologie Consultation, UF 1092 Néphrologie Hospitalisation, UF 1094 Néphrologie Dialyse et l'UF 1398 Néphrologie Secteur 4.

b) Définitions

La détection de l'ADN du virus BK dans le sang total et/ou dans l'urine sont appelées respectivement ADNémie ou virémie et ADNurie ou virurie.

(1) Critères d'inclusion ou d'exclusion

Les services de néphrologie pédiatrique n'ont pas été inclus dans cette étude. Les patients âgés de moins de quinze ans ont été exclus.

(2) Description de la population

La population étudiée représente 293 patients, ayant eu une recherche de virus BK prescrite par le service de néphrologie entre le 1er janvier 2005 et le 31 décembre 2009.

Au sein de cette population, le sexe ratio est 54,01 % de patients de sexe masculin et 45,99 % de sexe féminin.

La moyenne d'âge des patients de cette population s'élève à 51,7 ans avec une médiane à 53,7 ans et un écart-type à 15,4 ans. Le patient le plus jeune est âgé de 15,4 ans et le patient le plus âgé de 87,9 ans (figure 23, page 48).

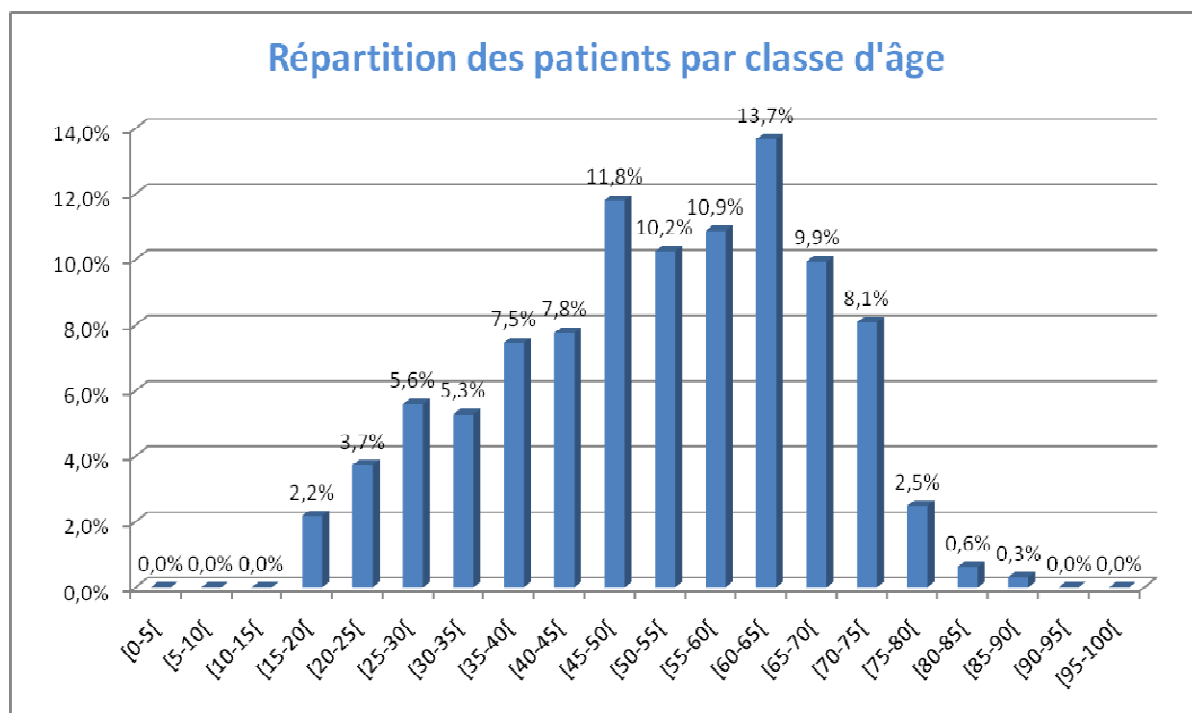


Figure 23 : Répartition des patients de l'étude rétrospective par classe d'âge

c) Echantillons biologiques

Les patients ont bénéficié d'une recherche de virus BK par PCR en temps réel dans un échantillon d'urines et/ou de sang total. Cela représente au total 1365 échantillons répartis en 633 (46,37 %) prélèvements de sang total et 732 (53,63 %) échantillons d'urines. Les prélèvements de sang total ont été réalisés dans des tubes EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) et les urines dans des tubes boratés. Les urines recueillies correspondent à des urines fraîchement émises par les patients lors de leur venue en consultation. Aucun protocole de suivi de la réactivation du virus BK n'avait été établi ; les recherches du virus BK par PCR quantitative ont été réalisées à la demande des prescripteurs du service de néphrologie, selon une périodicité non définie, essentiellement en cas de dégradation de la fonction rénale.

En moyenne, il y a eu 4,65 prélèvements par patient (répartis de la façon suivante : 2,16 prélèvements de sang total et 2,49 urines par patient) sur la durée de l'étude.

d) Marqueurs

Après extraction préalable, l'ADN du virus BK est recherché dans ces échantillons par PCR quantitative en temps réel.

e) Déroulement de l'analyse au laboratoire

❖ Réception des échantillons

A la réception des échantillons accompagnés de la feuille de demande, après vérification des identités, de la conformité des tubes, les demandes sont enregistrées sous Glims (Système d'informatique du laboratoire). Un numéro de demande leur est attribué. Les échantillons sont incrémentés dans les listes de travail de recherche de l'ADN du virus BK dans le sang et/ou dans l'urine.

❖ Extraction automatisée sur MagNA Pure LC Roche® (Roche Diagnostics, France)

Les échantillons d'urine ou de plasma doivent subir une extraction de l'ADN. Cette extraction est réalisée sur le MagNa Pure LC Roche® à l'aide de particules magnétiques.

Au préalable, une étape de reconstitution de chaque flacon de protéinase K du MagNA Pure LC DNA Isolation Kit est nécessaire. Les particules magnétiques doivent être agitées vigoureusement pour assurer une remise en suspension complète. Puis il faut assurer la programmation du MagNA Pure LC®. La prise d'essai de l'échantillon est 200 µL. L'ADN extrait est élué dans 100 µL. Pour davantage de détails, se conférer à la procédure d'extraction située en annexe.

❖ Description de la technique de *Polymerase Chain Reaction*

L'amplification est une technique de PCR quantitative en temps réel pour la détection de l'ADN du virus BK selon le principe Taq Man®. Cette technique utilise des marquages par sondes fluorescentes spécifiques de la région de l'antigène T, pour quantifier des charges virales de virus BK dans l'urine et/ou le sang de patients (tableau II, page 50). Un fragment de 179 paires de base du gène de l'antigène T est amplifié. L'utilisation d'une gamme plasmidique rend possible la quantification de la charge virale (gamme plasmidique commercialisée par ABI (Advanced Biotechnologies, Columbia).

Tableau II : Caractéristiques des amorces et de la sonde utilisées

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques 5' ==> 3'	Position
BKV-1M	AAG TCT TTA GGG TCT TCT AC	4379-4398
BKV-3M	GAG TCC TGG TGG AGT TCC	4527-4510
BKV-TMS (sonde taqman)	(6FAM) AGA ATC TGC TGT TGC TTC TTC ATC ACT GGC (TAMRA)	4432-4461

Tableau III : Conditions d'amplification

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	45
Hybridation	60°C	1 min	
Elongation			

Le mélange réactionnel est préparé en pièce propre avec la composition décrite ci-dessous (tableau IV).

Tableau IV : Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
Mix Taq Man 2x	12,5
Amorce sens BKV-1M à 10 µM	1
Amorces anti sens BKV-3M à 10 µM	1
Sonde BKV-TMS à 5 µM	1
H ₂ O	4,5
Volume final	20,0

Au total, il faut les tubes de mix pour la gamme plasmidique, un tube de mix pour le témoin négatif H₂O mis en pièce propre (contrôle négatif d'amplification), un pour chaque échantillon d'ADN, et un tube de mix pour le témoin H₂O mis avec la pipette échantillon (garant de la non contamination de la pipette). A chacun des mix est ajouté 5 µL d'ADN ou d'eau selon les cas. L'amplification peut être lancée sur ABI PRISM 7000 (Applied

Biosystems, France) (Tableau III, page 50). A la fin de la PCR, il est possible de procéder à l'analyse des données. Quelques exemples se trouvent ci-dessous (figures 24 à 28).

Setup		Instrument		Results						
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report				
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A2	ST1	BKV	Standard	41.35		1300.00				
B2	ST2	BKV	Standard	37.75		13000.00				
C2	ST3	BKV	Standard	34.58		130000.00				
D2	ST4	BKV	Standard	29.91		1.30e+006				
E2	ST5	BKV	Standard	26.38		1.30e+007				

Figure 24 : Exemples de résultats obtenus avec la gamme plasmidique permettant la quantification

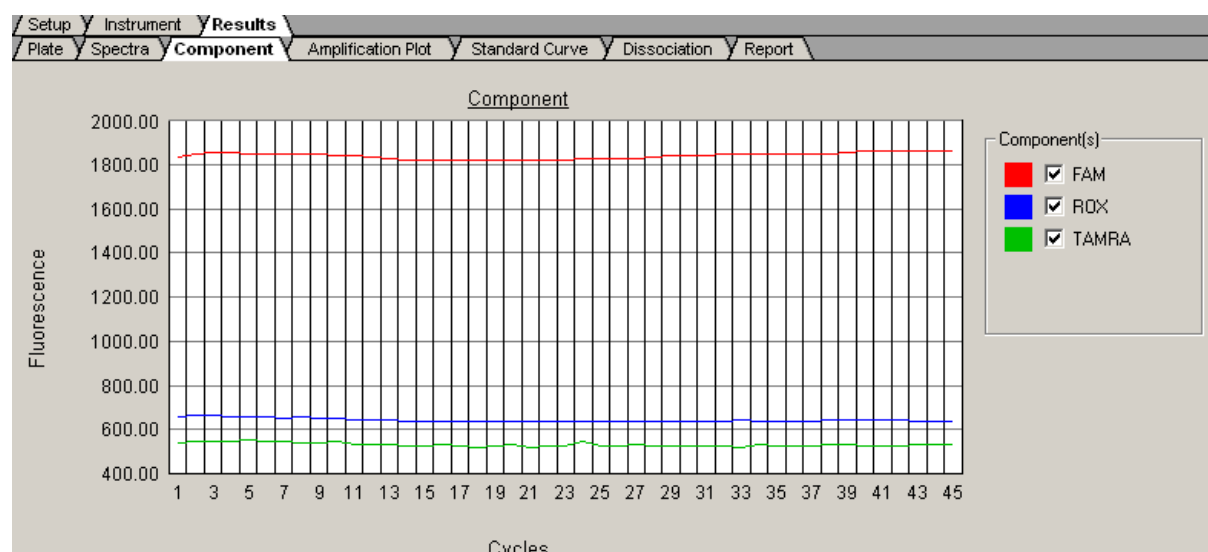


Figure 25 : Courbe de fluorescence d'une PCR virus BK négative

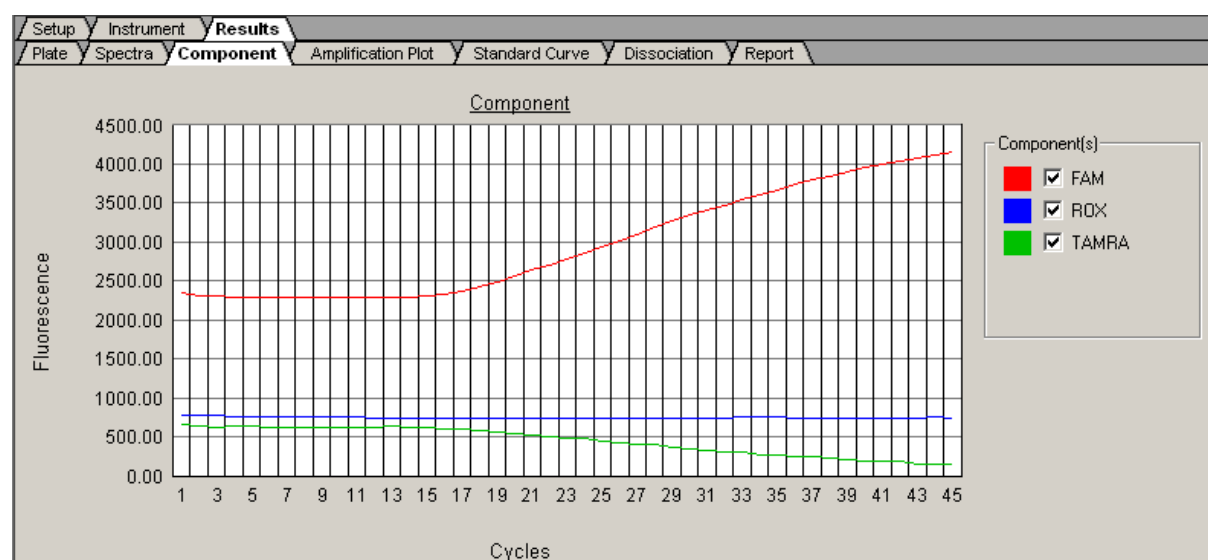


Figure 26 : Courbe de fluorescence d'une PCR virus BK positive

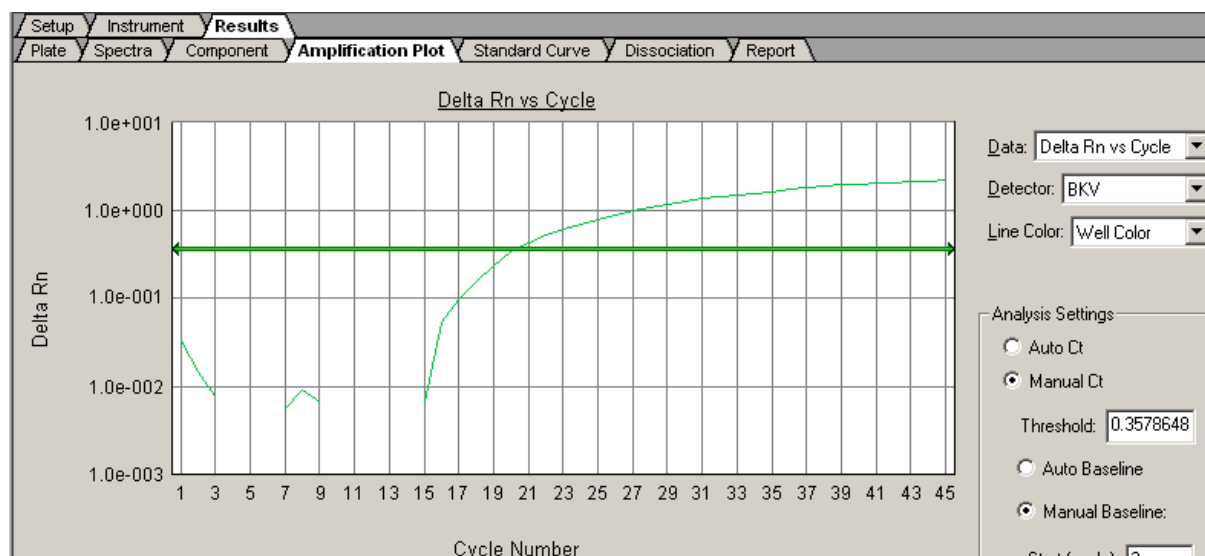


Figure 27 : Courbe d'amplification de la PCR virus BK positive

Results								
Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report				
Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
BKV	Unknown	20.29		5.53e+008				

Figure 28 : Quantification de la charge virale positive

Les résultats obtenus sont ensuite confirmés techniquement et validés biologiquement avant envoi des résultats vers les services.

4. Résultats

L'analyse rétrospective des années 2005 et 2006 a été effectuée dans les cahiers de paillasse tandis qu'à partir de 2007, les données ont été tracées dans le système d'informatique du laboratoire.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau ci-après (tableau V, page 53) et expliqués dans les paragraphes suivants.

La détectabilité correspond à une charge virale positive pour le virus BK mais non quantifiable car de valeur inférieure au premier point de la gamme de calibration. Ainsi, le premier point de calibration a une valeur de charge virale de 1300 copies/mL dans le sang, ce qui correspond à la limite de quantification. Dans le sang, les résultats peuvent être ainsi positifs avec la valeur de la charge virale, détectables ou non détectables. Dans les urines, les charges virales positives ne sont pas quantifiées ; les résultats sont rendus positifs, détectables ou négatifs.

Tableau V : Principaux résultats de l'analyse rétrospective (UR = urines, SGT = sang total)

			Pourcentage	
ADN BKV UR	Positif	229	31,3%	37,6%
	DéTECTABLE	46	6,3%	
	Négatif	457	62,4%	
Total ADN BKV UR		732		

ADN BKV SGT	Positif	31	4,8%	11,8%
	DéTECTABLE	44	7,0%	
	Non DéTECTABLE	558	88,2%	
Total ADN BKV SGT		633		

Total général		1365		
---------------	--	------	--	--

5. Description des résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessus (tableau V).

a) Présence de BK virus dans les urines et/ou dans le sang

(1) Urines

En analysant les résultats de la recherche quantitative du virus BK dans ces différents prélèvements, il apparaît que près d'un tiers des urines (31,3 %) contiennent du virus BK ce qui se traduit par une charge virale positive pour le virus BK. 62,4 % des urines n'ont pas d'ADN du virus BK qui a été amplifié. 6,3 % des urines contiennent de l'ADN du virus BK en quantité qualifiée de détectable.

Cela revient à conclure une négativité pour 62,4 % des urines et une positivité pour 37,6 % des urines (avec une positivité définie par une détection d'une charge virale que celle-ci soit quantifiable ou non).

(2) Sang

Au niveau sanguin, la positivité des résultats n'est pas aussi importante. Seuls 4,8 % des prélèvements sanguins sont positifs pour l'ADN du virus BK avec 88,2 % des

échantillons négatifs. 7 % des prélèvements sanguins ont une charge virale pour le virus BK qualifiée de détectable car de la même façon que pour dans les urines, la charge virale retrouvée étant plus faible que le premier point de la gamme de calibration, elle ne peut pas être quantifiée.

Cela revient à conclure une négativité pour 88,2 % des échantillons de sang total et une positivité pour 11,8 % des échantillons de sang (avec une positivité définie par une détection d'une charge virale que celle-ci soit quantifiable ou non).

b) Patients faisant l'objet d'une étude plus approfondie

Au fur et à mesure de l'analyse de cette étude rétrospective, il a semblé intéressant de décrire l'évolution de patients types. Trois types de profils seront décrits :

- les patients présentant une virurie associée à une virémie
- les patients avec virurie sans virémie
- les patients avec rejet du greffon

(1) Virurie associée à une virémie

Le premier type de patients rassemble les patients ayant présenté une virurie associée à une virémie avec des signes évocateurs de néphropathie à virus BK (essentiellement par des signes de dégradation de la fonction rénale, augmentation de la créatininémie ou diminution de la clairance de la créatinine). Les quatre patients ayant ce profil seront décrits sous la forme d'un tableau comparatif (tableau VI, page 55) et le suivi de l'un d'entre eux sera explicité de façon plus détaillée.

Tableau VI : Tableau comparatif des patients avec virémie et signes évocateurs de néphropathie associée au virus BK

	Patient 1 Monsieur W	Patient 2 Monsieur E	Patient 3 Monsieur V	Patient 4 Monsieur B
Transplantation rénale	31/07/2007	17/05/2006	09/02/2003	07/06/2008
Contexte	Uropathie malformative	Maladie de Berger	Néphropathie à IgA	Hyalinose
Augmentation de la créatininémie	17,5 mg/L	16,0 mg/L	18,9 mg/L	28 mg/L
Date	mai-09	janv.-08	déc.-05	mars-09
Virémie maximale	6,90.10 ⁴ copies/mL	2,89.10 ⁴ copies/mL	4,83.10 ⁴ copies/mL	6,83.10 ³ copies/mL
Date	juin-09	févr.-08	avr.-06	août-08
Biopsie rénale	Néphropathie associée au virus BK			
Cidofovir	5 cures	10 cures	10 cures	10 cures
Minimisation de l'immunosuppression	x	x	x	x

Ci-dessous l'exemple du patient 2, Monsieur E.

Histoire de la maladie

Monsieur E a bénéficié d'une transplantation rénale le 17/05/2006 sur un terrain de maladie de Berger avec insuffisance rénale terminale. Début 2008, est constatée une augmentation de la créatininémie de 13 à 16 mg/L. Compte tenu des constatations virologiques (présence d'une virurie et d'une virémie à virus BK), une biopsie rénale est décidée en août 2008. Cette biopsie met en évidence une inflammation interstitielle multifocale de 15 % sur le cortex profond et médullaire ainsi qu'une fibrose interstitielle modérée. Au niveau tubulaire, apparaissent des lésions de tubulite lymphocytaire. Sur certaines sections tubulaires, il y a présence d'un épithélium de cellules à noyau fortement dystrophique parfois en verre dépoli pouvant correspondre à l'effet cytopathogène du virus BK. L'immunohistochimie est positive pour le virus BK. Les résultats de cette biopsie, l'augmentation de la créatininémie et la présence de virus BK dans les liquides biologiques signent une néphropathie à virus BK associée à un rejet *a minima*.

Suivi du virus BK

La virurie a été persistante chez ce patient (figure 29, page 56). La virémie est passée par un maximum à 28 943 copies/mL en février 2008, puis la réplication du virus au niveau sanguin est quantifiée à 13 525 copies/mL le 4 août 2008 au moment de la biopsie rénale qui a affirmé le diagnostic de néphropathie à virus BK. Les mesures thérapeutiques ont permis de juguler cette néphropathie avec négativation de la charge virale sanguine mais l'excrétion du virus

BK est restée persistante dans les urines. La virémie sanguine a été le signal d'appel pour programmer la biopsie rénale qui pose le diagnostic.

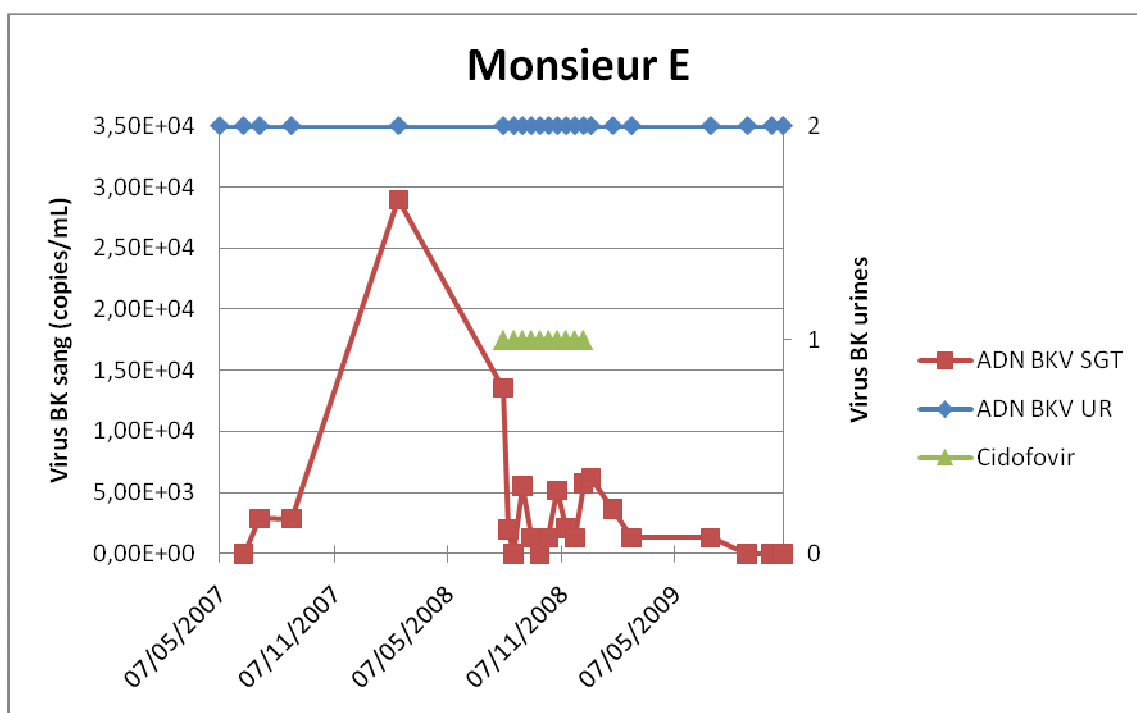


Figure 29 : Suivi du virus BK en post transplantation pour Monsieur E.

Sont présentées ici des courbes d'évolution parallèle de la virémie (BKV SGT) et de la virurie (BKV UR). La virémie décrite sur l'axe des ordonnées de gauche est quantifiée, tandis que la virurie rapportée sur l'axe des ordonnées de droite est décrite de la façon suivante : 2 pour une virurie avec charge virale positive pour le virus BK dans les urines, 1 pour une virurie avec charge virale du virus BK détectable dans les urines, 0 pour une absence de virurie.

Evolution

Le diagnostic de néphropathie à virus BK posé par la biopsie de greffon a justifié un traitement par cidofovir. Le patient a reçu un total de dix cures entre août et décembre 2008 avec en parallèle minimisation de l'immunosuppression à visée néphroprotectrice (une cure correspond à une injection de cidofovir). La persistance de la virurie à l'issue des cinq cures habituelles a justifié la poursuite du traitement pour un total de dix cures. En dépit de la persistance de la virurie, il n'y a pas eu de poursuite des injections de cidofovir au-delà des dix cures compte tenu du risque de néphrotoxicité. Ainsi, au mois de novembre 2009, la posologie de la ciclosporine a été diminuée de 15 % et celle du mycophénolate mofétil de 50 %. A distance de la dixième injection, au point de vue virologique, le virus BK est présent dans les urines et le sang de ce patient mais la fonction rénale reste stable.

Une biopsie comparative a été réalisée le 09/10/2009. Elle a révélé une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle atteignant environ 20 % de la biopsie sans argument en faveur d'une néphropathie à virus BK évolutive. Le traitement par cidofovir a donc bien permis de contrôler la néphropathie. L'évolution du patient est favorable et le patient se porte bien actuellement.

(2) Virurie sans virémie

Le second type de patients réunit les patients avec virurie sans virémie quantifiable (il peut y avoir des pics de détectabilité). Deux patients ont ce type de profil ; l'un d'entre eux, Monsieur D, le patient 6, a présenté dans ce cadre, une néphropathie associée au virus BK. Le second patient, Monsieur S, le patient 7 n'a pas souffert de néphropathie associée au virus BK.

Patient 6 : Monsieur D - Néphropathie associée au virus BK

Histoire de la maladie

Monsieur D est un patient présentant une insuffisance rénale chronique sur rein gauche unique congénital, en hémodialyse depuis 2005 et, ayant bénéficié d'une transplantation rénale le 25/04/2006. Le 13/09/2006, ce patient est porteur de virus BK dans les urines (figure 30, page 58) avec présence « *decoy cells* ». Par contre, la recherche de virus au niveau sanguin reste négative.

Au mois de juillet 2007, monsieur D présente une augmentation de la créatininémie avec protéinurie dans un contexte d'imprégnation importante par le traitement immunosuppresseur (tacrolimus Prograf®) et une persistance de l'excrétion urinaire de virus BK. La biopsie du greffon montre des lésions pouvant évoquer un virus BK en association avec des lésions de rejet *a minima*. L'immunohistochimie est positive au sein de quelques noyaux dystrophiques observés dans une section tubulaire, ce qui signe une tubulopathie à virus BK. Un traitement par cidofovir est alors instauré à compter du 17/08/2007 sous la forme de cinq injections bimensuelles. En décembre 2007, en raison de la persistance d'une virurie à virus BK, une diminution progressive du traitement immunosuppresseur est décidée. Le 31/01/2008, la recherche de virus BK est négative au niveau sanguin mais positive dans les urines. Il est donc décidé la poursuite de la diminution de l'immunosuppression. Le 28/08/2009, le virus est toujours présent dans les urines. Une biopsie réalisée en octobre 2009 ne montre pas de

dégradation de la fonction rénale, ni de glomérulonéphrite chronique ni de néphropathie à virus BK et les PCR sont négatives dans le sang et les urines.

Suivi du virus BK

Le suivi de la présence du virus BK par PCR quantitative au niveau sanguin est différent pour Monsieur D en comparaison des autres patients. En effet, ce suivi ne met pas en évidence de virémie à virus BK dans un contexte clinique de néphropathie associée au virus BK. Par contre, tout au long de l'étude rétrospective, l'excrétion du virus est notée dans les urines.

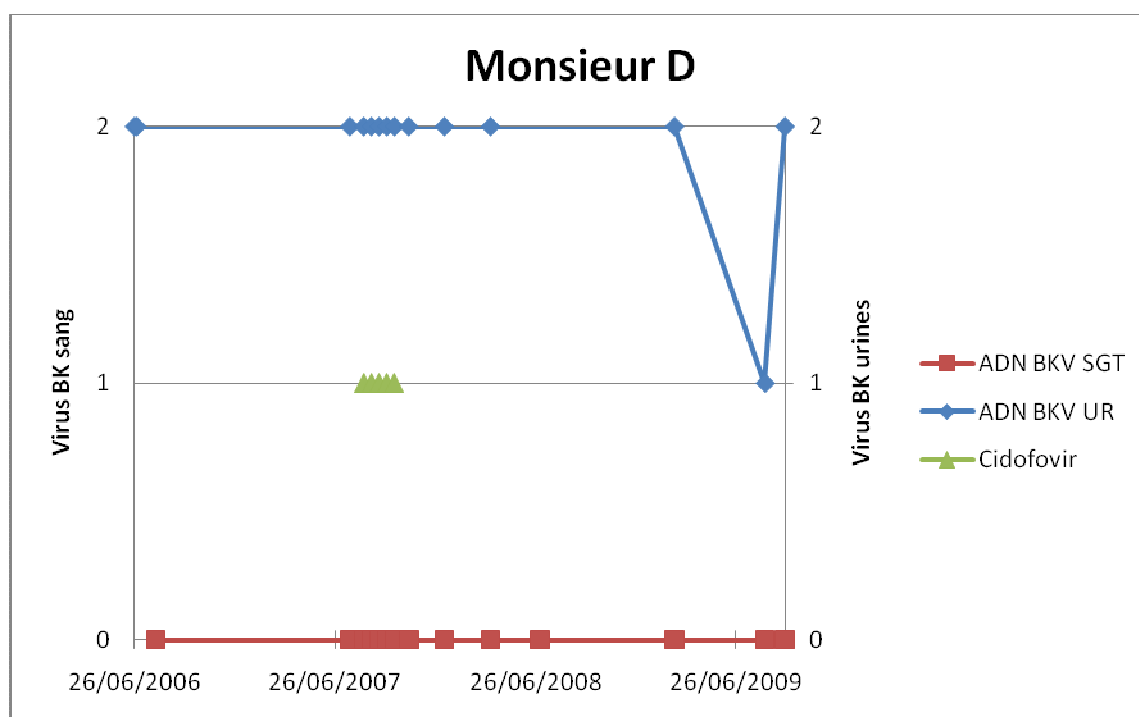


Figure 30 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur D.

Patient 7 : Monsieur S - réactivation du virus BK

Histoire de la maladie

Ce patient a été greffé en mars 2009 après trois ans et demi de dialyse dans un contexte de néphropathie diabétique.

Suivi du virus BK

Pour Monsieur S, le suivi par biologie moléculaire (figure 31, page 59), a essentiellement mis en évidence une virémie détectable mais non quantifiable en association avec une excrétion

urinaire du virus BK sans signe de néphropathie associée au virus BK. De la même façon que pour les urines, une virémie positive a été étiquetée par le chiffre 2 sur l'axe des ordonnées et une virémie détectable par le chiffre 1. Pour autant, aucune néphropathie associée au virus BK n'a été étiquetée chez ce patient. Ce patient illustre le cas d'une réactivation du virus BK bien contrôlée chez un patient greffé rénal et qui n'a pas conduit à une néphropathie associée au virus BK.

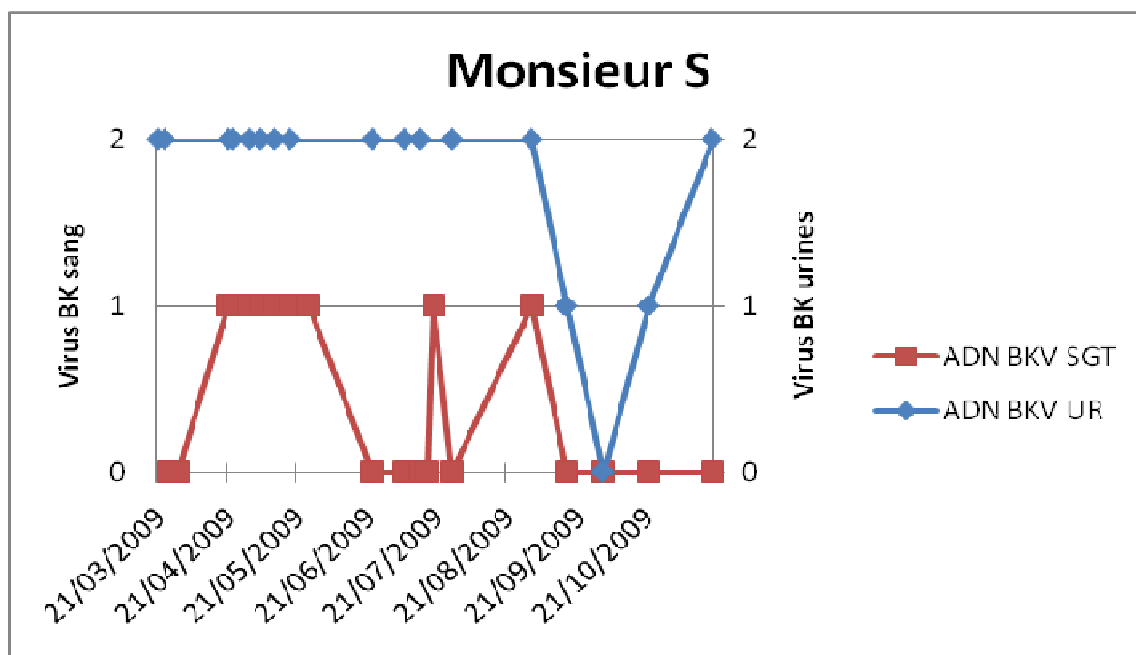


Figure 31 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur S.

(3) Exemple d'un patient ayant eu un rejet

Le troisième type de patient correspond aux patients ayant eu un rejet. Un exemple de rejet, observé chez le patient 5, Monsieur L, est rapporté ici. Ce patient a eu un rejet dans un contexte de virurie et de virémie associées.

Patient 5 : Monsieur L. – Rejet

Histoire de la maladie

Monsieur L est un patient souffrant d'une insuffisance rénale chronique connue depuis 2001 avec protéinurie et hématurie, vivant à Nouméa et arrivé en métropole début 2008. Une consultation aux urgences pour insuffisance rénale chronique terminale avec asthénie et prurit a entraîné la mise sous dialyse péritonéale. Ce patient a bénéficié d'une transplantation rénale avec donneur maternel le 16/12/2008. L'évolution post transplantation a été marquée par une

infection à cytomégalovirus résolue sous traitement par valganciclovir, puis par une augmentation de la créatininémie dans un contexte probable de réactivation du virus BK (présence du virus au niveau sanguin et urinaire, recherche de « *decoy cells* » positive). Une ponction biopsie rénale réalisée en mars 2009 révèle la présence de deux glomérules scléreux sur 53 avec fibrose. La biopsie ne montre pas de lésions vasculaires, ni de lésions rénales pouvant évoquer une néphropathie à virus BK. Il n'y a pas d'altération nucléaire de l'épithélium tubulaire et pas d'expression de l'antigène du virus BK à l'immunohistochimie. Il s'agit d'un rejet *a minima*. Après diminution du traitement immunosuppresseur, le virus BK est resté positif uniquement dans les urines. En août 2009, la possibilité d'une néphropathie à virus BK a été éliminée, malgré la présence d'une virurie et d'une virémie.

Suivi du virus BK

Monsieur L est un patient porteur du virus BK pour lequel le virus BK est présent dans les urines analysées au laboratoire de virologie du CHU de Nancy en 2009 (figure 32). Une virémie sanguine a été notée entre janvier et février 2009 mais avec des charges virales faibles comprises entre 1300 et 2257 copies/mL (valeurs très inférieures aux charges virales des patients chez qui a été constatée une néphropathie à virus BK). Le rejet a été bien contrôlé chez ce patient.

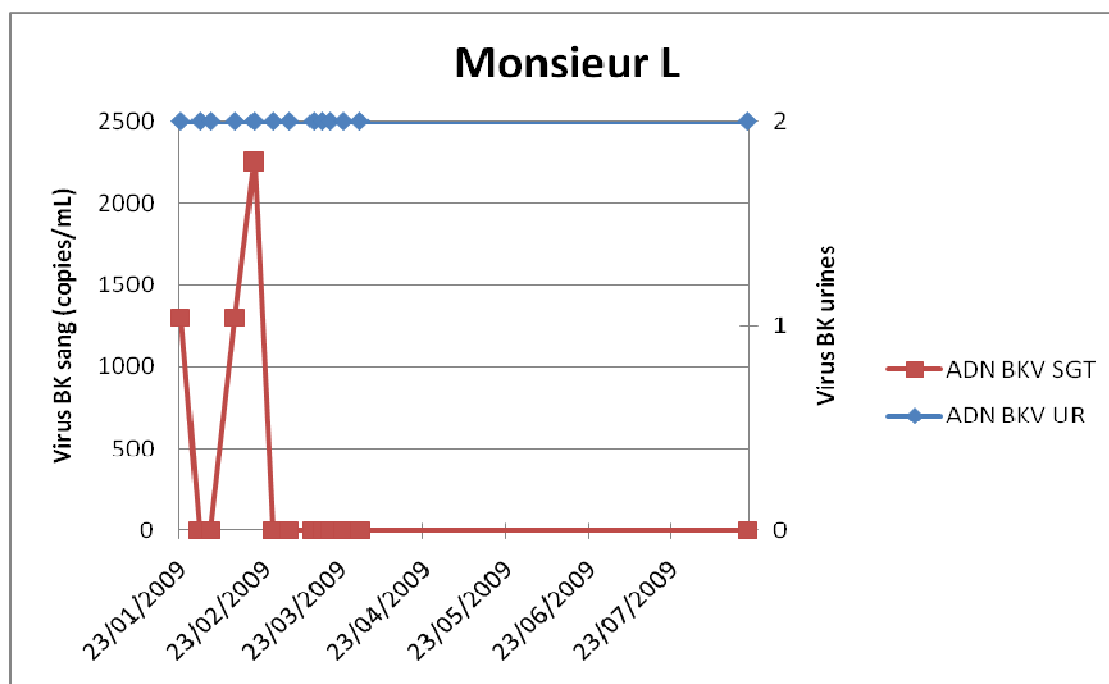


Figure 32 : Suivi du virus BK en post transplantation de Monsieur L.

c) Evolution comparée de ces patients et conclusion des cas cliniques

Ci-dessous un tableau résumant l'évolution de ces sept patients dont le profil est apparu intéressant (tableau VII).

Tableau VII : Evolution comparée de ces patients (s = semaines)

	P1 BKVAN	P2 BKVAN	P3 BKVAN	P4 BKVAN	P5 Rejet	P6 BKVAN	P7 Réactivation
Virémie maximale (copies/mL)	6,90.10 ⁴	2,89.10 ⁴	4,83.10 ⁴	6,83.10 ³	2,25.10 ³	0	1300
Délai de positivité des urines	91,86 s	47,21 s	150,14 s	7 s	5,49 s	8,86 s	2,29 s
Délai entre positivité des urines et du sang	0	12,64 s	14,43 s	0	0		4,42 s
Délai de positivité du sang total	91,86 s	59,86 s	164,57 s	7 s	5,49 s		6,71 s
Délai pour le maximum de virémie	99,29 s	91,71 s	166,57 s	10,29 s	9,35 s		
Réduction de l'immunosuppression	x	x	x	x		x	
Cidofovir	x	x	x	x		x	

L'étude rétrospective durant ces cinq années a révélé cinq cas de néphropathies associées au virus BK (BKVAN). La prévalence de la néphropathie à virus BK est ainsi de 1,71 % (cinq cas objectivés par ponction biopsie rénale pour un échantillon total de 293 patients). Dans cette étude rétrospective, pour les cinq patients ayant présenté une néphropathie associée au virus BK, les délais médians de survenue de la virurie sont compris entre 7 semaines (1,6 mois) et 150,14 semaines (34,7 mois) avec une médiane à 47,21 semaines (10,9 mois). Pour deux de ces patients, la virémie est détectée en même temps que la virurie ; pour deux autres, la virurie précède la virémie de 13,5 semaines en moyenne.

Chez tous ces patients, la première attitude thérapeutique adoptée a été une réduction de l'immunosuppression en cas de suspicion de néphropathie induite par le virus BK ; en cas de lésions prouvées par biopsie rénale, des cures de cidofovir ont été réalisées.

6. Discussion

Cette étude rétrospective a pour but d'investiguer une infection active par le virus BK après une transplantation rénale dans une population de 293 patients. Les critères d'inclusion dans l'étude ont été une recherche de virus BK par PCR quantitative en temps réel entre le 1^{er} janvier 2005 et le 31 décembre 2009. La discussion sera structurée en plusieurs points.

(1) Algorithme des résultats virologiques de l'étude rétrospective

L'algorithme ci-dessous (figure 33) résume les résultats de cette étude rétrospective. Au sein de la population de 293 patients suivis, cinq patients ont développé une néphropathie associée au virus BK dont un sans virémie. Par ailleurs, une virémie a été notée chez un patient ayant développé un rejet.

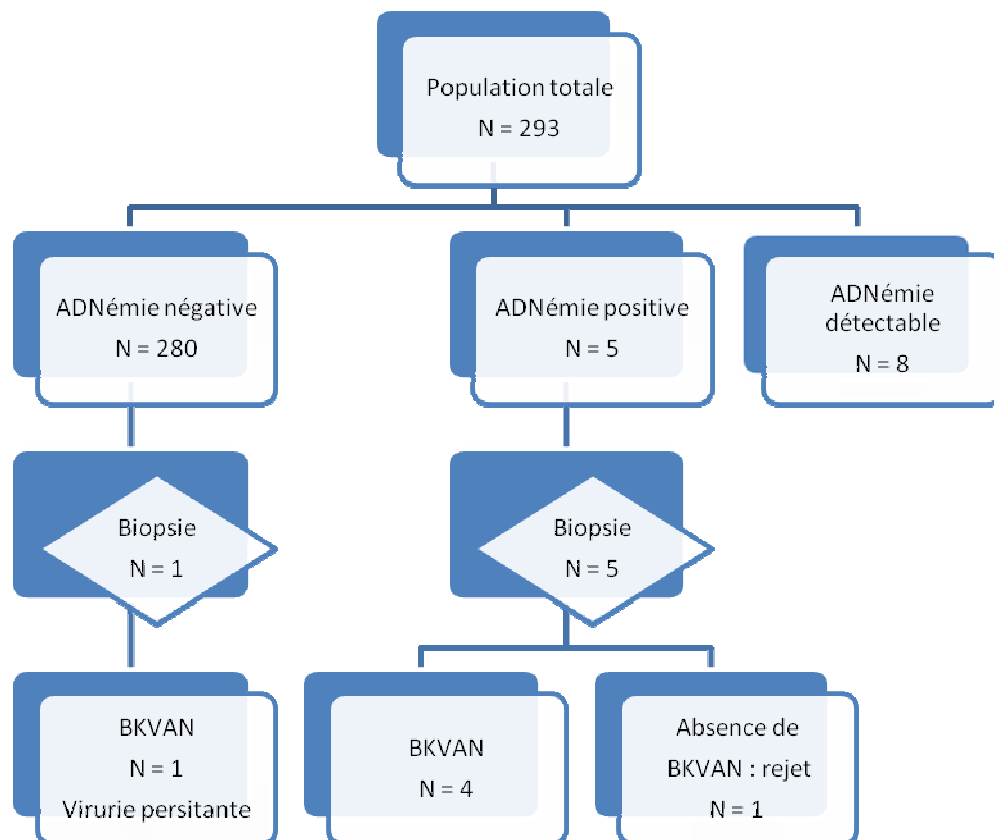


Figure 33 : Algorithme des résultats de l'étude rétrospective

(2) Interprétation des données

Si l'interprétation des données est soumise à une analyse statistique telle que celle proposée par Bressollette-Bodin *et al.*, les patients peuvent être séparés en trois groupes distincts (figure 34, page 63) :

- Le premier pour lesquels la recherche de l'ADN du virus BK dans le sang total et dans les urines a été négative, ce groupe représente 223 patients (77,47 %).
- Le deuxième rassemble les patients dont la recherche de l'ADN du virus BK dans les urines a été positive au moins une fois avec une ADNémie restée négative, ce groupe représente 57 patients (19,45 %).

- Le troisième réunit les patients dont la recherche de l'ADN du virus BK a été positive au moins une fois au niveau sanguin avec une charge virale détectable ou quantifiable, ce groupe rassemble 13 patients (4,44 %) mais seuls cinq d'entre eux ont eu une charge virale positive quantifiable (ce sont les cinq premiers cas rapportés de patients).

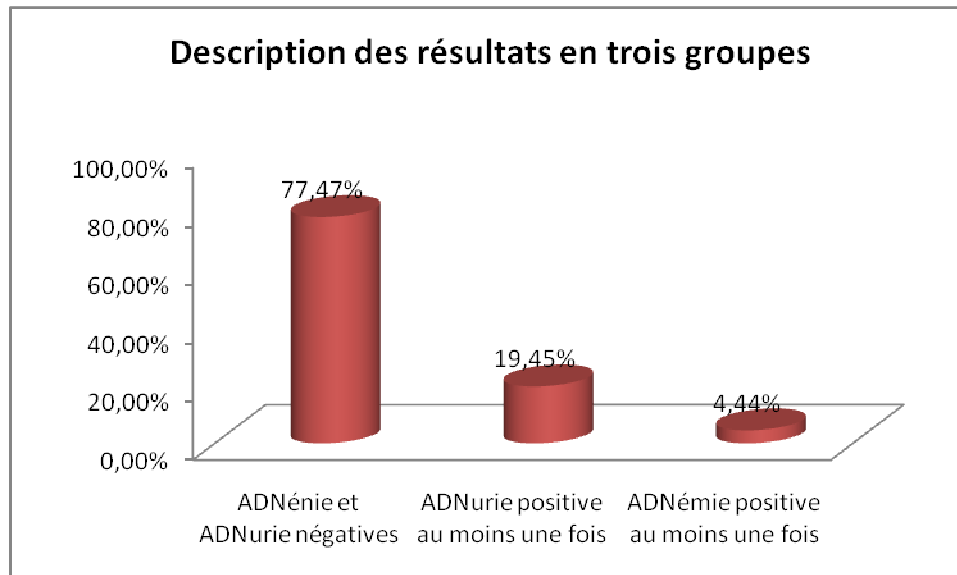


Figure 34 : Description des résultats en trois groupes selon la présence ou l'absence d'ADNurie et d'ADNémie

Pour Bressollette-Bodin *et al.*, le premier groupe représente 43,3 % des patients, le second 27,9 % et le troisième 28,8 % des 104 patients suivis. En comparaison avec les résultats de l'étude rétrospective, les patients de la cohorte ont en proportion des viruries moins nombreuses et 6,5 fois moins de virémies à virus BK. Les résultats se rapprochent davantage de ceux de Babel *et al.*, qui décrivent 70,2 % dans le premier groupe, 23 % dans le deuxième et 6,8 % dans le troisième ou de Costa *et al.*, qui décrivent 72,5 % dans le premier groupe, 18,3 % dans le deuxième et 9,2 % dans le troisième [Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Costa *et al.*, 2008 - Babel *et al.*, 2009].

(3) Pourcentage de positivité des patients ou des échantillons par rapport à la littérature

Il semble important de discuter un point primordial concernant la positivité. Afin de comparer les études de la littérature, il faut savoir que ces dernières rapportent soit une

positivité pour des échantillons biologiques soit pour des patients en sachant qu'il peut y avoir plusieurs échantillons par patient. Ceci complique l'interprétation et la comparaison des résultats. Dans le tableau XI en page 70, les données publiées dans les différentes études de la littérature ont été rapportées et comparées.

Parmi les 732 urines et les 633 échantillons de sang de l'étude rétrospective, la proportion d'échantillons positifs a été de 37,60 % soit 275/732 et de 11,80 % soit 75/633 respectivement. Dans l'étude rétrospective, les résultats sont comparables en termes de positivité des échantillons par rapport à ceux de la littérature : 30,9 % pour Bressollette-Bodin *et al.*, versus 37,60 % dans ce travail pour une virurie positive et 12,4 % versus 11,80 % pour une virémie positive. En revanche, en termes de positivité pour les patients, les résultats de l'étude rétrospective sont inférieurs à ceux rapportés par Bressollette-Bodin *et al.*, avec une virurie pour 19,45 % des patients contre 56,7 % pour ces auteurs et une virémie pour 4,44 % d'entre eux contre 28,8 % pour ces mêmes auteurs. En effet, la cohorte de patients de l'étude de Nancy est plus importante (293 patients versus 104 pour l'étude de Bressollette-Bodin *et al.*), ce qui diminue d'autant le pourcentage de positivité pour les patients. Malgré cette considération, la virémie observée dans la cohorte de Nancy est plus faible que celle rapportée par la littérature décrite pour 14 % des patients en moyenne de quatre études comparées (tableaux VIII et IX, page 65).

Tableau VIII : Pourcentage de positivité du virus BK dans les échantillons et pour les patients de l' étude rétrospective

		Echantillons		Patients	
ADNémie	Positive ou détectable	75/633	11,80%	13/293	4,44%
	Négative	558/633	88,20%	280/293	95,56%
ADNurie	Positive ou détectable	275/732	37,60%	57/293	19,45%
	Négative	457/732	62,40%	236/293	80,55%

Tableau IX : Bibliographie comparée en termes de positivité pour des patients ou pour des échantillons

Premier auteur	Revue	Année	Etude				
			BKurie (% de patients)	BKurie (% d'échantillons)	BKémie (% de patients)	BKémie (% d'échantillons)	Néphropathie à virus BK
Thakur	Transplant Infectious Disease	2011	12/32 (37,5%)	17/108 (15,7%)	16/32 (50,0%)	27/108 (25,0%)	3/32 (9,3%)
Costa	Nephrol Dial Transplant	2008	42/229 (18,3%)	228/2025 (11,3%)	21/229 (9,2%)	93/2025 (4,6%)	3/229 (1,3%)
Pang	Journal of Clinical Microbiology	2007	36/155 (23,2%)	119/533 (22,3%)	6/155 (3,9%)	25/106 (23,6%)	
Bressollette- Bodin	American Journal of Transplantation	2005	59/104 (56,7%)	130/421 (30,9%)	30/104 (28,8%)	56/451 (12,4%)	
Moyenne			149/520 (28,7%)	494/3087 (16,0%)	73/520 (14,0%)	201/2690 (7,5%)	

NANCY	Etude rétrospective 2005-2009	57/293 (19,45%)	275/732 (37,60%)	13/293 (4,44%)	75/633 (11,80%)	5/293 (1,71%)
-------	-------------------------------	-----------------	------------------	----------------	-----------------	---------------

Dans quatre études réalisées par Thakur *et al.*, Costa *et al.*, Pang *et al.*, Bressollette-Bodin *et al.*, les pourcentages de positivité en termes de patients ou d'échantillons ont été publiés. Si l'on fait les moyennes des résultats de ces quatre études, une BKurie est présente pour 28,7 % des patients et pour 16,0 % des échantillons (Les résultats de la cohorte de Nancy sont une positivité pour 19,45 % des patients et 37,60 % des échantillons, la positivité étant plus faible en pourcentage de patients qu'en pourcentage d'échantillons). Une virémie est présente pour 14,0 % des patients et 7,5 % des échantillons en moyenne. Mais dans la cohorte de Nancy, la virémie n'est observée que pour 4,44 % des patients et 11,80 % des échantillons. La virémie est soit moins présente à Nancy du fait d'un meilleur contrôle de la réplication virale, soit tout simplement moins présente avec une immunosuppression finement adaptée au patient.

Un petit bémol est à noter. Dans l'étude menée par Bressollette-Bodin *et al.*, la virurie a été trouvée chez 56,7 % des 104 patients et la virémie chez 28,8 % d'entre eux. Mais, en ne prenant en considération uniquement les données obtenues à trois, six et douze mois en post transplantation, ces chiffres diminuent à 29 % et 17 % des patients respectivement. Il est vrai que plus le nombre d'échantillons collectés est important, plus la possibilité de détecter une charge virale est grande. D'où une grande prudence dans l'interprétation des données statistiques de ces différentes études [Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Pang *et al.*, 2007 - Costa *et al.*, 2008 - Thakur *et al.*, 2011].

(4) Prévalence de la néphropathie associée au virus BK

Dans l'étude rétrospective menée entre 2005 et 2009, cinq cas de néphropathies associées au virus BK ont été rapportés. Sur l'échantillon total des 293 patients, cela équivaut à une prévalence de 1,71 %. Cette prévalence est faible comparée à celle rapportée de la littérature variable en moyenne de zéro à dix pour cent (tableau XI, page 70). Elle peut même

être supérieure à 10 % : 12,5 % décrite par Sung *et al.*, 2008, mais dans cette étude, seuls les patients présentant une dysfonction rénale ont été inclus contrairement aux autres études qui incluent une population de patients transplantés rénaux. Pour Hirsch *et al.*, la néphropathie associée au virus BK est décrite comme survenant dans 8 % des greffes rénales, 6,5 % pour Bressollette-Bodin *et al.*, 1,30 % pour Costa *et al.*, 0,90 % pour Alméras *et al.* La prévalence décrite de la néphropathie tend à diminuer, étant donné la meilleure compréhension du mécanisme de la néphropathie induite par le virus BK [Hirsch *et al.*, 2002 - Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Costa *et al.*, 2008 - Sung *et al.*, 2008 - Alméras *et al.*, 2011].

(5) Périodicité du suivi pour le virus BK des patients ayant eu une transplantation

En 2003, la conférence de consensus sur la néphropathie associée au virus BK rapportée par Hirsch *et al.*, recommande de rechercher le virus BK en post transplantation au moins tous les trois mois durant les deux premières années et annuellement ensuite jusqu'à la cinquième année [Hirsch *et al.*, 2003]. Mais ce consensus a suggéré d'adapter ce suivi selon les centres de transplantation et ainsi différentes périodicités sont rapportées dans la littérature. La périodicité du suivi des patients transplantés rénaux et les modalités de suivi (charges virales sanguines et/ou urinaires) seront discutées dans l'étude prospective.

(6) Cinétique du virus BK

Les notions de cinétique du virus BK rapportées ici sont issues de l'analyse comparée de différentes publications.

Les délais médians de survenue d'une virurie sont compris entre le deuxième (1-12 mois) [Huang *et al.*, 2010] et le troisième mois en médiane [(1-24 mois) Ginevri *et al.*, 2007 - Thakur *et al.*, 2011].

Les délais médians de survenue de la virémie varient entre 60 jours (18-276) [Brennan *et al.*, 2005], 90 jours (23-214) [Alméras *et al.*, 2011] et 16 semaines (4-73) [Hirsch *et al.*, 2005].

L'intervalle médian décrit entre le pic de virurie et le pic de virémie est compris entre une et douze semaines [Hirsch *et al.*, 2002 - Brennan *et al.*, 2005 - Bechert *et al.*, 2010 - Bressollette-Bodin *et al.*, 2003].

Le délai médian entre la virémie et l'apparition de la néphropathie est également compris entre un et trois mois.

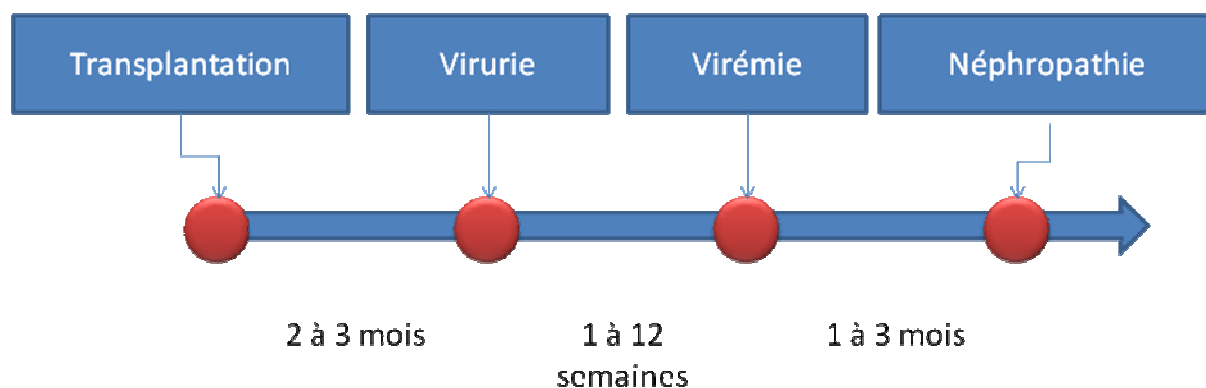


Figure 35 : Virus BK et cinétique

Dans l'étude rétrospective, malgré le faible nombre de patients ayant présenté une néphropathie associée au virus BK (cinq), hormis le patient P6 qui a présenté une néphropathie à virus BK sans virémie et le patient P7 qui a eu une réactivation, et hormis deux patients qui ont des viruries et virémies simultanées, deux patients P2 et P3 ont des cinétiques d'infection par le virus BK avec des délais proches de ceux rapportés ci-dessus (figure 35). Pour ces deux patients, la virurie est présente avant la virémie avec un délai moyen de 13,5 semaines. Le fait que deux patients présentent du virus BK au même moment dans le sang et dans les urines n'est pas réellement dû à la cinétique de l'infection par le virus BK ; il peut y avoir un biais du fait des modalités de suivi. En l'absence de protocole de suivi du virus BK, le suivi biologique du virus n'était pas toujours très régulier, et souvent consécutif à une dégradation de la fonction rénale. D'où la plus forte probabilité de décrire une virémie du virus BK.

La survenue d'une néphropathie associée au virus BK a lieu le plus souvent dans la première année qui suit la transplantation (Alméras *et al.*, Hirsch *et al.*) avec dans moins de 25 % des cas, une survenue entre la deuxième et la cinquième année. Pour Ramos *et al.*, et Vasudev *et al.*, ce délai médian est de onze et treize mois. Dans l'étude menée ici, la survenue de la néphropathie est plus tardive avec une médiane au diagnostic de la néphropathie de 23 mois et une moyenne de 19,4 mois en post transplantation [Hirsch *et al.*, 2005 - Vasudev *et al.*, 2005 - Ramos *et al.*, 2009 - Alméras *et al.*, 2011 - Thakur *et al.*, 2011].

Il est difficile de pouvoir comparer le délai entre la découverte de la virémie et le diagnostic de la néphropathie car celle-ci est objectivée par ponction biopsie rénale, réalisée en général après une virémie positive.

La plupart des suivis rapporte l'existence d'une virémie qu'en cas de virurie. Dans l'étude rapportée ici, tous les patients ayant eu une virémie, avaient une virurie. Babel *et al.*, ont montré qu'une virurie soutenue a non seulement une excellente sensibilité et spécificité pour prédire une virémie mais également pour prédire une néphropathie à virus BK (avec une anticipation de dix semaines sur le développement de la néphropathie) [Babel *et al.*, 2009].

Mais Bressollette-Bodin *et al.*, rapportent l'existence de trois patients greffés rénaux avec une virémie sans virurie. Ces cas suggèreraient la réactivation du virus BK à partir des cellules mononuclées sanguines. Ce sont des cas qui restent très rares. Dans ce travail, aucun profil de ce type n'a été observé [Bressollette-Bodin *et al.*, 2005].

La situation du patient P6 peut être discutée ; il s'agit d'un patient ayant eu une néphropathie associée au virus BK sans virémie à virus BK objectivée. Le passage virémique du virus BK a-t-il été trop bref pour être mis en évidence aux dates habituelles de suivi des patients transplantés rénaux ? Les analyses de biologie moléculaire ont-elles été réalisées au bon moment ? Dans ce cas, la présence d'une virurie a tout son intérêt pour alerter le clinicien quant aux risques de présence du virus BK et des lésions associées, en association avec l'ensemble des données clinico-biologiques du patient. En l'occurrence, en l'absence de suivi régulier du virus BK, les virémies sont sûrement passées inaperçues.

(7) Seuil de virémie prédictif d'une néphropathie induite par le virus BK

Différents seuils au-delà desquels le risque de néphropathie associée au virus BK est important, ont été proposés dans la littérature. Pour [Hirsch *et al.*, 2005], ce seuil est de $7,7.10^3$ copies/mL (seuil à partir duquel sont observées des lésions histologiques). Pour [Randhawa *et al.*, 2004], ce seuil est de 5.10^3 copies/mL. [Tong *et al.*, 2004] utilisent un seuil de 10^3 copies/mL de sang. Pour [Sung *et al.*, 2008], ce seuil est de $3,16.10^4$ copies/mL. [Costa *et al.*, 2008] appliquent un seuil de 10^4 copies/mL comme seuil prédictif de néphropathie induite par le virus BK.

Drachenberg *et al.*, et Ramos *et al.*, proposent un seuil de 10^4 copies/mL comme seuil prédictif d'une néphropathie [Drachenberg *et al.*, 2004 - Ramos *et al.*, 2009]. Costa *et al.* montrent que ce seuil de 10^4 copies/mL a une sensibilité de 100 %, une spécificité de 99,1 %, une valeur prédictive négative de 100 % et une valeur prédictive positive de 59,4 % pour le diagnostic de néphropathie à virus BK [Costa *et al.*, 2008]. Hirsch *et al.*, suggèrent qu'une charge virale supérieure à 10^4 copies/mL pendant plus de trois semaines est hautement prédictive d'une néphropathie. Il est à noter qu'une charge virale supérieure à 5.10^3 copies/mL est indiquée comme un facteur de risque important de néphropathie. Dans le tableau X, sont présentées les virémies maximales en fonction des seuils 10^4 et 5.10^3 copies/mL.

Tableau X : Patients de la cohorte et seuil prédictif de néphropathie

	P1 BKVAN	P2 BKVAN	P3 BKVAN	P4 BKVAN	P5 Rejet	P6 BKVAN
Virémie maximale (copies/mL)	$6,90.10^4$	$2,89.10^4$	$4,83.10^4$	$6,83.10^3$	$2,25.10^3$	0
Supérieure au seuil de 10^4	+	+	+	-	-	-
Supérieure au seuil de 5.10^3	+	+	+	+	-	-

Dans ce travail, un seuil de 10^4 copies/mL a une sensibilité de 60 %, une spécificité de 50 %, une valeur prédictive positive de 100 % et une valeur prédictive négative de 33 %. Un seuil de 5.10^3 copies/mL a ici une sensibilité de 80 %, une spécificité de 50 %, une valeur prédictive positive de 100 % et une valeur prédictive négative de 50 %. Il semble difficile d'interpréter ces données statistiques étant donné le faible nombre d'échantillons positifs.

Pour les charges virales détectables, se pose la question de leur signification : est-ce une infection latente à bas bruit, le début ou la fin d'une infection active délétère ? Les résultats décrits ci-dessus montrent qu'en général, face à une infection par le virus BK, les charges virales sont élevées (comme rapporté dans la littérature [Bressollette-Bodin *et al.*, 2005]). Une charge virale détectable au niveau sanguin doit être un signe d'alerte et de vigilance face à la surveillance du virus BK chez le transplanté rénal.

Tableau XI : Revue exhaustive de la littérature

Premier auteur	Revue	Année	Données rapportées de la littérature				Etude			
			BKurie	BKémie	Néphropathie à virus BK	BKurie (% de patients)	BKurie (% d'échantillons)	BKémie (% de patients)	BKémie (% d'échantillons)	Néphropathie à virus BK
Almeras	Transplant Infectious Disease	2011	35 à 40%	11 à 13%	0-8%			10,9%		0,9%
Thakur	Transplant Infectious Disease	2011	13 à 35,4%	13 à 29%	1 à 10%	37,5%	15,7%	50,0%	25,0%	9,3%
Huang	Clinical Transplantation	2010				45,6%		22,2%		5,6%
Babel	Transplantation	2009	15%			19,0%		7,0%		
Sung	J Korean Med Sci	2008	10 à 57%	5 à 29%	1 à 10%		28,1%		18,8%	12,5%
Mischitelli	Virology Journal	2008			8%					
Costa	Nephrol Dial Transplant	2008	24 à 40%	9 à 40%	1 à 10%	18,3%	11,3%	9,2%	4,6%	1,3%
Pang	Journal of Clinical Microbiology	2007	10 à 60%		8%	23,2%	22,3%	3,9%	23,6%	
Acott	Pediatr Nephrol	2007	18 à 33%	5 à 16%	2 à 8%					
Ginevri	American Journal of Transplantation	2007				62,9%		21,0%		0,0%
Bressollette-Bodin	American Journal of Transplantation	2005			6,50%	56,7%	30,9%	28,8%	12,4%	
Hirsch	Transplantation	2005			1 à 10%					
Randhawa	Journal of Clinical Microbiology	2004			8%					
Tong	Nephrol Dial Transplant	2004			1 à 5%					0,9%
Merlino	Journal of Vlnical Virology	2003	5 à 45%		3 à 5%		43,1%		11,8%	0,0%
Hirsch	The New England journal of Medicine	2002			1 à 5%	decoy cells 30%		13,0%		8,0%
Leung	Journal of virologic methods	2002	0 à 44%							

NANCY	Etude rétrospective 2005-2009				
	19,45%	37,60%	4,44%	11,80%	1,71%

7. Limites

Cette étude rétrospective a bien sûr des limites.

L'ensemble des patients des services de néphrologie ayant eu une demande de recherche du virus BK par PCR quantitative a été inclus. Il n'y aurait pas d'autre indication en néphrologie à rechercher le virus BK que le suivi des patients transplantés rénaux. Pour ces patients, cette recherche est systématique en cas de dégradation de la fonction rénale, en l'absence de suivi prospectif. En effet, l'absence de calendrier et de rythme de suivi du virus BK, a conduit à une recherche de virus BK en fonction du contexte clinique et non pas avec une périodicité régulière.

Un autre point critiquable est l'absence de quantification dans les urines. Néanmoins, quelle peut être la signification d'une charge virale sur un échantillon mictionnel d'un patient venu en consultation ? L'excrétion du virus BK est-elle homogène tout au long de la journée ? Ces données ne sont pas encore rapportées dans la littérature. La comparaison et l'intérêt éventuel des urines de vingt quatre heures par rapport aux urines fraîchement émises seront étudiés dans l'étude prospective.

En ce qui concerne la qualification de la virémie, celle-ci peut être recherchée dans des prélèvements de nature différente (sang total, plasma ou sérum selon les études). Les techniques de biologie moléculaire appliquées sont également différentes : choix des amorces de la région amplifiée par biologie moléculaire, seuil de sensibilité et seuil de quantification différents. Cependant, la littérature rapporte une intense répllication du virus BK en cas de néphropathie avec présence de milliers de copies de l'ADN du virus BK par millilitre de sang. Quelle que soit la technique et ses spécificités, celle-ci doit être en mesure de quantifier la virémie.

Un dernier point soumis à discussion est le seuil de détectabilité du virus BK au niveau sanguin. Avec la technique de PCR quantitative rapportée dans ce travail, le seuil de détectabilité est de 1300 copies/mL de sang. La mise en place d'une nouvelle technique au laboratoire pourrait diminuer ce seuil à 500 copies/mL, ce qui pose alors des questions quant à l'abaissement du seuil et l'augmentation des positivités des virémies de surcroît.

8. Conclusion

Le diagnostic de l'infection à virus BK chez le transplanté rénal s'est considérablement amélioré depuis l'utilisation des techniques de biologie moléculaire. Les infections à virus BK se manifestent quand l'équilibre de la situation de latence du virus est rompu. La mise en évidence du virus dans le sang ou l'urine est le constat objectif de sa réactivation.

Les charges virales élevées et quantifiables (supérieures à 5.10^3 ou 10^4 copies/mL) constituent le reflet d'une réactivation virale active. Les facteurs de risque liés à la réactivation du virus en post transplantation restent encore à ce jour mal établis. La transplantation est en elle-même un facteur de risque sachant qu'un des sites principaux de latence du virus BK est l'épithélium rénal.

L'étude de l'efficacité des traitements antiviraux n'a pas été envisagée ici. Les patients avec une néphropathie prouvée ont été traités par du cidofovir. Ce point nécessiterait une étude plus approfondie.

L'intérêt de cette étude rétrospective est de faire le point de l'apport de la biologie moléculaire dans la pathologie associée au virus BK chez le transplanté rénal. La prévalence de la néphropathie a également été comparée à la littérature. A Nancy, elle est de 1,71 %, ce qui est dans les valeurs basses rapportées. A l'échelon local, l'immunosuppression est *a priori* finement adaptée à l'état du patient contrairement à d'autres centres qui préfèrent utiliser une immunosuppression plus forte. Certains auteurs décrivent l'infection par le virus BK comme résultant systématiquement d'un excès d'immunosuppression [Celik *et al.*, 2003 - Beimler *et al.*, 2007].

Afin d'approfondir ces données, une étude prospective du suivi des patients ayant eu une transplantation rénale au premier semestre 2010 au CHU de Nancy a été réalisée ; deux modalités de suivi du virus BK chez ces patients vont être comparées.

B. Etude prospective de suivi du virus BK chez des patients transplantés rénaux au cours du premier semestre 2010

1. Problématique et objectifs de l'étude

En coopération avec le service de néphrologie du CHU de Nancy, ce travail s'est centré sur le suivi des patients ayant eu une transplantation rénale au cours du premier semestre de l'année 2010.

Dans un premier temps, cette étude prospective a pour intérêt de comparer le suivi du virus BK par charge virale sanguine ou urinaire et dans un deuxième temps, cette étude a pour objectif de proposer un algorithme de suivi du virus BK chez des patients ayant eu une transplantation rénale.

L'objectif général de cette étude prospective est de montrer l'intérêt d'instaurer un tel suivi chez le patient transplanté rénal.

2. Matériels et méthodes

a) Population étudiée

Ont été inclus les patients ayant eu une transplantation rénale au cours du premier semestre de l'année 2010.

A chaque patient a été attribué un numéro, le patient 1 étant celui ayant eu la première transplantation rénale en 2010, le patient 2 la deuxième et ainsi de suite... Ces patients sont répartis en deux groupes (figure 36, page 74) :

- D'une part, les patients ayant un numéro impair
- D'autre part, les patients ayant un numéro pair

Les patients avec un numéro impair sont suivis par recherche du virus BK par biologie moléculaire dans les urines tandis que les patients avec un numéro pair sont suivis par recherche du virus BK dans le sang total. En cas de positivité d'une virurie, à la consultation suivante, sera prévue une recherche couplée du virus BK à la fois dans les urines et dans le sang.

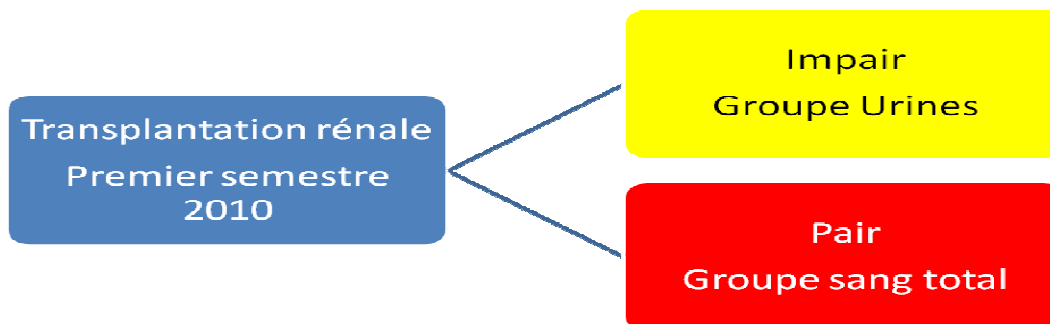


Figure 36 : Répartition des patients de l'étude prospective

b) Mise en place du suivi de ces patients

Après revue et comparaison des suivis rapportés dans la littérature, il est choisi d'établir un suivi qui se déroule de la façon suivante : suivi en post transplantation à un mois, deux mois, trois mois, six mois, neuf mois et enfin douze mois. Les données ont été recueillies jusqu'au 30 juin 2011 inclus pour avoir l'année entière de suivi des transplantés rénaux dans l'exploitation des résultats.

La recherche du virus BK dans les urines du suivi de l'étude prospective correspond à la recherche de virus dans des urines fraîchement émises par le patient lors de sa consultation de suivi au service de Néphrologie Transplantation – Hôpital de jour Greffes.

c) Critères d'inclusion ou d'exclusion

Tous les patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale au cours du premier semestre de l'année 2010 ont été associés à cette étude, sans autre critère d'inclusion particulier. L'origine du donneur du greffon à savoir donneur vivant ou décédé n'a pas également été retenue comme critère discriminant. L'intérêt de ce travail est de réaliser ce suivi sur les patients ayant eu une transplantation rénale à compter du premier janvier 2010 sans autre critère discriminant.

Deux patients ayant eu une transplantation rénale à Nancy mais n'ayant pas eu de suivi biologique du virus BK au laboratoire de virologie du CHU de Nancy ont été exclus. Le premier patient exclu a effectivement bénéficié d'une transplantation rénale à Nancy mais est suivi à Tahiti. Le deuxième patient exclu est un patient pour lequel le greffon a été retiré après un délai d'un mois post-transplantation pour non fonction primaire du greffon.

d) Description de la population

37 transplantations ont été réalisées entre le premier janvier et le 30 juin 2010. L'effectif réel de la population est de 35 patients car deux patients ont effectivement eu une transplantation à Nancy mais n'ont pas eu de suivi biologique du virus BK au laboratoire de virologie du CHU de Nancy. Au sein de cette population, le sexe ratio est 71,42 % de patients de sexe masculin et 28,57 % de sexe féminin.

La moyenne d'âge des patients de cette population s'élève à 48 ans avec une médiane à 48 ans également. Le patient le plus jeune est âgé de 23 ans et le patient le plus âgé de 78 ans (figure 37).

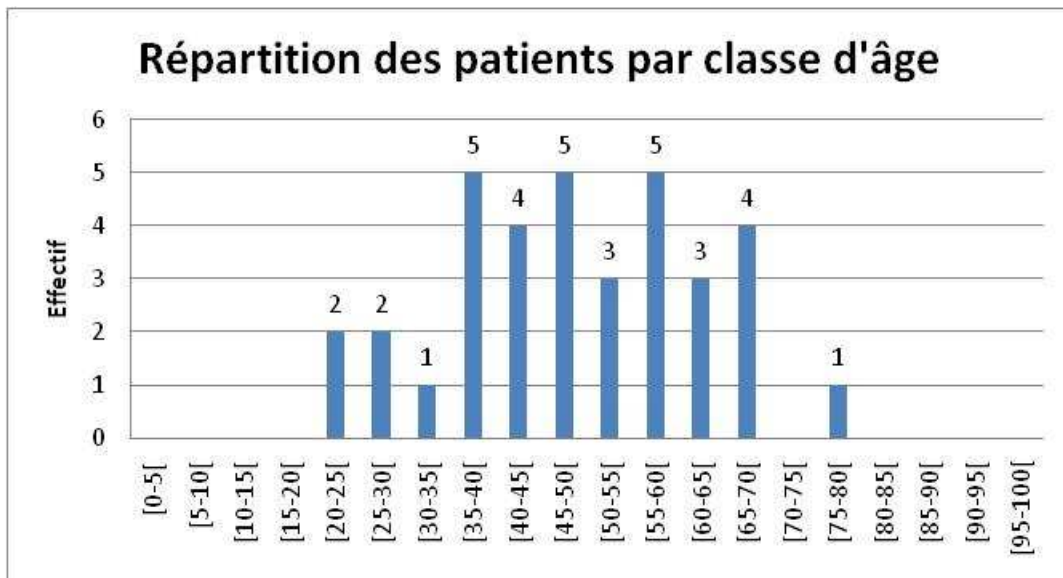


Figure 37 : Histogramme de répartition des patients de l'étude prospective par classe d'âge

Les patients avec un numéro impair sont suivis par recherche du virus BK par PCR dans les urines (19 patients) tandis que les patients avec un numéro pair sont suivis par recherche du virus BK dans le sang total (16 patients, du fait de l'exclusion de deux patients).

e) Marqueurs

Le suivi des patients transplantés rénaux a été effectué par recherche du virus BK par PCR quantitative dans les liquides biologiques (urines ou sang total en fonction du groupe du patient). Cette technique présente l'avantage d'être sensible et spécifique. Elle est réalisée au

laboratoire de virologie du CHU de Nancy par petite série (*Idem* étude rétrospective – Partie Matériels et méthodes).

f) En pratique

Afin de minimiser les risques d'oubli de prescription ou de demande sur urines au lieu de sang total ou *vice versa*, les prescriptions de virus BK ont été intégrées au système informatique du service de néphrologie, le logiciel Diatelic, qui met en parallèle les examens biologiques à réaliser aux rendez-vous du patient.

3. Résultats

a) Suivi des patients de l'étude prospective premier semestre 2010

(1) Données générales

35 patients ayant eu une transplantation rénale au cours du premier semestre de l'année 2010 ont été suivis. Dans le tableau XII, sont détaillés les résultats généraux des charges virales sanguines et/ou urinaires du virus BK réalisées chez les patients sans forcément respecter le strict protocole de suivi aux mois 1, 2, 3, 6, 9 et 12. L'intérêt de récupérer ces données est la possibilité de comparaison avec l'étude rétrospective.

Tableau XII : Résultats généraux

ADN BKV UR	Nombre d'échantillons	Pourcentage		Etude rétrospective
Positif	56	23,05%	29,22%	37,60%
DéTECTABLE	15	6,17%		
Négatif	172	70,78%	70,78%	62,40%
	243	100,00%		
ADN BKV SGT	Nombre d'échantillons	Pourcentage		Etude rétrospective
Positif	8	3,72%	13,49%	11,80%
DéTECTABLE	21	9,77%		
Non détectable	186	86,51%	86,51%	88,20%
	215	100,00%		

PCR virus BK dans les urines

En analysant les résultats de ces différents prélèvements, il apparaît que près d'un tiers des urines (29,22 %) contiennent de l'ADN du virus BK en quantité détectable ou quantifiable. 70,78 % des urines n'ont pas d'ADN du virus BK qui a été amplifié.

Cela revient à conclure une négativité pour 70,78 % des urines et une positivité pour 29,22 % (avec une positivité définie par une détection d'une charge virale que celle-ci soit quantifiable ou non), résultats cohérents avec ceux obtenus dans l'étude rétrospective.

PCR Virus BK dans le sang

Seuls 3,72 % des prélèvements sanguins sont positifs pour l'ADN du virus BK et 86,51 % des échantillons négatifs. 9,77 % des prélèvements sanguins ont une charge virale pour le virus BK qualifiée de détectable car, la charge virale retrouvée étant plus faible que le premier point de la gamme de calibration, elle ne peut pas être quantifiée.

Cela revient à conclure une négativité pour 86,51 % des échantillons de sang total et une positivité pour 13,49 % des échantillons de sang (avec une positivité définie par une détection d'une charge virale que celle-ci soit quantifiable ou non). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans l'étude rétrospective.

(2) Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans les urines

Si ne sont prises en compte que les données obtenues aux dates du protocole de suivi (M1, M2, M3, M6, M9, M12), les résultats suivants sont obtenus pour les patients du groupe Impair/suivi urines (tableau XIII). Le suivi de ce groupe a permis d'analyser 88 échantillons sur les 114 attendus.

Tableau XIII : Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans les urines

		Nombre	Pourcentage
BK UR	Négatif	65	73,86%
	Détectable	9	10,23%
	Positif	14	15,91%
	total	88	100,00%

Dans le groupe suivi par charge virale urinaire, le virus BK n'est pas présent pour 12 des 19 patients. Il est présent pour sept des patients de ce groupe (U1 à U7) et l'évolution des paramètres biologiques à 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois est décrite ci-dessous (tableau XIV).

Tableau XIV : Résultats des patients du groupe urines avec virurie (ND = non détectable)

Patient - groupe urines		Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 6	Mois 9	Mois 12
U1	Urines	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Détectable	Négatif
	Sang						
U2	Urines	Détectable	Positif	Positif	Détectable	Positif	Négatif
	Sang		ND	ND	ND	ND	ND
U3	Urines	Détectable	Détectable	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
	Sang		ND				
U4	Urines	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Positif	Détectable
	Sang						
U5	Urines	Détectable	Positif	Détectable	Négatif	Négatif	Positif
	Sang		ND	ND	ND	ND	ND
U6	Urines	Négatif	Négatif	Positif	Positif	Positif	Négatif
	Sang			Détectable	Négatif		
U7	Urines		Positif	Détectable	Positif	Positif	Positif
	Sang		Détectable	Positif	Détectable	Positif	Détectable

Un des patients du groupe urines, le patient U7, a présenté des lésions fortement évocatrices de néphropathie à virus BK au cours de l'étude prospective avec une virémie maximale à 13 358 copies/mL.

(3) Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans le sang

Si ne sont prises en compte que les données obtenues aux dates du protocole de suivi (M1, M2, M3, M6, M9, M12), les résultats suivants (tableau XV, page 79) sont obtenus pour les patients du groupe Pair/suivi sang. Ce groupe comprend seize patients et 96 échantillons (16 x 6) étaient attendus. Seuls 75 échantillons ont été recueillis suite à des difficultés de mise en place de l'étude, avec 72 résultats négatifs et 3 présentant une charge virale du virus BK détectable.

Tableau XV : Résultats du groupe avec recherche de virus BK dans le sang

		Nombre	Pourcentage
BK SGT	Non détectable	72	96 %
	Détectable	3	4 %
	Positif	0	0,00%
	total	75	100,00%

Dans le groupe suivi par charge virale sanguine, le virus BK n'est pas mis en évidence pour 14 des 16 patients de ce groupe. Les spécificités des deux patients dont les échantillons de sang ont révélé la présence de virus BK sont décrites brièvement ci-dessous.

Le premier patient S1 est un homme ayant bénéficié d'une transplantation après insuffisance rénale chronique consécutive à la toxicité d'une chimiothérapie dans le traitement d'une leucémie aiguë lymphoblastique. Le virus BK est détectable dans le sang les sixième et neuvième mois suivant la transplantation rénale mais ne l'est plus le douzième mois. Ce patient est suivi d'une part par le service de néphrologie transplantation et d'autre part par le service d'hématologie. Il est à noter que des recherches de virus BK ont été réalisées dans les urines en post transplantation rénale immédiat à la demande du service d'hématologie ; le virus BK était déjà présent dans les urines en post transplantation rénale immédiat et ce pendant toute la durée de cette étude prospective. Lors d'une biopsie réalisée au neuvième mois post transplantation rénale est mise en évidence une discrète nécrose épithéliale tubulaire sans argument pour un rejet ou une infection par le virus BK, mais plutôt en faveur d'une toxicité des immunosuppresseurs.

Le second patient S2 est une patiente ayant présenté un seul échantillon de sang avec du virus BK détectable au sixième mois post greffe sans autre échantillon positif, sans signe clinique particulier.

(4) Résumé des résultats de cette étude prospective

Ci-dessous sont résumés les résultats de l'étude prospective des transplantés rénaux du premier semestre 2010 (figure 38, page 80).

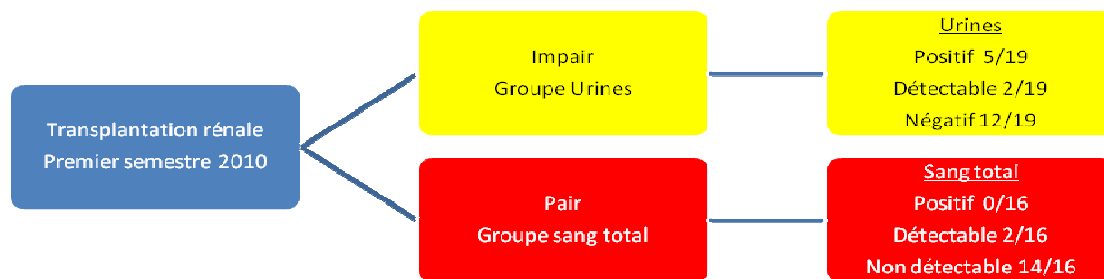


Figure 38 : Résultats de l'étude prospective (en nombre de patients)

(5) Déroulement du suivi : détection de charges virales positives en cas de charges virales urinaires positives

En cas de charges virales urinaires positives, une recherche couplée du virus BK à la fois dans le sang et dans les urines est effectuée. Les résultats des charges virales sanguines pour les patients ayant des viruries positives sont présentés ci-dessous (tableau XVI et figure 39, page 81).

Tableau XVI : Résultats des virémies en cas de virurie positive

		Nombre	Pourcentage
BK SGT	Non détectable	39	66,10%
	DéTECTable	12	20,34%
	Positif	8	13,56%
	total	59	100,00%

En présence d'une charge virale urinaire positive, le virus BK est également présent au niveau sanguin dans un tiers des cas (33,90 %) avec une charge virale quantifiable pour 13,56 % des échantillons et une charge virale uniquement détectable pour 20,34 % des échantillons.

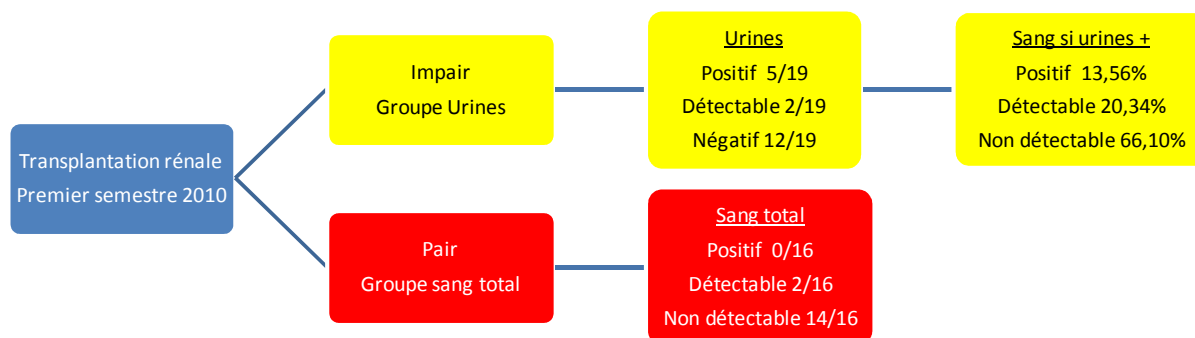


Figure 39 : Résultats complets de l'étude prospective

Un seul patient, du groupe avec suivi urinaire, a présenté des lésions fortement évocatrices de néphropathie associée au virus BK. L'incidence de la néphropathie est d'un patient sur 35 patients inclus soit 2,86 %, avec des réserves évidentes liées au faible nombre de patients inclus dans cette étude.

c) Cinétique des charges virales urinaires et sanguines

La cinétique des charges virales sanguines et urinaires du virus BK pour le patient U7 sera décrite (figure 40, page 82) (comme pour l'étude rétrospective, la virémie décrite sur l'axe des ordonnées de gauche est quantifiée, tandis que la virurie rapportée sur l'axe des ordonnées de droite est décrite de la façon suivante : 2 pour une virurie avec charge virale positive pour le virus BK dans les urines, 1 pour une virurie avec charge virale du virus BK détectable dans les urines, 0 pour une absence de virurie).

Ce patient, un homme de 59 ans, a bénéficié d'une transplantation rénale le 19 mars 2010 dans un contexte de dysplasie rénale avec reflux vésico-urétéral diagnostiqué en 1981. Du fait de la positivité du virus BK en post greffe, une recherche du virus BK rapprochée tous les quinze jours est réalisée chez ce patient. En juin 2010, en raison de la présence conjointe du virus BK dans le sang et dans les urines, le traitement immunosuppresseur est diminué. En juillet 2010, la créatininémie est augmentée mais stable à 20 mg/L, la protéinurie passe de 0,6 à 1 gramme par vingt-quatre heures, le virus BK toujours présent dans les liquides biologiques. Une biopsie du greffon rénal met en évidence des lésions de tubulite lymphocytaire avec des modifications des cellules épithéliales à type de noyau vésiculeux, très en faveur d'une néphropathie associée au virus BK.

Le traitement a été une minimisation de l'immunosuppression avec réduction des doses d'immunosuppresseur de moitié par rapport à la posologie initiale et dix cures de cidofovir entre août 2010 et janvier 2011. L'évolution a été bonne mais avec persistance de la virurie.

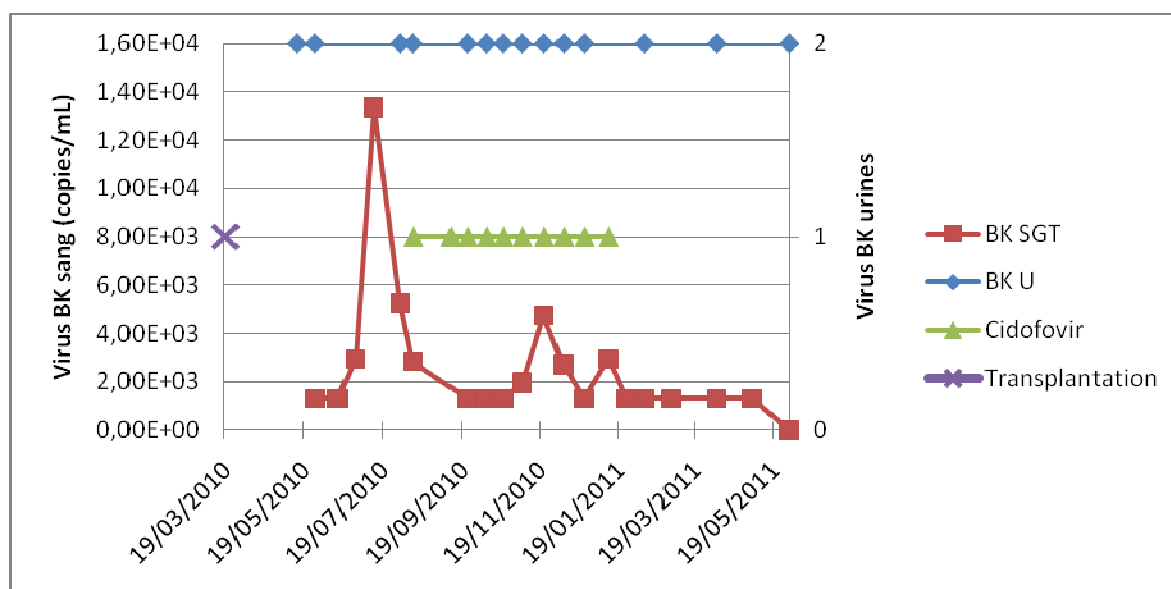


Figure 40 : Cinétique des charges virales sanguines et urinaires du patient U7

Dès la première recherche du virus BK (figure 40) (analyse réalisée le cinquante sixième jour soit à la huitième semaine suivant la transplantation au lieu du premier mois) et durant toute l'étude prospective, le virus BK a été détecté dans les urines de ce patient. La virémie, détectable à la dixième semaine s'est ensuite positivée avec une charge virale quantifiable au cours de la quinzième semaine (14,4 s). Le maximum à 13 358 copies/mL est atteint à la seizième semaine post transplantation. La créatininémie est alors augmentée, voisine de 20 mg/L avec protéinurie.

La positivité du virus BK dans les urines de ce patient a permis d'instaurer un suivi rapproché de la multiplication du virus BK et l'authentification de façon précoce des lésions de néphropathie associées au virus BK.

d) Comparaison des urines de 24 heures par rapport aux urines fraîches

Il est intéressant de s'interroger quant à l'intérêt d'urines fraîchement émises par rapport à des urines de 24 heures pour la recherche du virus BK dans les urines par biologie moléculaire. Les urines appelées de 24 heures correspondent à l'ensemble des urines d'un patient collectées pendant 24 heures après vidange de la vessie, l'analyse étant effectuée dans ce cas sur un aliquot du volume d'urines recueillies.

Une comparaison entre urines fraîches et urines de 24 heures a été réalisée pour quelques patients, à savoir quinze patients. Pour ces patients, sont comparés les résultats des charges virales du virus BK dans un échantillon d'urines fraîches et dans un échantillon d'urines de 24 heures (tableau XVII).

Tableau XVII : Comparaison des urines fraîches et urines de 24 heures

	Urines fraîches		Urines de 24 heures	
	Résultat	Quantification (copies/mL)	Résultat	Quantification (copies/mL)
Patient 1	négatif		négatif	
Patient 2	négatif		négatif	
Patient 3	négatif		négatif	
Patient 4	négatif		négatif	
Patient 5	négatif		négatif	
Patient 6	positif	6.10^8	positif	$3,41.10^8$
Patient 7	négatif		négatif	
Patient 8	négatif		négatif	
Patient 9	négatif		négatif	
Patient 10	positif	$5,67.10^8$	positif	$3,50.10^8$
Patient 11	positif	$2,2.10^6$	positif	$1,97.10^5$
Patient 12	déTECTABLE	885,45	déTECTABLE	1041,21
Patient 13	positif	$2,6.10^5$	positif	$3,3.10^4$
Patient 14	négatif		négatif	
Patient 15	négatif		négatif	

Sur quinze patients, cinq présentent une excrétion de virus BK dans les urines ce qui correspond à une excrétion urinaire de 33 %.

Les échantillons négatifs sur urines fraîches sont également bien négatifs au niveau des urines de 24 heures. Ces premières données permettent de considérer les urines fraîches comme comparables aux urines de 24 heures pour la recherche de virus BK par biologie moléculaire. Il n'y aurait pas de faux négatif sur urine fraîche par rapport aux urines de 24 heures. L'excrétion du virus BK dans une urine fraîchement émise serait représentative de l'excrétion du virus BK à l'échelle d'une journée. D'où la réalisation de l'étude prospective pour les patients ayant eu une transplantation rénale au cours de l'année 2010 avec des échantillons d'urines fraîchement émises par les patients lors de leur venue en consultation.

Par ailleurs, les échantillons d'urines fraîches contenant de l'ADN du virus BK sont également retrouvés positifs pour l'ADN du virus BK dans les urines de 24 heures. Il est intéressant de s'interroger sur la comparaison de l'intensité de l'excrétion du virus dans des urines fraîches et des urines de 24 heures. Il n'y a pas de différence importante dans la quantification de la charge virale entre ces deux types de prélèvements. Les charges virales quantifiées sont du même ordre de grandeur. Si l'on compare les valeurs en échelle logarithmique, une variation de plus ou moins 0,3 log n'est pas considérée comme significative. Ici l'écart moyen entre urines fraîches et urines de 24 heures est de 0,34 log, valeur faiblement significative.

Initialement, nous nous inquiétions de la possibilité d'avoir des urines faussement négatives sur les urines fraîches par rapport aux urines de 24 heures. Cela ne semble pas le cas. Peu importe si les quantifications diffèrent légèrement, les résultats étant rendus, au laboratoire de virologie du CHU de Nancy, de façon qualitative dans les urines : positif/délectable/négatif.

4. Discussion

Comme pour l'étude rétrospective, la discussion sera structurée en plusieurs points.

a) Protocole de suivi des patients ayant eu une transplantation rénale

Tout d'abord, le choix du protocole et la périodicité de suivi des patients ayant eu une transplantation rénale peuvent être discutés.

En 2003, la conférence de consensus sur la néphropathie associée au virus BK rapportée par Hirsch *et al.*, recommande de réaliser un suivi du virus BK en post transplantation au moins tous les trois mois durant les deux premières années et annuellement ensuite jusqu'à la

cinquième année. Mais, ce consensus suggère d'adapter ce suivi selon les centres de transplantation. Babel *et al.*, proposent un suivi des patients à deux semaines, trois, six, neuf puis douze mois. Costa *et al.*, ont suivi une cohorte de 229 patients à une périodicité bimensuelle les trois premiers mois puis trimestrielle ensuite. Ginevri *et al.*, proposent un suivi à un mois, trois mois, six mois, neuf mois, douze mois, dix-huit mois, vingt-quatre mois, trente-six mois et quarante-huit mois. Un tableau récapitulatif (figure 41, page 86) de la majorité des suivis effectués a été établi en collaboration avec les néphrologues.

Après étude de ces divers protocoles rapportés par la littérature, il a été choisi de réaliser ce suivi en post transplantation à 1 mois, 2 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois. [Hirsch *et al.*, 2002 - Merlino *et al.*, 2003 - Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Hirsch *et al.*, 2005 - Ginevri *et al.*, 2007 - Accott *et al.*, 2007 - Pang *et al.*, 2007 - Costa *et al.*, 2008 - Babel *et al.*, 2009 - Gautam *et al.*, 2010 - Huang *et al.*, 2010 - Renoult *et al.*, 2010 - Alméras *et al.*, 2011 - Thakur *et al.*, 2011]

			Protocole de suivi après transplantation rénale													
Premier auteur	Revue	Année	15 jours	1 mois	1 mois 1/2	2 mois	2 mois 1/2	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	7 mois	8 mois	9 mois	10 mois	12 mois
Thakur	Transplant Infectious Disease	2011		x				x			x					
Almeras	Transplant Infectious Disease	2011		x		x		x	x		x					x
Gautam	Transplantation Proceedings	2010		x		x		x	x	x	x			x		x
Huang	Clinical Transplantation	2010		x				x			x			x		x
Renoult	Transplantation Proceedings	2010		x		x		x			x			x		x
Babel	Transplantation	2009	x	x		x		x			x			x		x
Costa	Nephrol Dial Transplant	2008	x	x	x	x		x			x			x		x
Pang	Journal of Clinical Microbiology	2007				x		x	x	x	x		x		x	x
Acott	Pediatr Nephrol	2007						x			x			x		x
Ginevri	American Journal of Transplantation	2007		x				x			x			x		x
Bressollette-Bodin	American Journal of Transplantation	2005		x		x		x			x			x		x
Hirsch	Transplantation	2005						x			x			x		x
Merlino	Journal of Vlnical Virology	2003														
Hirsch	The New England journal of Medicine	2002						x			x					x
NANCY	ETUDE PROSPECTIVE	2010		x		x		x			x			x		x

Figure 41 : Comparaison de différents protocoles de suivi du virus BK en post-transplantation

b) Urines fraîchement émises ou urines de 24 heures

Le virus BK a été recherché, dans cette étude prospective, par PCR quantitative, dans les urines fraîchement émises par des patients lors de leur venue en consultation. En effet, se pose la question de l'excrétion du virus sur une période de 24 heures, la variabilité de cette excrétion, l'intérêt d'une analyse sur une urine extemporanée.

Dans la littérature, la grande majorité des études envisagent un suivi des patients transplantés rénaux par une charge virale réalisée sur urines, sans préciser la nature de cet échantillon d'urines (urines fraîches, ou de 24 heures, ou première miction du matin). Par ailleurs, Leung *et al.*, rapportent l'absence de différence significative entre les charges virales réalisées à partir du surnageant ou du sédiment urinaire [Leung *et al.*, 2001]. Les urines fraîches semblent être équivalentes aux urines de 24 heures (avec des limites concernant le faible nombre de patients étudiés).

c) Positivité dans le sang ou dans l'urine - Cinétique

Dans cette étude prospective, seuls deux patients S1 et S2 ont eu des charges virales détectables pour le virus BK entre le sixième et le neuvième mois suivant la transplantation. Pour le patient S1, la virurie a été positive tout au long de l'étude prospective avec deux petits pics de détectabilité du virus BK au niveau sanguin. Dans de telles situations, le suivi du virus BK par biologie moléculaire au niveau sanguin permet de s'affranchir de l'excrétion urinaire persistante du virus BK et de détecter les réels moments d'atteinte systémique du virus BK. En effet, les lésions de néphropathies sont associées à un passage systémique du virus qui peut être détecté par les virémies.

Sept patients du groupe urine ont eu une charge virale du virus BK détectable ou positive dans les urines. Ces patients sont classés en trois groupes (tableau XVIII, page 88) :

- Ceux avec virurie ponctuelle
- Ceux avec virurie persistante sans virémie. Une virurie persistante est définie comme une positivité sur au moins deux échantillons d'urines (détectabilité non prise en compte pour établir une virurie persistante).
- Ceux avec virurie persistante et virémie

Tableau XVIII : Description des patients du groupe urine en trois groupes

Virurie ponctuelle	Virurie persistante sans virémie	Virurie persistante avec virémie
U1	U2	U6
U3		U7
U4		
U5		

- Les patients U1, U3, U4, U5 ont présenté des viruries ponctuelles, témoins d'une excrétion ponctuelle de virus BK.
- Un patient U2 a présenté une virurie persistante sans virémie. Chez ce patient U2, un suivi de la réactivation du virus BK au niveau sanguin aurait été plus intéressant et plus informatif qu'un suivi urinaire.
- Deux patients U6 et U7 ont présenté des viruries persistantes avec virémie.

U6 a présenté dans un ensemble de viruries positives, une détectabilité du virus BK au troisième mois post transplantation. Les biopsies rénales n'ont pas été contributives chez ce patient compte tenu de la fibrose entourant le greffon. Une suspicion de rejet humoral est évoquée chez ce patient avec apparition d'anticorps anti-greffon à 2,5 mois post greffe. Le patient a dû présenter une légère réactivation du virus BK dans ce contexte de rejet humoral.

Pour le patient U7, dont la biopsie rénale fait état de lésions fortement évocatrices d'infection par le virus BK, ce dernier est présent dès la première analyse en post transplantation réalisée à J56 au lieu de J30 pour des raisons qui ne sont pas connues. Cette analyse positive, a justifié un contrôle à quatorze jours. La présence conjointe du virus BK dans le sang et les urines lors de contrôle a conduit à une minimisation du traitement immunosuppresseur.

Babel *et al.*, ont montré que le pic de réplication du virus BK dans le sang est observé à une médiane de 10 (5-51) semaines, après transplantation. Pour Brennan *et al.*, le maximum de virémie survient à 60 jours en post transplantation. Pour le patient U7, la virémie est passée par un maximum à 13 358 copies/mL 16,4 semaines après la transplantation. Comme évoqué

dans l'étude rétrospective, cette valeur de virémie est supérieure aux seuils prédictifs de néphropathie rapportés dans la littérature ($7,7.10^3$ copies/mL pour Hirsch *et al.*, 10^4 copies/mL pour Drachenberg *et al.*). Une biopsie rénale réalisée quelques jours après cette virémie maximale (soit à J126 ou semaine 18 post transplantation), révèle des lésions épithéliales tubulaires évocatrices d'une infection par le virus BK. Néanmoins, il n'y a pas eu d'immunohistochimie réalisée.

Le patient U7 a ensuite bénéficié de dix cures de cidofovir. A la suite de ces cures, à une distance d'un an après la transplantation, le virus BK est resté détectable au niveau sanguin et positif dans les urines.

La seule conduite possible est la minimisation de l'immunosuppression. Au bout de quatorze mois post transplantation, le virus BK s'est négativé dans le sang mais restait positif dans les urines (tableau XIX).

Tableau XIX : Cinétique de l'infection par le virus BK pour le patient U7

Paramètres	Délais post transplantation
Première virurie positive	J56 – 8 semaines
Première virémie détectable	J70 – 10 semaines
Maximum de virémie	16,4 semaines
Diagnostic de néphropathie	18,0 semaines
Négativation de la virémie	Quatorze mois
Négativation de la virurie	Non observée

Les deux patients U6 et U7 montrent tout l'intérêt du suivi du virus BK au niveau urinaire pour une détection précoce de la réactivation du virus BK. La présence urinaire persistante du virus BK a permis une surveillance précoce du virus BK par recherche du virus BK au niveau sanguin [Hirsch *et al.*, 2002 - Drachenberg *et al.*, 2004 - Brennan *et al.*, 2005 - Babel *et al.*, 2009].

d) Incidence de la néphropathie associée au virus BK

L'incidence de la néphropathie dans cette étude prospective est de 2,86 % (un patient sur les 35 suivis), ce qui est comparable aux données de la littérature rapportées dans la discussion de l'étude rétrospective. Pour Hirsch *et al.*, la néphropathie associée au virus BK

est décrite comme survenant dans 8 % des greffes rénales, 6,5 % pour Bressollette-Bodin *et al.*, 1,30 % pour Costa *et al.*, 0,90 % pour Alméras *et al.* [Hirsch *et al.*, 2002 - Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Costa *et al.*, 2008 - Alméras *et al.*, 2011].

e) Suivi par charge virale sanguine ou urinaire

L'instauration du suivi de la réplication du virus BK dans le sang ou dans les urines reste à ce jour un sujet très débattu.

Le suivi du virus BK dans les urines peut être réalisé soit par recherche de « *decoy cells* » soit par mise en évidence de l'ADN du virus. Une BKurie persistante est définie comme la positivité du virus BK dans au moins deux échantillons d'urines.

Les valeurs de sensibilité, spécificité, valeur prédictive négative ou positive rapportées dans la littérature pour ces paramètres ont été comparées (tableau XX). Les « *decoy cells* » ont une sensibilité comprise entre 25 % et 100 %, valeur égalant celle de l'ADNurie. La sensibilité est ici très variable car la cytologie urinaire est une technique manuelle, opérateur dépendant. La spécificité des « *decoy cells* » est comprise entre 71 et 84 % contre 78 à 91 % pour l'ADNurie. Pour ces deux paramètres, l'intérêt réside dans leur très forte valeur prédictive négative de 100 % rapportée par Babel *et al.*, et Hirsch *et al.* Ceci signifie qu'en l'absence de « *decoy cells* » ou de BKurie, le diagnostic de néphropathie associée au virus BK est fortement exclu.

En ce qui concerne la virémie, Hirsch *et al.* et Babel *et al.* rapportent des valeurs comparables de sensibilité à 100 %, de spécificité comprise entre 88 et 96 %, de valeur prédictive positive variant entre 43 et 50 % et de valeur prédictive négative de 100 %. En présence d'une virémie, une néphropathie associée au virus BK n'est présente que chez la moitié des patients.

Tableau XX : Comparaison statistique entre ADNurie, « *decoy cells* » et ADNémie

	BKurie				BKémie			
	Decoy Cells	Decoy Cells	BKurie persistante	BKurie persistante				
Bibliographie	Hirsch, 2002	Bechert, 2010	Babel, 2009	Bechert, 2010	Nickeleit, 2000	Hirsch, 2002	Babel, 2009	Bechert, 2010
Sensibilité	100%	25%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Spécificité	71%	84%	91%	78%	88%	88%	96%	91%
Valeur prédictive positive	29%		21,40%			50%	43%	
Valeur prédictive négative	100%		100%			100%	100%	

[Nickeleit *et al.*, 2000 - Hirsch *et al.*, 2002 - Babel *et al.*, 2009 - Bechert *et al.*, 2010]

f) Intérêts-Inconvénients du suivi urinaire et comparaison entre *Decoy cells* et virurie

Une néphropathie à virus BK est dans la plupart des cas précédée d'une virurie à la clinique silencieuse au départ. Un échantillon d'urines est un liquide biologique de recueil aisé, non invasif, bien accepté par le patient de façon générale.

Une technique de suivi des patients transplantés rénaux peu onéreuse est l'analyse du sédiment urinaire par coloration de Papanicolaou, qui révèle la présence des « *decoy cells* ». Mais il s'agit d'une lecture opérateur dépendant. La recherche du virus par biologie moléculaire est plus sensible que la cytologie urinaire. La présence de virus circulant peut être associée avec une néphropathie active car les virions peuvent entrer dans la circulation à travers les capillaires péri tubulaires. Par conséquent, la détection de l'ADN du virus BK dans les urines par biologie moléculaire a été proposée comme marqueur précoce du diagnostic de la néphropathie à virus BK. Ainsi, Drachenberg *et al.*, rapportent que, la virurie précédant la virémie, est un signe précoce de réplication virale.

Hirsch *et al.*, recommandent la recherche de la présence du virus BK dans les urines tous les trois mois dans les deux années qui suivent la transplantation, en cas de dysfonction du greffon, en association avec la réalisation d'une biopsie. Un résultat positif doit être confirmé par un nouveau prélèvement dans un délai inférieur à quatre semaines.

Tong *et al.*, décrivent une relation entre virurie et virémie avec des charges virales urinaires supérieures d'un facteur mille aux charges virales sanguines. Si l'on quantifie les charges virales urinaires, celles-ci seraient prédictives des charges virales sanguines. Contrairement à cela, pour Bressollette-Bodin *et al.*, il n'y a pas de corrélation entre les virémies et les viruries à virus BK. Une charge virale urinaire négative a une excellente valeur prédictive négative (quasiment 100 %). Cependant, un test positif dans les urines n'est pas associé à un risque augmenté de néphropathie à virus BK et ce cas nécessite un suivi par une recherche du virus au niveau sanguin. Alméras *et al.*, ont ainsi choisi d'abandonner la recherche du virus BK dans les urines par biologie moléculaire étant donné le coût de l'analyse et le temps qu'elle demande. Ils réalisent des recherches de virus BK au niveau sanguin. Mais pour Laskin *et al.*, la recherche du virus BK dans les urines ne présente pas de surcoût. [Hirsch *et al.*, 2002 - Tong *et al.*, 2004 - Bressollette-Bodin *et al.*, 2005 - Drachenberg *et al.*, 2005 - Blanckaert *et al.*, 2006 - Laskin *et al.*, 2010 - Alméras *et al.*, 2011]

g) Intérêts-Inconvénients des charges virales sanguines

Le premier inconvénient du suivi sanguin concerne les modalités de prélèvement qui consistent en un acte invasif avec prise de sang. Néanmoins, les patients suivis en post transplantation ont des prises de sang régulières pour suivi de la créatininémie, suivi de la réactivation des autres virus (CMV, EBV,...). La recherche du virus BK au niveau sanguin ne consiste pas en une prise de sang supplémentaire mais est réalisée en même temps que les autres examens de biologie médicale.

Hirsch *et al.*, décrivent qu'à cause de la faible valeur prédictive positive des « *decoy cells* » et de la BKurie, la virémie est le marqueur diagnostique à privilégier. Dans leur étude, les charges virales sont inférieures au seuil de $7,7.10^3$ copies/mL pour les patients ayant une virémie sans preuve histologique. Même si la réplication du virus BK ne peut être exclue, celle-ci peut se limiter à des sites étroits invisibles sur les échantillons biopsiés. La PCR quantitative pour la recherche d'ADN du virus BK dans le sang est donc utile à la fois pour identifier les patients transplantés rénaux à risque de développer une néphropathie associée au virus BK et pour suivre l'évolution de la réponse au traitement. Pour Nickeleit *et al.*, et Randhawa *et al.*, une virémie du virus BK permet le diagnostic de néphropathie induite par le virus BK, la présence du virus dans le sang étant le reflet de lésions tissulaires du parenchyme rénal.

Mais pour Nickeleit *et al.*, la virémie est également une conséquence de la virurie. Les résultats de Babel *et al.*, montrent que chez de nombreux patients, la disparition de la virémie est associée avec une virurie persistante, suggérant que le suivi des patients greffés doit être effectué à la fois sur échantillons d'urines et de sang, ceci afin d'obtenir un suivi correct [Nickeleit *et al.*, 2000 - Limaye *et al.*, 2001 - Hirsch *et al.*, 2002 - Randhawa *et al.*, 2004 - Mischitelli *et al.*, 2007 - Babel *et al.*, 2009].

5. Conclusion

Depuis le milieu des années 1990, le virus BK a été identifié comme un pathogène émergent tout particulièrement après une transplantation rénale. De nos jours, avec l'augmentation de l'espérance de vie, les candidats à une transplantation rénale seront de plus en plus nombreux. D'où l'intérêt actuel pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et un suivi régulier du virus BK en post transplantation.

Cette étude prospective a pour intérêt de comparer un suivi prospectif du virus BK dans le sang ou dans les urines, chez des patients ayant eu une transplantation rénale au premier

semestre 2010 au CHU de Nancy. Les virémies, à virus BK sont certes, spécifiques et corrélées à une réactivation du virus BK tandis que les viruries sont des marqueurs moins spécifiques mais plus précoces.

C. Discussion générale

La conclusion de ce travail rapporte les recommandations du KDIGO (*Kidney Disease : Improving Global Outcomes*) publiées dans *Clinical Practice Guideline for the care of the kidney transplant recipients* en 2009. Ces recommandations ont été publiées juste avant le début de cette thèse et servent de référence en néphrologie. Certains points seront soumis à discussion.

En résumé, les lignes directrices de ces recommandations sont les suivantes avec recommandation du suivi de la charge virale du virus BK des patients transplantés rénaux au niveau du plasma (recommandation de grade 2C) selon la chronologie suivante, à savoir tous les mois pour les trois à six premiers mois suivant la greffe (2D), ensuite, tous les trois mois jusqu'à la fin de la première année post transplantation (2D), en cas d'augmentation inexpliquée de la créatininémie (2D), après un traitement pour rejet aigu (2D).

Une recommandation de niveau 2 correspond à une suggestion, un grade C indique un bas niveau de preuve (l'effet réel peut être différent de l'effet estimé), un grade D un très bas niveau de preuve (l'effet estimé est très incertain et peut être différent de l'effet réel).

1. Suivi de la charge virale : urines ou sang

Ces recommandations rappellent qu'il est possible de suivre la charge virale du virus BK dans les urines ou dans le sang. Une recherche de virus BK négative par biologie moléculaire dans les urines a une valeur prédictive négative de 100 % [Hirsch *et al.*, 2002]. Tester les urines permet d'éviter une recherche du virus BK au niveau sanguin pour les patients dont les urines sont négatives.

Cependant, la présence d'une charge virale positive dans les urines en l'absence de virémie n'est pas associée à un risque augmenté de pathologie induite par le virus BK [KDIGO, 2009]. Par conséquent, la mise en place d'un suivi dans les urines, nécessite une

nouvelle analyse par biologie moléculaire au niveau du sang. Ceci nécessite de convoquer à nouveau le patient. C'est pourquoi les recommandations du KDIGO privilégient une recherche du virus par biologie moléculaire au niveau sanguin [KDIGO, 2009].

2. Intérêt des « *decoy cells* »

En l'absence de techniques de biologie moléculaire, la cytologie urinaire avec détection de « *decoy cells* » est une technique acceptable, bien que non spécifique de détection du virus BK et du risque de néphropathie. Ce test a une valeur prédictive négative élevée, ce qui signifie que l'absence de « *decoy cells* » élimine la possibilité d'une néphropathie à virus BK dans la plupart des cas. Mais, une détection de « *decoy cells* » a une faible valeur prédictive positive, la majorité des patients ayant des « *decoy cells* » dans leurs urines ne développant pas de néphropathie [Hirsch *et al.*, 2002 - KDIGO, 2009].

3. Chronologie générale de l'infection à virus BK

La présence du virus BK peut être objectivée avant même l'apparition des premiers signes clinique de la pathologie. Il a été prouvé que la présence du virus BK précède l'apparition de la néphropathie avec une médiane de huit semaines. Environ 50 % des patients sont virémiques dans les trois mois qui suivent la transplantation.

La plupart des néphropathies à virus BK surviennent dans les deux ans qui suivent la transplantation avec seulement cinq pour cent des cas survenant entre deux et cinq ans suivant la transplantation. Le suivi recommandé par le KDIGO est plus intense en post greffe immédiat, avec une fréquence diminuant au fil du temps. Une surveillance du virus BK peut être poursuivie annuellement dans les deux à cinq années qui suivent la transplantation. Une recherche de virus BK doit également être entreprise chez les patients ayant une augmentation inexplicquée de la créatininémie [KDIGO, 2009].

4. Traitement des patients dont la biopsie objective une néphropathie à virus BK

Le traitement de la néphropathie à virus BK n'est pas encore standardisé. Certains centres utilisent des molécules antivirales (cidofovir, leflunomide et/ou ciprofloxacine) à visée thérapeutique sans pour autant avoir d'efficacité prouvée de ces molécules.

En revanche, la réduction de l'immunosuppression a un réel impact sur la néphropathie, malgré la description de pertes de greffon consécutives à une néphropathie à virus BK chez des patients ayant eu une réduction du traitement immunosuppresseur. Pour Ramos *et al.*, la réduction préemptive de l'immunosuppression semble être plus efficace dans la surveillance préemptive de la néphropathie associée au virus BK que les marqueurs biologiques moléculaires [Ramos *et al.*, 2009]. Néanmoins, le retour d'une immunité cellulaire spécifique nécessite une période prolongée, période pendant laquelle les lésions cytopathogènes peuvent continuer à endommager les cellules rénales. Un déséquilibre entre la réplication du virus BK et l'immunité cellulaire spécifique du virus BK est impliquée comme principal élément de la pathogenèse de la néphropathie à virus BK. Une pratique assez courante consiste en l'arrêt d'un anti métabolite ou une réduction des posologies (effectuées à Nancy).

Ci-dessous quelques modifications des modalités du traitement immunosuppresseur envisageables dans un contexte de suspicion de néphropathie associée au virus BK [Hirsch *et al.*, 2005 - KDIGO, 2009].

Modifications de molécules

- Changement du tacrolimus pour ciclosporine, azathioprine ou sirolimus
- Changement du mycophénolate mofétil pour sirolimus ou leflunomide

Diminution de posologies

- De tacrolimus, mycophénolate mofétil ou ciclosporine

Arrêt de molécules

- Tacrolimus ou mycophénolate mofétil (maintien ou changement pour une bithérapie) à savoir ciclosporine/prednisone, tacrolimus prednisone, sirolimus/prednisone, mycophénolate mofétil/prednisone

Entre le début de l'étude prospective et aujourd'hui, des publications ont remis en cause l'efficacité du cidofovir [Pallet *et al.*, 2010 - Hakeem *et al.*, 2011], essentiellement en raison de sa néphrotoxicité. En l'absence de traitement spécifique, la réduction de l'immunosuppression semble être l'attitude la plus consensuelle et la plus efficace à adopter. Le patient U7 de l'étude prospective a bénéficié de dix cures de cidofovir. Du fait de l'apport de ces nouvelles publications, la réalisation de ces dix cures de cidofovir a été beaucoup

discutée, l'essentiel de la démarche thérapeutique s'est concentrée par ailleurs sur la réduction de l'immunosuppression.

5. Algorithme de suivi du virus BK au CHU de Nancy

L'intérêt de la comparaison du suivi urinaire ou sanguin du virus BK permet de proposer l'algorithme suivant (figure 42, page 97). Conformément aux recommandations, le protocole de suivi du virus BK pourrait être effectué à un rythme mensuel pour les trois premiers mois suivant la transplantation, trimestriel ensuite pendant la première année et enfin semestriellement. Cet algorithme ne propose pas un suivi par PCR quantitative du virus BK uniquement dans les urines ou dans le sang, mais combine les deux types de prélèvements afin d'optimiser le suivi des patients transplantés, tout diminuant le nombre de prélèvements pour le confort du patient et pour limiter le coût économique.

Dans la plupart des cas, le suivi du virus BK serait urinaire. En cas de virus BK détecté dans les urines, à la prochaine venue du patient, pourra être réalisée une recherche combinée du virus BK par PCR quantitative à la fois dans les urines et dans le sang. Cette recherche couplée permettra d'établir un suivi par charge virale sanguine pour les patients dont la virurie est persistante. Pour ceux d'entre eux dont la virurie est ponctuelle, le suivi adopté pourrait dépendre de la recherche du virus BK dans le sang (suivi sanguin pour les patients présentant une virémie positive, suivi urinaire pour ceux dont la virémie est négative).

Cet algorithme présente l'intérêt de combiner les avantages du suivi du virus BK dans les urines et dans le sang [Brennan *et al.*, 2005 - Hirsch *et al.*, 2005 - Williams *et al.*, 2005 - Randhawa *et al.*, 2006 - Binggeli *et al.*, 2007 - Giraldi *et al.*, 2007 - Ramos *et al.*, 2009].

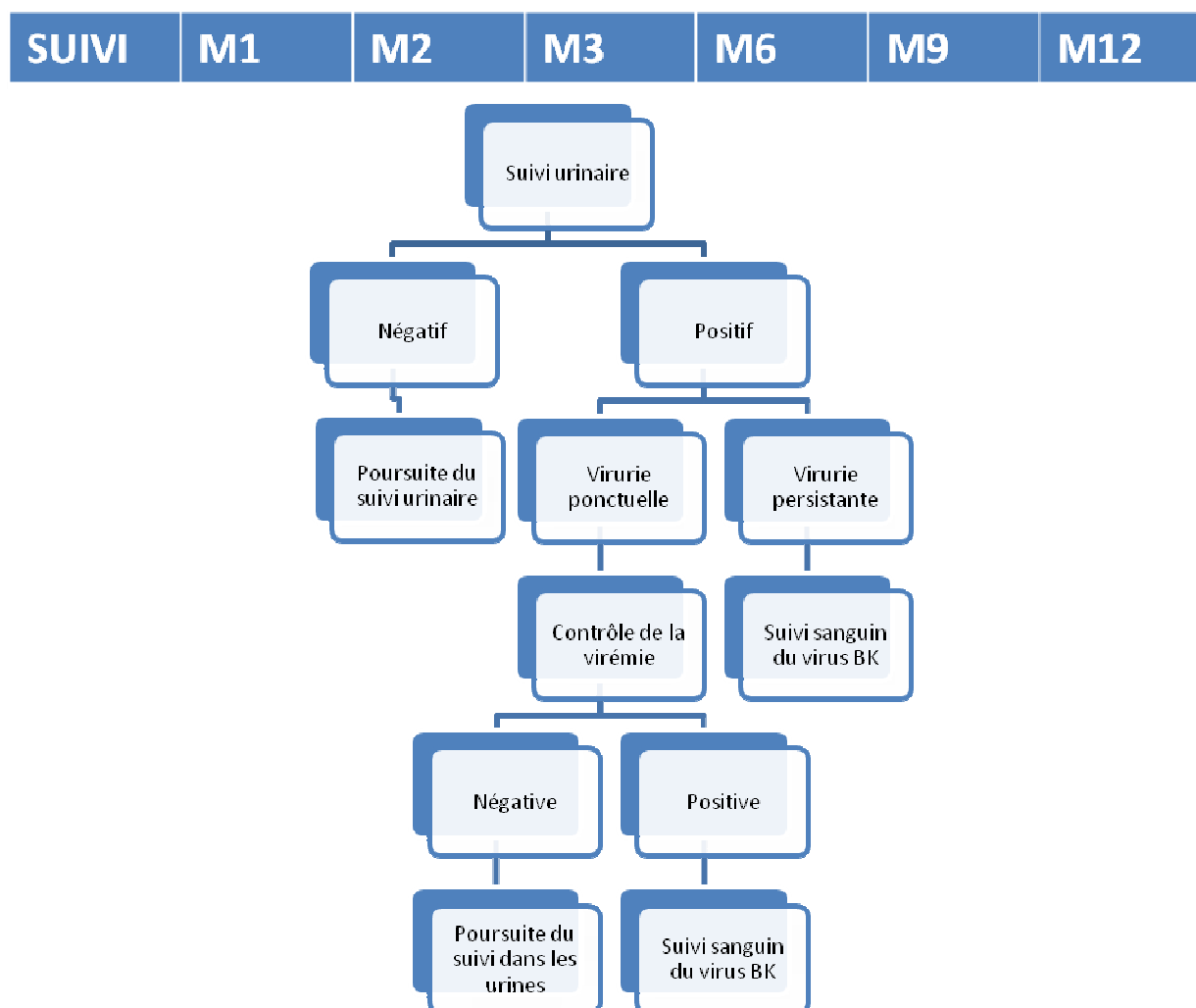


Figure 42 : Proposition d'algorithme de suivi du virus BK en post transplantation rénale

6. Intérêt du suivi prospectif

Après avoir réalisé une étude prospective de ce type, se pose la question de l'intérêt de conserver un suivi prospectif du virus BK chez le patient transplanté rénal. Il est à noter qu'il n'y a pas davantage de néphropathies à virus BK dans la cohorte de l'étude prospective (2,86 %) que dans celle de l'étude rétrospective (1,71 %). Le suivi prospectif n'aurait pas permis de diagnostiquer davantage de néphropathies à virus BK, bien sûr avec les limites évidentes du faible nombre de patients.

Mais, dès la mise en évidence d'une virurie persistante à virus BK, les néphrologues instaurent une réduction de l'immunosuppression ; le suivi prospectif permet une intervention précoce, sûrement avant que les lésions de néphropathie ne se développent. Par ailleurs, il n'y

a pas eu de rejet de greffon chez les patients ayant bénéficié d'une réduction du traitement immunosuppresseur.

Dans l'étude rétrospective, les recherches de virus BK par PCR quantitative ont été effectuées sans périodicité régulière, et donc avec des détections parfois simultanées du virus BK au niveau urinaire et sanguin. Un suivi régulier aurait sûrement mis en évidence la présence du virus dans les urines avant une présence au niveau sanguin. L'intérêt du suivi prospectif est bien la détection précoce de la multiplication du virus BK, le suivi de la cinétique de l'infection si elle a lieu et le contrôle de l'efficacité des traitements. Ce suivi ne doit pas être contraignant pour le patient, et coïncident avec les visites de contrôle normalement prévues après une transplantation. Un suivi urinaire a ici tout son intérêt avec recherche couplée au niveau sanguin si nécessaire dans les situations évoquées ci-dessus.

D. Perspectives et conclusion

Les infections actives à virus BK sont fréquentes chez les patients bénéficiant d'une transplantation rénale. Cependant, l'incidence des néphropathies tubulo-interstitielles à virus BK reste, même si elle a augmenté depuis le milieu des années 1990, faible, ce qui complique l'évaluation des marqueurs biologiques prédictifs. Il semble pourtant important de disposer d'outils permettant de dépister les patients les plus à risque de développer une néphropathie, et de suivre l'évolution de ceux déjà atteints, afin d'optimiser le traitement immunosuppresseur associé ou non à un traitement antiviral. La forte séroprévalence du virus BK dans la population générale, contrastant avec la faible fréquence des manifestations cliniques en primo-infection ou en réactivation, amène également à se poser la question du degré de pathogénicité de ce virus.

Malgré d'importants progrès dans la connaissance du virus BK, d'importants défis restent à relever notamment le cas des patients avec néphropathies réfractaires au traitement.

En conclusion, il s'agit d'une infection opportuniste, émergente, à tropisme rénal, fortement intriquée avec le rejet. Les possibilités thérapeutiques sont encore restreintes et le nombre de cas est encore sans doute sous-estimé, alors que le diagnostic devrait être posé avant le développement de la néphropathie. Afin de minimiser les manifestations cliniques du virus BK, le juste équilibre entre une immunosuppression protégeant du rejet, et un excès d'immunosuppression favorable à la réactivation du virus BK doit être trouvé. Le diagnostic virologique a dans ce contexte tout son intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Acott PD, Hirsch HH. BK virus infection, replication, and diseases in pediatric kidney transplantation. *Pediatr Nephrol*. 2007 Sep;22(9):1243-50
- Alméras C, Vetromile F, Garrigue V, Szwarc I, Foulongne V, Mourad G. Monthly screening for BK viremia is an effective strategy to prevent BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2011 Apr;13(2):101-8
- Andrews CA, Daniel RW, Shah KV. Serologic studies of *papovavirus* infections in pregnant women and renal transplant recipients. *Prog Clin Biol Res*. 1983;105:133-41
- Azzi A, De Santis R, Ciappi S, Leoncini F, Sterrantino G, Marino N, Mazzotta F, Laszlo D, Fanci R, Bosi A. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol*. 1996 Dec;2(6):411-6
- Babel N, Fendt J, Karaivanov S, Bold G, Arnold S, Seifin A, Lieske E, Hoffzimmer M, Dziubianau M, Bethke N, Meisel C, Grütz G, Reinke P. Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation*. 2009 Jul 15;88(1):89-95
- Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Randhawa P. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2001 Aug;38(2):354-65
- Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, Dong J. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *Am J Clin Pathol*. 2010 Feb;133(2):242-50
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Wallely PJ, Cleator GM. BK virus DNA in CSF of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Arch Dis Child*. 2003;88:174-5
- Beimler J, Sommerer C, Zeier M. The influence of immunosuppression on the development of BK virus nephropathy, does it matter? *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii66-viii71
- Binet I, Nicleleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalquen P, Gudat F, Mihatsch MJ, Thiel G. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*. 1999 Mar 27;67(6):918-22
- Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, Hirsch HH. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007 May;7(5):1131-9
- Blanckaert K, De Vriese AS. Current recommendations for diagnosis and management of polyoma BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Dec;21(12):3364-7
- Bohl DL, Brennan DC. BK Virus Nephropathy and Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:S36-S46

Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol.* 2008 Oct;43(2):184-9

Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Nestasio I, Paganotti A, Veggiani C, Monga G, Pietropaolo V. BK virus sequences in specimens from aborted fetuses. *J Med Virol.* 2010 Dec; 82(12):2127-32

Boutonnat J, Pinel N, Janbon B. Urinary cytology and polyomavirus infection: a major stake for patients. *Ann Pathol.* 2009 Nov;29 Spec No 1:S116-7

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 2005 Mar;5(3):582-94

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* 2003 ;7(6) : 433-44

Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Seville V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005 Aug;5(8):1926-33

Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human *papovaviruses*. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol.* 1975 Oct;102(4):331-40

Celik B, Shapiro R, Vats A, Randhawa PS. Polyomavirus allograft nephropathy: sequential assessment of histologic viral load, tubulitis, and graft function following changes in immunosuppression. *Am J Transplant.* 2003 Nov;3(11):1378-82

Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol.* 2000 Mar;60(3):353-62

Chen CH, Wen MC, Wang M, Lian JD, Wu MJ, Cheng CH, Shu KH, Chang D. A regulatory region rearranged BK virus is associated with tubulointerstitial nephritis in a rejected renal allograft. *J Med Virol.* 2001 May;64(1):82-8

Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, Woodle ES, Khalili K, Koralnik IJ. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3495-505

Coleman DV, Gardner SD, Field AM. Human polyomavirus infection in renal allograft recipients. *Br Med J.* 1973 Aug 18;3(5876):371-5

Coleman DV, Baker R. Quality assurance in cervical cytopathology. *Cytopathology.* 1997 Oct;8(5):350-3; author reply 353-4

Corneille J, Boutolleau D. Infections à virus BK après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Virol.* 2011 ;15(2) :11525

Costa C, Bergallo M, Astegiano S, Terlizzi ME, Sidoti F, Segoloni GP, Cavallo R. Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Oct;23(10):3333-6

Dall A, Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;3 Suppl 2:S68-75

De Clercq E, Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:569-596

De Mattei M, Martini F, Tognon M, High incidence of BK virus large-T-antigen-coding sequences in normal human tissues and tumors of different histotypes. *Int J Cancer* 1995 ;61:756-60

Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol.* 2000 Aug;81(Pt 8):1967-73

Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, Weir MR, Cangro CB, Klassen DK, Khaled A, Cunningham R, Bartlett ST. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant.* 2001 Nov;1(4):373-81

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *Am J Transplant.* 2003 Nov;3(11):1383-92

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Mian A, Ramos E. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant.* 2004 Dec;4(12):2082-92

Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou JC. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Hum Pathol.* 2005 Dec;36(12):1245-55

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E. Histologic versus molecular diagnosis of BK polyomavirus-associated nephropathy: a shifting paradigm? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 May;1(3):374-9

Droller MJ, Saral R, Santos G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology.* 1982 Sep;20(3):256-8

Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jan;41(1):11-8

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. J Virol. 2005 Nov;79(22):14442-5

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. Transpl Infect Dis. 2006 Jun;8(2):62-7

Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, Atwood WJ. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. J Virol. 2007 Nov;81(21):11798-808

Dugan AS, Gasparovic ML, Atwood WJ. Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). J Virol. 2008 Mar;82(5):2560-4

Eash S, Atwood W. Involvement of cytoskeletal Components in BK Virus Infectious Entry. J Virol 2005;79(18):11734-11741

Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, Degener AM, Russo G, Giordano A, Pietropaolo V. The human polyomavirus BK: Potential role in cancer. J Cell Physiol. 2005 Aug;204(2):402-6

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B, New Human *Papovavirus* (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet 1971 Jun 19(7712):1253-7

Gardner SD. Implication of *papovaviruses* in human diseases. In : Kurstak E, Kurstak C, eds. Comparative Diagnosis of Viral Diseases. I. Human and Related Viruses. Part A. Chapter 3. New-York : Academic Press, 1977:41-84

Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. J Clin Pathol. 1984 May;37(5):578-86

Gautam A, Patel V, Pelletier L, Orozco J, Francis J, Nuhn M. Routine BK virus surveillance in renal transplantation--a single center's experience. Transplant Proc. 2010 Dec;42(10):4088-90

Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, Bodaghi S, Salotti V, Rinieri A, Botti G, Perfumo F, Locatelli F, Comoli P. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. Am J Transplant. 2007 Dec;7(12):2727-35

Giraldi C, Noto A, Tenuta R, Greco F, Perugini D, Dodaro S, Spadafora M, Lo Bianco AM, Savino O, Papalia T, Greco R, Bonofiglio R. Prospective study of BKV nephropathy in 117 renal transplant recipients. New Microbiol. 2007 Apr;30(2):127-30

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. J Med Virol. 1982;10(2):91-9

Hakeem A, Sharma H, Sharma A. Cidofovir may be deleterious in BK virus associated with nephropathy. Transplantation. 2011 Jan; 91(2):e11-2

Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK-Virus and the Impact of Pre-Emptive Immunosuppression Reduction: 5-Year Results. *Am J Transplant*. 2010 Jan 5

Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int*. 2006 Feb;69(4):655-62

Harris KF, Chang E, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus as a potential co-factor in human cancer. *Dev Biol Stand*. 1998;94:81-91

Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* 1999;106:129-32

Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of *papovavirus* BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol*. 1981;8(2):143-50

Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2002 Jan;2(1):25-30

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):611-23

Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nicleleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1277-86

Hirsch HH, Randhawa P, and the AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Virus in Solid Organ Transplant Recipients. *Am Journal of Transplan* 2009;9(Suppl4);S136-S146

Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clinical Microbiol*. 2008 Aug;2671-2680

Howell DN, Smith SR, Butterly DW, Klassen PS, Krigman HR, Burchette JL Jr, Miller SE. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 1999 Nov 15;68(9):1279-88

Huang G, Chen LZ, Qiu J, Wang CX, Fei JG, Deng SX, Li J, Chen GD, Zhang L, Fu Q, Zeng WT, Zhao DQ. Prospective study of polyomavirus BK replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and clinical course. *Clin Transplant*. 2009 Nov 18

Huang G, Chen LZ, Qiu J, Wang CX, Fei JG, Deng SX, Li J, Chen GD, Zhang L, Fu Q, Zeng WT, Zhao DQ. Prospective study of polyomavirus BK replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and clinical course. *Clin Transplant*. 2010 Sep-Oct;24(5):599-609

Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de Virologie Médicale*. 2003, Estem De Boeck Diffusion, Paris, France

Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1350-8

Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):266-73

Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol*. 1993 Jan;39(1):50-6

Johnsen JI, Seternes OM, Johansen T, Moens U, Mantyjarvi R, Traavik T. Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus : sequence comparisons and biological characteristics. *J Virol*. 1995;76:1571-1581

Kaneko T, Moriyama T, Tsubakihara Y, Horio M, Imai E. Prevalence of human polyoma virus (BK virus and JC virus) infection in patients with chronic renal disease. *Clin Exp Nephrol*. 2005 Jun;9(2):132-7

Kayler LK, Batal I, Mohanka R, Morgan C, Basu A, Shapiro R, Randhawa PS. Antirejection treatment in kidney transplant patients with BK viruria. *Transplantation*. 2008 Sep 27;86(6):797-803

Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3):e1000363

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9 Suppl 3:S1-155

Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:19-45

Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, Zell R. Evolution of four BK virus subtypes. *Infect Genet Evol*. 2008 Sep;8(5):632-43.

Krumbholz A, Bininda-Emonds ORP, Wutzler P, Zell R. Phylogenetics, evolution and medical importance of polyomaviruses. *Infect Genet Evol*. 2009; 9:784-799

Lafon ME, Dutronc H, Dubois V, Pellegrin I, Barbeau P, Ragnaud JM, Pellegrin JL, Fleury HJ. JC virus remains latent in peripheral blood B lymphocytes but replicates actively in urine from AIDS patients. *J Infect Dis*. 1998 Jun;177(6):1502-5

Laskin BL, Goebel J. Cost-efficient screening for BK virus in pediatric kidney transplantation: A single-center experience and review of the literature. *Pediatr Transplant*. 2010 Mar 28

Lekakis LJ, Macrinici V, Baraboutis IG, Mitchell B, Howard DS. BK virus nephropathy after allogeneic stem cell transplantation: a case report and literature review. *Am J Hematol*. 2009 Apr;84(4):243-6

Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang RH, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1971-8

Leung AYH, Chan M, Tang SCW, Liang R, Kwong YL. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients. *J Virol Methods*. 2002;103:51-56

Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Dec;36(11):929-37

Li YJ, Chen YC, Lai PC, Fang JT, Yang CW, Chiang YJ, Chu SH, Wu MJ, Tian YC. A direct association of polyomavirus BK viruria with deterioration of renal allograft function in renal transplant patients. *Clin Transplant*. 2009 Aug-Sep;23(4):505-10

Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS, Ferrenberg J, Huang ML, Davis CL, Corey L, Marsch CL. Quantification of BK virus load in serum for the diagnosis of BK-virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. 2001 Jun 1;183(11):1169-72

Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, Liu Z, Mehta SK, Pierson DL, Rooney CM, Vilchez RA, Smith EO, Butel JS. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis*. 2003 May 15;187(10):1571-80

Lundstig A, Dillner J. Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:96-101

Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol*. 2009 Mar;83(5):2285-97

Mackenzie EF, Poulding JM, Harrison PR, Amer B. Human polyoma virus (HPV)--a significant pathogen in renal transplantation. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*. 1978;15:352-60

Major EO. Human polyomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams, Wilkins; 2001 : 2175-96

Mammette A. Virologie médicale. Collection AZAY, Presses Universitaires de Lyon. 2002, 80 Boulevard de la Croix Rousse, BP 4371, 69242 Lyon 04

Mannon RB, Hoffmann SC, Kampen RL, Cheng OC, Kleiner DE, Ryschkewitsch C, Curfman B, Major E, Hale DA, Kirk AD. Molecular evaluation of BK polyomavirus nephropathy. *Am J Transplant*. 2005 Dec;5(12):2883-93

Merlino C, Bergallo M, Griboudo G. Polyomavirus BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *J Clin Virol* 2003;28:165-274

Mischitelli M, Fioriti D, Anzivino E, Bellizzi A, Ferretti G, Gussman N, Mitterhofer AP, Tiniti F, Barile M, Dal Maso M, Chiarini F, Pietropaolo V. BKV QPCR detection and infection monitoring in renal transplant recipients. *New Microbiol.* 2007 Jul;30(3):271-4

Mischitelli M, Bellizzi A, Anzivino E, Fioriti D, Boldorini R, Miglio U, Chiarini F, Di Monaco F, Pietropaolo V. Complications post renal transplantation: literature focus on BK virus nephropathy and diagnostic tools actually available. *Virol J.* 2008 Mar 3;5:38

Monini P, Rotola A, De Lellis L, Corallini A, Secchiero P, Albini A, Benelli R, Parravicini C, Barbanti-Brodano G, Cassai E. Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer.* 1996 Jun 11;66(6):717-22

Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May;10(5):1080-9

Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1309-15

Nickeleit V, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int.* 2006 Dec;19(12):960-73

Nishimoto Y, Takasaka T, Hasegawa M, Zheng HY, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y. Evolution of BK virus based on complete genome data. *J Mol Evol.* 2006 Sep;63(3):341-52

Pallet N, Burgard M, Quamouss O, Rabant M, Bererhi L, Martinez F, Thervet E, Anglicheau D, Noel LH, Rouzioux C, Legendre C. Cidofovir may be deleterious in BK virus associated nephropathy. *Transplantation.* 2010 Jun;89(12):1542-4

Pang XL, Doucette K, LeBlanc B, Cockfield SM, Preiksaitis JK. Monitoring of polyomavirus BK virus viruria and viremia in renal allograft recipients by use of a quantitative real-time PCR assay: one-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2007 Nov;45(11):3568-73

Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchi A, Melis M, Orsi N. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol.* 1998 Dec;56(4):372-6

Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol.* 2003 Jan;26(1):71-7

Puliyanda D, Radha RK, Amet N. IVIG contains antibodies reactive with polyoma BK virus and may represent a therapeutic option for BK nephropathy. *Am J Transplant.* 2003;3[suppl4]: 393

Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Bartlett ST. BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. Clin Transpl. 2002;143-53

Ramos E, Vincenti F, Lu WX. Retransplantation in patients with graft loss caused by polyomavirus nephropathy. Transplantation. 2004; 77:131-133

Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. Transplantation. 2009 Mar 15;87(5):621-30

Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, Picken MM, Demetris AJ. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. Transplantation. 1999 Jan 15;67(1):103-9

Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to polyomavirus type BK. N Engl J Med. 2000 May 4;342(18):1361-3

Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, Swalsky P, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. Transplantation. 2002 Aug 27;74(4):485-8

Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, Uhrmacher J, Weck K. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. J Clin Microbiol. 2004 Mar;42(3):1176-80

Randhawa P, Brennan DC. BK Virus Infection in Transplant Recipients: An Overview and Update. Am Journal of Transplan 2006;6:2000-2005

Renoult E, Coutlée F, Pâquet M, St Louis G, Girardin C, Fortin MC, Cardinal H, Lévesque R, Schürch W, Latour M, Barama A, Hébert MJ. Evaluation of a preemptive strategy for BK polyomavirus-associated nephropathy based on prospective monitoring of BK viremia: a kidney transplantation center experience. Transplant Proc. 2010 Dec;42(10):4083-7

Replogue MD, Storch GA, Clifford DB. Bk virus: a clinical review. Clin Infect Dis. 2001 Jul 15;33(2):191-202

Rice SJ, Bishop JA, Apperley J, Gardner SD. BK virus as cause of haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. Lancet. 1985 Oct 12;2(8459):844-5

Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human *papovavirus* BKV. Cell. 1979 Dec;18(4):963-77

Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. Nephrol Dial Transplant. 2000 Jun;15(6):754-5.

Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa P. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. J Virol. 2006 Sep;80(18):8869-79

Smith F, panek R, Kiberd A. Screening to Prevent Polyoma Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: A Cost Analysis. *Am J of Transplan.* 2009;9:2177-2179

Sundsford A, Osei A, Rosenqvist H, Van Ghelue M, Silsand Y, Haga HJ, Rekvig OP, Moens U. BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viruria, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis.* 1999 Jul;180(1):1-9

Sung H, Choi BH, Pyo YJ, Kim MN, Han DJ. Quantitation of BK virus DNA for diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Korean Med Sci.* 2008 Oct;23(5):814-8

Thakur R, Arora S, Nada R, Minz M, Joshi K. Prospective monitoring of BK virus reactivation in renal transplant recipients in North India. *Transpl Infect Dis.* 2011 Apr 20. doi: 10.1111/j.1399-3062.2011

Thoulouzan M, Courtade-Saidi M, Kamar N, Bellec L, Huyghe E, Soulié M, Plante P. [Urologic aspects of Polyomavirus infection] *Prog Urol.* 2010 Jan;20(1):11-6

Tong CYW ou William Tong CY, Hilton R, MacMahon EME, Brown L, Pantelidis P, Chrystie IL, Kidd M, Tungekar MF, Pattison JM. Monitoring the progress of BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:2598-2605

Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R, Elia F, Gordon J, Ferrante P. *J cell Physiol.* 2010;222:195-199

Trofe J, Hirsch HH, Ramos E. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Trans Infect Dis.* 2006(8):76-85

Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu YR, Bresnahan BA, Cohen EP. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005 Oct;68(4):1834-9

Vats A, Shapiro R, Singh Randhawa P, Scantlebury V, Tuzuner A, Saxena M, Moritz ML, Beattie TJ, Gonwa T, Green MD, Ellis D. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation.* 2003 Jan 15;75(1):105-12

White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology.* 2004;324:1-16

Williams JW, Javaid B, Kadambi PV. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Eng J Med.* 2005;352:1157-1158

Zaia J, Baden L, Boeckh MJ, Chakrabarti S, Einsele H, Ljungman P, McDonald GB, Hirsch H; Center for International Blood and Marrow Transplant Research; National Marrow Donor Program; European Blood and Marrow Transplant Group; American Society of Blood and Marrow Transplantation; Canadian Blood and Marrow Transplant Group; Infectious Disease Society of America; Society for Healthcare Epidemiology of America; Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada; Centers for Disease Control and Prevention. Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Oct;44(8):471-82

Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect*. 2007 Feb;9(2):204-13

Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, Takeuchi T, Shibuya A, Kitamura T, Yogo Y. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of VIRUS BK and the human race. *J Gen Virol* 2009 Jan;90(Pt 1):144-52

ANNEXES

CHU de Nancy	Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058	Numéro de version : 03	Page 113 / 145
Date de création : 23/05/2006	Date de modification : 04/03/2008	
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)		

MOTS CLES : PCR quantitative, BKV

DESTINATAIRES :

- Techniciennes du laboratoire de Virologie (secteur Biologie Moléculaire)
- Attachés
- Internes
- Assistants
- MCU/PH
- PU/PH

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy	Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058	Numéro de version : 03	Page 114 / 145
Date de création : 23/05/2006	Date de modification : 04/03/2008	
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)		

PRESENTATION

1. TITRE

PCR quantitative en temps réel pour la détection de l'ADN du BKV (Méthode Taq Man)

2. OBJET

Détection quantitative des BKV en temps réel. Cette technique utilise des marquages par sondes fluorescentes, spécifiques du brin amplifié. Il est possible de déterminer la présence de BKV par PCR dans un échantillon donné (urine, plasma et surtout sang total.) [Ali Si-Mohamed and al., 2005].

3. CHAMP D'APPLICATION

Virologie, secteur Biologie Moléculaire

4. MODIFICATIONS

Gamme plasmidique BKV commercialisée à $1,3 \cdot 10^5$ copies / μ L ou $1,3 \cdot 10^8$ copies/mL

BK Polyomavirus quantified viral DNA control catégorie N°08-942-250, lot N°7A005 (ABI Advanced Biotechnology)

5. MATERIEL ET EQUIPEMENT

- Gants à usage unique
- Pipettes automatiques (10, 20, 100, et 1000 μ L) et les cônes correspondants
- Tubes Microamp® (Applied Biosystems, France) : barrette de 8 tubes de 0,2ml (Ref 4316567)
- Barrette couvercle pour 8 tubes (optical caps Ref 4323032)
- Support noir pour plaques ou tubes
- Tubes « Eppendorf » de 1,5 ml pour mix PCR
- Trousse Taqman : Universal PCR Master Mix, No Amperase UNG (contient dNTPs, Taq, MgCL2, Tampon) - Ref 4324020
- H₂O distillée stérile qualité biologie moleculaire
- Amorces sens BKV-1M à 10 μ M (séquence ci-dessous)

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058		Numéro de version : 03	
Date de création : 23/05/2006		Date de modification : 04/03/2008	
Page 115 / 145			
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)			

- Amorce antisens BKV-3M à 10 μ M (séquence ci-dessous)
- SondeTaqMan BKV-TMS à 5 μ M (solution mère à 200 μ M cf séquence ci-dessous)
- ADN à amplifier
- Gamme plasmidique de BKV
- ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems France)

6. MODE OPERATOIRE

7. SEQUENCES DES AMORCES ET DE LA SOND

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques	Position
BKV-1M	5' AAG TCT TTA GGG TCT TCT AC 3'	4379-4398
BKV-3M	5' GAG TCC TGG TGG AGT TCC 3'	4527-4510
BKV-TMS (sonde taqman)	5' (6FAM) AGA ATC TGC TGT TGC TTC TTC ATC ACT GGC (TAMRA) 3'	4432-4461

PREPARATION DE LA GAMME PLASMIDIQUE COMMERCIALISEE

Dans la pièce R3-26

Il s'agit de préparer une gamme étalon de l'ADN plasmidique (contenant le gène cible) à partir d'une solution initiale de plasmide à $1,3 \times 10^8$ copies/ml, dans du tampon AE (60%) et de l'eau distillée (40%) par la méthode de dilution par entraînement. Les dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} seront utilisées pour la PCR quantitative du BKV en gamme étalon.

	50 μ L					
Dilution	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Volume diluant (AE/Eau ; μ L)		450	450	450	450	450
Vol. plasmide						
Copies/ml: $1,3 \times$	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058		Numéro de version : 03	
Date de création : 23/05/2006		Date de modification : 04/03/2008	
Page 116 / 145			
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)			

PROGRAMMATION DU RUN BKV SUR ABI PRISM

UTILISER LA PROCEDURE VCB 114 (FONCTIONNEMENT DE L' ABI PRISM)

Lors de l'ouverture d'un nouveau fichier choisir le « TEMPLATE BKV »

- Vérifier le détecteur BKV : Reporter FAM, Quencher TAMRA

-Vérifier les conditions de thermocyclage :

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	45
Hybridation	60°C	1 min	
Elongation			

-Rentrer l'identification des patients.

-Sauvegarder la plaque toujours à l'aide de la procédure VCB 114

8. PREPARATION ET DISTRIBUTION DU MIX (MELANGE REACTIONNEL)

Dans la pièce R3-13 , préparer le mélange réactionnel avec les pipettes réservées à cet usage

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
Mix Taq Man 2x	12,5
Amorce sens BKV-1M à 10 µM	1
Amorces antisens BKV-3M à 10 µM	1
Sonde BKV-TMS à 5 µM	1
H ₂ O	4,5
Volume final de MIX	20,0

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058		Numéro de version : 03	
Date de création : 23/05/2006		Date de modification : 04/03/2008	
Page 117 / 145			
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)			

Prévoir - 5 tubes de mix pour la gamme plasmidique

-1 tube de mix pour le Témoin négatif H₂O (de la pièce R3-13)

-1 tube de mix pour chaque échantillon d'ADN

-1 tube de mix pour le témoin négatif H₂O en pièce R3-14 avec pipette échantillon

9. DISTRIBUTION DES ADN DES ECHANTILLONS ET DE LA GAMME PLASMIDIQUE

En pièce R3-14 au 20µL de Mix ajouter en homogénéisant par aller-retour

- les 5µL d'ADN des échantillons extraits avec la pipette qui leur est réservée

-les 5µL d'H₂O avec cette même pipette

-les 5µL des ADN des dilutions de la gamme de plasmide avec la pipette réservée à cet usage

-Refermer les barrettes avec leur couvercle

-Centrifuger les barrettes avec centrifugeuse de la pièce R3-5

10. LANCEMENT DU RUN

Utiliser la PROCEDURE VCB 114

11. ANALYSE DES DONNEES

A la fin de la PCR, l'acquisition des données s'arrête, le bloc retourne à la température de 25°C, il est alors possible de procéder à l'analyse (**ANALYSIS**) en se référant à la PROCEDURE VB114

Sauvegarder les résultats et les éditer.

Eteindre l'ABI PRISM 7000 ainsi que l'ordinateur

Rentrer les résultats dans Glms tout en sachant que

- les urines ne sont pas quantifiées sauf demande particulière

- seuls les sangs totaux sont quantifiés

12. ANNEXE : FICHE DE TRAVAIL

13. FIN DE DOCUMENT

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCA058		Numéro de version : 03	
Date de création : 23/05/2006		Date de modification : 04/03/2008	
Page 118 / 145			
PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION DE L'ADN DU BKV (METHODE TAQ MAN)			

FICHE DE TRAVAIL

MATERIEL ET EQUIPEMENT

- Tubes Microamp ® (Applied Biosystems, France) : barrette de 8 tubes de 0.2 ml (Ref 4316567)
- Pipettes automatiques (10, 20, 100, et 1000 µL) et leurs cônes
- Barrette couvercle pour barrette de 8 tubes (optical caps Ref 4323032)
- Tubes « Eppendorf » de 1,5 ml pour mix PCR
- ABI Prism 7000 (Applied biosystems, France)
- Trousse taqman Ref 4324020 Universal PCR Master Mix, No Amperase UNG
- H₂O distillée stérile
- Tampon Taqman master mix (contient dNTPs, Taq, MgCl₂, Tampon)
- Amorce sens BKV-1M à 10 µM
- Amorce antisens BKV-3M à 10 µM
- SondeTaqMan BKV-TMS à 5 µM (solution mère à 200 µM)
- ADN à amplifier

SEQUENCES DES AMORCES ET DE LA SONDE

Amorces utilisées	Séquences nucléotidiques	Position
BKV-1M	5' AAG TCT TTA GGG TCT TCT AC 3'	4379-4398
BKV-3M	5' GAG TCC TGG TGG AGT TCC 3'	4527-4510
BKV-TMS (sonde taqman)	5' (6FAM) AGA ATC TGC TGT TGC TTC TTC ATC ACT GGC (TAMRA) 3'	4432-4461

PREPARATION DU MIX (MELANGE REACTIONNEL) POUR UNE REACTION

Réactifs	Volume pour une réaction (µL)
Mix Taq Man 2x	12,5
Amorce sens BKV-1M à 10 µM	1
Amorces antisens BKV-3M à 10 µM	1
Sonde BKV-TMS à 5 µM	1
H ₂ O	4,5
ADN extrait	5
Volume final	25,0

Distribution de 20 µL de mix par cupule + 5 µL d'ADN

PROGRAMMATION DE LA PCR SUR ABI PRISM 7000 (APPLIED BIOSYSTEMS)

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	45
Hybridation	60°C	1 min	
Elongation			

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Martine Didier	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059		Numéro de version : 02	
Date de création : 19/05/2006		Date de modification : 04/03/2008	
Page 119 / 145			
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE			

MOTS CLES : Extraction automatisée, ADN, MagNA pure Roche

DESTINATAIRES :

- Techniciennes du laboratoire de Virologie (secteur Biologie Moléculaire)
- Attachés
- Internes
- Assistants
- MCU/PH
- PU/PH

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy	Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02	Page 120 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008	
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE		

TABLE DES MATIERES

1. PRESENTATION.....	121
1.1 TITRE.....	121
1.2 OBJET.....	121
1.3 CHAMP D'APPLICATION	121
1.4 MANUEL DE REFERENCE	121
2. MODE OPERATOIRE.....	122
2.1 ETAPES PRELIMINAIRES AVANT EXTRACTION.....	122
2.2 ETAPES DE DEMARRAGE POUR LA CONFIGURATION DE LA STATION DE TRAVAIL	122
2.3 ORGANIGRAMME DE DEMARRAGE D'UN PROTOCOLE DE PURIFICATION	122
2.3.1 Ouverture de l'écran feuille échantillons (Sample Ordering)	122
2.3.1.1 Sélection du protocole de purification appropriée.....	123
2.3.1.2 Spécification des données échantillons	123
2.3.2 Confirmation de la disposition de la zone de travail sur l'écran Informations de démarrage (Start Information)	123
2.3.3 Contrôle du cycle d'extraction sur l'écran Statut cycle d'extraction (Batch Status)	124
2.3.4 Evaluation du résultat de la purification dans l'écran résultats (result)	124
2.4 MAINTENANCE	125
3. FIN DE DOCUMENT.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségoène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02		Page 121 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008		
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE			

1. PRESENTATION

1. TITRE

Extraction ADN automatisée - MagNA Pure Roche

2. OBJET

Procédures d'automatisation d'extraction de sang total, sérum, urines, lavages broncho alvéolaires (éventuellement : plasma, autres liquides biologiques) sur automate MagNA Pure LC, société ROCHE

3. CHAMP D'APPLICATION

Virologie, secteur biologie moléculaire

4. MANUEL DE REFERENCE

MagNA Pure LC Roche diagnostic : Version 3.0

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy	Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02	Page 122 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008	
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE		

2. MODE OPERATOIRE

1. ETAPES PRELIMINAIRES AVANT EXTRACTION

Préparation de la solution de protéinase K (extraction de l'ADN) :

Reconstituer chaque flacon de protéinase K (bouchon rose) du MagNA Pure LC DNA Isolation Kit dans 3,0 ml de tampon d'élution (bouchon jaune). Fermer le flacon et bien mélanger jusqu'à complète dissolution du lyophilisat. Seulement après complète solubilisation, ajouter 2 mL supplémentaires de tampon d'élution (**pour atteindre le volume final de 5 mL**). Un tube de poudre de protéinase K permet de réaliser 32 extractions. Si vous n'utilisez pas toute la solution le jour même, stockez-la entre 2 et 8°C (4 semaines maximum) ou entre -15 et -20°C (12 mois maximum).

Particules magnétiques recouvertes de verre (MGP, Magnetic Glass Particles) :

Les MGP doivent être agitées vigoureusement pour assurer une remise en suspension complète.

Préparation d'échantillons pour l'extraction d'acide nucléique :

ADN : utilisez 200 µL d'échantillon.

2. ETAPES DE DEMARRAGE POUR LA CONFIGURATION DE LA STATION DE TRAVAIL

- Mettez sous tension la station de travail **MagNA Pure LC**, l'ordinateur et l'imprimante.
- Pressez sur les touches du clavier : CTRL-ALT-DELETE
- Password (aucun mot de passe) : cliquez « OK »
- L'écran principal apparaît

3. ORGANIGRAMME DE DEMARRAGE D'UN PROTOCOLE DE PURIFICATION

1. OUVERTURE DE L'ECRAN FEUILLE ECHANTILLONS (SAMPLE ORDERING)

Se référer page 89 (ouvrage MagNA Pure LC)

Dans l'écran du menu principal (Main Menu), cliquez sur SAMPLE ORDERING pour saisir toutes les données nécessaires au démarrage d'un cycle d'extraction.

Si une liste ancienne apparaît, pour la supprimer : cliquez FILE / NEW SAMPLE ORDER

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy	Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02	Page 123 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008	
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE		

(1) Sélection du protocole de purification appropriée

Se référer page 97 (ouvrage MagNA Pure LC)

- Dans le menu déroulant, sélectionnez le protocole de purification d'ADN : DNA I High cell Performance
- Vérifiez le Volume échantillon (Sample Volume = 200 µL), le Volume d'élution (Elution Volume = 100 µL) et le volume de dilution (Dilution volume= None).
- Entrez le numéro du lot du kit (MAGNA PURE LC KIT LOT)

(2) Spécification des données échantillons

Se référer page 99 (ouvrage MagNA Pure LC)

- Cliquez sur la ligne correspondante au puits échantillon A1 du Graphique Cartouche Echantillons (Sample Cartbridge Graphic).
- Saisissez le numéro et le nom de l'échantillon. Confirmez en appuyant sur Entrée et passez à la ligne suivante.
- Continuez jusqu'à ce que tous les échantillons soient identifiés.

Remarque : il est impossible de démarrer un cycle avant d'avoir nommé tous les échantillons.

2. CONFIRMATION DE LA DISPOSITION DE LA ZONE DE TRAVAIL SUR L'ECRAN INFORMATIONS DE DEMARRAGE (START INFORMATION)

Se référer pages 103 à 114 (ouvrage MagNA Pure LC)

- Dans l'écran SAMPLE ORDERING, cliquez sur STAGE SETUP
- Le Graphique Disposition de la zone de travail (START INFORMATION) indique les consommables plastiques et les volumes de réactifs nécessaires pour le cycle (en fonction du nombre d'échantillons).
- Placez tout le matériel nécessaire, à savoir cartouches, supports pour embouts, embouts à réactifs, dans leurs tiroirs et supports respectifs.

Remarque : lorsque vous manipulez des consommables, portez toujours des gants pour éviter toute contamination.

- Placez le détrompeur correspondant à la manipulation sur le support des cuves à réactifs (Identification réactifs / couleur).
- Placez le Support métallique des cuves à réactifs (Reagent Tub Rack) sur la paillasse, puis les cuves à réactifs symbolisées de couleurs différentes (Reagent Tubs) nécessaires dans ce support. Remplissez chaque cuve du volume correct de réactif (comme indiqué sur le Graphique Disposition de la zone de travail - Stage Lay-out Graphic. Fermez le bouchon des cuves à réactifs (Reagent Lids) pour réduire l'évaporation. Placez sur la zone de travail le Support Métallique des cuves à réactifs, contenant les réactifs nécessaires.
- Confirmez le placement correct des consommables et le remplissage des cuves à réactifs en

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02		Page 124 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008		
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE			

cliquant sur les zones de texte correspondantes de la zone de travail sur l'écran START INFORMATION.

- **Remarque** : avant de verser les particules magnétiques enduites de verre (MGP) dans une cuve, vous devez les agiter vigoureusement pour être sûr qu'elles soient complètement remises en suspension. Ajoutez **en dernier les MGP** sur le support des cuves à réactifs, et **commencez immédiatement** le cycle d'extraction du lot.
- Assurez-vous que tous les consommables sont correctement placés et qu'il n'y a aucun obstacle sur la zone de travail.
- **Remarque** : une collision entre le bras haute vitesse du robot et un élément mal placé occasionnerait des réparations très coûteuses.
- Fermez le loquet de la zone REAGENT TUBS de la zone de travail et fermez le capot (Cover) de l'appareil.
- Assurez-vous que tous les voyants de statut des Blocs thermiques (Thermal Block) , à droite de l'écran ,sont verts et affichent le statut : PASS (Réussi).
- **Remarque** : le logiciel ne contrôle pas si l'appareil contient bien les éléments corrects, il vous appartient de faire cette vérification.

3. CONTROLE DU CYCLE D'EXTRACTION SUR L'ECRAN STATUT CYCLE D'EXTRACTION (BATCH STATUS)

Se référer page 115 (ouvrage MagNA Pure LC)

- Cliquez sur le bouton OK de l'écran START INFORMATION pour lancer le cycle préparatoire. Le capot se verrouille automatiquement et l'écran BATCH STATUS (Statut cycle d'extraction) s'affiche.
- **Remarque** : le bouton OK ne s'affiche pas tant que vous n'avez pas cliqué sur toutes les zones de texte nécessaires sur l'écran.
- Dans l'écran BATCH STATUS, les phases du cycle d'extraction (prologue, traitement et épilogue) s'affichent sous forme de barres horizontales. Les périodes d'activité s'affichent en bleu, les pauses en blanc. L'axe temporel (horizontal) affiche l'heure actuelle et l'heure de fin du cycle. La ligne rouge (verticale) qui se déplace indique l'avancement du cycle.

4. EVALUATION DU RESULTAT DE LA PURIFICATION DANS L'ECRAN RESULTATS

Se référer page 117 (ouvrage MagNA Pure LC)

- Une fois le cycle terminé, l'écran RESULT SCREEN s'affiche et apparaît :
 - PASS (Réussi) (vert) : l'échantillon a été purifié correctement.
 - FAIL (Echec) (rouge) : une erreur de prélèvement est survenue (due à la coagulation de l'échantillon ou à la perte de l'embout).

Remarque : en cas de statut FAIL (Echec), la colonne d'erreur (Error) affiche un Code d'erreur

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségoène Pernet	Véronique Venard
Signature			

CHU de Nancy		Laboratoire de Virologie	
Numéro de document : VCB059	Numéro de version : 02		Page 125 / 145
Date de création : 19/05/2006	Date de modification : 04/03/2008		
EXTRACTION ADN AUTOMATISEE - MAGNAPURE ROCHE			

(Error Code) qui explique les raisons du problème.

- Cliquez sur FILE / PRINT RESULTS SCREEN : 2 feuilles de résultats s'impriment et sont déposées dans un bac sur une étagère au dessus de l'imprimante.
- Cliquez sur FILE / CLOSE (2 fois) : l'écran du menu principal apparaît.
- Eventuellement, imprimer journal erreurs

4. MAINTENANCE

* Ouvrez la porte du MAGNA PURE et enlevez les échantillons extraits , le matériel inutilisé propre et le matériel usagé ,

Décontaminez la zone de travail en essuyant sa surface à l'aide de l' agent de décontamination (DNA-OFF). Remarque : ne projetez pas d'agent de décontamination directement sur la zone de travail, des composants électroniques risqueraient d'être endommagés.

Pour éviter toute contamination croisée, remplacez systématiquement le récupérateur de gouttes avant chaque cycle. Pour ce faire, cliquez sur CHANGE DROP CATCHER (le bras du robot se déplace vers l'avant).Changez le récupérateur de gouttes (Tub Lid Seal).Cliquez sur HOME (le bras retourne à sa position initiale).

* Mettre en route la décontamination automatique du MAGNA PUR : DECONTAMINATION/03HRS/ACTIONS/START DECONTAMINATION.

Changer les 8 joints du bras (« étanchéité cones-bras ») une fois par mois et tester l'étanchéité (Se référer pages 177 à 180 ouvrage Magna Pur LC)

* Mettre l'appareil, l'ordinateur, l'imprimante hors tension.

	Réalisé par	Relecture	Vérifié et approuvé par
	Valérie Jominet	Ségolène Pernet	Véronique Venard
Signature			

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : lundi 10 octobre 2011

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Muriel HOARAU

Sujet : Le virus BK en transplantation rénale
Etude rétrospective 2005 – 2009
Suivi prospectif premier semestre 2010

Jury :

Président : Monsieur Christophe GANTZER

Juges :

Monsieur Luc FRIMAT
Monsieur Marc LADRIERE
Mademoiselle Axelle PAQUIN
Madame Véronique VENARD

Vu,

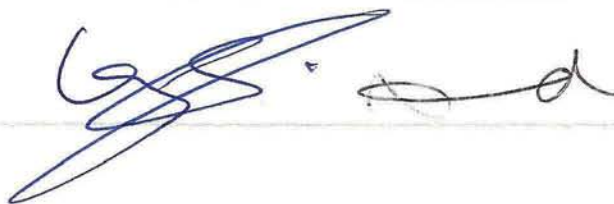
Nancy, le 24 août 2011

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. GANTZER

Mme VENARD



Vu et approuvé,

Nancy, le 05.09.2011

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine KEDZIEREWICZ
Vice doyen



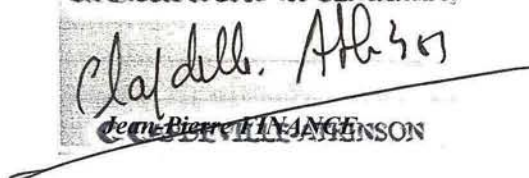
Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 13.9.2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,



Jean-Benoît LANGE

N° d'enregistrement : 3722

N° d'identification :

TITRE

**Le virus BK en transplantation rénale
Etude rétrospective 2005 – 2009
Suivi prospectif premier semestre 2010**

**Thèse soutenue le 10 octobre 2011
par Muriel HOARAU**

RESUME :

Le virus BK, petit virus de la famille des *Polyomaviridae*, découvert en 1970, est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence est élevée au sein de la population générale. Après une primo-infection asymptomatique, le virus BK est capable de latence, notamment au niveau de l'épithélium rénal. Le pouvoir pathogène du virus BK s'exprime essentiellement chez les transplantés rénaux, sous la forme d'une néphropathie. Depuis les années 1990 et l'utilisation de puissantes molécules immunosuppressives, le virus BK est un pathogène émergent en transplantation rénale. Le diagnostic de l'infection par le virus BK doit être précoce afin de limiter l'étendue des lésions. Le suivi biologique de la réactivation du virus BK peut être effectué par PCR quantitative en temps réel dans le sang et/ou les urines de ces patients. Dans une étude rétrospective menée entre 2005 et 2009, la prévalence de la néphropathie associée au virus BK au CHU de Nancy a été de 1,71% sur une population de 293 patients. Dans un second temps, le suivi prospectif des patients transplantés rénaux au cours du premier semestre 2010 a comparé deux modalités de suivi (recherche du virus BK dans les urines ou dans le sang). L'objectif de ce travail est de proposer un algorithme de suivi du virus BK chez le patient transplanté rénal ainsi que les périodicités du suivi. Cet algorithme propose un suivi général par charge virale urinaire, une charge virale sanguine étant réalisée en cas de positivité des urines, à un rythme mensuel pendant les trois premiers mois suivant la transplantation, et trimestriel ensuite pendant la première année. Devant l'absence de traitement antiviral spécifique, le suivi biologique régulier de la multiplication du virus BK et la réduction préemptive de l'immunosuppression semblent être les stratégies les plus efficaces et reconnues.

MOTS CLES : Virus BK – Transplantation rénale – PCR quantitative en temps réel – Modalités de suivi – Néphropathie associée au virus BK

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Véronique VENARD	Laboratoire de Virologie CHU de Nancy	Expérimentale ☒
		Bibliographique ☒
		Thème ☒ 5

Thèmes

**1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie**

**2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle**