



Rôle du Polyomavirus de Merkel dans les carcinomes à cellules de Merkel

Hélène Laude

► **To cite this version:**

Hélène Laude. Rôle du Polyomavirus de Merkel dans les carcinomes à cellules de Merkel. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. <NNT : 2012PA05T065>. <tel-00801219>

HAL Id: tel-00801219

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00801219>

Submitted on 15 Mar 2013

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

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

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Gc2iD

Equipe de recherche EA1833

« Stress oxydant, prolifération cellulaire et inflammation »

Thèse de doctorat

en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Infectiologie

Rôle du Polyomavirus de Merkel dans les carcinomes à cellules de Merkel

Par Hélène Laude

Présentée et soutenue publiquement le 28 Novembre 2012

Devant un jury composé de :

Professeur Nicolas Dupin	Président du Jury
Professeur Flore Rozenberg	Directeur de thèse
Professeur Henri Agut	Rapporteur
Docteur Michel Favre	Rapporteur
Docteur Uriel Hazan	Examineur
Docteur Simon Wain-Hobson	Examineur

**Rôle du Polyomavirus de Merkel
dans les carcinomes à cellules de Merkel**

Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm

Winston Churchill (1874 – 1965)

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre Lebon pour être entré un matin dans mon bureau, un article scientifique à la main, en annonçant d'une voix pleine d'enthousiasme : « ils ont découvert un nouveau virus ! »

Je remercie Flore Rozenberg pour m'avoir encadrée pendant ces quatre années de travail, en particulier pour la rigueur scientifique qu'elle s'est efforcée de me transmettre et l'espace de liberté qu'elle m'a accordé dans la réalisation du travail.

Je remercie les dermatologues et les anatomopathologistes qui se sont lancés dans le projet avec enthousiasme : les uns, pour leur travail de recrutement des cas et de recueil des renseignements cliniques ; les autres, pour leur travail de diagnostic et de transmission de matériel. Je remercie en particulier les Professeurs Marie-Françoise Avril et Nicolas Dupin du service de dermatologie de l'hôpital Cochin, le docteur Eve Maubec du service de dermatologie de l'hôpital Bichat et le docteur Agnès Carlotti du service d'anatomopathologie de l'hôpital Cochin. Je remercie également les équipes des services de chirurgie de ces hôpitaux et de l'institut Curie pour leur aide précieuse dans le recueil des prélèvements.

Je remercie les patients atteints de carcinome de Merkel qui ont accepté de donner des petits bouts d'eux mêmes et sans lesquels le projet n'aurait pu être réalisé.

Je remercie toute l'équipe du service de virologie de l'hôpital Cochin pour leur participation à la gestion de la collection biologique mais surtout pour leur agréable compagnie au travail, les conseils qu'ils m'ont prodigués, les places pour les hottes et les thermocycleurs qu'ils m'ont cédés, et les marqueurs qu'ils m'ont laissé leur voler.

Je remercie les membres de l'équipe de recherche EA1833 qui ont participé au projet, le docteur Jean-François Meritet, Lilia Cantero, Benoit Vallette et en particulier Barbara Jonchère, la première étudiante que j'ai encadrée et avec qui nous avons débuté le travail.

Je remercie pour leur précieuse collaboration les membres de l'équipe du docteur Xavier Sastre-Garau du département de Biologie des tumeurs à l'Institut Curie, et en particulier Martine Peter, ainsi que les membres de l'équipe du docteur Pierre Coursaget de l'U618 et en particulier Antoine Touzé.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, les professeurs Henri Agut, Nicolas Dupin et les docteurs Michel Favre, Uriel Hazan et Simon Wain-Hobson.

Enfin, je remercie chaudement Olivier qui m'a laissé installer mon bureau au milieu du salon et réquisitionner tous les ordinateurs de l'appartement, Elisabeth qui a éliminé quelques billions de coquilles du manuscrit, Thomas qui m'a réconciliée *in extremis* avec le logiciel de traitement de texte, Nathan qui a fait tout ce qu'il pouvait pour se tenir tranquille et Vital qui m'a placidement tenu compagnie.

Résumé

En 2008, le génome d'un nouveau virus a été caractérisé au sein d'un cancer cutané rare survenant préférentiellement chez l'immunodéprimé, le carcinome de Merkel. Ce nouveau virus appartenait à la famille des *Polyomaviridae* qui comprend des virus dont le caractère cancérigène chez l'animal est avéré depuis plus de 50 ans. Dénommé Polyomavirus de Merkel puisqu'il semblait lié à la survenue du cancer du même nom, il constituait le premier Polyomavirus impliqué de manière consistante dans un cancer humain. Cette implication reposant sur une étude unique limitée à 10 cas, l'objectif de notre travail de thèse était de confirmer le rôle étiologique du Polyomavirus de Merkel dans le carcinome de Merkel.

Nous avons montré que le génome du Polyomavirus de Merkel était présent dans les trois quarts des cas de carcinome de Merkel, mais également que le virus infecte la population générale de manière quasi-ubiquitaire et de nombreux tissus en dehors de la peau. Les faits que chez les sujets atteints de carcinome de Merkel, l'ADN viral soit présent à des taux décelables de manière chronique dans différents tissus et que les titres d'anticorps sériques spécifiques du virus soient élevés suggèrent que ces sujets développent une infection chronique active. Celle-ci pourrait faciliter la survenue de mutations et d'intégrations de l'ADN viral qui sont spécifiquement associées aux carcinomes de Merkel. Ces modifications secondaires du génome viral aboutissent à la production d'oncoprotéines virales par les cellules tumorales, mais à l'abolition des capacités répliquatives donc lytiques du virus et constitueraient ainsi le support de la transformation tumorale.

Mots clés : carcinome de Merkel, Polyomavirus de Merkel, cancer, virus oncogène

Abstract

Title : Merkel Cell Polyomavirus role in Merkel Cell Carcinoma

Nucleotidic sequences defining the genome of a new virus, the Merkel Cell Polyomavirus, has been discovered in 2008 in Merkel cell carcinoma, a rare form of cutaneous cancer developing mostly in immunosuppressed individuals. Whereas this new virus belongs to the Polyomaviridae family, which includes known oncogenic viruses in animals, it was the first study consistently implicating a Polyomavirus in human cancer. Because scientific arguments were only based on a ten-case-single report, the primary goal of our work was to confirm the role of the Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma.

Our work demonstrated that Merkel Cell Polyomavirus DNA was indeed present in three quarters of Merkel Cell Carcinoma cases, but also that Merkel Cell Polyomavirus was a near ubiquitous virus infecting various tissues among healthy individuals. Nonetheless, viral DNA is chronically detected in various tissues from Merkel Cell Carcinoma cases, which harbour elevated seric titers of specific antibodies. Those facts suggest that Merkel Cell Polyomavirus develop an active and chronic infection that could favour genomic mutation and integration events specifically associated to Merkel Cell Carcinoma. Those modifications, inducing both expression of truncated viral oncoproteins and abolishment of cell lysis mediated by viral replication, may support cell transformation.

Keywords : Merkel Cell Carcinoma, Merkel Cell Polyomavirus, cancer, oncogenic virus

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	16
FIGURES	16
TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	18
CHAPITRE 1 : LES VIRUS ONCOGENES	19
1. <i>Historique de la découverte des virus oncogènes.....</i>	19
1.1. <i>Découverte des premiers virus oncogènes.....</i>	19
1.1.1. <i>Premiers travaux expérimentaux.....</i>	19
1.1.2. <i>Découverte de virus associés aux sarcomes du poulet.....</i>	19
1.2. <i>Découverte des virus oncogènes de mammifères.....</i>	20
1.2.1. <i>Découverte des premiers virus oncogènes chez le lapin.....</i>	20
1.2.2. <i>Découverte des premiers virus oncogènes chez les rongeurs.....</i>	20
1.3. <i>Découverte des virus oncogènes chez l'Homme.....</i>	21
1.3.1. <i>Découverte du premier virus oncogène chez l'Homme.....</i>	21
1.3.2. <i>Découverte d'autres virus oncogènes chez l'Homme.....</i>	21
2. <i>Découvertes majeures associées à l'étude des virus oncogènes.....</i>	22
2.1. <i>Des modèles précieux.....</i>	22
2.2. <i>Découvertes associées aux virus oncogènes en biologie.....</i>	23
2.3. <i>Découvertes associées aux virus oncogènes en oncologie.....</i>	23
3. <i>Mécanismes cancérigènes associés aux virus oncogènes.....</i>	23
3.1. <i>Mécanismes indirectement liés à la présence du virus.....</i>	24
3.2. <i>Mécanismes directement liés à la présence du virus.....</i>	24
4. <i>Mécanismes additionnels.....</i>	24
5. <i>Attribution de la responsabilité d'un agent infectieux dans un cancer.....</i>	25
5.1. <i>Postulats de Koch.....</i>	25
5.2. <i>Postulats de Hill.....</i>	26
5.3. <i>Critères de l'IARC.....</i>	26
CHAPITRE 2 : LES POLYOMAVIRUS	27
1. <i>Historique de la découverte des Polyomavirus.....</i>	27
1.1. <i>Découverte du Polyomavirus murin.....</i>	27
1.2. <i>Découverte du Virus simien 40.....</i>	27
1.3. <i>Découverte des Polyomavirus à tropisme humain.....</i>	28
1.4. <i>Découverte des Polyomavirus aviaires.....</i>	29
1.5. <i>Découvertes des derniers membres de la famille.....</i>	29
1.5.1. <i>Mise en évidence de nouveaux virus par biologie moléculaire.....</i>	29
2. <i>Taxonomie.....</i>	30
2.1. <i>Une famille de 21 membres.....</i>	30
2.2. <i>Polyomavirus aviaires.....</i>	32
2.3. <i>Polyomavirus de mammifères.....</i>	32
3. <i>Classification phylogénétique.....</i>	32
3.1. <i>Classification en deux branches.....</i>	32
3.2. <i>Classification des Polyomavirus de mammifères en deux sous-groupes.....</i>	33
4. <i>Structure.....</i>	34
4.1. <i>Capside virale.....</i>	34
4.2. <i>Nature du génome viral.....</i>	34
5. <i>Organisation du génome viral.....</i>	35
5.1. <i>La NCCR.....</i>	35
5.2. <i>La région codante précoce.....</i>	36
5.3. <i>La région codante tardive.....</i>	37
6. <i>Cycle de répllication virale in vitro.....</i>	37
6.1. <i>Entrée du virus.....</i>	37

6.2.	<i>Transport intracellulaire</i>	38
6.3.	<i>Expression des protéines précoces</i>	38
6.4.	<i>Réplication du génome viral</i>	39
6.5.	<i>Expression des protéines tardives</i>	39
6.6.	<i>Assemblage et sortie du virus</i>	39
7.	<i>Les fonctions des protéines virales précoces</i>	40
7.1.	<i>LT</i>	40
7.1.1.	<i>Fonctions impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire</i>	40
7.1.2.	<i>Fonctions impliquées dans la réplication et la transcription du génome viral</i>	41
7.2.	<i>La protéine ST</i>	41
CHAPITRE 3 : POUVOIR PATHOGENE DES POLYOMAVIRUS A TROPISME HUMAIN		42
1.	<i>Epidémiologie</i>	42
2.	<i>Mode de transmission</i>	42
3.	<i>Tropisme tissulaire in vivo</i>	43
3.1.	<i>Les polyomavirus infectent différents tissus</i>	43
3.2.	<i>Déterminants du tropisme tissulaire</i>	43
3.2.1.	<i>Rôle de VP1</i>	43
3.2.2.	<i>Rôle de la NCCR</i>	44
3.2.3.	<i>Rôle de LT</i>	44
4.	<i>Pouvoir pathogène des Polyomavirus humains</i>	44
4.1.	<i>Les déterminants du pouvoir pathogène des Polyomavirus humains</i>	44
4.1.1.	<i>Une infection à vie</i>	44
4.1.2.	<i>Facteurs viraux influençant le niveau de réplication virale</i>	45
4.1.3.	<i>Facteurs de l'hôte influençant le niveau de réplication virale</i>	45
4.1.3.1.	<i>Rôle de l'immunodépression</i>	45
4.1.3.2.	<i>Facteurs micro–environnementaux</i>	46
4.2.	<i>Pouvoir pathogène des différents Polyomavirus à tropisme humain</i>	47
4.2.1.	<i>BKPyV</i>	47
4.2.2.	<i>JCPyV</i>	47
4.2.3.	<i>Autres Polyomavirus</i>	47
5.	<i>Les Polyomavirus humains sont–ils cancérogènes chez l'Homme ?</i>	47
5.1.	<i>Modèles expérimentaux</i>	48
5.2.	<i>Mise en évidence des Polyomavirus dans les cancers humains</i>	48
CHAPITRE 4 : MECANISMES ONCOGENIQUES ASSOCIES A LA TRANSFORMATION PAR LES POLYOMAVIRUS		50
1.	<i>Notions de permissivité cellulaire et d'infection productive ou transformante</i>	50
1.1.	<i>Non permissivité</i>	50
1.2.	<i>Semi-permissivité</i>	50
1.3.	<i>Infection transformante</i>	51
2.	<i>Mécanismes associés à la transformation par les Polyomavirus oncogènes</i>	51
2.1.	<i>Déterminants de la transformation in vitro</i>	51
2.1.1.	<i>Expression des protéines virales</i>	51
2.1.2.	<i>Persistance dans la population tumorale sous forme non infectieuse</i>	52
2.1.2.1.	<i>Persistance sous forme intégrée</i>	52
2.1.2.1.1.	<i>Généralités</i>	52
2.1.2.1.2.	<i>Mécanisme de l'intégration virale</i>	53
2.1.2.1.3.	<i>Conséquences sur l'expression du génome cellulaire</i>	53
2.1.2.2.	<i>Autres modes de persistance</i>	53
2.1.3.	<i>Remaniements et mutations du génome viral</i>	54
2.1.3.1.	<i>Remaniements</i>	54
2.1.3.2.	<i>Mutations du génome viral</i>	55
2.1.4.	<i>Absence d'expression des protéines tardives et de production de particules virales</i>	55
2.2.	<i>Dépendance au virus</i>	55
2.3.	<i>Facteurs déterminants la cancérogenèse in vivo</i>	56
CHAPITRE 5 : LA REPONSE IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE LES POLYOMAVIRUS		57
1.	<i>Protéines virales immunogènes</i>	57
2.	<i>Réponse immunitaire humorale</i>	57
3.	<i>Réponse immunitaire cellulaire</i>	58

4.	<i>Intérêt des pseudo-particules virales de Polyomavirus en vaccinologie</i>	58
CHAPITRE 6 : LE CARCINOME DE MERKEL		59
1.	<i>Définition</i>	59
2.	<i>Evolution, pronostic et prise en charge</i>	59
3.	<i>Origine du carcinome de Merkel</i>	60
4.	<i>Epidémiologie et facteurs de risque</i>	60
5.	<i>Physiopathologie du MCC</i>	61
CHAPITRE 7 : LA DECOUVERTE DU POLYOMAVIRUS DE MERKEL		62
1.	<i>A la recherche de nouveaux agents cancérogènes</i>	62
2.	<i>Découverte d'un nouveau virus</i>	62
2.1.	<i>Mise en évidence d'ARN non humains</i>	62
2.2.	<i>Confirmation de la présence d'ARN messagers non humains</i>	63
3.	<i>Découverte d'un nouveau Polyomavirus à tropisme humain</i>	63
3.1.	<i>Caractérisation du génome viral du nouvel agent</i>	63
3.2.	<i>Analyse phylogénétique</i>	64
4.	<i>Arguments en faveur du rôle cancérigène du nouveau Polyomavirus dans les MCC</i>	65
4.1.	<i>Prévalence de l'ADN viral dans les MCC</i>	65
4.2.	<i>Prévalence de l'ADN viral dans des tissus contrôles</i>	65
4.3.	<i>Intégration de l'ADN viral</i>	66
5.	<i>Conclusion</i>	66
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE		67
ARTICLES PUBLIES		68
AVANT PROPOS		69
RESUME DU PREMIER ARTICLE		70
RESUME DU DEUXIEME ARTICLE		80
RESUME DU TROISIEME ARTICLE		90
RESULTATS, DISCUSSION ET REVUE DE LA LITTERATURE		99
CHAPITRE 1 : DETECTION DU GENOME VIRAL DE MCPyV		100
1.	<i>Prévalence de l'ADN de MCPyV dans les échantillons biopsiques de MCC</i>	100
1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	100
1.1.1.	<i>Bref rappel méthodologique</i>	100
1.1.2.	<i>Résultats</i>	100
1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	101
1.2.1.	<i>Résultats publiés dans la littérature</i>	101
1.2.2.	<i>Variabilité des méthodes utilisées dans la littérature</i>	102
1.2.2.1.	<i>Variabilité de la qualité des échantillons biopsiques</i>	102
1.2.2.2.	<i>Variabilité des techniques de détection de l'ADN</i>	105
1.3.	<i>Conclusion</i>	105
2.	<i>Présence du génome viral de MCPyV dans des échantillons de tissus non tumoraux</i>	106
2.1.	<i>Chez les sujets atteints de MCC</i>	106
2.1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	106
2.1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	106
2.2.	<i>Chez les sujets exempts de MCC</i>	108
2.2.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	108
2.2.2.	<i>Revue de la littérature</i>	108
2.2.2.1.	<i>Prélèvements non tumoraux cutanéomuqueux</i>	108
2.2.2.1.1.	<i>Prévalence globale</i>	108
2.2.2.1.2.	<i>Association éventuelle avec des lésions cutanées bénignes</i>	108
2.2.2.1.3.	<i>Rôle de l'immunodépression</i>	109
2.2.2.1.4.	<i>Origine de l'ADN décelé et aspects de l'infection cutanée</i>	109
2.2.2.1.5.	<i>Conclusion</i>	109
2.2.2.2.	<i>Echantillons non cutanéomuqueux</i>	112
2.2.2.2.1.	<i>Appareil respiratoire</i>	112

2.2.2.2.2.	<i>Appareil génito–urinaire</i>	113
2.2.2.2.3.	<i>Tissu hématopoïétique</i>	113
2.2.2.2.4.	<i>Autres tissus</i>	114
2.2.2.2.5.	<i>Conclusion</i>	114
3.	<i>Présence de l'ADN de BKPyV et JCPyV chez les sujets atteints de MCC</i>	114
4.	<i>Conclusion</i>	115
CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DU GENOME DE MCPyV		117
1.	<i>Quantification du génome de MCPyV dans les MCC</i>	117
1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	117
1.1.1.	<i>Bref rappel méthodologique</i>	117
1.1.2.	<i>Résultats</i>	117
1.1.2.1.	<i>Charge virale médiane et variabilité</i>	117
1.1.2.2.	<i>Interprétation des résultats</i>	118
1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	119
1.2.1.	<i>Résultats de la littérature</i>	119
1.2.2.	<i>Diversité des méthodes utilisées dans la littérature</i>	121
1.3.	<i>Conclusion</i>	121
2.	<i>Quantification du génome de MCPyV dans les prélèvements non tumoraux</i>	122
2.1.	<i>Résultats obtenus au cours de travail de thèse</i>	122
2.2.	<i>Revue de la littérature</i>	122
2.2.1.	<i>Echantillons de tissus non tumoraux et non cutanés</i>	122
2.2.2.	<i>Echantillons non tumoraux cutanéomuqueux</i>	123
3.	<i>Conclusion</i>	123
CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'INTEGRATION DU GENOME DE MCPyV		124
1.	<i>Etude de l'intégration du génome de MCPyV dans les MCC</i>	124
1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	124
1.1.1.	<i>Bref rappel méthodologique</i>	124
1.1.2.	<i>Etude de l'intégration par la technique de FISH</i>	124
1.1.3.	<i>Etude de l'intégration par la technique de DIPS–PCR</i>	125
1.1.3.1.	<i>Caractère monoclonal de l'intégration</i>	125
1.1.3.2.	<i>Caractéristiques des intégrations au niveau du génome cellulaire</i>	125
1.1.3.2.1.	<i>Identification des locus et des séquences impliquées</i>	125
1.1.3.2.2.	<i>Conséquences de l'intégration sur l'expression du génome cellulaire</i>	126
1.1.3.2.3.	<i>Identification des gènes au voisinage</i>	126
1.1.3.2.4.	<i>Remaniements du génome cellulaire</i>	126
1.1.3.2.5.	<i>Etude de l'expression de gènes cellulaires au voisinage</i>	127
1.1.3.3.	<i>Caractéristiques des intégrations au niveau du génome viral</i>	127
1.1.3.3.1.	<i>Cassures en dehors du gène LT</i>	127
1.1.3.3.2.	<i>Cassures dans le gène LT</i>	128
1.1.3.3.3.	<i>Abolition concomitante des 2 types de fonction</i>	129
1.1.4.	<i>Conclusion</i>	130
1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	130
1.2.1.	<i>Observations confirmant nos résultats</i>	130
1.2.2.	<i>Observations atypiques</i>	131
1.3.	<i>Conclusion</i>	132
2.	<i>Recherche de l'intégration virale dans les tissus sains</i>	132
2.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	132
2.2.	<i>Revue de la littérature</i>	132
3.	<i>Mise en évidence de génomes viraux complets dans les MCC</i>	133
3.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	133
3.2.	<i>Revue de la littérature</i>	133
4.	<i>Conclusion</i>	133
CHAPITRE 4 : MUTATIONS DU GENOME DE MCPyV		135
1.	<i>Etude de la présence de mutations de ST</i>	135
2.	<i>Etude de la présence de mutations de LT</i>	135
2.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	135
2.1.1.	<i>Bref rappel méthodologique</i>	135

2.1.2.	Résultats.....	136
2.1.2.1.	Variabilité virale.....	136
2.1.2.2.	Mise en évidence de souches virales.....	136
2.1.2.3.	Mise en évidence de mutations additionnelles dans l'ADN viral tumoral.....	136
2.1.2.4.	Analyse détaillée des mutations des séquences associées aux MCC.....	137
2.1.2.4.1.	Caractère monoclonal des mutations.....	137
2.1.2.4.2.	Types de mutations.....	137
2.1.2.4.3.	Sièges des mutations.....	138
2.1.2.5.	Mise en évidence de séquences codant une protéine LT complète.....	138
2.1.2.6.	Redondance des processus de troncature de LT.....	139
2.2.	Revue de la littérature.....	139
2.2.1.	Données de la littérature en accord avec nos résultats.....	139
2.2.2.	De nouvelles informations apportées par la littérature.....	141
2.2.2.1.	Profils atypiques.....	141
2.2.2.2.	Recherches de mutations dans l'ADN somatique.....	141
2.2.2.3.	Fonctionnalité du domaine de fixation à pRb de LT.....	141
2.2.2.4.	Fonctionnalité du domaine hélicase.....	141
2.2.2.5.	Fonctionnalité de l'OBD.....	142
2.2.2.6.	Autres domaines de LT.....	142
2.2.3.	Données de la littérature en contradiction avec nos résultats.....	142
2.3.	Conclusion.....	143
3.	Présence de mutations en dehors de la région codante précoce.....	143
3.1.	Résultats obtenus au cours du travail de thèse.....	143
3.2.	Revue de la littérature.....	144
3.2.1.	Mutations de la NCCR.....	144
3.2.2.	Présence de mutations au niveau de la région codante tardive.....	144
4.	Conclusion.....	146
CHAPITRE 5 : EXPRESSION DU GENOME VIRAL.....		147
1.	Expression des gènes codants les protéines précoces dans les MCC.....	147
1.1.	Résultats obtenus au cours du travail de thèse.....	147
1.2.	Revue de la littérature.....	147
1.2.1.	Etude de la littérature sur l'expression des ARNm précoces.....	147
1.2.2.	Expression des protéines précoces.....	148
1.2.2.1.	Expression de protéines tronquées.....	148
1.2.2.2.	Etudes de grande ampleur de l'expression des protéines précoces.....	149
1.2.2.2.1.	Résultats globaux.....	149
1.2.2.2.2.	Corrélations en les résultats d'IHC et de détection/ quantification de l'ADN viral.....	151
1.2.3.	Dépendance des cellules tumorales à l'expression des protéines virales.....	151
2.	Expression des gènes codants les protéines tardives dans les MCC.....	152
2.1.	Résultats obtenus au cours du travail de thèse.....	152
2.2.	Revue de la littérature.....	152
3.	Expression des gènes viraux dans les tissus non tumoraux.....	153
3.1.	Expression des ARNm viraux.....	153
3.2.	Expression des protéines virales.....	153
4.	Conclusion.....	153
CHAPITRE 6 : MARQUEURS SEROLOGIQUES DE L'INFECTION PAR MCPyV.....		154
1.	Réponse immunitaire humorale dirigée contre MCPyV.....	154
1.1.	Présence d'Ac anti-VP1 chez les MCC et dans la population générale.....	154
1.1.1.	Résultats obtenus au cours du travail de thèse.....	154
1.1.1.1.	Bref rappel méthodologique.....	154
1.1.1.2.	Résultats.....	154
1.1.2.	Revue de la littérature.....	155
1.1.2.1.	Diversité des techniques utilisées dans la littérature.....	155
1.1.2.2.	Résultats de la littérature.....	155
1.1.2.2.1.	Prévalence dans la population générale.....	155
1.1.2.2.2.	Lien avec l'âge.....	155
1.1.2.2.3.	Comparaison de la fréquence entre différentes populations.....	157
1.1.2.2.4.	Démonstration du lien entre taux d'Ac anti-VP1 et excrétion virale cutanée.....	157

1.1.2.2.5.	<i>Comparaison avec les taux d'Ac spécifiques des autres Polyomavirus humains</i>	157
1.2.	<i>Conclusion</i>	158
2.	<i>Présence d'Ac anti-LT</i>	158
2.1.	<i>Des marqueurs du MCC</i>	158
2.2.	<i>Lien avec l'évolution de la maladie</i>	159
3.	<i>Réponse immunitaire cellulaire dirigée contre MCPyV</i>	159
4.	<i>Conclusion</i>	160
CHAPITRE 7	LE CARCINOME DE MERKEL A-T-IL PLUSIEURS ETIOLOGIES ?	161
1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	161
1.1.	<i>Lien entre la charge virale tumorale et le pronostic de la maladie</i>	161
1.2.	<i>Lien entre le taux d'Ac anti-VP1 et le pronostic de la maladie</i>	161
2.	<i>Revue de la littérature</i>	162
2.1.	<i>Corrélations avec le pronostic de la maladie</i>	162
2.1.1.	<i>Présence de métastases au diagnostic</i>	162
2.1.2.	<i>Survie</i>	162
2.2.	<i>Etudes en faveur de deux étiologies, virale et non virale</i>	162
2.2.1.	<i>Concordance intra cas</i>	162
2.2.2.	<i>Corrélations avec l'exposition au soleil : origine géographique des sujets et siège de la tumeur primitive</i>	163
2.2.3.	<i>Corrélation avec l'aspect anatomopathologique</i>	163
2.2.4.	<i>Corrélation avec les résultats sérologiques</i>	164
2.2.5.	<i>Conclusion</i>	164
2.3.	<i>Etudes en faveur d'une élimination du virus</i>	165
3.	<i>Conclusion</i>	166
CHAPITRE 8	: LE MCPyV EST-IL IMPLIQUE DANS D'AUTRES CANCERS HUMAINS ?	167
1.	<i>Rôle de l'infection à MCPyV dans d'autres cancers chez les sujets atteints de MCC</i>	167
1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	167
1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	167
2.	<i>Rôle de l'infection à MCPyV dans d'autres cancers chez les sujets exempts de MCC</i>	168
2.1.	<i>Autres cancers cutanéomuqueux</i>	168
2.1.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	168
2.1.2.	<i>Revue de la littérature</i>	168
2.1.2.1.	<i>Détection de l'ADN</i>	168
2.1.2.2.	<i>Quantification du génome viral et recherche de mutations</i>	169
2.1.2.3.	<i>Mutations de l'ADN viral</i>	169
2.1.2.4.	<i>Expression du génome viral</i>	169
2.1.2.5.	<i>Séroprévalence et présence d'ADN dans le sang</i>	171
2.1.3.	<i>Conclusion</i>	171
2.2.	<i>Autres cancers non cutanéomuqueux</i>	171
2.2.1.	<i>Résultats obtenus au cours du travail de thèse</i>	171
2.2.2.	<i>Revue de la littérature</i>	171
2.2.2.1.	<i>Cancers pulmonaires</i>	171
2.2.2.1.1.	<i>Détection de l'ADN</i>	171
2.2.2.1.2.	<i>Quantification de l'ADN et expression du génome viral</i>	173
2.2.2.2.	<i>Hémopathies</i>	173
2.2.2.2.1.	<i>Détection et quantification de l'ADN viral</i>	173
2.2.2.2.2.	<i>Mutations de l'ADN viral</i>	174
2.2.2.2.3.	<i>Expression de l'ADN viral</i>	174
2.2.2.2.4.	<i>Etudes sérologiques</i>	174
2.2.2.2.5.	<i>Conclusion</i>	174
2.2.2.3.	<i>Cancers digestifs</i>	174
2.2.2.4.	<i>Autres cancers</i>	175
3.	<i>Conclusion</i>	175

CONCLUSION ET "PERSPECTIVES"..... 176

1.	<i>L'infection par MCPyV est ubiquitaire, persistante et le plus souvent asymptomatique...</i>	177
1.1.	<i>MCPyV infecte la population générale.....</i>	177
1.2.	<i>MCPyV infecte de nombreux tissus.....</i>	177
1.3.	<i>Caractère persistant de l'infection</i>	178
1.4.	<i>Une infection le plus souvent asymptomatique</i>	178
2.	<i>Mode de transmission et de dissémination du virus.....</i>	179
2.1.	<i>Mode de transmission.....</i>	179
2.2.	<i>Mode de dissémination et tropisme cellulaire</i>	179
3.	<i>MCPyV constitue également très probablement un agent oncogène chez l'Homme</i>	180
3.1.	<i>MCPyV est vraisemblablement impliqué dans la survenue des MCC</i>	180
3.2.	<i>Autres cancers</i>	181
4.	<i>Conséquences de l'implication de MCPyV dans les MCC pour la pratique clinique.....</i>	181
4.1.	<i>Conséquences pour le diagnostic.....</i>	181
4.1.1.	<i>Mise en évidence de l'ADN viral</i>	182
4.1.2.	<i>Mise en évidence des protéines virales</i>	183
4.1.3.	<i>Marqueurs sérologiques</i>	183
4.2.	<i>Conséquences pour l'évaluation du pronostic.....</i>	183
5.	<i>Compréhension des mécanismes associés au pouvoir cancérigène de MCPyV</i>	184
5.1.	<i>Un lien entre l'importance de la réplication de MCPyV et le développement des MCC... 184</i>	184
5.2.	<i>Lien entre le système immunitaire et le développement des MCC.....</i>	185
5.3.	<i>Facteurs viraux.....</i>	186
5.3.1.	<i>Génotypes</i>	186
5.3.2.	<i>Fonctions des protéines précoces de MCPyV.....</i>	186
5.3.3.	<i>Dépendance du phénotype tumoral vis-à-vis de l'expression des oncoprotéines</i>	186
5.3.4.	<i>Remaniements du génome viral</i>	187
5.4.	<i>Autres facteurs</i>	188

BIBLIOGRAPHIE..... 190

Liste des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
Ac : Ac
AdV : Adénovirus
ALV : Avian Leukemia Virus ou Virus de la leucémie aviaire
APV : Avian Polyomavirus ou Polyomavirus aviaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger

B

BCC : Basal Cell Carcinoma ou carcinome basocellulaire
BKPyV : BK Polyomavirus ou Polyomavirus BK
BFPyV : Budgerigar fledging disease ou Polyomavirus de l'oisillon perruche
BPyV : Bovine Polyomavirus ou Polyomavirus du bovin
BPyV-2 : Baboon Polyomavirus 2 ou second Polyomavirus du babouin

C

ChPyV : Chimpanzee Polyomavirus ou Polyomavirus du Chimpanzee
CK20 : Cytokératine 20
c/c : copie(s) de génome viral par cellule
CPV : Cynomolgus Polyomavirus ou Polyomavirus du singe Cynomolgus
CPyV : Corvus monedula Polyomavirus ou Polyomavirus du corbeau
CRPV : Cottontail Rabbit Papilloma Virus également dénommé Shope papilloma virus ou virus du papillome de Shope
CVT : Charge virale tumorale

D

DIPS-PCR : Detection of Integrated Papillomavirus Sequences-PCR ou détection de séquences de Papillomavirus intégrées par PCR
Dr : docteur

E

EBV : Epstein Barr Virus ou Virus d'Epstein Barr
EGF : Epidermal Growth Factor ou facteur de croissance épidermique

F

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization ou hybridation fluorescente *in situ*
FSV : Fujinami Sarcoma Virus ou Virus du sarcome de Fujinami
FPyV : Finch Polyomavirus ou Polyomavirus du pinson

G

GHPyV : Goose hemorrhagic Polyomavirus ou Polyomavirus de l'oie

H

HaPyV : Hamster Polyomavirus ou Polyomavirus du hamster

HBV : Hepatitis B virus ou Virus de l'hépatite B

HCV : Hepatitis C Virus ou Virus de l'hépatite C

HHV8 : Human Herpes Virus 8 ou huitième herpes virus humain ou virus associé au sarcome de Kaposi

HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus type 1 ou Virus de l'immunodéficience humaine acquise de type 1

HPyV6 : Human Polyomavirus 6 ou sixième Polyomavirus humain

HPyV7 : Human Polyomavirus 7 ou septième Polyomavirus humain

HPyV9 : Human Polyomavirus 9 ou neuvième Polyomavirus humain

HPV16 : Human Papillomavirus type 16 ou Papillomavirus humain de génotype 16

HPV18 : Human Papillomavirus type 18 ou Papillomavirus humain de génotype 18

HR-HPV : High Risk Human Papillomavirus ou Papillomavirus humain à haut risque cancérigène

HTLV-1 : Human T-Lymphotropic Virus-Type 1 ou Virus T-lymphotrope humain de type 1

HPV : Human Papillomavirus ou Papillomavirus humain

I

IHC : IHC

IARC : International Agency for Research on Cancer ou Centre international de Recherche sur le Cancer

J

JCPyV : JC Polyomavirus ou Polyomavirus JC

K

kDa : kilo Daltons

KIPyV : KI Polyomavirus ou Polyomavirus KI

kpb : kilo paires de bases

L

LT : Large T antigen ou antigène grand T

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LEMP : Leuco-encéphalopathie multifocale progressive

LPyV : B-Lymphotropic Polyomavirus ou Polyomavirus B-lymphotrope

M

MC : Merkel Cell ou cellule de Merkel

MCC : Merkel Cell Carcinoma ou Carcinome à cellules de Merkel

MCPyV : Merkel Cell Polyomavirus ou Polyomavirus de Merkel

MCV : Merkel Cell Virus ou Virus de Merkel

MPtV : Murine Pneumotropic Virus ou Virus pneumotrope murin ou K virus

MPyV : Mouse Polyomavirus ou Polyomavirus murin

MT : Middle T antigen ou antigène moyen T

MuLV : Murine Leukemia Virus ou Virus de la leucémie murine

MWPyV : MW Polyomavirus ou Polyomavirus MW

N

NCCR : Non Coding Region Control ou région non codante de contrôle

Ng : nanogrammes

O

OBD : Origin Binding Domain ou domaine de liaison à l'origine de réplication

P

pb : paire(s) de base

PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

PTPRG : Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type G ou récepteur de type G de la tyrosine phosphatase

R

3' RACE PCR : Rapid Amplification of 3' cDNA Ends

Rat-PyV : Athymic Rat Polyomavirus ou Polyomavirus du rat athymique

RCA : Rolling Circle Amplification

RKV : Rabbit kidney vacuolating virus ou Polyomavirus du lapin

RSV : Rous Sarcome Virus ou virus du sarcome de Rous

RT-PCR : Reverse Transcription PCR

S

SCC : Squamous Cell Carcinoma ou carcinome épidermoïde

SFV : Shope fibroma virus ou virus du fibrome de Shope

SquiPyV : Squirrel monkey Polyomavirus ou Polyomavirus du singe écureuil

ST : Small t antigen ou antigène petit t

SA12 : Simian agent 12 ou virus simien 12

SV40 : Simian vacuolating virus 40 ou Virus vacuolisant simien 40

T

TSPyV : Trichodysplasia Spinulosa associated Polyomavirus ou Polyomavirus associé à la *Trichodysplasia Spinulosa*

V

Vero : cellules de rein de singe Vert

VLP : Virus-like particles ou Pseudo-particules virales

VP1 : Viral Protein 1 ou Protéine majeure de capsid

VP2 : Viral Protein 2 ou Protéine mineure de capsid 2

VP3 : Viral Protein 3 ou Protéine mineure de capsid 3

W

WUPyV : WU Polyomavirus ou Polyomavirus WU

Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure n° 1 : Représentation phylogénétique des Polyomavirus après analyse comparative des génomes complets de 14 membres de la famille	32
Figure n° 2 : Représentation schématique de la structure des Polyomavirus	33
Figure n° 3 : Représentation schématique du génome viral de SV40	34
Figure n° 4 : Représentation schématique de la NCCR des Polyomavirus de mammifères	35
Figure n° 5 Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines LT et ST des Polyomavirus de mammifères	39
Figure n° 6 : Photographie d'une lésion de MCC localisée au niveau du sourcil	58
Figure n° 7 : Représentation schématique du génome du nouveau virus présent au sein des MCC	63
Figure n° 8 : Analyse comparative des séquences de ST, LT, VP1 et VP2 du nouveau virus et de 15 autres membres de la famille	63
Figure n° 9 : Schéma représentatif du principe de la DIPS-PCR.	124
Figure n° 10 : Schéma représentatif d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie d'une troncature des protéines de structures éventuellement synthétisées	127
Figure n° 11 : Schéma représentatif d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie d'une abolition de la synthèse des protéines de structures	127
Figure n° 12 : Schéma d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie de l'expression d'une protéine ST complète mais d'une protéine LT tronquée	128

Tableaux

Tableau n° 1 : Historique de la découverte des virus cancérigènes	21
Tableau n° 2 : Liste des Polyomavirus connus en Janvier 2008	30
Tableau n° 3 : Détection du génome viral dans les échantillons de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	102-3
Tableau n° 4 : Détection de l'ADN de MCPyV dans de biopsies de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	106
Tableau n° 5 : Détection de l'ADN de MCPyV dans de biopsies de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	109
Tableau n° 6 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des écouvillons de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	110
Tableau n° 7 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des échantillons respiratoires de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature	111
Tableau n° 8 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des échantillons respiratoires de sujets exempts	112
Tableau n° 9 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	115
Tableau n° 10 : Quantification de l'ADN de MCPyV dans les MCC d'après les données de la littérature	119
Tableau n° 11 : Mise en évidence de l'expression de 57kT/LT de MCPyV dans des biopsies de MCC d'après les données de la littérature	149
Tableau n° 12 : Mise en évidence de la présence d'Ac sériques anti-VP1 de MCPyV chez les sujets atteints de MCC et des populations contrôles	155
Tableau n° 13 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de lésions précancéreuses et cancéreuses cutanées de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps	169
Tableau n° 14 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de cancers pulmonaires de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature	171

Première partie
INTRODUCTION GENERALE

Chapitre 1 : Les virus oncogènes

Le cancer constitue la première cause de mortalité en France. Parmi les facteurs de risque identifiés à l'heure actuelle, les agents infectieux occupent une place prépondérante puisque 15 à 20 % des cancers leurs sont imputables (Parkin 2006).

Les différents types d'agents infectieux – bactéries, parasites et virus – sont impliqués dans la survenue de cancers chez l'Homme, mais les virus sont de loin les agents les plus incriminés. De plus, l'histoire des agents cancérigènes transmissibles débute avec la mise en évidence des virus oncogènes. Enfin, leur nombre ne cesse d'augmenter en raison de découvertes régulières, le virus oncogène chez l'Homme dont la découverte est la plus récente ayant été caractérisé il y a 4 ans et faisant l'objet de ce travail.

1. Historique de la découverte des virus oncogènes

Les dates principales de l'historique de la découverte des virus oncogènes sont résumées dans le tableau n° 1.

1.1. Découverte des premiers virus oncogènes

1.1.1. Premiers travaux expérimentaux

Au début du siècle précédent, l'américain Leo Loeb effectua des expériences sur la transmissibilité des cancers à partir d'ultrafiltrats de cellules tumorales de bétail, mais celles-ci se soldèrent par des échecs.

En 1908, deux danois, Oluf Bang et Vilhelm Ellerman, décrivirent pour la première fois l'existence d'un agent ultrafiltrable présent dans une forme de leucémie survenant spontanément chez le poulet et responsable de la propagation de la maladie (Hu, Bushman *et al.* 2004). Cette découverte majeure, celle du tout premier agent infectieux cancérigène, le virus de la leucémie aviaire (ou Avian Leukemia Virus, ALV) passa cependant inaperçue dans la communauté scientifique de l'époque, probablement en raison du fait que la leucémie n'était pas réellement considérée comme un cancer.

1.1.2. Découverte de virus associés aux sarcomes du poulet

Cette première découverte fut rapidement suivie par celle d'un second virus aviaire oncogène, le virus du sarcome de Rous (ou Rous Sarcome Virus, RSV), par l'américain Peyton Rous en 1911 (Rous 1911). Le RSV était, comme l'ALV, présent dans des cancers se développant spontanément chez le poulet. Mais dans le cas du RSV, il s'agissait de tumeurs solides – des sarcomes –. Comme dans le cas de l'ALV, les tumeurs pouvaient être transmises expérimentalement d'un animal à l'autre à partir d'extraits tumoraux ultrafiltrés, mais au contraire de ce qui était observé avec l'ALV, les cancers se développaient avec une rapidité foudroyante – en quelques semaines – et chez la majorité des animaux infectés.

Quelques années plus tard après cette seconde découverte, Fujinami et Inamoto mirent en évidence un troisième virus oncogène aviaire, également responsable de sarcomes, le Virus du Sarcome de Fujinami (ou Fujinami Sarcoma Virus, FSV) en 1914 (Lee, Bister *et al.* 1980).

Une nouvelle fois, la réelle portée de ces travaux ne fut pas immédiatement perçue. D'une part, le fait que le poulet soit un animal assez éloigné de l'Homme ne permit pas à l'idée selon laquelle certains cancers humains pourraient également être transmissibles, de faire immédiatement son chemin. D'autre part, ces observations furent interprétées de manière contradictoire par une partie de la communauté scientifique qui considéra non pas que le virus transformait les cellules normales en cellules tumorales, mais qu'au contraire du virus était produit à chaque étape par les cellules tumorales.

Il fut démontré plus tard que ces 3 virus, dont le génome était constitué d'acide ribonucléique (ou ARN), appartenaient à la même famille, celle des *Retroviridae*.

1.2. Découverte des virus oncogènes de mammifères

1.2.1. Découverte des premiers virus oncogènes chez le lapin

Une vingtaine d'années plus tard, Richard Shope découvrit les deux premiers virus oncogènes de mammifères, le virus du papillome de Shope également dénommé Cottontail Rabbit Papilloma Virus (ou CRPV) en 1931 et le virus du fibrome de Shope (ou Shope Fibroma Virus, SFV) en 1932 (Shope 1932; Shope 1932). Le CRPV était responsable chez le lapin sauvage du développement de tumeurs cutanées bénignes mais évoluant éventuellement vers des carcinomes malins chez le lapin domestique. En outre, l'agent infectieux, présent chez les lapins sauvages, ne pouvait être isolé des lésions cancéreuses. L'observation de Shope mettait ainsi en évidence des éléments fondamentaux dans la physiopathologie des cancers viro-induits, telles que l'influence du patrimoine génétique de l'hôte, l'existence d'étapes successives dans la cancérogenèse et la perte des capacités répliquatives virales contemporaine à la transformation cellulaire, cette dernière assertion n'étant valable que pour certains virus oncogènes.

Il fut démontré plus tard que ces deux nouveaux virus étaient constitués cette fois d'un génome formé d'acide désoxyribonucléique (ou ADN) et appartenaient à deux familles distinctes, celles des *Papillomaviridae* et des *Poxviridae*.

1.2.2. Découverte des premiers virus oncogènes chez les rongeurs

Une vingtaine d'années s'écoulèrent à nouveau avant la découverte des premiers virus oncogènes chez les petits rongeurs. Ludwig Gross découvrit successivement le virus de la leucémie murine (Murine Leukemia Virus, MuLV) en 1951 (Gross 1951) et le Polyomavirus murin (ou Mouse Polyomavirus, MPyV) en 1953 (Gross 1953). Le MuLV appartenait à la famille précédemment citée des *Retroviridae* alors que le MPyV constituait le premier membre d'une troisième famille de virus oncogènes à ADN, celle des *Polyomaviridae*.

Neuf ans plus tard, John Trentin montra qu'un virus infectant l'Homme, l'Adénovirus (ou AdV) de type 12, était capable d'induire des cancers chez le hamster. Celui-là appartenait à une quatrième famille de virus oncogènes à ADN, celle des *Adenoviridae* (Trentin, Yabe *et al.* 1962).

1.3. Découverte des virus oncogènes chez l'Homme

1.3.1. Découverte du premier virus oncogène chez l'Homme

C'est avec la découverte des virus oncogènes chez les petits rongeurs que le champ de l'oncologie virale connut sa pleine expansion, car l'existence de ces virus offrait des possibilités d'expérimentations contrôlées sur des animaux de laboratoire, et avec celles-ci naquit l'espoir d'identifier des agents viraux cancérigènes chez l'Homme. Deux années plus tard, en 1964, la découverte du premier virus oncogène chez l'Homme, le virus d'Epstein Barr (ou Epstein Barr Virus, EBV), fut publiée par Michael Anthony Epstein et Yvonne Barr (Epstein, Achong *et al.* 1964). C'est la découverte de ce virus associé à un cancer humain – le lymphome de Burkitt – qui permit à la communauté scientifique de redécouvrir, cinquante ans plus tard, les travaux pionniers effectués sur les virus oncogènes aviaires. Mais seul Peyton Rous se vit attribuer un prix Nobel – en 1966 –, l'histoire ayant oublié Oluf Bang et Vilhelm Ellerman, probablement en raison du fait que le RSV avait un pouvoir oncogène supérieur à celui de l'ALV, générant à la fois plus de tumeurs et plus rapidement.

L'EBV appartenait à une cinquième famille de virus oncogènes à ADN, celle des *Herpesviridae*.

1.3.2. Découverte d'autres virus oncogènes chez l'Homme

Sept virus sont actuellement reconnus comme cancérigènes chez l'Homme par le Centre International de Recherche sur le cancer (ou International Agency for Research on Cancer, IARC), c'est-à-dire qu'il a été considéré après examen par des groupes d'experts qu'il existait une évidence que certaines expositions à ces agents viraux pouvaient modifier l'incidence de certains des cancers associés.

Trois virus ont un génome composé d'ARN et appartiennent à deux familles différentes : les virus de l'immunodéficience humaine acquise de type 1 (ou Human Immunodeficiency Virus - Type 1, HIV-1) et le virus T-lymphotrope humain de type 1 (ou Human T-Lymphotropic Virus - Type 1, HTLV-1) appartenant à la famille des *Retroviridae*, et le virus de l'hépatite C (ou Hepatitis C Virus, HCV) appartenant à la famille des *Flaviviridae*. A noter que comme nous le détaillerons à la fin de ce chapitre, bien que le HIV-1 soit reconnu comme agent cancérigène par l'IARC, il ne constitue pas *sensu stricto* un virus oncogène puisque son effet est très indirect.

Les quatre virus restant ont un génome constitué d'ADN double brin et appartiennent à trois familles différentes. Deux d'entre eux ont un génome de grande taille – plusieurs centaines de milliers de pb (ou kilo paires de bases, kpb) et appartiennent à la famille des *Herpesviridae* : l'EBV et le virus du sarcome de Kaposi, également dénommé huitième herpès virus humain (ou Human Herpes Virus 8, HHV8). Les 2 virus restant ont un génome de petite taille ou de taille moyenne - entre 5 et 10 kilo paires de base (ou kbp) - et appartiennent à 2 familles distinctes : les Papillomavirus humains à haut risque cancérigène (ou High Risk Human Papillomavirus, HR-HPV), dont les principaux représentants sont les génotypes 16 (HPV16) et 18 (HPV18), qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*, et le virus de l'hépatite B (ou Hepatitis B virus, HBV) qui appartient à celle des *Hepadnaviridae*.

Au début de ce travail de thèse, aucun virus cancérigène avéré chez l'Homme n'appartenait à trois familles mentionnées dans l'historique et comportant des virus oncogènes chez l'animal : les *Poxviridae*, les *Adenoviridae* et les *Polyomaviridae*.

Espèce		Virus		Découverte		
		Acronyme	Date	Mode		
Oiseaux	Poulet	ALV	1908	Isolement		
		RSV	1911	Isolement		
		FSV	1914	Isolement		
Mammifères	Lapin		CRPV	1931	Isolement	
			SFV	1932	Isolement	
	Petits rongeurs	Souris	MuLV	1951	Isolement	
		Souris	MPyV	1953	Isolement	
		Hamster	AdV 12	1962	Isolement	
	Primates	Hommes	EBV	1964	Isolement	
			HBV	1970	Isolement	
			HR-HPV	1974	Isolement	
			HTLV-1	1980	Isolement	
			HIV-1	1983	Isolement	
HCV			1987	Biologie moléculaire		
HHV8	1994	Biologie moléculaire				

Tableau n° 1 : Historique de la découverte des virus cancérigènes

2. Découvertes majeures associées à l'étude des virus oncogènes

2.1. Des modèles précieux

Comme tous les virus d'animaux, les virus oncogènes constituent des parasites intracellulaires obligatoires dont la complexité est infiniment réduite par rapport à celle de la cellule eucaryote qu'ils infectent, en particulier lorsqu'il s'agit de virus constitués d'un génome de petite taille. Certains virus fonctionnent ainsi avec un nombre extrêmement limité de protéines – inférieur à dix dans le cas des Polyomavirus – qui leur suffit à détourner la machinerie cellulaire et à se répliquer. Cela est permis grâce au fait que les protéines virales ciblent des voies clés de fonctionnement de la cellule.

Or, certains virus oncogènes, tels que le MPyV et le second membre de cette famille, le Polyomavirus virus simien SV40 (ou Simian Virus 40, SV40) sont à la fois aisément cultivables et accessibles à la manipulation génétique. En effet ces virus sont cultivables sur une grande variété de cellules et le premier génome viral à avoir été séquencé dans son intégralité est celui de SV40. La caractérisation des protéines de ces virus et des partenaires cellulaires de celles-ci était alors relativement aisée. Ces travaux ont ainsi mené directement à des découvertes majeures et au développement de concepts fondamentaux qui dépassent largement le champ restreint des cancers viro-induits.

2.2. Découvertes associées aux virus oncogènes en biologie

C'est en cherchant à comprendre comment un virus à ARN pouvait interagir avec le génome cellulaire qu'Howard Temin démontra que la réplication du RSV passait par une molécule intermédiaire constituée d'ADN s'intégrant au génome cellulaire et étant synthétisée par une protéine virale, la transcriptase inverse (Mizutani, Boettiger *et al.* 1970). La découverte de cette enzyme bouleversa les modes de pensée – son existence contredisait le dogme du flux unidirectionnel du passage de l'information génétique de l'ADN vers l'ARN – et révolutionna les techniques de biologie moléculaire.

Les travaux sur la réplication des virus oncogènes à ADN permirent quant à eux d'élucider les mécanismes de réplication et de transcription de l'ADN s'appliquant à la cellule eucaryote, notamment le mode de réplication bidirectionnel de l'ADN, l'existence de séquences promotrices et *enhanceurs*, ou encore l'épissage alternatif des ARN messagers (ou ARNm) (Howley and Livingston 2009).

2.3. Découvertes associées aux virus oncogènes en oncologie.

Le premier oncogène viral et le premier proto-oncogène cellulaire ont été découverts grâce à l'étude du RSV (Stehelin, Varmus *et al.* 1976). La découverte de leur pendant, les gènes suppresseurs de tumeurs, tels que ceux codant la protéine p53 et la protéine associée au rétinoblastome (ou pRb), découle de l'identification des partenaires cellulaires des oncoprotéines antigène grand T (ou large T antigen) des Polyomavirus et E1A des Adénovirus (Lane and Crawford 1979).

Enfin, plusieurs concepts en oncologie, telles que la notion de coopération entre oncogènes ou la nécessité d'inhiber le système immunitaire, découlent de l'étude des virus oncogènes.

3. Mécanismes cancérogènes associés aux virus oncogènes

La survie et la propagation des agents infectieux – et en particulier des virus – reposent sur leurs capacités à se répliquer et/ou persister dans les cellules qu'ils infectent. Les virus ont ainsi développé d'une part, des stratégies de promotion de la prolifération et de la survie cellulaire et, d'autre part, des méthodes d'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire. Il s'avère que ces mécanismes développés par les virus peuvent également aboutir à la transformation de la cellule infectée, mais cet événement constitue ce que l'on peut considérer comme un accident dans le cycle infectieux naturel du virus.

Trois grands mécanismes cancérogènes – non exclusifs les uns des autres – sont actuellement associés aux virus oncogènes. Certains de ces mécanismes – qui supposent tous une infection chronique de l'individu par l'agent viral – sont communs aux agents infectieux en général, alors que d'autres sont *a priori* exclusifs aux virus.

3.1. Mécanismes indirectement liés à la présence du virus

Le 1^{er} mécanisme est exclusivement associé à des infections virales. C'est un mécanisme très indirect puisque dans ce cas l'agent infectieux ne constitue pas *sensu stricto* un agent cancérigène. Ce n'est en effet pas le virus lui-même mais le fait que celui-ci induise une immunodépression profonde et prolongée qui a pour conséquence de favoriser la survenue du cancer. Le cancer survient alors à la fois parce que l'immunodépression favorise les infections par d'autres pathogènes, incluant des agents cancérigènes, et parce que les capacités de repérage et/ou de destruction des cellules tumorales par le système immunitaire sont altérées. L'infection par le HIV-1 constitue l'unique exemple.

Les deux autres mécanismes sont plus étroitement en rapport avec la présence du virus.

3.2. Mécanismes directement liés à la présence du virus

Le 2^{ème} mécanisme est lié à la stimulation prolongée – et inadaptée en terme d'éradication du pathogène – du système immunitaire par l'agent infectieux. C'est alors l'inflammation chronique qui en résulte qui fait le lit du cancer. Les infections par le HCV ou des agents non viraux telles que des bactéries comme *Helicobacter Pylori* et des parasites comme *Schistosoma haematobium* illustrent parfaitement ce mécanisme.

Le 3^{ème} mécanisme – qui est, comme le premier mécanisme, exclusivement associé à des infections virales – est lié à la transformation cellulaire non pas par l'agent infectieux lui-même mais en raison de la présence et de l'expression de son génome. Deux situations – non exclusives – illustrent ce mécanisme.

Dans le premier cas de figure, la transformation est due à une perturbation de l'expression de protéines cellulaires résultant de l'insertion d'ADN viral au sein du génome cellulaire. C'est typiquement ce qui se produit dans les cancers induits par le RSV.

Dans le second cas de figure, c'est l'expression de protéines virales promouvant la prolifération ou la survie cellulaire, les oncoprotéines, qui génère le cancer. Les cancers induits par EBV ou les HR-HPV en constituent deux exemples. C'est ce 3^{ème} mécanisme que nous aborderons en particulier dans ce travail.

4. Mécanismes additionnels

Cependant, de nombreux virus sont capables d'affaiblir le système immunitaire, de générer de l'inflammation et de stimuler la prolifération et la survie cellulaire sans pour autant constituer des agents cancérigènes. De fait, la majorité des humains sont infectés par des virus avec qui ils cohabitent en bons termes jusqu'à la fin de leur vie. De plus, y compris dans le cas de virus cancérigènes avérés, l'infection ne s'accompagne pas du développement d'un cancer chez tous les individus infectés et, au sein de l'individu, dans tous les tissus infectés.

Des mécanismes additionnels extérieurs à l'agent viral participent donc très probablement au développement des cancers viro-induits, notamment l'acquisition de mutations génétiques et/ou de remaniements chromosomiques. Or, si cancers *et* altérations génétiques somatiques sont liés depuis plusieurs décennies, l'ampleur de ces dernières est actuellement reconsidérée grâce aux progrès fulgurants des techniques de séquençage. Des analyses génomiques exhaustives de différents cancers humains ont en effet révélé la présence, au sein de chaque cancer, d'un nombre spectaculaire de remaniements chromosomiques (de 10 à 100) et de mutations (de 10^3 à 10^5) (Greenman, Stephens *et al.* 2007; Campbell, Stephens *et al.* 2008).

L'intervention de ces facteurs additionnels explique également pourquoi dans certains cas la persistance du virus n'est pas forcément requise pour le maintien du phénotype cancérigène, ce qui est résumé par le concept du "hit and run".

5. Attribution de la responsabilité d'un agent infectieux dans un cancer

5.1. Postulats de Koch

La démonstration du lien de causalité entre un virus et un cancer peut s'avérer délicate. En effet, si l'on se réfère aux postulats établis par Robert Koch concernant l'attribution d'une maladie à un agent infectieux, plusieurs critères ne sont pas respectés par les virus oncogènes et une adaptation de ces critères est nécessaire.

Selon le 1^{er} postulat, l'agent infectieux doit être présent en abondance dans tous les tissus atteints – ou la majorité si la maladie admet plusieurs causes –, mais absent ou présent mais plus rarement et en quantités moindre dans les tissus sains. Or, dans le cas des cancers viro-induits, seuls des fragments de génome sont parfois présents. Difficulté supplémentaire, si la présence du virus est requise pour l'induction du cancer, elle ne l'est pas forcément pour la persistance du phénotype tumoral, comme nous l'avons mentionné précédemment. Toute trace de virus peut donc avoir été éliminée au moment du diagnostic. A l'inverse, plusieurs virus oncogènes sont ubiquitaires alors qu'une fraction minoritaire d'individus développe le cancer : le virus peut donc être fréquemment présent dans les tissus sains de l'individu atteint et même chez les individus sains.

Selon les 2^{ème} et 3^{ème} postulats, l'agent infectieux doit pouvoir être isolé de l'organisme malade, puis être cultivé et enfin sa réintroduction dans un organisme sain doit entraîner l'apparition de la maladie. Ces postulats ne sont pas valables dans certains cancers, soit parce que le lien de causalité peut être retenu alors que les moyens de culture font défaut, soit parce que le virus oncogène perd ses capacités répliquatives lors de la transformation tumorale qu'il induit. Difficulté supplémentaire, le délai de survenue entre l'infection et le développement du cancer peut être de l'ordre de plusieurs décennies.

Enfin, selon le 4^{ème} postulat, l'agent infectieux doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade, puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original. Ce postulat n'est pas non plus respecté dans le cas de certains cancers viro-induits, puisque le virus est modifié et, comme nous venons de le mentionner, perd ses capacités répliquatives lors du processus de transformation tumorale.

5.2. Postulats de Hill

Etant donné la difficulté d'appliquer les postulats de Koch pour attribuer un cancer à un agent infectieux, il est nécessaire de faire appel à d'autres critères plus généraux, tels que les postulats de Hill, qui ont été élaborés pour affirmer un lien de causalité entre un facteur spécifique – pas nécessairement viral – et une maladie. Ces postulats de Hill font appel à deux types de notions.

En premier lieu, ils concernent la qualité de l'association entre le facteur de risque et la maladie. Celle-ci doit être forte, spécifique et consistante, c'est-à-dire observée par différentes équipes et dans différentes circonstances. La notion de gradient, avec un risque croissant de développer la maladie en parallèle avec le niveau d'exposition, est en revanche difficilement applicable aux virus oncogènes.

Les postulats de Hill font également appel à la notion de cohérence : l'exposition au facteur doit précéder la survenue de la maladie et il doit exister un rationnel permettant de supporter le lien causal, reposant à la fois sur la connaissance de l'histoire naturelle de la maladie, l'existence éventuelle d'analogies avec d'autres pathologies et enfin l'expérimentation.

5.3. Critères de l'IARC

En pratique, pour attribuer un caractère oncogène à un agent viral, les experts de l'IARC s'appuient à la fois sur des critères d'évidence épidémiologique – une prévalence du cancer plus élevée chez les sujets infectés et inversement un taux de cancer faible chez les sujets séronégatifs – et des critères expérimentaux axés sur la présence et la persistance d'acides nucléiques de l'agent viral ainsi que l'induction par ceux-ci d'une stimulation de la prolifération cellulaire.

Chapitre 2 : Les Polyomavirus

1. Historique de la découverte des Polyomavirus

1.1. Découverte du Polyomavirus murin

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le membre fondateur de la famille des *Polyomaviridae*, le Polyomavirus murin, a été découvert par Ludwig Gross en 1953. Le terme Polyomavirus a été formé à partir des préfixe *poly* et suffixe *oma* du grec ancien signifiant respectivement plusieurs et tumeurs. Cette appellation illustre le fait que le virus était à l'origine de tumeurs de différents tissus.

Comme cela s'est régulièrement produit dans l'histoire des Sciences, cette découverte est le fruit du hasard et de l'interprétation attentive de ses conséquences. Gross étudiait alors un autre virus oncogène, le MuLV. Afin d'améliorer le rendement de transmission des leucémies induites par ce virus, Gross modifia son protocole expérimental en changeant notamment la taille du filtre qu'il utilisait pour ultrafiltrer les extraits cellulaires. Gross constata qu'une fois inoculés aux souris nouveaux-nés, ces nouveaux ultrafiltrats induisaient des tumeurs des glandes salivaires beaucoup plus efficacement que des leucémies. Étant donné que les deux virus présentaient des propriétés physico-chimiques différentes – notamment en termes de taille, la particule virale de MPyV étant environ deux fois plus petite que celle de MuLV, et de sensibilité à la chaleur, MPyV ne possédant pas d'enveloppe au contraire de MuLV –, Gross démontra qu'il avait isolé un nouveau virus cancérogène.

Les travaux initiaux de Gross furent poursuivis par Sarah Stewart et Bernice Eddy qui effectuèrent des expériences d'inoculation d'extraits provenant soit d'embryons totaux, soit de tumeurs, à différentes lignées de souris de laboratoire, les lignées Ak et C3H. Elles montrèrent que MPyV était présent à l'état endémique et non pathogène chez Ak, mais cancérogène chez l'espèce hétérologue C3H, espèce chez qui MPyV ne circulait pas naturellement. Elles mirent également en évidence qu'une forme infectieuse de MPyV pouvait être isolée de différents tissus non tumoraux des animaux Ak, mais pas des tumeurs. Ces expériences mettaient ainsi l'accent sur une ambivalence du virus, infectieux et non pathogène dans une espèce, mais non infectieux et cancérogène chez l'autre, ambivalence qui s'avèrera commune aux Polyomavirus oncogènes en général.

1.2. Découverte du Virus simien 40

Sept ans plus tard, Ben Sweet et Maurice Hilleman firent la découverte d'un deuxième Polyomavirus, le Virus vacuolisant simien 40 (ou Simian vacuolating Virus 40, SV40), ainsi dénommé ainsi parce qu'il produisait un effet cytopathogène de type vacuolisant lorsqu'il était cultivé sur des cellules de rein de singe Vert (ou cellules Vero) (Sweet and Hilleman 1960). Au contraire de celle de MPyV, cette découverte de SV40 ne fut pas fortuite. Sweet et Hilleman étaient à la recherche de contaminants de la souche vaccinale anti-poliomyélitique orale dite de Salk et Sabin. Cette souche était en effet produite après culture sur cellules de rein provenant de singes Rhésus dont l'état sanitaire était discutable. C'est en testant la souche en remplaçant les cellules de singe Rhésus – sur lesquelles SV40 était dépourvu d'effet – par des cellules Vero que Sweet et Hilleman firent leur découverte.

La présence possible d'un virus contaminant (et cancérigène chez l'animal) dans cette souche vaccinale avait cependant préalablement été suggérée par des travaux d'Eddy (qui avait travaillé auparavant sur MPyV). Celle-ci avait observé que des hamsters inoculés avec des extraits de cellules de rein de singe ayant été utilisés pour la préparation des souches vaccinales développaient des cancers au niveau du site d'injection. Mais ses travaux furent rejetés par la communauté scientifique, y compris par son chef de laboratoire, probablement pour deux raisons. A cette époque les tumeurs viro-induites étaient encore considérées comme des curiosités survenant essentiellement chez le poulet. Ensuite, Eddy avait précédemment été impliquée dans un scandale impliquant les laboratoires Cutter (Offit 2005). Elle avait alors signalé la persistance, dans certaines souches vaccinales antipoliomyélitiques de type Salk, de formes virulentes responsables de paralysies chez le singe, alors que le vaccin avait été déclaré comme sain par les autorités sanitaires.

Dans l'article publiant sa découverte, Hilleman souligna également que le virus contaminant les souches pouvait potentiellement développer une infection chez l'Homme, puisque des anticorps (ou Ac) spécifiques de SV40 étaient présents dans le sérum de sujets vaccinés (Sweet and Hilleman 1960).

Deux années plus tard, la démonstration du fait que, comme MPyV, SV40 était cancérigène chez l'animal, connut un grand retentissement (Girardi, Sweet *et al.* 1962). En effet, le vaccin contaminé avait alors été administré, en ne considérant que les Etats-Unis, à presque une centaine de millions d'individus, ce qui constituait un véritable problème de santé publique et justifia la mise en œuvre de programmes ambitieux de recherche sur SV40.

1.3. Découverte des Polyomavirus à tropisme humain

Les premiers Polyomavirus à tropisme humain furent découverts une dizaine d'années après celle de SV40. En 1971, dans le même fascicule du journal Lancet furent publiés deux articles décrivant les Polyomavirus BK (ou BK Polyomavirus, BKPyV) et JC (ou JC Polyomavirus, JCPyV), dénommés d'après les initiales des individus chez lesquels ils avaient été mis en évidence (Gardner, Field *et al.* 1971; Padgett, Walker *et al.* 1971). Dans les deux cas, les virus avaient été isolés après culture d'échantillons de sujets immunodéprimés et symptomatiques. BKPyV était présent dans l'urine d'un sujet transplanté rénal présentant une sténose urétérale, et JCPyV dans le cerveau d'un individu atteint d'un lymphome de Hodgkin et présentant une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (ou LEMP). Une cause virale à cette dernière maladie était déjà suspectée depuis la mise en évidence dans le cerveau des sujets atteints de particules virales ressemblant à celles de SV40. Mais en démontrant qu'un virus isolé à partir de l'extrait cérébral pouvait être transmis *in vitro* à des astrocytes humains, Padgett *et al* avaient démontré de manière formelle que la LEMP avait une cause virale.

C'est avec la découverte de ces deux virus que les Polyomavirus passèrent du statut de modèles expérimentaux utiles à la compréhension du cancer au statut de pathogènes humains. Ces deux virus se distinguaient ainsi de MPyV et SV40 qui n'étaient pas naturellement pathogènes chez leur hôte. BKPyV et JCPyV n'étaient cependant pas associés à des cancers *in vivo*.

1.4. Découverte des Polyomavirus aviaires

Il fut démontré au début des années 80 que les Polyomavirus infectaient également les oiseaux, avec la découverte du Polyomavirus de l'oisillon perruche (ou Budgerigar fledging disease Polyomavirus, BFPyV) (Bernier, Morin *et al.* 1981). Ce virus fut renommé par la suite Polyomavirus aviaire (ou Avian Polyomavirus, APV) en raison du fait qu'il infectait de nombreuses espèces d'oiseaux.

Le pouvoir pathogène de ce virus différait radicalement de celui des Polyomavirus de mammifères – qui induisaient généralement des infections asymptomatiques – puisque celui-ci était responsable d'infections aiguës disséminées rapidement mortelles chez les oisillons.

1.5. Découvertes des derniers membres de la famille

Depuis les années 2000, de nouveaux Polyomavirus ont été découverts grâce à des techniques de biologie moléculaire permettant de mettre en évidence des séquences géniques de virus inconnus.

1.5.1. Mise en évidence de nouveaux virus par biologie moléculaire

Plusieurs approches ont été utilisées pour mettre en évidence des nouveaux membres de la famille des *Polyomaviridae*.

Certains virus ont été découverts *via* une méthode d'amplification par PCR à l'aide de couples d'amorces consensus, qui correspondent en pratique à des amorces dégénérées ciblant des régions conservées entre différents Polyomavirus. Ces amorces permettent donc en théorie d'amplifier des nouveaux membres encore inconnus de la famille (Johne, Enderlein *et al.* 2005).

D'autres virus ont été mis en évidence à l'aide de la technique de RCA (pour multiply Rolling Circle Amplification). Cette technique permet l'amplification préférentielle de molécules d'ADN double brin circulaire grâce à la polymérase du bactériophage $\phi 29$ et d'amorces hexamériques de séquence aléatoire. Au contraire de la méthode précédente, la RCA ne cible donc pas des virus d'une famille en particulier, mais n'importe quel virus dont le génome est constitué d'ADN double brin circulaire. Cette méthode, qui s'était avérée fructueuse pour la découverte de nouveaux Papillomavirus, a permis de découvrir plusieurs Polyomavirus (Johne, Wittig *et al.* 2006).

Une troisième méthode décrite par Allander *et al.* a également été utilisée (Allander, Tammi *et al.* 2005). Cette technique associe d'une part un enrichissement des échantillons en particules virales par ultracentrifugation, ultrafiltration et traitement par des enzymes de digestion des acides nucléiques et une amplification par PCR à l'aide d'amorces dont la séquence nucléotidique au niveau de l'extrémité 3' est aléatoire d'autre part. Cette technique est donc encore plus généraliste que la précédente puisqu'elle permet en théorie la mise en évidence de séquences génomiques virales de n'importe quelle famille. Elle avait auparavant permis la découverte d'un nouveau Parvovirus, et a été utilisée avec succès pour la découverte de nouveaux Polyomavirus.

Les techniques de séquençage de nouvelle génération ont également constitué un atout majeur pour la découverte de nouveaux Polyomavirus. Elles permettent en effet de séquencer de grandes quantités d'ADN ou d'ARN en un temps réduit, de l'ordre de 700 megabases à 600 gigabases par réaction en fonction des techniques (Radford, Chapman *et al.*). Toutes comprennent des étapes initiales de fragmentation des séquences nucléotidiques puis de ligature à des adaptateurs. Ces adaptateurs servent aux étapes ultérieures de fixation des séquences à des supports et/ou d'amplification préalable au séquençage et/ou au séquençage proprement dit. Ce dernier fait appel à des techniques d'incorporation de nucléotides colorés – comme certaines méthodes de séquençage de première génération –, de dégagement de chaleur, de modification du pH, ou encore d'hybridation à des oligomères colorés.

C'est ainsi qu'on a été identifiés 6 nouveaux Polyomavirus: en 2005, le Polyomavirus du Chimpanzee (ou Chimpanzee Polyomavirus, ChPyV) dans un prélèvement de selles (Johne, Enderlein *et al.* 2005); en 2006, les Polyomavirus du corbeau (ou Corvus monedula Polyomavirus, CPyV) et du pinson (ou Finch Polyomavirus, FPyV) dans des prélèvements de foie et de rate (Johne, Wittig *et al.* 2006); en 2007, les troisième et quatrième Polyomavirus à tropisme humain, les Polyomavirus KI (ou KI Polyomavirus, KIPyV) et WU (ou WU Polyomavirus, WUPyV) dans des prélèvements respiratoires (Allander, Andreasson *et al.* 2007; Gaynor, Nissen *et al.* 2007) et enfin en 2008 le Polyomavirus du singe écureuil (ou Squirrel monkey Polyomavirus, SquiPyV) (Verschoor, Groenewoud *et al.* 2008). Selon la tradition des initiales, KIPyV et WUPyV ont été nommés d'après les initiales des institutions, l'Institut Karolina (ou Karolina Institute) et l'université de Washington, (ou Washington University) au sein desquelles ils ont été découverts.

Ces approches de biologie moléculaire se sont révélées fructueuses pour la découverte de nouveaux virus et en particulier de Polyomavirus puisque plus du quart d'entre eux ont été mis en évidence par ce type de méthodes. Ces approches présentent néanmoins, comme nous le verrons, deux limites : elles ne fournissent pas les capacités techniques de cultiver le virus découvert, et elles ne permettent pas d'associer directement ce dernier à une pathologie.

2. Taxonomie

2.1. Une famille de 21 membres

Initialement, les Polyomavirus formaient avec les Papillomavirus la famille des *Papovaviridae*. Ces virus avaient été regroupés en raison de leur caractère oncogène et de caractéristiques structurales communes – absence d'enveloppe, capsidie icosaédrique, génome à ADN double brin –. Mais la mise en évidence de divergences en terme de taille et d'organisation génomique – les deux virus ne codent pas pour les mêmes types de protéines – a justifié la création en 2000 de deux familles distinctes, celles des *Papillomaviridae* et *Polyomaviridae* (Woolford, Rector *et al.* 2007).

La famille des *Polyomaviridae* ne comprend actuellement qu'un seul genre, le genre *Polyomavirus* qui regroupait 21 membres jusqu'en Janvier 2008. La liste complète des Polyomavirus connus en Janvier 2008 est présentée dans le tableau n° 2.

Espèce		Virus		Découverte							
		Acronyme	Date	Mode							
Oiseaux		APV (BFPyV)		1981	Isolement						
		GHPV		2000	Isolement						
		FPyV		2006	Biologie moléculaire						
		CPyV		2006	Biologie moléculaire						
Mammifères		Rongeurs		Souris							
				MPyV		1953	Isolement				
				MPTv		1953	Isolement				
				Hamsters		HaPyV	1968	Isolement			
				Rats		Rat-PyV	1984	Isolement			
				Lapins		RKV	1966	Isolement			
				Bovins		BPyV	1980	Isolement			
		Primates		Singes		SV40		1960	Isolement		
						SV12		1963	Isolement		
						LPyV		1979	Isolement		
						CPyV		1984	Isolement		
						BPyV-2		1989	Isolement		
						ChPyV		2005	Biologie moléculaire		
						SquiPyV		2008	Biologie moléculaire		
						Hommes		BKPyV		1971	Isolement
								JCPyV		1971	Isolement
KIPyV								2007	Biologie moléculaire		
WUPyV		2007	Biologie moléculaire								

Tableau n° 2 : Liste des Polyomavirus connus en Janvier 2008

2.2. Polyomavirus aviaires

Quatre Polyomavirus ont été isolés chez les oiseaux : l'APV, le CPyV, le FPyV et le Polyomavirus de l'oie (ou Goose hemorrhagic Polyomavirus, GHPyV). Au contraire des Polyomavirus de mammifères qui ont un tropisme d'espèce restreint, l'APV infecte des espèces d'oiseaux nombreuses et variées, des petits oiseaux comme la perruche et le pinson jusqu'aux grands rapaces comme la buse et le vautour, en passant par l'oie et le corbeau (Johne and Muller 2007).

2.3. Polyomavirus de mammifères

Au début de notre travail, dix-sept Polyomavirus infectant les mammifères étaient connus (Wognum, Sol *et al.* 1984; Johne and Muller 2007; Verschoor, Groenewoud *et al.* 2008).

Cinq membres ont été isolés chez les petits mammifères. Quatre virus ont été décrits chez 3 espèces de rongeurs : le MPyV et le virus pneumotrope murin (ou Murine Pneumotropic Virus, MPtV, anciennement dénommé K virus) chez la souris, le Polyomavirus du hamster (ou Hamster Polyomavirus, HaPyV) et le Polyomavirus du rat athymique (ou Athymic Rat Polyomavirus, Rat-PyV). Un virus a été décrit chez le lapin, le Polyomavirus du lapin (ou Rabbit kidney vacuolating virus, RKV).

Douze membres infectant les grands mammifères étaient connus en Janvier 2008.

Un seul virus a été décrit chez les bovins, le Polyomavirus bovin (ou Bovine Polyomavirus, BPyV).

C'est chez les primates que la plus grande variété était observée, avec 7 membres infectant 6 espèces de primates : SV40 chez le singe Rhesus, le virus simien 12 (ou Simian agent 12, SA12) et le Polyomavirus du babouin (ou Baboon polyomavirus 2, BPyV-2) chez le babouin, le Polyomavirus B-lymphotrope (ou B-lymphotropic polyomavirus, LPyV) chez le singe Vert, le Polyomavirus du Chimpanzee ou Chimpanzee polyomavirus, ChPyV), le Polyomavirus du singe Cynomolgus (ou Cynomolgus Polyomavirus, CPV) et le Polyomavirus du singe Ecureuil (ou Squirrel monkey Polyomavirus, SquiPyV).

Enfin, au début de notre travail, 4 membres infectaient l'homme: BKPyV, JCPyV, KIPyV et WUPyV.

3. Classification phylogénétique

3.1. Classification en deux branches

Les arbres phylogénétiques incluant les 15 génomes complets de Polyomavirus séquencés à l'heure actuelle révèlent une répartition des virus grossièrement cohérente avec leur tropisme d'hôte (Johne and Muller 2007). Un exemple d'arbre phylogénétique est présenté figure n° 1.

Une césure initiale sépare d'un côté les Polyomavirus à tropisme *aviaire* et de l'autre les Polyomavirus de mammifères. Ces deux branches pourraient dans le futur former deux genres distincts, Avipolyomavirus et Mastpolyomavirus. L'existence de ces 2 branches suggère que les Polyomavirus ont dans l'ensemble co-évolué avec leurs hôtes.

Les différences majeures entre les Polyomavirus aviaires et de mammifères résident dans la séquence codante de LT, dans la région non codante de contrôle (ou Non Coding Control Region, NCCR) et enfin – différence la plus évidente – dans la présence d’un cadre de lecture spécifique aux Polyomavirus aviaires et codant une protéine dénommée protéine virale 4 (ou Viral Protein 4, VP4) ou ORF-X (pour Open Reading Frame-X) selon les virus.

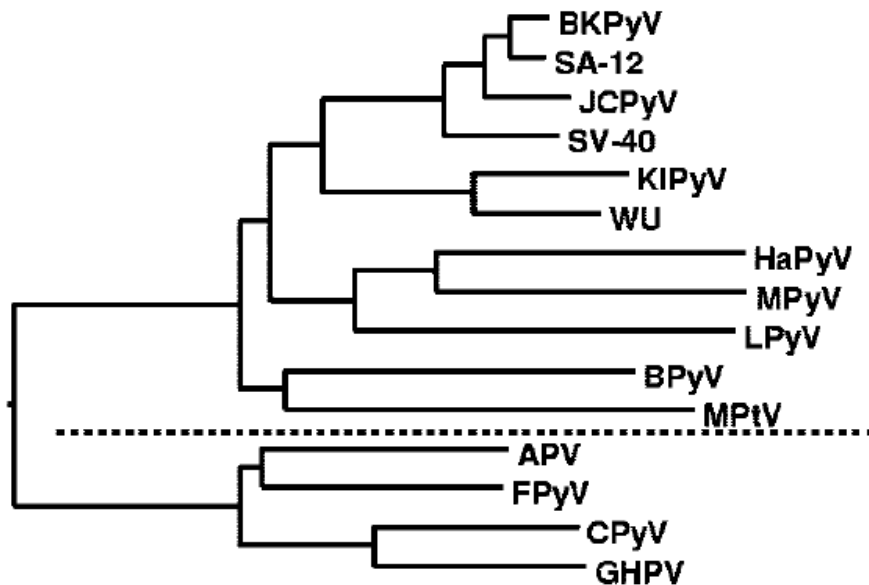


Figure n° 1 : Représentation phylogénétique des Polyomavirus après analyse comparative des génomes complets de 14 membres de la famille ((Johne and Muller 2007).

3.2. Classification des Polyomavirus de mammifères en deux sous-groupes

La branche des Polyomavirus de mammifères se subdivise en deux sous-groupes dont les chefs de file sont SV40 et MPyV. Au contraire de la première division de l’arbre phylogénétique, cette seconde division ne respecte que partiellement le tropisme des différents virus. En effet, les virus infectant les mêmes espèces – notamment la souris et l’Homme – ne sont plus regroupés. Cette observation suggère que des franchissements de la barrière d’espèce se sont produits au cours de l’évolution dans le cas de certains virus, en particulier MPtV, BPyV SA12, et BKPyV (Perez-Losada, Christensen *et al.* 2006)

A noter cependant que les Polyomavirus à tropisme humain sont regroupés tous les quatre dans le même sous-groupe apparenté à SV40.

4. Structure

Une représentation schématique de la structure des Polyomavirus est présentée figure n° 2.

4.1. Capside virale

Les virions se présentent sous la forme de petites particules d'environ 40 à 45 nm de diamètre, dépourvues d'enveloppe – donc relativement résistantes – et de structure icosaédrique.

La capside virale est constituée de 60 hexamères et de 12 pentamères formés de trois types de protéines, les protéines de capsid virale 1, 2 et 3 (ou Viral Capsid, VP1–3). Chaque unité est constituée de 4 ou 5 molécules de VP1 interagissant avec une molécule de VP2 ou de VP3. VP1 est également dénommée protéine majeure de capsid à la fois parce qu'elle en constitue le composant majoritaire et parce qu'elle assure des rôles fonctionnels majeurs.

VP1 possède des capacités d'auto-assemblage et serait l'unique protéine indispensable à la formation de la capsid virale, puisque des pseudo-particules constituées exclusivement de VP1 peuvent être obtenues *in vitro*, sans que l'adjonction de VP2 ne permette d'améliorer le rendement de production. De plus, en tant que seule protéine exposée à l'extérieur de la capsid, VP1 est impliquée dans les phénomènes d'interaction avec le(s) récepteur(s) cellulaire(s) et la stimulation du système immunitaire. Les protéines mineures VP2 et VP3 des Polyomavirus de mammifères semblent néanmoins également jouer un rôle accessoire puisque, *in vivo*, l'introduction de mutations au sein des gènes correspondants diminue l'infectiosité des particules (Mannova, Liebl *et al.* 2002).

4.2. Nature du génome viral

Le génome viral est constitué d'une molécule unique d'ADN double brin circulaire d'une taille de 5 à 5,3 kpb.

Dans la particule virale, cette molécule d'ADN est associée à des histones cellulaires et compactée sous forme de mini-chromosome à l'intérieur de la capsid. Dans la cellule, lorsque le génome est libéré dans le noyau, un type d'histone supplémentaire, l'histone H1, vient compléter la structure qui devient alors équivalente à celle de la chromatine cellulaire.

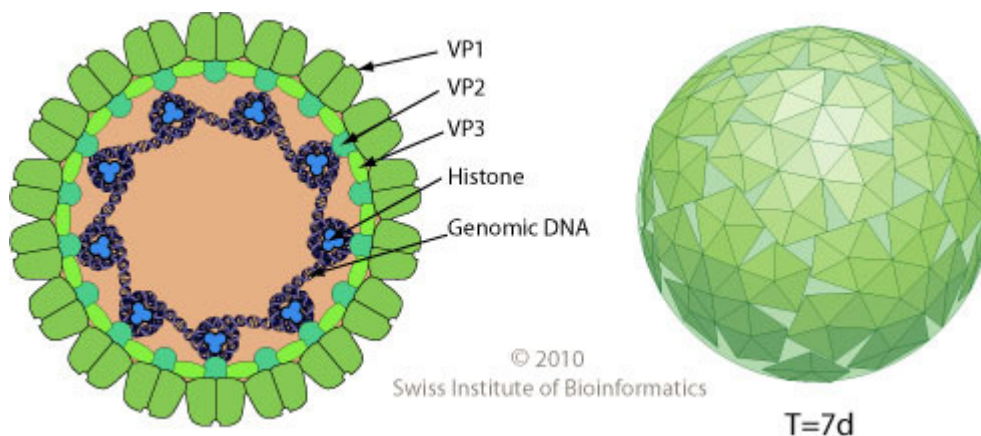


Figure n° 2 Représentation schématique de la structure des Polyomavirus ([http : //www.viralzone.expazy.org/](http://www.viralzone.expazy.org/))

5. Organisation du génome viral

Sur le plan fonctionnel, le génome est divisé en deux régions codantes non chevauchantes de taille grossièrement équivalente et une région non codante, la NCCR. Une représentation schématique du génome viral du Polyomavirus SV40 est présentée figure n°3.

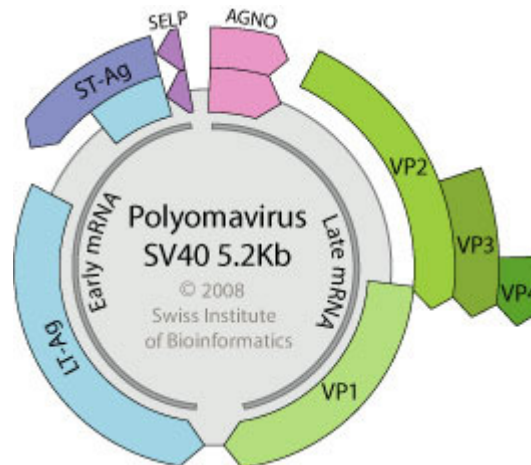


Figure n° 3 : Représentation schématique du génome viral de SV40 (<http://www.viralzone.expasy.org/>). La NCCR est représentée en violet, les cadres de lecture des régions codantes précoce et tardive en bleu pour la première et en vert et rose pour la seconde.

5.1. La NCCR

Une représentation schématique de la NCCR des Polyomavirus de mammifères est représentée figure n° 4. Cette région contient l'ensemble des éléments *cis*-régulateurs nécessaires à la réplication et l'expression du génome viral. Elle est constituée de 4 types d'éléments, sachant que la région minimale indispensable à la réplication virale ne comprend que les 3 premiers éléments (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009).

Une première séquence riche en bases de type thymidine et adénosine, dénommée séquence riche en AT, constitue la région au niveau de laquelle débute la séparation des 2 brins d'ADN lors de la réplication virale.

La NCCR comprend également de 4 à 7 (selon les virus) séquences pentanucléotidiques de type GAGGC. Ces pentanucléotides constituent des sites de fixation pour la protéine virale LT qui est impliquée à la fois dans la réplication du génome viral et la régulation de la synthèse des protéines virales. Une partie de ces séquences sont disposées en sens inverse et définit un deuxième élément de la NCCR, de type palindromique, qui constitue à la fois le promoteur de la région codante tardive et un domaine indispensable à la fixation de LT pour promouvoir la réplication. Ainsi, toute mutation de cette région aura des conséquences potentielles sur la réplication du génome viral et la synthèse des protéines tardives.

Le troisième élément est constitué de courtes séquences inversées et constitue la région promoteur de la région codante précoce.

Enfin, le quatrième élément est constitué de séquences pentanucléotidiques disposées cette fois en tandem et orientées vers la région codante précoce dont elles constituent la région *enhanceur*.

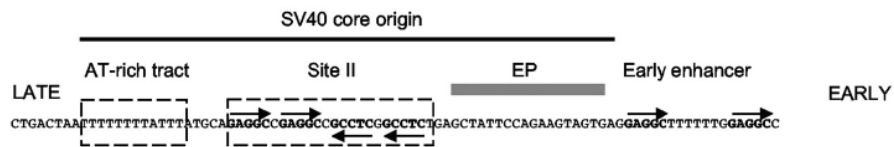


Figure n° 4 : Représentation schématique de la NCCR des Polyomavirus de mammifères (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009). Sont représentées de gauche à droite, de la région codante tardive vers la région précoce : région riche en AT, région promotrice de la région codante tardive (“site II”) contenant des séquences pentamériques disposées en sens inverse, région promotrice de la région codante précoce (“EP”) et région *enhanceur* de la région codante précoce.

5.2. La région codante précoce

La région codante précoce est ainsi nommée en raison du fait que sa transcription débute peu de temps après l’infection. Elle comprend sur le brin d’ADN de polarité positive un cadre de lecture correspondant aux protéines virales non structurales. Ces protéines, impliquées dans la régulation du cycle de réplication viral, sont également responsables, comme nous le détaillerons dans le chapitre quatre, de la transformation cellulaire dans le cas des Polyomavirus à caractère oncogène (Gjoerup and Chang).

La région codante précoce comprend les gènes codant au moins deux protéines invariablement exprimées par tous les Polyomavirus – à ceci près que pour les Polyomavirus dont la découverte est récente, l’expression de ces protéines a été prédite *in silico* mais n’a pas été démontrée -. Ces protéines sont dénommées antigènes grand T et petit t (ou small t antigen, ST), t signifiant tumoral, après la mise en évidence d’Ac spécifiques de celles-ci dans le sérum d’animaux porteurs de cancers induits. De fait, comme nous le détaillerons, ces protéines sont largement impliquées dans la transformation néoplasique.

Le gène de ST est constitué d’un unique exon, alors que celui de LT en comprend deux, la séquence du premier exon étant commune dans son intégralité à la séquence codante de ST. Ainsi, ST et LT ont une extrémité N terminale commune mais une partie C terminale distincte.

Chez les Polyomavirus de mammifères, une/des protéine(s) supplémentaire(s) de taille intermédiaire est/sont produite(s). Elles correspondent soit à des formes tronquées de LT, telles que les protéines 17 kT chez SV40 et T’135, 136 et 165 chez JCPyV, soit à des protéines plus courtes que LT mais possédant des régions propres, telles que la protéine virale antigène moyen T (ou middle T antigen, MT) chez MPyV et HaPyV.

A l'exception de MT qui joue un rôle majeur dans la réplication et la transformation tumorale, ces protéines supplémentaires sont couramment considérées comme accessoires en raison du fait que leurs fonctions sont mal connues et apparaissent comme dispensables à la réplication dans des modèles *in vitro*.

5.3. La région codante tardive

La région codante tardive doit son nom au fait qu'elle est transcrite de manière retardée lors de l'infection virale. Les gènes qu'elle porte sont situés sur le brin de polarité négative, ce qui signifie que les deux régions codantes des Polyomavirus sont orientées en sens inverse (Gjoerup and Chang).

La région code systématiquement pour au moins 3 protéines exprimées chez tous les membres de la famille, les protéines majeures et mineures de capsid VP1, 2 et 3. Un premier cadre de lecture correspond à VP1, et un second cadre de lecture non chevauchant contient les séquences codantes de VP2 et VP3. La protéine VP1 n'a donc pas de région commune à VP2 et VP3 alors que ces dernières ont une extrémité N terminale distincte mais C terminale commune.

Chez certains virus, des protéines additionnelles sont produites. A titre d'exemple, chez SV40, une protéine présentant une extrémité C terminale commune avec VP2 et VP3 et dénommée VP4 (pour Viral Protein 4) a été décrite. Elle constituerait une troisième protéine mineure de capsid. Une protéine également dénommée VP4 ou alternativement ORF X a été décrite chez les Polyomavirus aviaires mais correspond à une protéine totalement différente et dont la fonction est mal connue. C'est également le cas de l'agnoprotéine codée par le génome de certains Polyomavirus de mammifères. Le fait que ces protéines supplémentaires – éventuellement impliquées dans la maturation du virion, dans la lyse cellulaire ou encore la libération des particules virales – soient ou non des protéines structurales est encore débattu (John R, Muller H, J Virol 2007).

Enfin, chez certains Polyomavirus, des micro ARN sont également codés au niveau de la région tardive. Leur rôle serait de réguler l'expression des protéines précoces aux temps tardifs de l'infection (Gjoerup and Chang), notamment l'expression de LT qui n'est plus nécessaire au stade tardif du cycle de réplication viral et pourrait en outre s'avérer nuisible en stimulant le système immunitaire.

6. Cycle de réplication virale *in vitro*

6.1. Entrée du virus

Les Polyomavirus étant dépourvus d'enveloppe, c'est la protéine virale VP1 – l'unique protéine de capsid exposée à la surface du virion – qui est impliquée dans l'attachement à la surface de la membrane plasmique cellulaire. VP1 comporte entre autres une poche capable d'interagir avec des résidus sucrés, en particulier avec des résidus d'acide sialique présents au niveau de 2 types de protéines identifiés comme étant des récepteurs cellulaires des Polyomavirus, les gangliosides et les glycoprotéines N-glycosylées.

Les données concernant les récepteurs cellulaires des Polyomavirus sont lacunaires. Des récepteurs n'ont été identifiés que pour les 4 Polyomavirus les plus étudiés, MPyV et SV40 en tant que modèles de virus oncogènes et BKPyV et JCPyV en tant que pathogènes humains. Il ressort des données actuelles que le processus d'entrée des Polyomavirus fait fréquemment intervenir plusieurs récepteurs selon un mécanisme d'entrée probablement séquentiel. En outre, différents Polyomavirus utilisent les mêmes récepteurs cellulaires qui sont par ailleurs des molécules ubiquitaires – à l'exception de récepteurs de JCPyV –, ce qui ne permet pas d'expliquer les particularités de tropisme cellulaire des différents virus.

BKPyV, JCPyV, MPyV et SV40 interagissent tous les quatre avec des gangliosides qui sont des constituants de la membrane cellulaire concentrés au niveau des rafts lipidiques. Sur le plan biochimique, ce sont des glycolipides complexes constitués d'un nombre variable de sucres et de résidus d'acides sialiques. Ceux que reconnaissent les Polyomavirus comportent tous 4 résidus ose mais de 1 à 3 résidus d'acide sialique branché en β plus souvent qu'en α : GM1 est utilisé par SV40, GD1a par MPyV, GD1b par BKPyV et enfin GT1b à la fois par MPyV et BKPyV (Tsai and Qian).

BKPyV et JCPyV interagissent également avec des glycoprotéines N-glycosylées porteuses de deux résidus d'acide sialique branchés en α , α (2,6) et α (2,3) respectivement (Dugan, Eash *et al.* 2005).

Enfin, JCPyV interagit avec le récepteur sérotoninergique 5HT2A, une protéine exprimée exclusivement dans le tissu cérébral ce qui justifie au moins en partie le neurotropisme de ce virus (Elphick, Querbes *et al.* 2004).

6.2. Transport intracellulaire

Les virions pénètrent dans la cellule par endocytose. BKPyV, MPyV et SV40 utilisent une voie caveoline dépendante alors que JCPyV se distingue en empruntant une voie dépendante de la clathrine (Dugan, Eash *et al.* 2006).

Via le caveosome, les virions gagnent le réticulum endoplasmique puis le noyau au niveau duquel la particule est désencapsidée.

6.3. Expression des protéines précoces

La transcription des gènes viraux précoces débute rapidement après l'infection virale et précède la synthèse de néo-génomés viraux (White, Safak *et al.* 2009).

L'initiation de la transcription de cette région nécessite la présence en *cis* du promoteur viral localisé au niveau de la NCCR et en *trans* de facteurs activateurs de la transcription de nature exclusivement cellulaire. L'étape de recrutement de ces facteurs pourrait expliquer en partie le tropisme tissulaire restreint de certains virus, notamment du virus JCPyV.

La transcription dans le noyau cellulaire produit un unique ARNm primaire. Celui-ci subit un épissage qui génère au moins deux ARNm secondaires communs à l'ensemble des Polyomavirus. L'un est constitué d'un court exon et code pour la protéine virale ST, l'autre est formé de deux exons séparés d'un intron et code pour la protéine LT. Cette dernière se fixe au niveau de la NCCR et régule de manière négative la transcription précoce, c'est-à-dire sa propre transcription.

Ces ARNm sont traduits dans le cytoplasme par la machinerie cellulaire. Les protéines synthétisées regagnent alors le noyau, le transport de LT étant facilité par un signal de localisation intranucléaire.

6.4. Réplication du génome viral

La réplication du génome viral nécessite la présence en *cis* de l'origine de réplication virale localisée au niveau de la NCCR et en *trans* de la protéine LT et d'enzymes cellulaires impliquées dans la synthèse de l'ADN (Dean, Bullock *et al.* 1987). En d'autres termes, ce sont les ADN polymérases cellulaires qui synthétisent les néo-génomes, avec deux conséquences : i) le taux d'erreur généré à chaque cycle est faible car les ADN polymérases cellulaires sont relativement fiables ; ii) les virus ne peuvent se répliquer que si les polymérases cellulaires sont disponibles, c'est-à-dire si la cellule infectée effectue un cycle de division.

La réplication du génome viral est étroitement dépendante de LT qui possède, comme nous le préciserons, plusieurs fonctions indispensables à la réplication virale. Dans un premier temps, c'est LT qui va induire l'entrée en cycle de la cellule, *via* une interaction avec des partenaires cellulaires que nous détaillerons ci-après. Dans un deuxième temps, elle va recruter les enzymes cellulaires dont l'ADN polymérase au niveau de l'origine de réplication notamment grâce à son domaine de liaison à l'origine de réplication virale. Enfin, dans un troisième temps, LT va permettre la progression du complexe de réplication de manière bidirectionnelle à partir de l'origine à l'aide de ses fonctions hélicase et ATPase.

6.5. Expression des protéines tardives

La transcription de cette région nécessite la présence en *cis* du promoteur viral, comme dans le cas de la région précoce, mais au contraire de cette dernière, elle requiert en *trans* à la fois des facteurs de transcription cellulaires et la protéine virale LT. La bascule des activités de transcription des protéines précoces vers la production de protéines tardives requiert en effet la présence de LT, puisqu'une fois débutées les activités de synthèse des néo-génomes, LT va réprimer sa propre expression et induire celles des protéines tardives (White, Safak *et al.* 2009).

La transcription de la région codante tardive génère au moins deux ARNm primaires communs à l'ensemble des Polyomavirus et dépourvus d'introns. L'un donne naissance à VP1 et le second subit un épissage donnant naissance à VP2 et VP3.

6.6. Assemblage et sortie du virus

Le rétrotransport nucléaire des protéines de structure fait également intervenir des signaux de localisation intranucléaire. De plus, chez certains virus – tels que MPyV – , VP2 et VP3 doivent être complexées à VP1 pour regagner le noyau.

Une fois dans le noyau, les protéines virales structurales s'auto-assemblent, VP2 et VP3 étant cependant incapables d'interagir en l'absence de VP1.

Les particules virales sont libérées le plus souvent par lyse cellulaire. Cependant, des mécanismes apoptotiques ou encore de libération des virions ne s'accompagnant pas de lyse cellulaire ont été décrits (Clayson, Brando *et al.* 1989).

7. Les fonctions des protéines virales précoces

Nous ne détaillerons que les fonctions des protéines précoces ST et LT communes à tous les Polyomavirus. Un schéma représentatif de ces deux protéines est présenté figure n° 5.

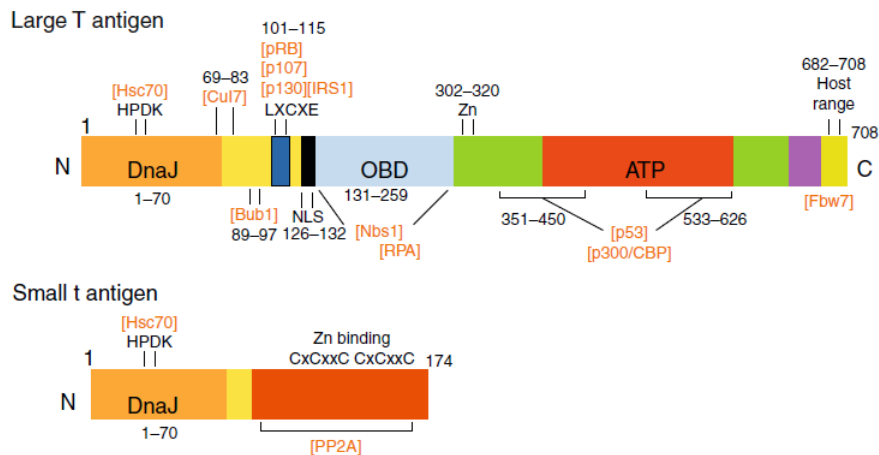


Figure n° 5 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines LT et ST des Polyomavirus de mammifères (Gjoerup and Chang). Sont indiqués en noir les noms et positions (numéros d'acides aminés) des domaines protéiques et en rouge les noms des protéines cellulaires avec lesquelles LT et ST interagissent.

7.1. LT

La protéine LT est une protéine multifonctionnelle indispensable à la réplication virale. LT possède à la fois des fonctions intrinsèques avec des activités enzymatiques et des capacités d'interaction avec des protéines cellulaires (White and Khalili 2004). Ces différentes fonctions sont reliées à plusieurs domaines séparés physiquement. En règle générale, les domaines impliqués dans l'interaction avec la prolifération et la survie cellulaires sont situés en N terminal et ceux liés à la réplication et la transcription du génome viral en C terminal.

7.1.1. Fonctions impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire

Les domaines de LT impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire sont, dans leur ordre de disposition de l'extrémité N terminale vers l'extrémité C terminale de la protéine: i) un domaine DnaJ permettant le recrutement de protéines cellulaires apparentées à pRb, p103 et p107 ii) un domaine de fixation à l'ubiquitine ligase Cul7, permettant à LT d'inhiber la dégradation par le protéasome de protéines cellulaires (Gjoerup and Chang); iii) un domaine d'interaction avec Bub-1, protéine cellulaire impliquée dans le contrôle de l'intégrité du génome cellulaire lors des divisions (Digweed, Demuth *et al.* 2002); iv) enfin, un domaine de liaison à pRb, qui permet à la fois une interaction avec pRb et avec les protéines apparentées p103 et p107, l'interaction avec ces dernières requérant également le domaine DnaJ. L'interaction avec Rb résulte en une dissociation de pRb d'avec son partenaire cellulaire E2F qui alors n'est plus réprimé, ce qui induit une entrée forcée en cycle cellulaire.

LT interagit de plus avec la protéine pro-apoptotique p53 *via* un domaine bipartite, l'une des parties étant entremêlée avec le domaine hélicase que nous décrirons ci-dessous. L'interaction de LT avec p53 aboutit à la fois à une stabilisation et une inhibition de p53. Cette inhibition inhibe l'entrée en apoptose potentiellement déclenchée par l'entrée forcée en cycle de réplication cellulaire (Gjoerup and Chang).

7.1.2. Fonctions impliquées dans la réplication et la transcription du génome viral

En C terminal sont situés plusieurs domaines impliqués dans la réplication et la transcription du génome viral. Comme nous le verrons ci-après, bien que ces deux domaines soient associés à la réplication virale, leur fonctionnalité peut avoir des conséquences sur le génome cellulaire en cas d'intégration du génome viral, en générant des foyers de réplication autonomes et aberrants.

Le premier domaine est celui de la fixation à l'origine de réplication virale (ou Origin Binding Domain, OBD). C'est *via* ce domaine que LT se fixe à la NCCR et régule la réplication et la transcription du génome viral. Le second domaine est le domaine hélicase-ATPase, qui permet la dissociation des brins d'ADN viraux au cours de la réplication.

Notons que le domaine DnaJ situé en N terminal est également crucial pour la réplication du génome viral puisqu'il permet le recrutement de protéines cellulaires chaperonnes – telle que Hsc70 – qui stimulent l'activité ATPase de LT et fournissent l'énergie nécessaire à la réplication virale (Gjoerup and Chang).

7.2. La protéine ST

Au contraire de LT, ST joue un rôle accessoire dans la réplication du génome viral. Cependant comme LT, c'est une protéine multifonctionnelle.

Son extrémité N terminale étant commune à LT, elle possède le même domaine DnaJ.

Elle possède de plus un domaine fonctionnel propre lui permettant d'inhiber la protéine cellulaire PP2A, une sérine-thréonine protéine phosphatase. Cette protéine est impliquée dans le maintien du cytosquelette et du réseau d'actine d'une part, et la régulation de l'expression de gènes viraux tardifs et cellulaires, telles que les cyclines, d'autre part (Gjoerup and Chang).

Chapitre 3 : Pouvoir pathogène des Polyomavirus à tropisme humain

1. Epidémiologie

Les Polyomavirus à tropisme humain sont des virus quasi-ubiquitaires, avec des séroprévalences élevées dans la population générale partout dans le monde. Une étude récente aux Etats-Unis incluant plus de 1500 sujets a rapporté des prévalences chez l'adulte de 82, 39, 55 et 69 % pour BKPyV, JCPyV, KIPyV et WUPyV respectivement (Kean, Rao *et al.* 2009). La primo-infection surviendrait le plus souvent dans l'enfance, plus ou moins tôt dans la vie selon les virus, l'infection par BKPyV étant la plus précoce (Stolt, Sasnauskas *et al.* 2003).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, SV40 est présent dans la population humaine mais avec une faible prévalence, de l'ordre de 2%. Un second virus simien, LPV pourrait éventuellement infecter l'Homme puisque des Ac sériques réagissant contre ce virus ont été décelés chez l'Homme dans certaines études. Cependant d'autres équipes suggèrent que cette réactivité pourrait en fait s'expliquer par une réaction croisée avec d'autres Polyomavirus humains (Nicol, Touze *et al.*; Kean, Rao *et al.* 2009).

2. Mode de transmission

Le mode de transmission des Polyomavirus humains n'est pas connu à l'heure actuelle. Cette difficulté à identifier les voies de contamination par ces virus est due aux faits que la primo-infection passe inaperçue dans la quasi totalité des cas, que le virus persiste ensuite à vie dans différents tissus de l'organisme et qu'enfin il n'existe pas de modèle animal permettant de reproduire l'infection. Les spéculations actuelles reposent sur les données sérologiques, les résultats de détection de l'ADN viral, ou plus rarement, des particules virales dans différents tissus et enfin études sur le tropisme *in vitro*. Trois modes de transmission ont été proposés et pourraient varier selon les virus.

BKPyV pourrait être transmis par voie orale – salivaire –, puisque de l'ADN de BKPyV a été décelé dans la salive et que BKPyV se réplique *in vitro* dans des cellules des glandes salivaires (Jeffers, Madden *et al.* 2009).

BKPyV et JCPyV pourraient également être acquis par voie oro-fécale au travers de l'ingestion d'eau et de nourriture contaminées par des selles et des urines, ou au contact de fomites souillés. La présence de particules virales dans l'eau et le fumier a en effet été rapportée (Gjoerup and Chang).

Enfin, la transmission par voie respiratoire semble plus probable dans les cas de KIPyV et WUPyV qui sont rarement présents dans l'urine mais plus souvent dans les voies respiratoires (Gjoerup and Chang).

3. Tropisme tissulaire *in vivo*

3.1. Les polyomavirus infectent différents tissus

Les données sur le tropisme *in vivo* des Polyomavirus reposent essentiellement sur des études de détection de l'ADN viral et plus rarement des protéines ou des particules virales. Il ressort de ces travaux que les Polyomavirus disséminent dans l'organisme de l'hôte infecté et qu'ils sont capables d'infecter de multiples tissus. Les données énoncées ci-dessous concernent les sujets immunocompétents.

BKPyV a été initialement découvert dans un échantillon d'urines. Il a été montré depuis que l'ADNurie à BKPyV mais également à JCPyV est banale, avec des fréquences de 7 et 19 % respectivement, ces taux atteignant 44 % et 70 % chez la femme enceinte ou les sujets âgés respectivement (Egli, Infanti *et al.* 2009). L'ADNurie est en revanche extrêmement rare ou inexistante dans les cas de KIPyV et WUPyV (Allander, Andreasson *et al.* 2007; Gaynor, Nissen *et al.* 2007).

BKPyV, JCPyV et WUPyV sont présents dans le tube digestif. Un à 8 % des selles contiennent de l'ADN de ces virus, avec des taux de détection le plus élevé pour JCPyV et le plus faible pour KIPyV (Allander, Andreasson *et al.* 2007; Bialasiewicz, Whiley *et al.* 2009; Vanchiere, Abudayyeh *et al.* 2009).

Bien que les Polyomavirus KIPyV et WUPyV aient été initialement découverts dans des prélèvements respiratoires de sujets atteints d'infections respiratoires, la prévalence des Polyomavirus dans les voies respiratoires semble faible. De l'ADN est décelé dans moins de 5 % des cas pour KIPyV et WUPyV et moins de 1% pour BKPyV (Sundsfjord, Spein *et al.* 1994; Abedi Kiasari, Vallely *et al.* 2008).

De l'ADN de BKPyV, JCPyV, KIPyV et WUPyV a été mis en évidence dans 4 à 35 % de biopsies amygdaliennes (Monaco, Jensen *et al.* 1998; Babakir-Mina, Ciccozzi *et al.* 2009). L'ADNémie à BKPyV, JCPyV, KIPyV et WUPyV est en revanche rare avec des taux de détection de 0 à 4 % (Babakir-Mina, Ciccozzi *et al.* 2009).

3.2. Déterminants du tropisme tissulaire

Trois éléments ont été impliqués dans le déterminisme du tropisme viral.

3.2.1. Rôle de VP1

La présence de mutations du gène codant VP1 dans les souches de JCPyV isolées du tissu cérébral mais leur absence dans les souches provenant d'urines suggèrent que VP1 constitue probablement une première restriction du tropisme.

Cette hypothèse est soutenue par des expériences avec des virus chimériques dont le génome est formé des régions NCCR et codante précoce de SV40 mais dont la région codante tardive a été remplacé par celle de JCPyV. Le tropisme *in vitro* de ces virus chimériques est alors, comme celui de JCPyV, limité aux cellules gliales (Chen and Atwood 2002).

3.2.2. Rôle de la NCCR

La NCCR semble aussi impliquée dans le tropisme cellulaire. *In vivo*, des réarrangements de la NCCR de JCPyV et plus rarement de BKPyV sont associés à l'ADN viral décelé dans le système nerveux central ou dans le sang mais pas dans les urines (Barcena-Panero, Echevarria *et al.*; Fedele, Polo *et al.* 2006). *In vitro*, l'introduction de mutations dans la NCCR de BKPyV modifie son tropisme cellulaire (Johnsen, Seternes *et al.* 1995).

3.2.3. Rôle de LT

La capacité de LT à interagir avec les protéines cellulaires constituent un dernier facteur restrictif. A titre d'exemple, *in vitro*, SV40 se réplique dans les fibroblastes mais pas dans les cellules mésothéliales humaines, au sein desquelles le taux basal de p53 est plus élevé (Bocchetta, Di Resta *et al.* 2000).

4. Pouvoir pathogène des Polyomavirus humains

4.1. Les déterminants du pouvoir pathogène des Polyomavirus humains

4.1.1. Une infection à vie

S'il est actuellement établi qu'après la primo-infection les Polyomavirus persistent chez l'individu tout le long de la vie, nous ne savons pas à l'heure actuelle comment les Polyomavirus se maintiennent dans les tissus infectés. Les termes de réactivation et d'infection latente sont largement utilisés dans la littérature pour désigner le passage de niveaux de réplication indétectables/faibles à des niveaux élevés. Mais ils supposent que les Polyomavirus soient capables d'établir une forme latente d'infection qui n'a pas été caractérisée chez eux, et, étant donné la faible complexité de leur génome, il est peu probable que ceux-ci en soient capables (Swanson, Lukacher *et al.* 2009).

Les Polyomavirus développent plus probablement une infection chronique à bas bruit s'accompagnant de conséquences minimales pour le tissu dans son ensemble, ce que suggèrent des études *in vitro* sur SV40 (Fahrbach, Katzman *et al.* 2008). Les différences de taux de détection du virus ou de ses composants en fonction du temps et des individus correspondent donc vraisemblablement non pas à des réactivations *sensu stricto*, mais à des variations de niveaux de réplication chronique avec des passages en deçà et au-delà des seuils de sensibilité des techniques de détection utilisées.

Paradoxalement, alors que les Polyomavirus infectent massivement la population générale et que tous les sujets infectés développent une infection à vie, ces virus ne sont pathogènes que chez une faible proportion d'individus.

Malgré l'absence de modèle animal reproduisant les pathologies liées aux Polyomavirus, plusieurs facteurs ont été impliqués à la fois dans les variations de niveau de réplication chronique et la survenue des pathologies.

4.1.2. Facteurs viraux influençant le niveau de réplication virale

Les pathologies liées au Polyomavirus n'ont pas été attribuées à des géotypes viraux particuliers.

En revanche, le niveau de réplication du virus au cours de l'infection persistante est corrélé à la charge virale initiale. Dans un modèle d'infection aiguë par MPyV chez la souris, il a en effet été montré que, à distance de l'infection aiguë, l'ADN viral était plus fréquemment décelé dans les tissus où la réplication initiale avait été élevée (Dubensky and Villarreal 1984).

4.1.3. Facteurs de l'hôte influençant le niveau de réplication virale

4.1.3.1. Rôle de l'immunodépression

Les Polyomavirus sont pathogènes exclusivement chez les sujets immunodéprimés, notamment les sujets présentant une immunodépression de type cellulaire, tels que les sujets infectés par le VIH, les individus sous traitement immunosuppresseur – notamment les transplantés – et les sujets atteints d'hémopathies malignes.

L'immunodépression n'influe pas sur les capacités de l'hôte à éradiquer le virus, puisque l'infection à vie semble obligatoire même chez l'immunocompétent. En revanche, l'immunodépression est impliquée à la fois dans un défaut de contrôle de l'intensité de la réplication virale. Ce défaut a deux types de conséquences, probablement liées. Premièrement, les taux de réplication sont plus élevés dans les tissus où les virus sont normalement présents. A titre d'exemples, l'ADNurie à BKPyV est décelée chez environ la moitié de la population transplantée rénale, et son intensité est corrélée avec le degré d'immunosuppression. Les ADNémie à JCPyV sont également plus fréquentes chez les sujets infectés par le VIH (Koralnik, Boden *et al.* 1999; Egli, Infanti *et al.* 2009). Deuxièmement, la limitation de la dissémination du virus est altérée, avec de l'ADN viral présent dans des tissus au niveau desquels le virus est normalement absent chez l'immunocompétent. Ainsi, BKPyV et JCPyV peuvent être présents dans le tissu cérébral chez l'immunodéprimé (Sadiq, Puccio *et al.*).

Ces observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle une réplication chronique à des niveaux consistants chez les immunodéprimés permettrait aux Polyomavirus d'évoluer et d'acquérir des caractères de virulence. Dans l'exemple de la LEMP, des remaniements du génome viral, notamment au niveau de la NCCR de JCPyV, impliqués dans la neurotoxicité du virus se produiraient ainsi de manière secondaire au décours de l'infection chronique.

Cependant, d'autres facteurs que l'immunodépression sont également impliqués dans le contrôle de la réplication virale et la pathogénicité des Polyomavirus. En effet, dans le cas des infections à Polyomavirus, les taux sériques d'Ac spécifiques des protéines de capsid virale reflètent l'importance de la réplication virale. Le fait que la majorité de la population ait des taux d'Ac élevés démontre que le virus s'est répliqué à des taux significatifs à certaines périodes de la vie de la plupart des individus infectés (Egli, Infanti *et al.* 2009). En d'autres termes, des augmentations de l'intensité de la réplication virale se produisent de manière relativement banale en l'absence d'immunodépression et sont sans conséquence pour l'individu.

De plus, seule une minorité des sujets immunodéprimés présentant des taux élevés de réplication virale développent une pathologie. A titre d'exemple, alors que des viruries à BKPyV sont mises en évidence chez jusqu'à 50 % des transplantés rénaux, une minorité d'entre eux développe des complications à BKPyV. Inversement, chez les sujets avec un niveau comparable d'immunodépression, la virurie à BKPyV est plus élevée et la virémie plus fréquente chez les sujets qui présentent une pathologie rénale (Azzi, Cesaro *et al.* 1999; Munoz, Fogeda *et al.* 2005); Cela démontre que chez ces derniers, d'autres facteurs que l'immunodépression favorisent la survenue de la pathologie.

Un modèle de néphrite secondaire à l'infection par MPyV chez la souris corrobore le fait que l'immunodépression n'est pas suffisante, puisque la seule administration d'une drogue immunosuppressive – le méthotrexate – ne permet pas le développement de l'atteinte rénale (Atencio, Shadan *et al.* 1993).

4.1.3.2. Facteurs micro-environnementaux

Les facteurs locaux qui déterminent les variations du niveau de réplication virale des Polyomavirus sont méconnus. Là encore, en l'absence de modèle, seules des hypothèses ont été formulées.

La fréquence de la virurie à BKPyV et JCPyV chez la femme enceinte suggère que l'imprégnation hormonale pourrait jouer un rôle (Coleman, Gardner *et al.* 1983).

Le fait que les individus transplantés rénaux soient plus fréquemment sujets aux complications rénales dues à BKPyV que les autres transplantés suggère que des phénomènes locaux d'ischémie et la production de médiateurs inflammatoires qui les accompagnent pourraient jouer un rôle. Cette hypothèse est également soutenue par le modèle susmentionné de néphrite chez la souris : l'induction d'une ischémie rénale résulte en la production en grande quantité de particules virales. Cet effet n'étant pas reproduit par l'administration de facteur de croissance épidermique, il a été suggéré que la différenciation cellulaire plus que la prolifération pourrait induire la réplication virale, ce qui expliquerait également pourquoi le virus se réplique dans le rein de souriceau nouveau-né mais pas dans le rein adulte (Atencio, Shadan *et al.* 1993).

4.2. Pouvoir pathogène des différents Polyomavirus à tropisme humain

4.2.1. BKPyV

BKPyV est essentiellement responsable de pathologies de l'appareil génito-urinaire, c'est-à-dire de néphrites (éventuellement compliquées d'insuffisance rénale, de sténose urétérale et de rejet de greffe de rein) et de cystites hémorragiques. Depuis la description du premier cas de néphrite à BKPyV en 1971, les pathologies liées à BKPyV, au départ relativement anecdotiques, ont pris de l'ampleur avec l'augmentation du nombre de transplantations d'organes et le développement des traitements immunosuppresseurs.

BKPyV est par ailleurs exceptionnellement responsable de pneumopathies, de méningo-encéphalites et de rétinites (Siguier, Sellier *et al.*).

4.2.2. JCPyV

JCPyV a été découvert dans le tissu cérébral d'un sujet atteint de LEMP, maladie dont JCPyV s'avère être l'agent étiologique exclusif. La LEMP est une pathologie démyélinisante du système nerveux central consécutive à la destruction des oligodendrocytes infectés par JCPyV et d'évolution fatale. Cette pathologie rare a connue une expansion avec l'épidémie du VIH, puisque son incidence a été multipliée par 50 après les années 80. Depuis l'avènement des trithérapies, cette complication est moins redoutée chez le VIH. Mais la LEMP fait actuellement l'objet d'une attention renouvelée en raison de la description de cas chez des sujets atteints de sclérose en plaque ou de lupus érythémateux disséminé et traités par des Ac anti-intégrines (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler 2005; Langer-Gould and Steinman 2006).

Exceptionnellement, l'infection à JCPyV est associée à des néphrites chez le transplanté (Kantarci, Eren *et al.*).

4.2.3. Autres Polyomavirus

KIPyV et WUPyV ont été mis en évidence chez des sujets atteints d'infections respiratoires. Mais de l'ADN de KIPyV et WUPyV est également présent dans les voies respiratoires de sujets asymptomatiques. De plus, en cas de symptômes, ces virus sont fréquemment décelés en présence d'autres virus. Cela n'est donc pas en faveur du rôle pathogène de KIPyV et WUPyV dans l'appareil respiratoire (Norja, Ubbillos *et al.* 2007). Le pouvoir pathogène de ces virus est donc inconnu à l'heure actuelle.

Comme nous l'avons mentionné, deux virus simien, SV40 et éventuellement LPV, infectent l'Homme. Cependant, leur pouvoir pathogène est actuellement inconnu.

5. Les Polyomavirus humains sont-ils cancérigènes chez l'Homme ?

Comme nous venons de le détailler, chez l'Homme, les infections asymptomatiques ou éventuellement associées à des destructions tissulaires sont au premier plan. Mais en raison du caractère oncogène d'autres membres de la famille, le rôle des Polyomavirus à tropisme humain dans la survenue des cancers chez l'Homme a fait l'objet de recherches attentives. Des études extensives ont été réalisées avec BKPyV, JCPyV et SV40. En raison de leur récente découverte, peu ou pas d'études ont été effectuées sur KIPyV et WUPyV.

5.1. Modèles expérimentaux

Le caractère oncogène de BKPyV, JCPyV et SV40 a été démontré par plusieurs modèles expérimentaux.

In vitro, BKPyV immortalise des cellules de rongeur (hamster, souris et rat), de lapin, de singe et des cellules humaines, avec cependant une transformation abortive dans ce dernier cas. JCPyV transforme également les cellules humaines, et notamment les neurones, mais pas aussi efficacement que SV40. SV40 transforme les cellules de rongeurs, de mammifères (bovins) et les cellules humaines (Trabanelli, Corallini *et al.* 1998; Del Valle, Gordon *et al.* 2001).

Des souris transgéniques exprimant tout ou une partie du génome des BKPyV, JCPyV et SV40 développent des cancers. Lorsque l'expression de LT est dirigée par son propre promoteur, les cancers se développent dans des organes différents (White and Khalili 2004).

Après inoculation chez l'animal, BKPyV génère des tumeurs dont la localisation dépend du site d'injection alors que JCPyV induit des tumeurs cérébrales (Walker, Padgett *et al.* 1973). Enfin, une étude critiquable sur le plan éthique a montré que SV40 génère chez l'homme des sarcomes spontanément régressifs après injection sous cutanée de cellules préalablement transformées *in vitro* (Habel, Jensen *et al.* 1965)

5.2. Mise en évidence des Polyomavirus dans les cancers humains

Chez l'homme, les Polyomavirus ont été recherchés soit par des techniques d'amplification par Polymérisation en Chaîne (ou Polymerase Chain Reaction, PCR) à l'aide d'amorces spécifiques de séquences virales, soit par des techniques immunohistochimiques utilisant des Ac spécifiques d'antigènes viraux.

BKPyV a été mis en évidence dans des tumeurs cérébrales (méningiomes), génito-urinaires (prostate) et pancréatiques. Une étude a mentionné la présence de séquences virales intégrées dans des cancers cérébraux (Corallini, Pagnani *et al.* 1987; Dorries, Loeber *et al.* 1987; Trabanelli, Corallini *et al.* 1998).

JCPyV a été décelé dans des cancers cérébraux, hématologiques, coliques et cérébraux (Del Valle, Gordon *et al.* 2001; Enam, Del Valle *et al.* 2002).

SV40 a été associé à des cancers pulmonaires dont des mésothéliomes, des ostéosarcomes, et des épendymomes. Une étude a notamment rapporté la présence de séquences intégrées (Mendoza, Konishi *et al.* 1998; Testa, Carbone *et al.* 1998).

Il ressort cependant de l'ensemble des études que les pourcentages de détection de ces virus sont le plus souvent faibles et/ou divergents. La présence d'ADN dans les tissus normaux complique de plus l'interprétation des résultats. Au final, c'est le rôle de SV40 qui a été le plus extensivement étudié. Or, les revues de la littérature concluent à une insuffisance de données permettant d'affirmer son rôle cancérigène chez l'homme, en dépit d'un demi-siècle de recul (Poulin and DeCaprio 2006).

En conclusion, bien que les Polyomavirus soient reconnus comme des agents cancérogènes chez l'animal, paradoxalement, jusqu'en 2008, aucune étude n'avait permis de les impliquer formellement dans un cancer humain. Dans ce contexte, la découverte d'un nouveau Polyomavirus dans un cancer cutané humain, le carcinome de Merkel, a suscité un regain d'intérêt considérable pour cette famille de virus.

Chapitre 4 : Mécanismes oncogéniques associés à la transformation par les Polyomavirus

1. Notions de permissivité cellulaire et d'infection productive ou transformante

Nous avons décrit dans le chapitre deux un cycle de réplication complet tel qu'il se produit *in vitro* dans des cellules permissives pour le virus. L'infection, qui aboutit à la production de *neo* virions, est dite alors productive et s'accompagne le plus souvent d'une destruction cellulaire lors de la libération des virions. Cependant, dans le cas des Polyomavirus, deux autres types d'infections *in vitro* ont été décrits, qui surviennent notamment lorsque l'infection se produit dans des cellules d'une autre espèce que celle de l'hôte naturel du virus.

1.1. Non permissivité

Dans certains cas, l'infection est non productive, ou abortive, puisque de nouvelles particules virales ne sont pas synthétisées et les cellules infectées ne sont pas détruites. C'est ce qui se produit lorsque le virus infecte une cellule non permissive, c'est-à-dire dans laquelle le virus ne peut recruter l'ensemble des facteurs cellulaires nécessaires à sa réplication. Ce type d'infection survient notamment en cas d'incapacité du virus à recruter l'ADN polymérase cellulaire. A titre d'exemple, SV40 peut interagir avec l'ADN polymérase simienne et humaine, mais pas avec les enzymes bovines et murines (Murakami, Wobbe *et al.* 1986). L'infection peut néanmoins aboutir à une synthèse au moins partielle des protéines virales précoces et avoir des conséquences sur le devenir de la cellule, qui, comme nous l'avons mentionné, n'est pas lysée.

1.2. Semi-permissivité

Dans d'autres cas, toutes les étapes de la réplication virale se produisent mais l'infection aboutit à la production de *neo* virions en faible quantité seulement. C'est ce qui se produit lorsque le virus infecte une cellule dite semi-permissive. Dans ce type d'infection, des facteurs de limitation de l'infection autres que la capacité de recrutement de l'ADN polymérase cellulaire interviennent probablement. A titre d'exemple, les cellules mésothéliales humaines produisent moins de particules virales de SV40 que les fibroblastes humains, alors que les cellules fonctionnent avec une même polymérase (Bocchetta, Di Resta *et al.* 2000). Ozer *et al* ont montré que la semi-permissivité des cellules humaines pour SV40 est due à des étape(s) limitante(s) en amont de la réplication du génome viral, telles que l'entrée du virus et la synthèse des protéines virales précoces (Ozer, Slater *et al.* 1981).

De fait, les infections semi-permissives reflètent deux réalités distinctes. Dans un cas, les cellules infectées répliquent pleinement le virus mais la semi-permissivité est due au fait qu'un faible nombre de cellules de la population est infectée. Dans le second cas, la majorité des cellules sont infectées mais répliquent le virus à bas bruit (Fahrbach, Katzman *et al.* 2008).

C'est au décours de ces infections semi- ou non permissives que des infections transformantes peuvent survenir. En effet, au cours de ces types d'infection, les cellules infectées ne sont pas ou peu détruites, et l'expression des protéines virales précoces qui possèdent des fonctions stimulatrices de la prolifération cellulaire et anti-apoptotiques peut aboutir au dérèglement du fonctionnement normal de la cellule.

1.3. Infection transformante

Une cellule transformée est une cellule dont le comportement *in vitro* se distingue de celui d'une cellule normale par la présence d'un ou plusieurs critères en rapport avec ses capacités prolifératives et au fonctionnement de sa membrane. Parmi ces critères, on peut citer la perte de l'inhibition de contact résultant en une croissance avec une densité cellulaire élevée, une diminution de l'exigence en quantité de sérum de veau fœtal, l'apparition de l'indépendance envers le support, l'immortalisation – c'est-à-dire la capacité de se multiplier indéfiniment – et enfin la capacité à induire des tumeurs après injection à l'animal immunodéprimé. L'immortalisation ne constitue donc qu'une forme particulière de transformation, et inversement, toute transformation ne s'accompagne pas d'immortalisation.

La transformation peut être soit stable (irréversible) ou transitoire (abortive). Dans le cas d'une transformation abortive, le virus induit une transformation dépendante de sa présence et est finalement éliminé. Dans le cadre d'une transformation stable, le virus induit une transformation persistante, en raison du maintien du virus, ou en raison du fait que le phénotype transformé ne dépend plus de la présence de l'agent viral si celui-ci est éliminé.

2. Mécanismes associés à la transformation par les Polyomavirus oncogènes

L'information génétique apportée par les Polyomavirus est très réduite puisque leur génome n'est constitué que de quelques kpb. Ces virus sont néanmoins capables d'induire de profonds bouleversements dans la vie de la cellule et dans ses relations avec les cellules environnantes.

Afin de comprendre ces bouleversements, de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont été développés. Les deux Polyomavirus qui ont été les plus étudiés sont les deux premiers membres découverts, MPyV et SV40. Ainsi, MPyV est le premier virus à ADN ayant permis de transformer *in vitro* une cellule normale en cellule tumorale.

2.1. Déterminants de la transformation *in vitro*

2.1.1. Expression des protéines virales

La persistance dans le temps d'ADN viral n'est pas suffisante pour induire une transformation *in vitro* par les Polyomavirus (Smith, Gelb *et al.* 1972). Celle-ci nécessite l'expression en grande quantité des protéines virales précoces, ce qui justifie leur appellation d'oncoprotéines (White and Khalili 2004).

Dans le cas de SV40, LT représente l'oncoprotéine majeure. Son expression suffit à elle seule à transformer une grande variété de cellules de rongeurs en culture, mais elle coopère néanmoins avec d'autres protéines telles que ST et les produits d'oncogènes cellulaires. Les capacités transformantes de LT et de ST reposent sur leurs fonctions de modulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire que nous avons détaillé précédemment. (Hahn, Dessain *et al.* 2002). En particulier, l'interaction de ST et LT avec la protéine cellulaire pRb constitue l'un des mécanismes majeurs impliqués dans la transformation (DeCaprio, Ludlow *et al.* 1988). En revanche, l'interaction avec p53 serait dispensable dans certains tissus (Gjoerup and Chang).

La transformation cellulaire par les Polyomavirus repose également sur l'induction d'une instabilité génomique (Chang, Ray *et al.* 1997). LT, mais pas ST, est requise pour l'induction d'aberrations chromosomiques dans des cellules humaines (Stewart and Bacchetti 1991). Des fonctions de LT autres que celles faisant appel à son interaction avec la protéine p53 cellulaire seraient impliquées, puisque les altérations génétiques se produiraient également dans des cellules mutées n'exprimant pas p53 (Woods, LeFeuvre *et al.* 1994). La capacité d'interférence de LT avec les processus de réparation de l'ADN a été mentionnée (Ray, Peabody *et al.* 1990; Digweed, Demuth *et al.* 2002). Notamment, l'interaction de LT avec Bub-1, protéine cellulaire responsable de la ségrégation des chromosomes lors de la mitose a été incriminée (Cotsiki, Lock *et al.* 2004). *In vitro*, l'apparition des aberrations chromosomiques précède les changements morphologiques associés à la transformation (Ray, Meyne *et al.* 1992; Trabanelli, Corallini *et al.* 1998) et les anomalies génétiques perdurent même si l'expression de LT n'est pas maintenue (Ray, Meyne *et al.* 1992; Ricciardiello, Baglioni *et al.* 2003).

2.1.2. Persistance dans la population tumorale sous forme non infectieuse

2.1.2.1. Persistance sous forme intégrée

2.1.2.1.1. Généralités

La présence de génome viral intégré est étroitement associée aux cancers. La première démonstration de l'intégration du génome des Polyomavirus dans celui des cellules tumorales a été faite en 1968 à l'aide de techniques historiques d'hybridation moléculaire (Sambrook, Westphal *et al.* 1968).

L'intégration se produit à la fois dans des cellules non permissives et permissives et, chez ces dernières, elle se produit indépendamment du fait que le génome viral soit ou non répliqué (Hirai and Defendi 1972). L'intégration se produit le plus souvent en un site unique commun à toutes les cellules tumorales suggérant qu'il s'agit d'un événement rare et se produisant précocement au cours du processus de transformation (Trabanelli, Corallini *et al.* 1998).

De faibles quantités d'ADN sont intégrées, comprise entre 1 et 10 copies de génome viral par cellule (Mazur, Feunteun *et al.* 1995). Les copies de génome viral peuvent être intégrées sous forme de copies uniques avec un seul site d'intégration, de copies multiples disposées en tandem au niveau du même locus, ou plus rarement de copies uniques mais intégrées en différents endroits du génome. Les tandems pourraient se constituer avant intégration dans le génome cellulaire, selon un processus indépendant de l'expression de LT (Chia and Rigby 1981).

2.1.2.1.2. Mécanisme de l'intégration virale

L'intégration du génome viral résulte essentiellement d'un processus aléatoire par recombinaison illégitime. En effet, le génome des Polyomavirus ne s'intègre pas au niveau de locus chromosomiques préférentiels. Ceci a notamment été démontré par le fait que lorsque des cellules porteuses de génome viral intégré sont réinfectées et que de nouvelles séquences s'intègrent, l'intégration se produit en des locus distincts des locus initiaux (Graessmann, Graessmann *et al.* 1979). L'intégration ne fait pas non plus intervenir de séquences préférentielles virales ou cellulaires (Botchan, Topp *et al.* 1976) et les séquences virales situées au niveau des jonctions avec les séquences cellulaires sont différentes d'une tumeur à l'autre. L'adjonction au génome viral de séquences répétées favorise les cassures du génome viral au niveau de ces séquences, mais pas leur insertion au niveau de séquences répétées du génome de l'hôte (Wallenburg, Nepveu *et al.* 1987).

Cependant, dans certains cas, de courtes séquences d'homologie de l'ordre de quelques nucléotides sont observées au niveau des jonctions entre les séquences virales de SV40 et les séquences cellulaires (Stringer 1982). En fait, il se produit probablement à la fois des recombinaisons homologues et non homologues, mais avec une dominance de ces dernières. Lorsque le virus se réplique, le processus est essentiellement aléatoire, et ce sont le plus souvent des molécules virales tronquées qui sont intégrées au niveau de différents sites chromosomiques. Lorsque le virus ne se réplique pas, c'est le processus de recombinaison homologue avec insertion de génomes viraux complets qui prédomine (Wallenburg, Nepveu *et al.* 1984).

2.1.2.1.3. Conséquences sur l'expression du génome cellulaire

Le génome des Polyomavirus s'intègre à la fois dans des régions codantes et non codantes, suggérant que le pouvoir transformant des Polyomavirus n'est pas dépendant de la perturbation de gènes cellulaires.

Cependant, l'intégration virale s'accompagne généralement d'une perte de matériel génétique cellulaire au niveau du locus d'intégration, d'une taille grossièrement équivalente à celle du génome inséré. Ces pertes peuvent également concerner des régions légèrement à distance du site d'intégration et leur taille peut parfois atteindre 10 kpb. Ces remaniements pourraient être antérieurs ou postérieurs à l'intégration virale (Ketner and Kelly 1976). En revanche, l'intégration ne s'accompagne pas de recombinaisons inter-chromosomiques, puisque les séquences cellulaires situées de part et d'autre des séquences virales intégrées proviennent du même chromosome (Wallenburg, Nepveu *et al.* 1987).

De rares observations ont montré que des phénomènes de mutagenèse insertionnelle pourraient être impliqués dans la transformation liée aux Polyomavirus. Liu *et al.* ont montré que dans une lignée de cellules humaines immortalisées par SV40, la réintroduction *via* un vecteur plasmidique de la séquence humaine correspondant au site d'intégration rétablissait le phénotype non tumoral (Liu, Kaur *et al.* 2009).

2.1.2.2. Autres modes de persistance

L'intégration des Polyomavirus a été très étudiée car elle est spécifiquement associée aux tissus cancéreux. Il semble néanmoins que dans les tumeurs, le génome des Polyomavirus puisse également persister sous forme épisomale, comme c'est le cas dans les tissus non tumoraux (Major, Vacante *et al.* 1987; Bocchetta, Di Resta *et al.* 2000).

La participation de ces épisomes au processus cancérogène serait variable. Dans la plupart des modèles, les molécules épisomales qui coexistent avec des formes intégrées sont perdues au cours du temps, – leur disparition étant plus ou moins rapide en fonction des clones analysés – et la persistance de ces épisomes ne serait pas nécessaire au maintien du phénotype tumoral (Birg, Dulbecco *et al.* 1979; Chenciner, Meneguzzi *et al.* 1980; Lania, Hayday *et al.* 1980). Dans de rares modèles cependant, les épisomes sont au contraire maintenus et présents en grande quantité – entre 1000 et 10 000 copies par cellule – et ils pourraient constituer un mode de persistance alternatif à l'intégration virale (Mazur, Feunteun *et al.* 1995). Le fait que le virus persiste soit sous forme intégrée, soit sous forme épisomale dépendrait à la fois du virus et de la cellule hôte. A titre d'exemple, dans un modèle de tumeurs induites par BKPyV chez le hamster, le virus est présent préférentiellement sous forme de copies complètes intégrées en tandem dans les épéndymomes, et de copies partielles épisomales dans les tumeurs pancréatiques et osseuses (Chenciner, Meneguzzi *et al.* 1980).

Le mode de persistance au cours des divisions cellulaires de ces épisomes viraux qui sont fréquemment défectifs dépendrait de plusieurs mécanismes. Dans certains cas, il semble exister un mélange de formes incompetentes et compétentes, ces dernières assurant la multiplication des copies au cours des divisions et constituant un stock à partir duquel les épisomes incompetents se reconstitueraient après remaniement (Mazur, Feunteun *et al.* 1995). Dans d'autres cas, une fraction seulement des cellules tumorales contiendrait des épisomes compétents et produirait du virus à bas bruit, ce permettrait la réinfection continue des cellules de la lignée (Huang, Yamasaki *et al.* 1999). Enfin, des phénomènes d'excision–recircularisation secondaires du génome viral intégré ont été décrits, responsables du maintien au long cours d'épisomes produits à partir des séquences intégrées (Gattoni, Colantuoni *et al.* 1980; Chartrand, Gusew-Chartrand *et al.* 1981). LT et l'origine de réplication seraient les deux éléments viraux nécessaires et suffisants au déroulement de ce processus d'excision–recircularisation (Conrad, Liu *et al.* 1982; Miller, Bullock *et al.* 1984).

2.1.3. Remaniements et mutations du génome viral

2.1.3.1. Remaniements

Des pertes de matériel génétique viral se produisent généralement lors de l'intégration. La taille des fragments des génomes viraux diffèrent en fonction des tumeurs (Ketner and Kelly 1976) mais une partie des séquences codant pour les protéines virales précoces est systématiquement préservée, au détriment des séquences codant les protéines tardives (Botchan, Ozanne *et al.* 1974). Dans le cas de LT, seule la partie de la séquence correspondant à l'extrémité N terminale de la protéine est préservée (Israel, Vanderryn *et al.* 1980; Lania, Hayday *et al.* 1981). Des délétions sont également observées au niveau des formes épisomales et seraient secondaires à des recombinaisons illégitimes (Scherneck, Delmas *et al.* 1987).

Ces tronçatures du génome viral permettraient d'une part de limiter les phénomènes de réplication du génome viral susceptibles de déstabiliser les séquences virales intégrées (Basilico, Gattoni *et al.* 1979) et, d'autre part, d'inhiber la production de particules virales engendrant la lyse cellulaire. La capacité accrue de ces formes tronquées à induire des tumeurs a été démontrée *in vitro* (Small, Gluzman *et al.* 1982; Mazur, Feunteun *et al.* 1995).

2.1.3.2. Mutations du génome viral

Le génome viral présent dans les tumeurs est de plus fréquemment muté. Ces modifications génétiques peuvent concerner les trois parties du génome (NCCR et régions codantes précoces et tardives) mais, comme les remaniements, elles préservent systématiquement certaines fonctions des protéines non structurales impliquées dans la transformation. Le fait que ces mutants perdent leurs capacités répliquatives mais ont toujours des fonctions transformantes a été démontré *in vitro* (Hayday, Chaudry *et al.* 1983; Manos and Gluzman 1984). De plus, la capacité accrue de ces formes mutées à induire des tumeurs a été démontrée *in vitro* (Small, Gluzman *et al.* 1982).

2.1.4. Absence d'expression des protéines tardives et de production de particules virales

En cohérence avec les modifications du génome viral observées, les transcrits des protéines tardives sont peu ou pas produits (Mazur, Feunteun *et al.* 1995). L'absence d'expression des protéines structurales par les cellules tumorales a été confirmée par immunohistochimie (ou IHC). En règle générale, aucune particule virale n'est visualisée au sein des tumeurs (Melnick, Khera *et al.* 1964).

Il existe cependant des exceptions à cette règle. *In vitro*, Major *et al.* ont montré que des cellules dérivées de tumeurs de singe induites par JCPyV et contenant du virus à la fois sous forme intégrée et épisomale produisaient des particules virales (Major, Vacante *et al.* 1987). *In vivo*, une grande quantité de particules virales sont observées au sein des tumeurs cutanées qui se développent spontanément chez le hamster infecté par HaPyV (Graffi, Schramm *et al.* 1968). La réalité pourrait être encore plus complexe puisque des variations notables dans le mode de persistance et de l'expression de MPyV au sein de tumeurs de différentes souris mais également au sein même de chaque tumeur ont été observées (Talmage, Freund *et al.* 1992).

2.2. Dépendance au virus

Il est généralement admis que l'expression de LT est nécessaire à la transformation tumorale et à son maintien (Brugge and Butel 1975).

De rares observations de la littérature suggèrent cependant que le maintien du phénotype tumoral pourrait parfois devenir indépendant de la présence du virus. En effet, des remaniements des sites d'intégrations peuvent se produire au cours du temps, consistant en des duplications et/ou des délétions des séquences initiales intégrées au sein du locus d'intégration. Ces remaniements concernent aussi bien les séquences virales que les séquences cellulaires avoisinantes (Chartrand, Gusew-Chartrand *et al.* 1981). Plus rarement, des séquences intégrées peuvent être éliminées, notamment lorsque plusieurs sites d'intégration coexistent, comme l'ont observé Chenciner *et al.* (Chenciner, Meneguzzi *et al.* 1980). Enfin, un modèle de souris transgénique développe des tumeurs qui s'affranchissent de leur dépendance à l'expression de LT au bout de plusieurs mois (Ewald, Li *et al.* 1996).

2.3. Facteurs déterminants la cancérogenèse *in vivo*

Le génome viral des Polyomavirus est également présent dans les tissus sains des animaux présentant des tumeurs viro-induites, mais exclusivement sous forme épisomale (Graffi, Schramm *et al.* 1968).

Le choix du tissu dans lequel se développe le cancer serait dépendant du niveau de réplication initiale. Chez la souris inoculée par MPyV, les organes qui ont le plus fort taux de réplication à distance de l'infection aiguë correspondent à ceux chez lesquels se développe le cancer (Wirth, Martin *et al.* 1997).

Le type de tissu dans lequel se développe le cancer résulte également de l'interaction entre le virus et l'hôte, puisqu'un même virus peut donner des cancers différents selon l'animal. Ainsi, HaPyV produit préférentiellement des tumeurs cutanées chez le hamster syrien de la colonie Buch et des lymphomes dans la colonie Postdam (Graffi, Schramm *et al.* 1968).

Chapitre 5 : La réponse immunitaire dirigée contre les Polyomavirus

1. Protéines virales immunogènes

La réponse immunitaire induite par les Polyomavirus est dirigée contre les deux types de protéines virales, structurales et non structurales.

En cas d'infection productive, la réponse immunitaire est principalement dirigée contre les protéines structurales, puisque des particules virales sont produites en grande quantité et libérées dans le milieu extracellulaire. VP1, constituant le plus abondant de la capsid et seule protéine exposée à la surface de la particule, est la plus immunogène de ces protéines structurales (Swanson, Lukacher *et al.* 2009).

En cas d'infection transformante, les protéines de capsides et les particules virales ne sont pas ou peu produites. En revanche, les protéines virales non structurales – en particulier ST et LT – sont produites en grande quantité. De plus, une étude a montré que les protéines précoces pourraient être exprimées au niveau de la membrane cellulaire des cellules transformées (Deppert, Hanke *et al.* 1980). En cas d'infection transformante, la réponse immunitaire est donc principalement dirigée contre les protéines précoces, qui doivent d'ailleurs leur appellation au fait que des Ac dirigées contre elles ont été mis en évidence dans le sérum de hamsters développant des tumeurs après inoculation par SV40 (Black and Rowe 1963).

2. Réponse immunitaire humorale

Le développement de la réponse humorale a été étudié dans un modèle murin inoculé par MPyV. De manière classique, des IgM et des IgG sériques apparaissent à partir des 4^{ème} et 7^{ème} jours respectivement, ces dernières atteignant un plateau environ 3 semaines après infection (Swanson, Lukacher *et al.* 2009).

Les Ac anti-VP1 sont neutralisants et interviendraient à la fois dans la prévention et le contrôle de l'infection initiale. Les souriceaux nouveau-nés porteurs d'Ac d'origine maternelle ou administrés expérimentalement sont en effet résistants à l'infection (Swanson, Lukacher *et al.* 2009). Pendant l'infection aiguë, la virémie décroît de manière inversement proportionnelle à l'augmentation du taux d'Ac sériques (Dubensky and Villarreal 1984).

Paradoxalement, malgré leur persistance à des taux élevés à distance de la primo-infection, ces Ac s'avèrent incapables de contrôler l'infection persistante et d'empêcher la survenue de tumeurs secondaires viro-induites. Chez l'Homme, BKPyV et JCPyV développent des infections productives chroniques en dépit de taux élevés d'Ac anti-VP1. Chez l'animal, l'administration d'Ac quelques jours après l'infection ne prévient pas l'apparition de tumeurs induites par MPyV (Swanson, Lukacher *et al.* 2009). Enfin, les tumeurs évoluent alors que les animaux produisent des Ac dirigés contre les oncoprotéines virales.

3. Réponse immunitaire cellulaire

Après inoculation à l'animal, une réponse immunitaire cellulaire spécifique du virus est décelable une semaine après infection initiale et persiste à vie. Les animaux infectés développent des lymphocytes T CD4 et CD8 anti-VP1 et anti-ST et LT (Swanson, Lukacher *et al.* 2009).

Au contraire de la réponse humorale, la réponse cellulaire est impliquée dans le contrôle de l'infection persistante. Chez l'Homme, les sujets qui développent des complications dues aux PyV présentent tous un déficit inné ou acquis de l'immunité cellulaire. Cependant, l'immunité cellulaire n'est pas le seul déterminant du contrôle de la réplication virale, puisque MPyV se réplique dans les reins du souriceau nouveau-né mais pas dans ceux des souris Nude (Demengeot, Jacquemier *et al.* 1990). La réponse immunitaire cellulaire, et en particulier la population des lymphocytes T CD8, seraient également déterminantes pour prévenir l'apparition de tumeurs (Swanson, Lukacher *et al.* 2009).

4. Intérêt des pseudo-particules virales de Polyomavirus en vaccinologie

Comme nous venons de le mentionner, les protéines de capsid des Polyomavirus sont immunogènes. Comme nous l'avons signalé dans le chapitre 2 dans la partie traitant de la réplication virale, la protéine majeure VP1 possède des capacités d'auto-assemblage. Cette protéine peut en effet être produite dans des bactéries ou en cellules d'insectes et forme alors des pseudo-particules virales (ou viral-like particle, VLP).

Ces VLP possèdent des caractéristiques qui en font des outils étudiés en vaccinologie. Comme les virions, elles ont des propriétés hémagglutinantes, elles sont capables d'infecter des cellules et elles sont immunogènes (An, Gillock *et al.* 1999). VP1 est également capable d'interagir avec des molécules d'ADN non virales et d'assurer leur empaquetage au sein des VLP (Moreland, Montross *et al.* 1991). Ces dernières peuvent de plus être formées de VP1 associée aux protéines virales mineures de capsid et notamment avec des protéines mineures modifiées.

Etant donné qu'à l'heure actuelle les Polyomavirus sont, comme nous l'avons vu, non ou rarement pathogènes chez l'Homme, les VLP n'ont pas été utilisées pour développer des vaccins contre les Polyomavirus à tropisme humain. En revanche, des VLP chimériques sont développées pour induire une immunité contre des antigènes d'intérêt. A titre d'exemple, dans la thématique du cancer qui nous intéresse, la capacité de VLP, constituées de protéines VP1 et de protéines VP2 fusionnées à l'antigène p16(INK4A) spécifique des cancers induits par les HR-HPV, à induire une réponse humorale ciblée contre cette antigène, a été démontrée chez la souris (Lasickiene, Gedvilaite *et al.*) Dans d'autres modèles ce type d'approche a également permis de générer des réponses immunes cellulaires (Eriksson, Andreasson *et al.*).

Chapitre 6 : Le carcinome de Merkel

1. Définition

Le carcinome à cellules de Merkel (ou Merkel Cell Carcinoma, MCC) est un carcinome cutané primaire de type neuro-endocrine décrit pour la première fois en 1972 par Toker (Toker 1972).

Sur le plan clinique, le MCC se présente sous la forme d'une lésion cutanée pourpre, luisante et indolore pouvant faire évoquer à tort une lésion inflammatoire. Un exemple de lésion est présenté figure n° 6. C'est la persistance ou l'augmentation rapide de la taille de la lésion qui permet de suspecter son caractère malin.



Figure n° 6 : Photographie d'une lésion de MCC localisée au niveau du sourcil (*Bachmann et al. World Journal of Surgical Oncology 2005*)

Sur le plan anatomopathologique, la tumeur se présente sous la forme d'une lésion nodulaire envahissant le derme et le tissu sous-cutané, mais respectant généralement l'épiderme. Les cellules tumorales sont disposées en couches ou en amas. Elles sont de petite taille, arrondies et avec un cytoplasme de taille réduite. La présence de cellules en mitose est fréquente et témoigne du caractère actif du cancer. Les cellules tumorales expriment à la fois des marqueurs cutanés, tels que la cytokératine 20 (ou CK20), et des marqueurs neuro-endocrines, tels que la chromogranine et la synaptophysine. Le marquage par CK20 présente typiquement un aspect punctiforme (ou en dot) paranucléaire et est le plus caractéristique, mais certaines tumeurs ne l'expriment pas. C'est l'examen anatomopathologique associant analyse de la morphologie et marquage immunohistochimique qui permet d'affirmer le caractère neuro-endocrine de la tumeur (Andea, Coit *et al.* 2008).

2. Evolution, pronostic et prise en charge

En raison du caractère rapidement métastatique de la tumeur et de la consultation retardée des patients – avec un délai médian de 3 mois –, des atteintes ganglionnaires régionales sont présentes dès le diagnostic dans environ un cas sur deux. En outre, des métastases à distance peuvent survenir, le plus souvent durant les deux premières années suivant le diagnostic. Ces métastases peuvent toucher différents organes tels que la peau, les os, le cerveau, le foie ou le poumon. Cette fréquente évolution métastatique du MCC en fait le cancer cutané le plus agressif – deux fois plus que le mélanome –, avec un pourcentage de survie à 5 ans de l'ordre de 40 % (Lemos, Storer *et al.*).

Le pronostic de la maladie est évalué sur la base d'une classification clinique, fonction de la taille de la lésion primitive et de la présence de métastases régionales ou à distance (Allen, Bowne *et al.* 2005). D'autres facteurs pronostiques ont été suggérés, tels que le sexe, l'âge au diagnostic et les caractéristiques histologiques de la tumeur.

En dépit de l'absence d'essai thérapeutique randomisé effectué à ce jour, il existe un relatif consensus dans la prise en charge thérapeutique de la maladie. Lorsqu'elle est possible, une exérèse chirurgicale de la tumeur initiale, des récidives, et/ou des métastases uniques est effectuée. Elle est associée à un curage ganglionnaire du ganglion sentinelle ou à un curage élargi, si ce dernier est atteint. La radiothérapie peut être utilisée comme traitement adjuvant de la chirurgie – en fonction du stade de classification pronostique – ou comme traitement curatif en cas de lésions non opérables. La chimiothérapie n'est prescrite qu'en cas de lésions non opérables et/ou multiples (Lemos, Storer *et al.*). Enfin, des observations isolées de succès obtenus après immunothérapie ont été signalées (Grandpeix, Bonvalot *et al.* 2006).

Pour finir, des cas de régression spontanée ont été décrits, que ces dernières soient purement spontanées ou secondaires à la biopsie diagnostique. Ces cas sont rares mais plus fréquents dans le cas du Merkel que les autres cancers cutanées (Wooff, Trites *et al.*)

3. Origine du carcinome de Merkel

Les cellules de Merkel (ou Merkel Cell, MC) sont des cellules cutanées neuro-endocrines décrites pour la première fois en 1875 par Friedrich Merkel. Les MC sont présentes en faible quantité – elles représentent moins de 1 % des cellules cutanées – dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme. Elles sont localisées préférentiellement au contact des terminaisons nerveuses avec lesquelles elles interagissent puisque les MC participent à la sensibilité cutanée. Les MC contiennent des granules neurosecrétaires contenant notamment de la chromogranine et des neurotransmetteurs tels que la sérotonine (Halata, Grim *et al.* 2003).

En raison de caractéristiques histologiques communes, la MC est considérée comme étant à l'origine du MCC. Néanmoins, certains éléments telles que la présence de neurofilaments au sein des cellules de MCC mais pas des MC, la localisation dermique du MCC mais épidermique de la MC et enfin l'absence de mitoses visualisées dans la MC vont à l'encontre de cette hypothèse. L'alternative est que le MCC dériverait d'une cellule souche pluripotente dermique (Ferringier, Rogers *et al.* 2005).

4. Epidémiologie et facteurs de risque

Le MCC est un cancer rare, avec une incidence de 0.4 pour 100 000 habitants, soit environ 150 nouveaux cas par an en France. Mais cette incidence a de manière inquiétante triplé en vingt ans (Hodgson 2005). Cette évolution s'explique vraisemblablement d'une part par l'amélioration du diagnostic grâce à l'utilisation du CK20, mais surtout par l'augmentation de la population à risque, les personnes âgées – en raison du vieillissement de la population – et les immunodéprimés – en raison de l'augmentation des transplantations et du développement des traitements immunosuppresseurs –.

Le MCC se développe en effet de manière quasi exclusive chez les sujets âgés – l'âge médian de survenue étant de 75 ans – et/ou immunodéprimés. Il est en particulier associé à l'immunodépression de type cellulaire. L'exposition aux rayons ultra-violetes constitue un second facteur favorisant puisque le MCC se développe préférentiellement chez les individus à peau blanche, au niveau de la peau exposée au soleil – la tête et le cou – et chez les sujets porteurs d'autres pathologies favorisées par l'exposition solaire, tels que les carcinomes épidermoïdes (ou Squamous Cell Carcinoma, SCC). Les tumeurs mixtes MCC/SCC ne sont d'ailleurs pas exceptionnelles (Koljonen 2006).

5. Physiopathologie du MCC

Jusqu'en Janvier 2008, la/les cause(s) du MCC n'étaient pas connues. Des abérations chromosomiques étaient mises en évidence dans 68 à 100 % des tumeurs mais aucune anomalie commune à tous les MCC n'avaient été identifiées, en dehors de certains déséquilibres récurrents notamment au niveau des chromosomes 1, 3, 5 et 6 et 19 (Harle, Arens *et al.* 1996; Van Gele, Speleman *et al.* 1998; Van Gele, Leonard *et al.* 2002; Larramendy, Koljonen *et al.* 2004).

Des mutations géniques communes à tous les cas n'avaient pas non plus été identifiées (Lemos and Nghiem 2007).

Chapitre 7 : La découverte du Polyomavirus de Merkel

1. A la recherche de nouveaux agents cancérigènes

Le fait que le MCC survienne de manière quasi exclusive chez les sujets âgés et/ou immunodéprimés a mené une équipe de chercheurs américains, celle des docteurs (Dr) Patrick Moore et Yuan Chang, à postuler que le développement de ce cancer était lié à une infection par un agent cancérogène encore inconnu (Feng, Shuda *et al.* 2008).

Quatorze années auparavant, ces chercheurs avaient formulé le même postulat au sujet d'un autre cancer cutané de l'immunodéprimé, le sarcome de Kaposi. Les membres de l'équipe avaient validé leur hypothèse de travail avec éclat en découvrant un nouvel agent viral cancérogène chez l'Homme, le huitième virus humain, effectivement responsable de cette pathologie (Chang, Cesarman *et al.* 1994).

Ne sachant pas au départ quel type d'agent infectieux était impliqué dans le sarcome de Kaposi, les auteurs avaient utilisé à l'époque une méthode de biologie moléculaire originale offrant la possibilité de mettre en évidence de séquences d'ADN inconnues sans *a priori*, au contraire des techniques utilisant des séquences nucléotidiques dégénérées ciblant certaines familles d'agents infectieux en particulier. Cette méthode, dénommée Analyse par représentation différentielle (ou Representational Difference Analysis, RDA) avait porté ses fruits mais présentait néanmoins deux inconvénients : i) un défaut de sensibilité, puisqu'elle n'offrait pas la possibilité de découvrir des agents dont le génome était constitué d'ARN – à l'exception des rétrovirus – ; ii) et un manque de spécificité puisqu'elle ne permettait pas de faire la distinction entre une infection latente ou active, cette dernière étant plus susceptible de faire le lit d'une transformation tumorale.

Les auteurs ont donc mis au point et utilisé une nouvelle méthode dénommée Soustraction digitale du transcriptome (ou Digitale Transcriptome Analysis, DTS). Cette technique consiste à séquencer l'intégralité des ARNm – le transcriptome – présents au sein d'un tissu, puis de soustraire *in silico* du mélange de séquences obtenues toutes celles qui sont déjà référencées dans les bases de données informatiques.

2. Découverte d'un nouveau virus

2.1. Mise en évidence d'ARN non humains

Les auteurs ont utilisé deux matériels de départ, un extrait d'acide ribonucléique (ou ARN) provenant d'un unique échantillon de MCC et un mélange d'extraits d'ARN de 3 biopsies différentes de MCC, afin d'accroître les possibilités de détection dans le cas d'un agent infectieux faiblement exprimé.

A l'aide d'une technique de séquençage haut débit, le pyroséquençage, les auteurs ont amplifié 395734 séquences de 150 à 200 paires de bases (ou pb) au total. Après exclusion des quelques 12 000 séquences non exploitables, l'analyse *in silico* a permis d'éliminer plus de 380 000 séquences d'origine humaine. Parmi les 2395 séquences restantes – correspondant à 0,6 % des séquences exploitables –, les auteurs ont identifié deux transcrits d'intérêt. Le premier transcrit, dénommé DTS1 par les auteurs, présentait un haut degré d'homologie avec deux Polyomavirus de primates, le Polyomavirus de singe LPyV et le Polyomavirus humain BKPyV. Le second transcrit, dénommé DTS2, n'était homologue à aucun autre organisme vivant connu. Paradoxalement, ces deux transcrits informatifs ont été obtenus à partir de l'extrait d'ARN correspondant au cas unique de MCC.

Aucune information sur les 2393 séquences non humaines restantes n'a été fournie par les auteurs.

2.2. Confirmation de la présence d'ARN messagers non humains

A l'aide de la technique de 3' RACE PCR (pour Rapid Amplification of 3' cDNA Ends), les auteurs ont identifié les séquences nucléotidiques situées en aval de DTS2 et en amont de la queue polyA des ARN messagers (ou ARNm). Ils ont ainsi mis en évidence des ARNm de tailles différentes, l'un ne comportant que des séquences non identifiées, et les deux autres étant constitués à la fois de séquences inconnues et de séquences humaines correspondant à un fragment du 1^{er} intron du gène codant le récepteur de type G de la tyrosine phosphatase (ou Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type G, PTPRG) situé au niveau du locus 3p14.2 du bras court du chromosome 3.

A ce stade du travail, les auteurs avaient donc découvert un nouvel agent infectieux – identifié par un fragment de son génome – au sein d'un cancer humain d'une part, et d'autre part, fait deux observations qui leur permettaient de suggérer que cet agent était impliqué dans la survenue du cancer dans au moins un cas. En effet, le génome du nouveau virus était à la fois exprimé par les cellules tumorales infectées et vraisemblablement intégré dans le génome cellulaire de celles-ci.

Dans la suite de leur travail, les auteurs ont dans un premier temps caractérisé le génome de ce nouvel agent et, dans un second temps, accumulé des observations leur permettant de documenter son caractère oncogène.

3. Découverte d'un nouveau Polyomavirus à tropisme humain

3.1. Caractérisation du génome viral du nouvel agent

A l'aide de la technique de marche sur le génome, les auteurs ont reconstitué les séquences virales présentes de part et d'autre de DTS1 et DTS2. Ils ont ainsi caractérisé deux génomes complets d'ADN circulaire correspondant à deux souches virales différentes issues d'échantillons de MCC de deux cas.

L'analyse de ces génomes révélait une organisation typique de celle des Polyomavirus, détaillée dans le chapitre deux. Un exemple de ce génome est présenté figure n° 7. Le génome comportait une région non codante de contrôle organisée de la même manière que celles des autres Polyomavirus, avec une séquence riche en bases de type thymidine et des domaines contenant des séquences pentamériques permettant la fixation de LT. De part et d'autres étaient localisées les 2 régions codantes, une région codante tardive avec également 2 cadres de lecture codant VP1 pour l'un et VP2 et VP3 et une région codante précoce avec 2 cadres de lecture codant ST et LT respectivement.

Les domaines fonctionnels caractéristiques de LT étaient également présents, mais les deux génomes étaient porteurs de mutations – mutation non sens dans un cas et délétion décalant le cadre de lecture dans l'autre – au niveau de la région codant l'extrémité C- terminale de la protéine et prédisant la production d'une protéine LT tronquée.

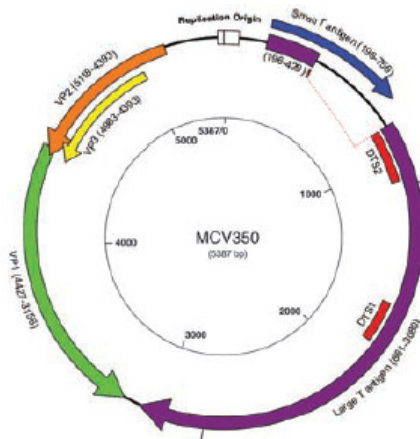


Figure n° 7 : Représentation schématique du génome du nouveau virus présent au sein des MCC (souche MCC 350, (Feng, Shuda *et al.* 2008).

3.2. Analyse phylogénétique

La comparaison des deux génomes entre eux révélait un haut degré (99,2 %) d'homologie, à l'exception d'une insertion de 5 pb dans la NCCR et d'une délétion de 191 pb dans la région codant LT de l'un des deux génomes, signifiant qu'il s'agissait bien de deux souches d'un même genre.

La comparaison de deux génomes à ceux des autres membres de la famille des Polyomavirus montrait que quelque soit le gène considéré, le nouveau virus s'apparentait au sous-groupe MPyV des Polyomavirus de mammifères, et non au sous-groupe apparenté à SV40 comme les quatre autres Polyomavirus humains connus au moment de cette découverte. Un exemple d'arbre phylogénétique est présenté figure n° 8

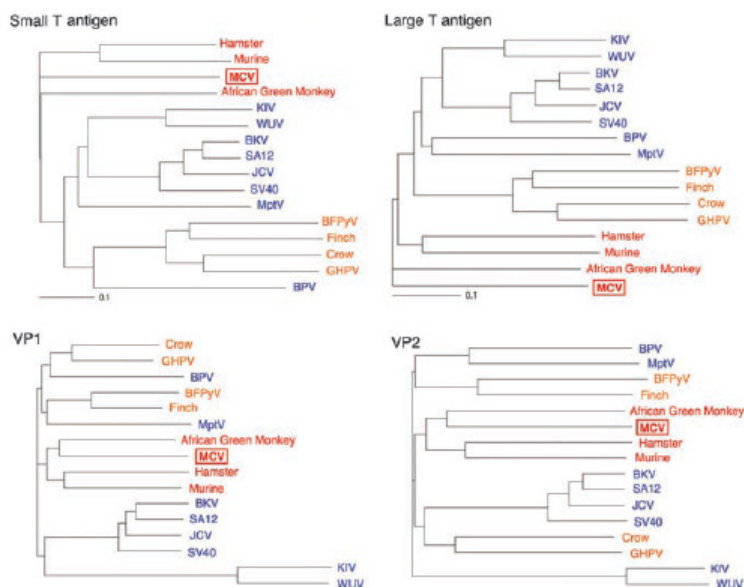


Figure n° 8 : Analyse comparative des séquences de ST, LT, VP1 et VP2 du nouveau virus et de 15 autres membres de la famille (Feng, Shuda *et al.* 2008)

Les auteurs avaient donc découvert un nouveau virus appartenant à une famille de virus notoirement cancérigènes chez l'animal. En outre, celui-ci se distinguait phylogénétiquement des autres Polyomavirus à tropisme humain déjà connus et codait vraisemblablement pour des protéines virales tronquées. En raison de sa découverte au sein du MCC, ce nouveau virus a été dénommé par les auteurs Polyomavirus de Merkel (ou Merkel Cell Virus MCV ou encore Merkel Cell Polyomavirus MCPyV).

4. Arguments en faveur du rôle cancérigène du nouveau Polyomavirus dans les MCC

4.1. Prévalence de l'ADN viral dans les MCC

A ce stade de leur travail, les auteurs avaient mis en évidence du génome viral dans les MCC de trois cas, mais la technique de DTS avait failli à montrer la présence du nouveau virus à partir d'un mélange d'acides nucléiques de trois cas. Les chercheurs ont donc, logiquement, recherché la présence d'ADN de MCPyV par PCR dans des échantillons supplémentaires de MCC.

Parmi les trois échantillons de MCC dont le regroupement avait donné des résultats négatifs en DTS, deux étaient dépourvus d'ADN et l'échantillon restant contenait une faible quantité d'ADN décelable uniquement par Southern Blot. L'absence d'ADN dans les deux cas négatifs a été confirmée par l'utilisation de treize couples d'amorces couvrant l'intégralité du génome de MCPyV.

En revanche, quatre échantillons correspondant à quatre nouveaux cas contenaient de l'ADN, ainsi que deux échantillons de métastase de MCC correspondant à deux cas dont l'échantillon de tumeur primitive contenait de l'ADN.

Au total, les auteurs avaient donc mis en évidence de l'ADN viral dans la majorité des cas de MCC de leur cohorte avec 10/12 (83 %) échantillons de 8/10 (80 %) cas de MCC contenant de l'ADN et des résultats concordants entre les différentes tumeurs d'un même cas (n=2). Ils avaient par ailleurs observé que dans un cas, le génome viral était présent mais en faible quantité et peu ou non exprimé.

4.2. Prévalence de l'ADN viral dans des tissus contrôles

Afin de déterminer si ces taux élevés de détection d'ADN viral étaient dus à une association spécifique de MCPyV à MCC ou au contraire à un caractère ubiquitaire du virus, les auteurs ont testé des échantillons de tissus variés de sujets exempts de MCC – incluant 5 sujets immunodéprimés –. Au total, les auteurs ont décelé de l'ADN uniquement en faible quantité dans seulement 9/84 (ou 11 %) échantillons de sujets immunocompétents, avec des taux de détection comparables dans les tissus cutanés (4/34 ou 12 %) et non cutanés (5/50 ou 10 %). A noter que ces échantillons cutanés contenant de l'ADN de MCPyV correspondaient à des biopsies d'un autre cancer cutané de l'immunodéprimé, le sarcome de Kaposi.

Les auteurs avaient donc montré que le virus n'était pas exclusivement associé aux MCC mais qu'il était plus rarement présent et en plus faible quantité dans ces autres tissus analysés et ce de manière significative.

4.3. Intégration de l'ADN viral

Les auteurs avaient observé un transcrit de fusion suggérant que le génome de MCPyV était intégré dans un cas. Les auteurs ont d'abord confirmé cette intégration par deux méthodes.

Les membres de l'équipe ont amplifié par PCR la séquence d'ADN correspondant au transcrit et ont obtenu une séquence contenant de l'ADN viral et cellulaire. Ensuite, par la technique associant une digestion enzymatique suivie d'une hybridation par Southern Blot avec l'aide de sondes spécifiques du génome viral d'une part et de la séquence cellulaire d'autre part, les auteurs ont montré qu'une insertion de matériel génétique viral s'était bien produite dans le génome cellulaire au sein du gène PTPRG, gène considéré par certains auteurs comme étant un gène suppresseur de tumeur.

Les auteurs ont ensuite logiquement recherché la présence d'ADN de MCPyV intégré par Southern Blot dans d'autres échantillons de MCC. Parmi les huit échantillons testés et contenant de l'ADN viral, cinq échantillons correspondant à quatre autres cas que le cas initial offraient un profil compatible avec un seul site d'intégration unique à chaque cas. Cela suggérait que le génome viral s'était intégré à différents endroits du génome selon les cas mais qu'au sein de chaque cas les cellules tumorales porteuses de l'ADN viral formaient une population monoclonale. Un échantillon correspondant à une métastase du cas initial avait un profil identique à celui de la tumeur primitive, confirmant l'aspect monoclonal de l'intégration. Ces observations suggéraient donc que l'intégration virale constituait un événement à la fois précoce et stable dans le temps.

Un profil compatible soit avec des séquences virales intégrées en concatémères, soit à du génome viral persistant sous forme d'épisomes, a été observé avec deux échantillons.

Enfin, les profils des échantillons correspondant au cas contenant de faibles quantités d'ADN et aux deux cas négatifs n'étaient pas informatifs.

Les auteurs avaient donc mis en évidence du génome de MCPyV intégré dans la majorité (au moins 5/8 ou 63 %) des cas de MCC contenant de l'ADN viral et montré que l'intégration constituait probablement un événement aléatoire, précoce et stable dans le temps.

5. Conclusion

Ce travail décrivait donc la découverte d'un nouveau virus au sein d'un cancer humain. Des arguments expérimentaux solides permettait de suspecter que ce nouveau virus jouait un rôle dans le cancer puisqu'il i) appartenait à une famille de virus notoirement cancérigènes chez l'animal; ii) semblait associé de manière forte et spécifique au cancer; iii) était intégré et muté au sein des tumeurs; iv) et enfin était vraisemblablement exprimé par les cellules tumorales.

L'importance de ce travail, qui impliquait pour la première fois de manière consistante un Polyomavirus dans un cancer humain, justifiait sa publication dans le journal Science. La parution de cet article a suscité un regain d'intérêt considérable pour la pathologie du carcinome de Merkel et les Polyomavirus en général.

Objectifs du travail de thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans une démarche très générale de compréhension des mécanismes qui sous-tendent le développement des tumeurs viro-induites.

Il s'est focalisé sur un agent viral en particulier, le Polyomavirus de Merkel, appartenant à l'une des familles de petits virus à ADN oncogènes, celle des *Polyomaviridae*.

En effet, la découverte d'un nouveau membre de cette famille, le Polyomavirus de Merkel, et de son rôle éventuel dans un cancer humain particulier, le carcinome de Merkel, a été publiée quelques mois après mon arrivée dans le laboratoire. Nous avons à ce moment débuté un travail sur une autre famille de petits virus oncogènes à ADN, très proche de celle des *Polyomaviridae*, celle des *Papillomaviridae*. Mais l'importance de la découverte du Polyomavirus de Merkel, suspecté d'être un virus oncogène chez l'Homme, après plus de cinquante années de recherches sur cette famille de virus, nous a amenés à choisir finalement ce modèle d'étude.

Au début de mon travail de thèse, les connaissances sur le Polyomavirus de Merkel se réduisaient à l'article de Feng *et al* publié en Février 2008 dans Science que nous avons détaillé dans l'introduction générale (Feng, Shuda *et al.* 2008). Les arguments en faveur du rôle cancérigène du Polyomavirus de Merkel chez l'Homme reposaient donc sur un travail unique et limité à l'étude de 10 cas, la taille réduite de la cohorte s'expliquant par la rareté de la maladie.

L'objectif principal de mon travail de thèse était donc de confirmer – ou d'infirmer – le rôle étiologique de MCPyV dans le MCC.

Le premier objectif du travail de thèse était simple : il s'agissait tout d'abord de confirmer que de l'ADN de MCPyV était fréquemment présent dans les MCC en général. Cet objectif ayant été atteint, les objectifs suivants se sont construits au fur et à mesure de la progression du travail parallèlement à l'avancée des connaissances sur le MCPyV, l'ensemble des articles traitant du MCPyV – en dehors de l'article princeps – ayant été publié au cours du travail de thèse.

Une partie du travail a consisté à étudier la spécificité de l'association entre MCPyV et MCC. Nos travaux sur la détection de l'ADN ayant montré que l'ADN viral était présent dans des tissus en dehors du MCC, nous avons recherché des marqueurs moléculaires permettant de distinguer l'ADN de MCPyV associé aux MCC et l'ADN viral non tumoral. Nous avons ainsi réalisé des travaux de quantification de l'ADN de MCPyV, de recherche de séquences virales intégrées et de séquençage du génome viral. Dans la même optique, nous avons étudié en parallèle des marqueurs sérologiques de l'infection par MCPyV.

Les résultats obtenus nous ont amené à formuler des hypothèses sur les mécanismes sous-tendant la transformation tumorale que nous nous sommes efforcés d'étoffer en étudiant les marqueurs d'infection par d'autres Polyomavirus humains chez les sujets atteints de MCC. Ils nous ont également conduit à évaluer la pertinence de marqueurs virologiques pour le diagnostic et l'évaluation pronostique de la maladie. Enfin, puisqu'il ressortait du travail que MCPyV constituait probablement un agent causal de MCC, nous avons étudié l'implication du virus dans d'autres cancers humains.

Deuxième partie
ARTICLES PUBLIES

Avant propos

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont fait l'objet de 3 publications.

Les résultats présentés résultent à la fois d'un travail personnel effectué dans le laboratoire et de deux collaborations, la première avec l'équipe du Dr Xavier Sastre-Garau du Département de Biologie des Tumeurs à l'Institut Curie à Paris et la seconde avec l'équipe du Dr Pierre Coursaget de l'unité INSERM U618 à Tours.

Les 3 publications sont présentées ci-après par des résumés précédant le texte intégral de chaque manuscrit.

En raison de la constitution espacée dans le temps – durant les quatre années du travail de thèse – de la cohorte de sujets atteints de MCC, les résultats présentés dans les différents articles présentent des recoupements. Afin d'éviter les répétitions, tous les résultats – éventuellement introduits par un bref rappel méthodologique par souci de clarté –, sont repris et discutés dans leur ensemble dans la troisième partie du travail.

En outre, étant donné qu'à l'exception de l'étude princeps, tous les articles publiés dans la littérature sur le MCPyV l'ont été parallèlement à la progression du travail de thèse, les points de discussion incluent une revue détaillée de la littérature sur les connaissances actuelles concernant le MCPyV.

Résumé du premier article

Le carcinome de Merkel est un cancer neuro-endocrine cutané primaire récemment associé à un Polyomavirus nouvellement découvert, le Polyomavirus de Merkel.

Le but de notre travail était d'étudier la spécificité de cette association ainsi que le rôle causal du virus dans le développement de la tumeur.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'ADN et l'ARN extraits de dix cas de MCC *via* des techniques de PCR et de RT-PCR (pour Reverse Transcription PCR), ainsi que de l'ADN de 1241 échantillons tumoraux humains de nature variée.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé les techniques d'hybridation *in situ* (ou Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH) et de DIPS-PCR (pour Detection of Integrated Papillomavirus Sequences-PCR) adaptée aux Polyomavirus pour mettre en évidence et identifier les locus d'intégration des séquences d'ADN de MCPyV.

Enfin, nous avons recherché la présence d'altérations structurales du génome cellulaire en lien avec la présence de génome viral dans les 10 cas de MCC à l'aide de la méthode de CGH-Array (pour Comparative Genomic Hybridization-Array).

Nous avons décelé du génome viral dans les échantillons de MCC des 10 cas mais dans aucun des 1241 échantillons de cancers autres que le MCC.

De l'ADN de MCPyV intégré dans le génome cellulaire a été mis en évidence dans les 10 cas par la technique de DIPS-PCR et le profil monoclonal de l'intégration a été confirmé par la technique de FISH dans un cas. Le caractère monoclonal de l'intégration a également été confirmé par l'analyse comparative des séquences intégrées dans des échantillons de tumeur primitive et de deux métastases d'un même cas.

Nous avons observé un profil récurrent d'intégration consistant en la conservation des séquences virales incluant la NCCR et les séquences codant ST et l'extrémité 5' terminale de LT. Nous avons démontré que les gènes ST et LT étaient effectivement exprimés dans les cas de MCC.

Cependant, nous n'avons observé ni intégration dans des locus chromosomiques préférentiels, ni perturbation de l'expression de gènes cellulaires au voisinage des séquences virales intégrées.

En conclusion, la spécificité de l'association entre le MCC et le MCPyV, le caractère monoclonal de l'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules tumorales et l'expression des gènes codant les oncoprotéines virales dans les MCC constituent des arguments forts en faveur d'un rôle causal de MCPyV dans la survenue du MCC. Cette découverte pourrait faciliter dans le futur le développement d'outils diagnostiques et thérapeutiques pour la prise en charge des cas de MCC et des cancers apparentés à cette pathologie.

Original Paper

Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis

Xavier Sastre-Garau,^{1*} Martine Peter,¹ Marie-Françoise Avril,² H el ene Laude,³ Jérôme Couturier,⁴ Flore Rozenberg,³ Anna Almeida,⁵ Françoise Boitier,² Agnès Carlotti,⁶ Benoît Couturaud⁷ and Nicolas Dupin²

¹Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France

²Department of Dermatology, Hôpital Cochin-APHP (Faculté de Médecine, Université René Descartes), Paris, France

³Department of Virology, Hôpital Cochin-APHP (Faculté de Médecine, Université René Descartes), Paris, France

⁴Department of Genetics, Institut Curie, Paris, France

⁵Department of Translational Research, Institut Curie, Paris, France

⁶Department of Pathology, Hôpital Cochin-APHP (Faculté de Médecine, Université René Descartes), Paris, France

⁷Department of Surgery, Institut Curie, Paris, France

*Correspondence to:

Xavier Sastre-Garau,
Department of Pathology, Institut
Curie, 26 Rue d'Ulm, 75248
Paris Cedex 05, France.
E-mail: xavier.sastre@curie.net

All authors declare that they
have no conflicts of interest.

Abstract

Merkel cell carcinoma (MCC), a skin tumour with neuroendocrine features, was recently found to be associated with a new type of human polyomavirus, called Merkel cell virus (MCV). We investigated the specificity of this association as well as a causal role of MCV in oncogenesis. DNA and RNA from ten cases of MCC were analysed using PCR and RT-PCR. DNA from 1241 specimens of a wide range of human tumours was also analysed. The DIPS technique was used to identify the integration locus of viral DNA sequences. Array CGH was performed to analyse structural alterations of the cell genome. MCV DNA sequences were found in all ten cases of MCC and in none of the 1241 specimens of other tumour types. Clonal integration of MCV into the host genome was seen in all MCC cases and was checked by FISH in one case. A recurrent pattern of conserved viral sequences which encompassed the replication origin, the small tumour (ST), and the 5' part of the large tumour (LT) antigen DNA sequences was observed. Both ST and LT viral sequences were found to be significantly expressed in all MCCs. Neither recurrent site of integration nor alteration of cellular genes located near the viral sequences was observed. The tight association of MCV with MCC, the clonal pattern of MCV integration, and the expression of the viral oncoproteins strongly support a causative role for MCV in the tumour process. This information will help the development of novel approaches for the assessment and therapy of MCC and biologically related tumours.

Copyright   2009 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: viral oncogenesis; Merkel cell virus; Merkel cell carcinoma; human polyomavirus; viral integration; small T oncogene

Received: 12 December 2008
Revised: 16 January 2009
Accepted: 20 January 2009

Introduction

Merkel cell carcinoma (MCC) is a cutaneous tumour [1] with neuroendocrine features and a poor outcome [2–4]. This tumour develops in the sun-exposed areas of the skin in elderly or immunosuppressed individuals [5]. A three-fold increase in incidence has been observed in the United States over the past 15 years [6], attributable in part to an ageing population with extensive sun exposure. Although classically believed to be derived from Merkel neuroendocrine epidermal cells [2], the histogenesis of this tumour is still under debate [3]. Studies on the molecular origins of MCC thus far have provided only negative results [7] and this lack of knowledge limits the development of

targeted therapies. A new type of human polyomavirus was recently identified in MCC, thus called Merkel cell polyomavirus (MCV or MCPyV) [8]. The presence of MCV DNA sequences in MCC has been confirmed in three series of cases [9–11]. This association does not, however, establish a causal role for MCV in MCC. Polyomaviruses are small non-enveloped viruses with a double-stranded circular DNA chromosome composed of 4700–5400 bp. This genome encodes the three structural proteins which constitute the viral particle (VP1, 2, 3) and two early tumour antigens, called small T (ST) and large T (LT). In their natural host, polyomaviruses are non-oncogenic: infection leads to replication of the viral genome and production of viral particles resulting in cell lysis. In

contrast, in heterologous experimentally transformed cells, no production of infectious virus occurs. The non-permissive host cells integrate into their genome viral DNA sequences which constitutively express ST and LT antigens.

Four other types of human polyomaviruses have been identified to date: JC and BK viruses in 1971 [12,13], and KIV and WUV in 2007 [14,15]. JC and BK viruses are ubiquitous and widely spread in the population. The primary infection generally occurs in childhood and can lead to lifetime persistence. Although capable of inducing various tumours when injected into newborn animals, these viruses were not found to be oncogenic in humans [16]. The pathogeny of KIV and WUV, identified by screening respiratory secretions, is still unclear. This information prompted us, firstly, to compare the prevalence of MCV in MCC with a large series of other human tumours; and, secondly, to look for evidence of genetic alterations in MCC which could indicate an oncogenic role for MCV. MCV was found to be strongly and selectively associated with MCC. Clonal integration of MCV DNA sequences was observed in all cases of MCC, together with significant expression levels of transforming viral sequences. These data strongly support a causative role for MCV in MCC. Similarly, polyomaviruses yet unknown may also act as carcinogenic agents for other human tumours.

Materials and methods

Cases and tumour specimens

Ten cases of MCC were accumulated from 1996 to 2007. For nine cases, a tumour specimen was fixed in formalin for histological analysis, and another specimen frozen in liquid nitrogen and then kept at -70°C for molecular studies. In one case, a patient with MCC from the nasal septum (No 4), only a fine needle aspiration product of a supra-clavicular lymph node was available for cytological analysis and DNA extraction. Twelve tumour specimens were analysed from these ten patients, corresponding to primary tumours in six cases, three skin metastases, and three lymph node metastases. According to French regulations, patients were informed of research performed using the biological specimens obtained during their treatment and did not express opposition.

Histological analysis

Tumours were analysed according to a standard histological procedure. Histological reports specified the architectural pattern as solid/cohesive (massive or trabecular) or diffuse/discohesive [3]. Immunohistochemistry was performed to confirm the diagnosis using antibodies directed against chomogranin A (clone DAK-A3, dilution 1/200; Dako, Glostrup, Denmark) and synaptophysin (clone SY38, dilution 1/40; Dako), markers expressed by virtually all MCCs [4,17].

Reactivity was scored as follows: 1: <10% of reactive cells; 2: 10–50%; 3: >50%. Detection of cytokeratin intermediate filaments was performed using pan anti-cytokeratins (clone KL1, dilution 1/200; Beckman Coulter, Villepinte, France). Staining was revealed by the avidin biotin technique, using DAB as a chromogen (Dako).

Screening of MCV350 DNA sequences and viral load

MCV350 sequences were detected by PCR amplification with primers MCV_ST_A and MCV_ST_B specific for the ST sequences (size product 165 bp), MCV_LT_C and MCV_LT_D for the LT sequences (162 bp), and MCV_VP1_A and MCV_VP1_B for the VP1 gene (204 bp). The viral load was obtained by amplification of DNA (10 ng) with 600 nm of each MCV_LT_C and MCV_LT_D primer in the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), using the standard cycling conditions of 10 min at 95°C and 40 cycles (15 s at 95°C , 1 min at 60°C). Amplification of a genomic DNA sequence, ZNF277 (7q31.1), with primers IC5A and IC5B was used as a DNA quality control and reference for two copies of DNA sequences per cell. Viral copy number was estimated by quantitative PCR using a delta-delta Ct method [18].

In non-MCC tumours, a total of 1277 DNA specimens from tumours of various histological types and organs were obtained from the DNA bank of the Institut Curie. DNA quality control assessed by amplification of the ZNF277 DNA sequences showed that DNA quality was insufficient in 36 cases, which were discarded from the study. The 1241 remaining specimens were analysed for MCV sequences using MCV_LT_C and MCV_LT_D primers designed in the 5' part of the LT sequences. The primer sequences are listed in the Supporting information, Supplementary Table S1.

MCV cloning and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments

The whole viral genome could be amplified in one case (No 5) using primers MCV-U2 and MCV-L2 located at bases 5283 and 5282 of the MCV genome, respectively. DNA (250 ng) was amplified by PCR (final volume 25 μl) using the Expand 20kb^{plus} PCR System (Roche Applied Science, Meylan, France). The viral genome (5387 bp) was then cloned in the pCR^{XL}-TOPO[®] vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced. This genome was used for FISH experiments. DNA was labelled by nick translation using the BioNick[™] Labelling System (Invitrogen) with biotinylated dATP. Hybridization was performed on frozen histological sections. The slides were analysed using a Leica DMRB microscope fitted with a Quips (Visys, Downers Grove, IL, USA) Image Capture System.

Viral integration sites

The DIPS-PCR technique (detection of integrated papilloma sequences), which allows the amplification of genomic viral–cellular junctions [19], was used to investigate the integration sites of MCV in MCC. After tumour DNA digestion with restriction enzyme *Taq* I, enzyme-specific adapters were ligated to the restriction fragments. The ligation products obtained were subjected to PCR amplification, which consisted of a first round of linear PCR with a viral specific primer a, followed by a second round of exponential PCR with a viral specific primer b, internal to the previous one, and a second primer AP1 specific for the adapter. The 3' viral–cellular DNA junctions were detected with primers f_a and f_b, and the cellular–5' viral DNA junctions with primers r_a and r_b. PCR products were excised from an agarose gel, purified, and sequenced (see Supporting information, Supplementary Table S1 for primer sequences). Sequences were submitted to a database (UCSC Genome Browser website; Working Draft March 2006) for genomic localization.

Viral gene expression

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen). DNase digestion using the Nucleospin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) was performed. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed (RT+) using the GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). For each sample, a negative control without reverse transcriptase (RT–) was performed to verify the absence of contaminating DNA. PCRs were performed in parallel on the RT+ and RT– products. One hundredth of the RT+ or RT– product was used for each PCR (final volume of 25 µl), in the presence of 600 nM of each specific primer and in the SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). Primers MCV_ST_A and MCV_ST_B were used for MCV ST expression, and MCV_LT_C and MCV_LT_D for LT expression. The MCV_ST_B primer was designed in the spliced LT sequences and thus allows the amplification of ST sequences only. A12 and A13 primers were used for the *TATA box binding protein (TBP)* gene as a reference for gene expression level. PCR amplifications were performed in an ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). *MCV350* mRNA expression levels were directly compared with *TBP* expression using the delta-delta Ct method [18].

MYC and *IL20RA* gene expression

PCR with primers A227 and A228 for *MYC* expression and *IL20RA_B* and *IL20RA_C* for *IL20RA* were performed under the conditions previously described for the *MCV350* genes.

Array CGH

Tumour cellularity of the samples was verified to be greater than 60%. Tumour DNA was prepared using

Dpn II digestion (Ozyme, St Quentin-en-Yvelines, France), and purification on a QIAquick column (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reference and test DNAs were labelled with Cy3 and Cy5 cyanine dyes, respectively (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France), using the BioPrime random priming labelling kit (Invitrogen). Reference and test DNAs were precipitated together with human Cot-1 DNA (Invitrogen), resuspended in hybridization buffer, and denatured. The DNA was hybridized onto a genome-wide DNA microarray consisting of 5K BAC clones spotted in triplicate, with a 1 Mbase resolution (CIT/INSERM U830/IntegraGen). Slides were scanned using an Axon GenePix 4000B scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Image analysis was performed with Axon GenePix 5.1 software (Molecular Devices). The data were visualized using VAMP software [20].

Results

Patients and tumours

Ten cases of Merkel cell carcinoma (MCC) in eight male and two female patients with a mean age of 79.1 years (range 63–85 years) were studied (Table 1). All primary tumours were dermal, and localized on the head and neck in four cases, the limbs in four cases, and the trunk in two cases (Table 1). In one case (No 6), two cutaneous metastases were analysed in addition to the primary tumour. The mean primary tumour size was 23.9 mm (range 10–45 mm). Histological analysis showed the architectural pattern to be solid in five cases, either trabecular (three cases) or massive (two cases), and discohesive/diffuse in four cases. This latter pattern was characterized by a proliferation of tumour cells that lacked cohesion and appeared individually dispersed throughout the connective tissue (Figure 1a). All nine cases exhibited co-expression of chromogranin A and synaptophysin neuroendocrine markers, a characteristic immunophenotype of MCC (Figure 1b and Table 1). Staining of cytokeratins disclosed dot-like immunolabelling close to the nucleus of tumour cells, corresponding to a localized aggregate of these intermediate filaments (Figure 1c).

MCV350 DNA sequences in Merkel cell carcinoma

DNA extracted from frozen tumour tissue or cells was analysed by PCR for the presence of *MCV350* DNA sequences using primers designed in the ST, LT, or VP1 sequences (see Supporting information, Supplementary Table S1). All ten cases of MCC were positive for MCV (Table 2). DNA fragments with the expected sizes of 165, 162, and 204 bp were obtained in each case except case 1, for which only DNA corresponding to the ST and LT sequences could be amplified.

Q-PCR experiments using amplimers designed in the LT sequences of *MCV350* were performed to

Table I. Clinical and histological data in Merkel cell carcinoma

Case No	Age (years)	Sex	Localization		Size (mm)	Pattern	Histology	
			Primary	Metastasis			Immunophenotype	
							Chromogranin	Synaptophysin
1	82	M	Eyelid	Cervical LN*	30	Discohesive/diffuse	3	1
2	72	M	Forearm*		10	Discohesive/diffuse	2	2
3	84	M	Thigh	Inguinal LN*	27	Discohesive/diffuse	3	2
4	79	F	Nose	Cervical LN*	30	Solid/trabecular	ND	ND
5	81	M	Ankle	Leg*	11	Solid/trabecular	2	2
6a	80	M	Wrist*		21	Solid/massive	3	3
6b				Trunk*	–	ND	ND	ND
6c				Trunk*	–	ND	ND	ND
7	82	F	Cheek*		15	Solid/massive	1	1
8	85	M	Buttock*		30	Discohesive/diffuse	3	2
9	63	M	Breast*		20	Solid/trabecular	2	3
10	83	M	Ear*		45	Solid/massive	3	3

LN = lymph node; ND = not done.
 *Specimens analysed for MCV characterization.

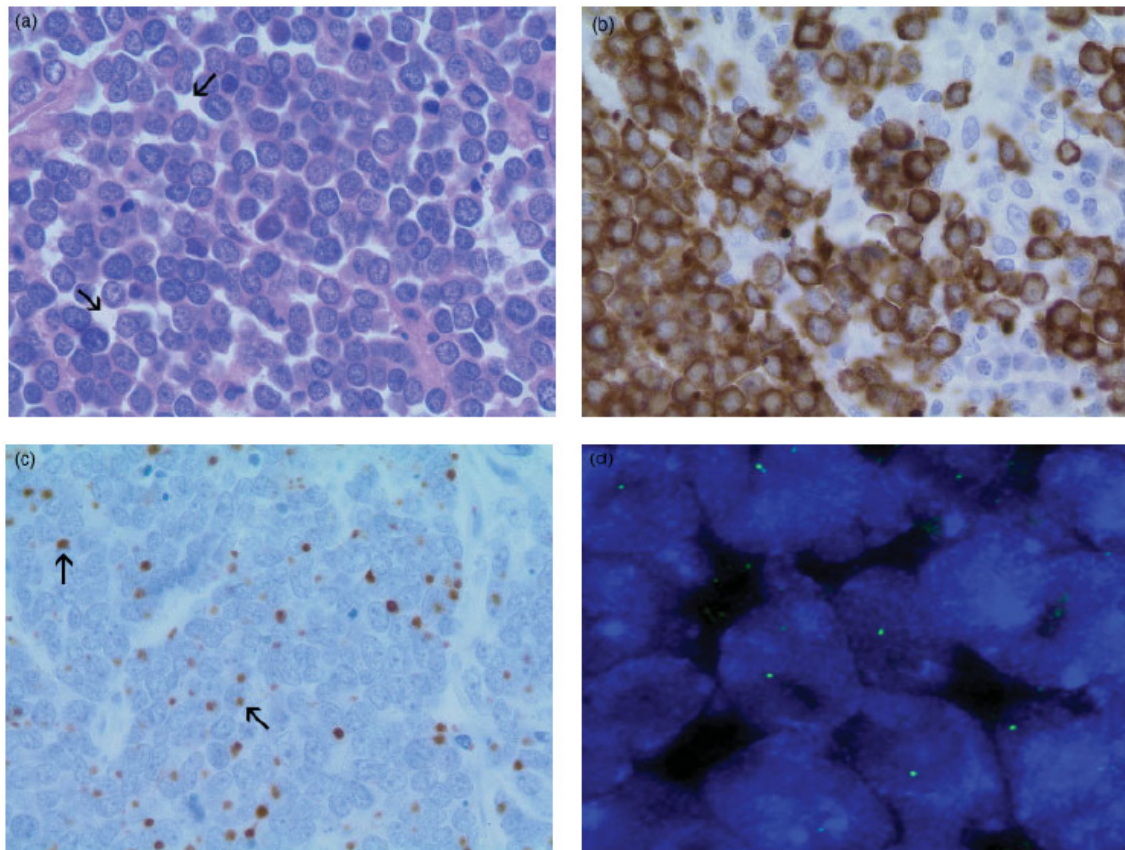


Figure 1. Histological aspects of Merkel cell carcinoma (original magnification $\times 400$). (a) Tumour of diffuse architectural pattern composed of round cells with non-cohesive feature characterized by spaces between cells (arrows) indicating a lack of cell–cell adhesion (standard staining). (b) Immunohistochemical detection of chromogranin A neuroendocrine marker showing strong brown staining restricted to the cytoplasm of tumour cells. (c) Immunohistochemical detection of cytokeratin intermediate filaments showing paranuclear dot-like staining (arrows) corresponding to local aggregation of these filaments. (d) MCV DNA sequences visualized by FISH in a Merkel cell carcinoma (case 8). Presence of a single green signal per nucleus of carcinoma cells

Table 2. Viral and genetic data in Merkel cell carcinoma

Case No	MCV DNA load*		MCV RNA expression level		Array CGH chromosome imbalances†	Chromosome insertion sites	Locus‡	MCV breakpoints	Putative target genes expression level		
	+	-	Small	Large					Putative target genes	MYC	IL20RA
1	+	+	3	0.23	+5p, -5q, -8p	8q24.21	130177462	1532 (3')	MYC	0.008	0.000
2	+	+	1.2	0.42	No imbalance	12q23.1	97372542	5202 (3')	AX747640	0.007	0.000
3	+	+	0.6	ND	+6p, +11, -17p	2q32.3	196674834	3925 (5')			
4	+	+	3.3	ND	-2, +6, -7, -10, -17	20q11.21	31474040	3712 (3')	SNTA1		
5	+	+	62.2	0.24	+1p, +1q	4q13.1	64683073	1515 (3')	SRD5A2L2	0.043	0.073
6a	+	+	3.8	3.16	No imbalance	3q26.33	183625703	2663 (3')	ATP1B	0.025	0.000
6b	+	+	ND	ND	ND	3q26.33	183625703	2663 (3')			
6c	+	+	ND	ND	ND	3q26.33	183625703	2663 (3')			
7	+	+	1.7	0.21	+1q	5q35.1	170684993	1978 (5')	TLX3		0.034
8	+	+	6.3	0.28	+11	?		3119 (5')		0.012	0.000
9	+	+	1	0.33	No imbalance	6q23.3	137409329	2240 (3')	IL20RA	0.036	0.029
10	+	+	10.3	0.39	+1q, +6p, -6qter, +7pter	Yq12	57288464	2980 (3')		0.068	0.000

* Number of equivalent viral genome per cell.

† Recurrent imbalances are in bold.

‡ Working Draft March 2006.

ND = not done.

assess the number of viral genomes per cell in MCC. Viral DNA loads ranging from 0.6 to 10.3 genome-equivalent per carcinoma cell were observed in nine cases. A much higher viral load of 62.2 was detected in one case (No 5) (Table 2), which was further analysed using contiguous and inversely orientated primers. This experiment allowed amplification of the whole viral genome (5387 bp), suggesting the presence of viral episomes. This genome was cloned. Sequencing showed that ST, LT, and VP1, VP2, VP3 viral genes were fully conserved without mutation that could lead to truncated protein. This sequence showed a 99.3% homology rate with that of MCV350.

In order to verify that MCV350 DNA sequences were located in the nucleus of epithelial tumour cells, we performed *in situ* hybridization analysis using the whole viral genome as a probe. FISH experiments were performed on frozen sections of case 8, which contains six copies of the MCV genome integrated at a single site. A single fluorescent signal was observed in the nucleus of epithelial tumour cells (Figure 1d). About 90% of the cells showed the signal, corresponding to the clonal pattern of integration. No significant signal was found in non-tumour cells.

MCV350 DNA sequences in non-Merkel cell tumours

To determine whether MCV DNA sequences were present in tumour types other than MCC, detection of MCV350 sequences was performed by PCR using primers designed in the 5' part of the LT sequences found to be conserved in all MCC cases. A total of 1241 specimens, taken from tumours of epithelial or mesenchymal origin, developed in adults or children, were included in the analysis (Table 3). In none of these 1241 different specimens was there evidence of DNA likely to correspond to MCV sequences.

MCV gene expression in Merkel cell carcinoma

Frozen tissue specimens from eight of our ten cases of MCC were available for RNA extraction. Total RNA was treated with DNase to avoid the amplification of viral DNA. Quantitative RT-PCR was performed using amplimers designed in ST and LT sequences. The expression level of the *TBP* human gene was used as a reference and three cervical cancer cell lines (IC1, 2, 3) negative for MCV were used as controls. RNAs from the MCV sequences were expressed in all eight cases. The LT expression level ranged from 1.46 to 21.56 fold *TBP* expression level, and ST from 0.21 to 3.16 (Table 2). No significant correlation between viral DNA load and viral RNA expression level was observed.

Chromosome localization of the viral DNA sequences

Integration of viral DNA sequences into the tumour cell genome was investigated using the DIPS-PCR

Table 3. MCV analysis in non-MCC human tumours

Organ	Histological tumour type	No of cases	MCV DNA	
Skin	Basal cell carcinoma	13	–	
	Melanoma	13	–	
	Others	2	–	
Uterine cervix	Normal skin	4	–	
	Invasive carcinoma			
	HPV-positive	26	–	
	HPV-negative	18	–	
Large bowel	Adenocarcinoma	38	–	
	Others	1	–	
Liver	Metastatic melanoma	94	–	
	Metastatic breast carcinoma	16	–	
	Others	4	–	
Uveal tract	Melanoma	45	–	
Ovary	Serous adenocarcinoma	71	–	
	Endometrioid carcinoma	9	–	
	Mucinous carcinoma	3	–	
	Clear cell carcinoma	5	–	
	Poorly differentiated carcinoma	32	–	
	Metastatic carcinoma	39	–	
	Serous border line tumours	6	–	
	Others	7	–	
	Breast	Invasive ductal carcinoma	451	–
		Invasive lobular carcinoma	49	–
Poorly differentiated carcinoma		41	–	
Medullary carcinoma		9	–	
Mucinous or papillary carcinoma		18	–	
Axillary node metastases		31	–	
Intraductal carcinoma		41	–	
Phyllodes tumour		41	–	
Others		6	–	
Bone and soft tissue	Ewing tumour	30	–	
	Rhabdomyosarcoma	25	–	
	Desmoplastic tumour	24	–	
	Neuroblastoma	21	–	
Others	Fibromatosis	4	–	
	Others	4	–	
Total		1241		

method, which allows localization of the viral integration site at the molecular level. The integration site was identified in all ten cases with primers designed to determine either the 3' or the 5' virus–host junctions. All cases harboured a single integration site which was found in ten different loci (Table 2). Viral DNA sequences were found inserted in the long arm of chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 20, and Y. In case 6, the same chromosome localization was observed in the primary and in the two skin metastases, demonstrating the clonality of the insertional mutation. In case 8, the viral genome was interrupted at base 3119, at the junction between LT and VP1 sequences. Only 70 bp of cell DNA at the 5' virus–host junction could be amplified. When compared with the human database, the specificity of this short sequence was not sufficient to correspond to a unique locus.

Analysis of the virus–host junctions allowed specification of the pattern of the integrated viral sequences. In six cases (Nos 1, 5, 6, 7, 9, and 10), the virus–host junction was located in the 3' part of the LT sequences (between nt 1515 and nt 2980), which were thus partly deleted (Figure 2). In two cases (Nos 4 and 2), the 3'

virus–host junction was located in VP1 (nt 3712) or in the regulatory region (nt 5202) and the LT sequences were fully conserved. LT DNA sequencing showed the presence of a 72 bp deletion (1403–1480) leading to a stop codon (PY261X) (case 2) and the presence of a mutation (1390) leading to a stop codon (PQ255X) (case 4). In two cases (Nos 3 and 8), only the 5' host–virus junction was identified and the localization of the 3' break point regarding LT sequences could not be specified. In all eight informative cases, the 3' part of integrated viral LT sequences was prematurely truncated (Figure 2). In all ten cases, ST sequences were fully conserved.

Status of cellular genes potentially involved in oncogenesis and located in the vicinity of the integration sites

The possibility that integration of MCV DNA could lead to the deregulation of cellular genes involved in the tumour process was investigated. The genes located in the vicinity of the integrated viral sequences were identified. Viral sequences were found to be located in the *AX747640* and *SNAT1* genes (cases 2 and 3), at 1.3 kb from the *IL20RA* gene (case 9), at 1 Mb from the *SRD5A2L2* gene (case 5), and at 1.35 Mb from *MYC* (case 1) (Table 2). Since *MYC* has been found to be activated by viral insertion in human tumours [21] and *IL20RA* inactivation implicated in lung carcinogenesis [22], the expression level of these genes was further assessed by RT-PCR for eight of the ten cases. No significant gene deregulation related to MCV viral insertion was found (Table 2).

Array CGH analysis

Cellular DNA sequence copy number changes are reported in Table 2. Three of the ten samples analysed did not show any imbalance. Recurrent imbalances were gains of 1q (two cases), 6p (three cases), and 11 (two cases), and loss of 17p (two cases). No correlation was found between these chromosome rearrangements and integration sites of the MCV.

Discussion

In this study, MCV was found to be closely associated with MCC, as recently reported by Feng *et al* [8] and confirmed by two independent studies [9,10]. To assess the specificity of this association, we analysed more than 1200 various tumour specimens, including melanoma and skin basal cell carcinoma. In none of these were MCV sequences detectable. This does not exclude the possibility that other still unknown types of polyomavirus are associated with these human tumours [16]. MCV is phylogenetically closer to the African Green Monkey polyomavirus (LPV) than to human polyomaviruses [8]. It is likely that other new agents would be missed by PCR using consensus primers for human polyomaviruses.

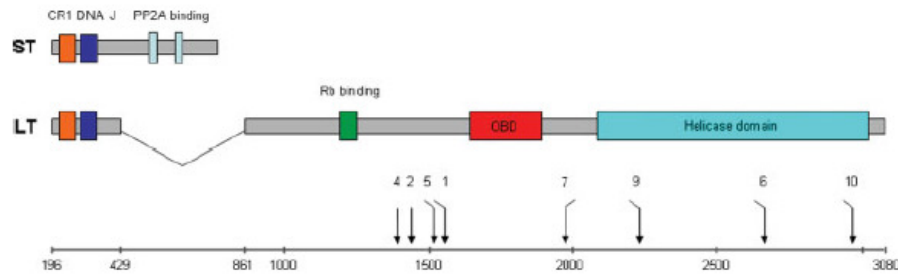


Figure 2. Scheme of the main functional domains of ST and LT proteins. The bottom line shows the corresponding nucleotide positions in the MCV genome. Arrows indicate the position of the interruption of integrated viral DNA sequences determined by DIPS-PCR at the 3' end (\curvearrowright) or the 5' end (\curvearrowleft) of the viral genome. \downarrow refers to mutation leading to the stop codon identified by sequencing. The numbers above the arrows correspond to the case number. CR I = conserved region I; OBD = origin binding domain

We searched for molecular alterations indicative of a causative role for MCV in the tumour process, possibly related to mutational insertion and/or the expression of viral oncogenes. As seen in experimental models of cell transformation by polyomavirus, MCV DNA sequences were found to be integrated into the host genome in all the MCC cases in this study. A single integration site was detected in each case, in molecular and FISH experiments. Identical integration patterns were observed in the primary and metastases, indicating that integration took place before clonal expansion of carcinoma cells. A low number of viral genome copies were present per cell, except for one case in which episomes of the full MCV genome were also detected. Integrated viral DNA sequences presented a recurrent pattern, characterized by the conservation of the replication origin, the ST, and the 5' part of LT sequences, and by deletions of the structural genes. Only ST and the 5' part of LT sequences were conserved in all ten cases. Both LT and ST sequences were found to be expressed in all cases. No evidence of cellular gene alterations related to the viral insertion was detected. Integration occurred in different chromosomal regions in each case and putative target genes showed no significant alteration in expression level. Our FISH data showed the presence of MCV DNA sequences at a single site in the nucleus of most MCC tumour cells, a feature underlying the clonality of the cell proliferation. The low intensity of the signal was in accordance with the presence of a few copies of viral genome per cell. In only one case was a higher viral load of about 60 copies observed, corresponding mostly to viral episomes. After cloning, episomal genome was found to be complete with functional genes. In contrast, in the same tumour, a deletion of the 3' part of LT in the integrated viral sequences was observed.

Overall, the frequent and selective association of MCC with MCV, the insertion of viral DNA into the host genome, the recurrent pattern of conserved viral DNA sequences, and the constant expression of viral oncoproteins constitute a biological context very similar to that observed in neoplasia of the uterine cervix induced by high-risk human papillomaviruses (HPVs).

In this latter model, it was shown that the HPV E6 and E7 proteins exert their oncogenic properties via the inactivation of cellular *p53* and *pRB*, leading to the inhibition of crucial checkpoints of cell growth and division [23]. In cell transformation experiments induced by polyomaviruses, the expression of both LT and ST antigens was required to express a completely transformed phenotype. As in high-risk HPV E6/E7, LT was found to inactivate *p53* and *pRB* [24,25]. In the study performed by Shuda *et al*, as in our cases, MCV-LT transcripts were found to harbour mutations disrupting the 3' part of the LT protein [26]. This truncation leading to the loss of helicase domain and replicative properties of tumour-derived LT sequences might be an oncogenic event. However, one of our cases also harboured episomal MCV sequences with conserved LT helicase domain. Alternatively, it is to be stressed that in most cases of MCC, the Rb binding domain of LT and ST were found to be conserved and may play a major part in the tumour process. Recent data have shown that the primary transforming activity of the ST oncoprotein was to disrupt the Ser/Thr protein phosphatase 2A (PP2A) complexes [27].

PP2A is a family of proteins forming heterotrimers which comprise a core enzyme, containing the catalytic C and the structural A subunit, which is bound to a regulatory B subunit [27]. The function of these complexes is to regulate cell signalling cascades by opposing the activity of signalling kinases [28] involved in many pathways essential for cell survival, cell cycle regulation, DNA damage response, and embryonic development [29]. ST was found to compete with B subunits for binding to A subunits, thus altering the activity of the AC complex [27]. It is of particular interest that among its numerous functions, PP2A is implicated in the maintenance of cell-cell adhesion junctions and of the intermediate filament network [30]. Through its interaction with PP2A, ST was found to alter cell junctions and cytoskeletal dynamics, inducing a loss of cell polarity, a crucial step in oncogenesis. Two morphological features characteristic of MCC have been consistently reported and were also observed in the present work: an architectural pattern of discohesive round cells [3,17] and

a dot-like paranuclear aggregate of the intermediate filaments of cytokeratins [4,17]. Early ultrastructural analyses clearly stated that the intermediate filaments in MCC cells were often collapsed in aggregates, displacing peripherally other organelles, and that these filaments never terminated in attachment devices, a feature characteristic of tonofilaments [3]. These morphological observations strongly suggest a cytopathic effect related to alterations of the network of intermediate filaments and of cell adhesion complexes in MCC, and are coherent with the recently recognized oncogenic properties of ST.

Cytogenetic studies of the genomic profile of MCC are rare [31–33]. No specific translocation has been identified, but conventional comparative genomic hybridization showed recurrent imbalances affecting whole chromosomes or chromosome arms. The most frequent alterations observed were gains of 1q, 5p, and 6 [33]. In our study, gains of 1q and 6, in particular 6p, were found in at least two cases, and a gain of 5p in one case. Other recurrent imbalances in the present study were gain of chromosome 11 and loss of 17p.

Whether MCC derives from Merkel cells is still a subject of debate. It has been shown that MCCs exhibit the ultrastructural features of Merkel cells [2,3] but this does not constitute proof of a histogenetic link. The characteristic dermal location of MCC without epidermal involvement does not favour this hypothesis. MCCs were frequently found to develop around the skin adnexa [3], where epidermal stem cells are located; thus, the development of MCC from a cell precursor is also possible.

MCC represents a new type of virus-associated human tumour. Elucidation of the role of the viral oncoproteins, particularly regarding the loss of cell polarity, together with additive cell molecular alteration, is a key step towards understanding the mechanisms of oncogenesis and the design of specific therapy. More extensive virological studies are needed to discern other tumour types potentially associated with MCV, as well as other types of human or animal polyomaviruses that could be implicated in oncogenesis in humans [16]. This would provide important information for the identification of cell types targeted by the virus, tumour precursors, and viral reservoirs. All this information is essential for the development of novel diagnostic procedures, biological assessment, treatment, and the prevention of polyomavirus-associated tumours and of biologically related tumours.

Acknowledgements

We thank Zofia Maciorowski and Annie Le Cunff for their help in the preparation of the manuscript.

Supporting information

Supporting information may be found in the online version of this article.

References

1. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 1972;**105**:107–110.
2. Sibley RK, Rosai J, Foucar E, Dehner LP, Bosl G. Neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin. A histologic and ultrastructural study of two cases. *Am J Surg Pathol* 1980;**4**:211–221.
3. Frigerio B, Capella C, Eusebi V, Tenti P, Azzopardi JG. Merkel cell carcinoma of the skin: the structure and origin of normal Merkel cells. *Histopathology* 1983;**7**:229–249.
4. Llombart B, Monteagudo C, Lopez-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartin O, et al. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology* 2005;**46**:622–634.
5. Swann MH, Yoon J. Merkel cell carcinoma. *Semin Oncol* 2007;**34**:51–56.
6. Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 2005;**89**:1–4.
7. Lemos B, Nghiem P. Merkel cell carcinoma: more deaths but still no pathway to blame. *J Invest Dermatol* 2007;**127**:2100–2103.
8. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008;**319**:1096–1100.
9. Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, et al. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the *VPI* gene. *Cancer Res* 2008;**68**:5009–5013.
10. Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 2009;**129**:248–250.
11. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 2009;**129**:246–248.
12. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971;**1**:1253–1257.
13. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1971;**1**:1257–1260.
14. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007;**81**:4130–4136.
15. Gaynor AM, Nissen MD, Whitley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;**3**:e64.
16. zur Hausen H. Novel human polyomaviruses — re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* 2008;**123**:247–250.
17. Asioli S, Righi A, Volante M, Eusebi V, Bussolati G. p63 expression as a new prognostic marker in Merkel cell carcinoma. *Cancer* 2007;**110**:640–647.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
19. Luft F, Klaes R, Nees M, Dürst M, Heilmann V, Melsheimer P, et al. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 2001;**92**:9–17.
20. La Rosa P, Viara E, Hupe P, Pierron G, Liva S, Neuvial P, et al. VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. *Bioinformatics* 2006;**22**:2066–2073.
21. Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006;**25**:5985–5993.
22. Tessema M, Willink R, Do K, Yu YY, Yu W, Machida EO, et al. Promoter methylation of genes in and around the

- candidate lung cancer susceptibility locus 6q23–25. *Cancer Res* 2008;**68**:1707–1714.
23. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;**89**:213–228.
 24. Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001;**11**:15–23.
 25. Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 2005;**24**:7729–7745.
 26. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:16272–16277.
 27. Arroyo JD, Hahn WC. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 2005;**24**:7746–7755.
 28. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 1999;**24**:186–191.
 29. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 2001;**353**:417–439.
 30. Sontag JM, Sontag E. Regulation of cell adhesion by PP2A and SV40 small tumor antigen: an important link to cell transformation. *Cell Mol Life Sci* 2006;**63**:2979–2991.
 31. Van Gele M, Speleman F, Vandesompele J, Van Roy N, Leonard JH. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in Merkel cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998;**58**:1503–1508.
 32. Van Gele M, Leonard JH, Van Roy N, Van Limbergen H, Van Belle S, Cocquyt V, et al. Combined karyotyping, CGH and M-FISH analysis allows detailed characterization of unidentified chromosomal rearrangements in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 2002;**101**:137–145.
 33. Larramendy ML, Koljonen V, Bohling T, Tukiainen E, Knuutila S. Recurrent DNA copy number changes revealed by comparative genomic hybridization in primary Merkel cell carcinomas. *Mod Pathol* 2004;**17**:561–567.

Résumé du deuxième article

Le Polyomavirus de Merkel est un virus associé au carcinome à cellules de Merkel, un cancer cutané neuro-endocrine agressif. En effet, les faits que l'ADN de MCPyV soit intégré au génome des cellules tumorales et que celles-ci expriment l'oncoprotéine majeure, l'antigène grand T, suggèrent que MCPyV serait l'agent étiologique du MCC.

Nous avons étudié les caractéristiques moléculaires de l'ADN de MCPyV présent dans des échantillons de MCC mais également dans des prélèvements respiratoires, urinaires et sanguins de 33 sujets atteints de la maladie.

Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques de PCR quantitative, de séquençage et de détection de séquences virales intégrés.

Nous avons analysé les liens potentiels existant entre la charge virale dans les tumeurs primitives ou la présence d'ADN viral sanguin d'une part et le pronostic de la maladie d'autre part. Nous avons interprété les résultats à la lumière des signatures moléculaires que nous avons observé dans les différents échantillons.

Nous avons observé que les sujets dont la charge virale tumorale était supérieure ou égale à une copie par cellule avaient une survie sans récurrence plus longue par rapport aux cas avec une charge virale tumorale inférieure à une copie par cellule (34 mois versus 10 mois, $p = 0,037$). D'autre part, de l'ADN viral était plus fréquemment décelé dans le sang des sujets prélevés pendant la phase active de la maladie par rapport aux sujets prélevés en rémission complète (60 % versus 11%, $p = 0,00083$). Enfin, la présence d'ADN viral dans au moins un prélèvement sanguin durant le suivi était associée à un pronostic péjoratif avec un délai de survie raccourci ($p = 0,003$).

Nous avons analysé de manière comparative des séquences d'ADN viral présent dans les échantillons tumoraux et non tumoraux. Cela nous a permis de définir des polymorphismes communs aux deux types d'échantillons d'un même cas et définissant des souches spécifiques chez 8 sujets. Néanmoins, l'ADN présent dans les tumeurs présentait des modifications additionnelles et notamment des mutations résultant en la production d'une forme tronquée de l'oncoprotéine virale majeure que nous avons caractérisées dans 8/12 cas. Ces mutations tronquantes n'étaient pas présentes dans les séquences provenant des échantillons respiratoires et urinaires de 15 cas.

Nous avons identifié de nouveaux locus chromosomiques d'intégration du génome viral dans les MCC de 4 cas.

Enfin, nous avons mis en évidence de l'ADN de MCPyV muté et intégré dans le sang de 2 sujets présentant un stade métastatique de la maladie, suggérant que l'ADNémie témoignait de la présence de métastases circulantes.

En conclusion, nos travaux suggèrent que les caractéristiques moléculaires de l'ADN de MCPyV présent dans les MCC et le sang des sujets atteint de la pathologie pourraient constituer des outils potentiels d'évaluation du pronostic de la maladie.

Distinct Merkel Cell Polyomavirus Molecular Features in Tumour and Non Tumour Specimens from Patients with Merkel Cell Carcinoma

Hélène C. Laude^{1,2}, Barbara Jonchère¹, Eve Maubec³, Agnès Carlotti⁴, Eduardo Marinho⁵, Benoit Couturaud⁶, Martine Peter⁷, Xavier Sastre-Garau⁷, Marie-Françoise Avril^{1,8}, Nicolas Dupin^{1,8}, Flore Rozenberg^{1,2*}

1 Université Paris Descartes, EA1833, Paris, France, **2** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service de Virologie, Paris, France, **3** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Dermatologie, Paris, France, **4** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service d'Anatomopathologie, Paris, France, **5** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service d'Anatomopathologie, Paris, France, **6** Institut Curie, Service de Chirurgie, Paris, France, **7** Institut Curie, Laboratoire d'Anatomopathologie, Paris, France, **8** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service de Dermatologie, Paris, France

Abstract

Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) is associated with Merkel Cell carcinoma (MCC), a rare, aggressive skin cancer with neuroendocrine features. The causal role of MCPyV is highly suggested by monoclonal integration of its genome and expression of the viral large T (LT) antigen in MCC cells. We investigated and characterized MCPyV molecular features in MCC, respiratory, urine and blood samples from 33 patients by quantitative PCR, sequencing and detection of integrated viral DNA. We examined associations between either MCPyV viral load in primary MCC or MCPyV DNAemia and survival. Results were interpreted with respect to the viral molecular signature in each compartment. Patients with MCC containing more than 1 viral genome copy per cell had a longer period in complete remission than patients with less than 1 copy per cell (34 vs 10 months, $P=0.037$). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) contained MCPyV more frequently in patients sampled with disease than in patients in complete remission (60% vs 11%, $P=0.00083$). Moreover, the detection of MCPyV in at least one PBMC sample during follow-up was associated with a shorter overall survival ($P=0.003$). Sequencing of viral DNA from MCC and non MCC samples characterized common single nucleotide polymorphisms defining 8 patient specific strains. However, specific molecular signatures truncating MCPyV LT were observed in 8/12 MCC cases but not in respiratory and urinary samples from 15 patients. New integration sites were identified in 4 MCC cases. Finally, mutated-integrated forms of MCPyV were detected in PBMC of two patients with disseminated MCC disease, indicating circulation of metastatic cells. We conclude that MCPyV molecular features in primary MCC tumour and PBMC may help to predict the course of the disease.

Citation: Laude HC, Jonchère B, Maubec E, Carlotti A, Marinho E, et al. (2010) Distinct Merkel Cell Polyomavirus Molecular Features in Tumour and Non Tumour Specimens from Patients with Merkel Cell Carcinoma. *PLoS Pathog* 6(8): e1001076. doi:10.1371/journal.ppat.1001076

Editor: Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center, United States of America

Received: May 19, 2010; **Accepted:** July 27, 2010; **Published:** August 26, 2010

Copyright: © 2010 Laude et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors received no specific funding for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: flore.rozenberg@svp.aphp.fr

Introduction

Polyomaviruses are small, non enveloped double stranded DNA viruses which infect many species with a restricted host range. The initial discovery of Murine polyomavirus (MPyV) and Simian vacuolating 40 (SV40) was closely linked to the demonstration of their experimental tumorigenic properties [1]. Infections by the human polyomaviruses BK (BKPyV), JC (JCPyV), and the recently identified KI (KIPyV) and WU (WUPyV) are highly prevalent in most populations [2,3]. Polyomaviruses persist latently in the host and may reactivate, causing disease in the immunocompromised [4,5], but have not been firmly associated with cancer in humans [6]. Therefore, the discovery in a rare but aggressive skin cancer, Merkel Cell Carcinoma (MCC), of a fifth human Polyomavirus, named Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) has raised new interest in the oncogenic potential of human Polyomaviruses [7]. MCPyV DNA was shown to be monoclonally integrated into most MCC, and tumour cells were found to express

the major viral oncoprotein, large T antigen (LT) [8]. Remarkably, MCPyV present in MCC tissue exhibited a molecular signature, consisting of mutations which truncate LT and suppress its helicase domain required for viral replication [9]. These features are similar to molecular defects observed in MPyV [10] and bring strong evidence for a causative role of the virus in MCC.

MCC is a carcinoma of neuroendocrine cells which affects principally elderly and immunocompromised patients. The close association between MCPyV and MCC has been confirmed in several case series worldwide [11,12,13,14,15,16,17,18,19,20, 21,22]. However, MCPyV has been detected in normal skin [23], benign skin lesions [24] and non MCC skin cancer [25], and also found in various tissues such as the oral cavity [26], gastrointestinal and urogenital tracts [23], tonsils [27], respiratory tract [28], blood [9], and rarely in non skin cancers [19,25,29,30]. Seroepidemiologic studies have revealed that most healthy individuals are infected with MCPyV, as with other human Polyomaviruses [31,32,33,34,35]. Therefore, numerous questions

Author Summary

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is a recently discovered virus highly associated with a rare skin cancer, Merkel cell carcinoma (MCC). The causal role of MCPyV in cancer is suggested by integration of viral sequences into the cell genome and by a specific molecular signature. We looked for and compared molecular species of MCPyV in tumour and non tumour samples of 33 MCC patients. We showed that a tumour viral load greater than 1 copy per cell was associated with a better outcome, and that detection of the virus in blood but not in urine correlated with a shorter overall survival. A tumour-specific molecular signature was found in the blood of two patients with metastatic disease, but did not occur in their respiratory nor urine samples. We propose that molecular analysis of MCPyV in tumour and blood be used as a biomarker of infection and cancer progression in MCC patients.

related to the persistence and replication of the virus in the host and mechanisms of oncogenesis remain unanswered. We investigated whether MCC patients' clinical data were related to the presence of MCPyV and specific molecular features in tumour and non tumour tissues. In a cohort of 33 MCC patients, we collected MCC and non MCC samples, and compared the frequencies of MCPyV DNA detection, viral load and nucleotide sequences. We looked for integration of MCPyV in MCC cells and for the presence of integrated/mutated forms of MCPyV in non tumour samples.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. According to French regulation, information was delivered to the patients on research performed on biological samples, and written informed consent was obtained for participation in the study, which was approved by the institutional review board of the Comité de protection des personnes Ile de France 3.

Patients and samples

All patients with Merkel cell carcinoma who attended the Dermatology Departments of Cochin and Bichat hospitals from March 2008 to April 2010 were prospectively included in the study. Histopathologic confirmation of MCC diagnosis relied on tumour morphology consistent with MCC on hematoxylin-eosin-stained tissue sections, paranuclear dot immunostaining pattern for CK20 or positive immunostaining for synaptophysin and chromogranin A. Clinical data were retrieved from hospital case records, and included sex, age at diagnosis, site and size of primary MCC, and stage of the disease at diagnosis, according to Allen's classification [36] based on primary tumour diameter (<2 cm = I, >2 cm = II) and the presence of metastasis (regional lymph node metastasis = III, distant = IV). Samples from primary and/or metastatic MCC lesions were recovered and included retrospectively retrieved formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections and/or fresh-frozen specimens for patients newly diagnosed or who relapsed. FFPE sections from non MCC cancer tissue were retrieved if possible. In addition, blood and/or nasal swab and/or urine were sampled in patients at inclusion and follow-up visits when possible, and disease stage and status were recorded. Status was defined according to the presence or absence of tumour (primary and/or metastatic) as alive with disease (AWD) or in complete remission (CR) respectively. Date and cause of death were recorded.

Detection and quantification of MCPyV sequences in MCC and non MCC samples

For FFPE samples, two consecutive 10 μ -thick sections were retrieved. Frozen fragments were cut and mechanically dissociated. DNA was extracted using the QIAmp DNA tissue extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions. Nasal swabs discharged in 200 μ l sterile saline buffer and urine were immediately frozen and kept at -20°C until analysis. PBMC were obtained by Ficollpaque centrifugation (Eurobio) of 3 mL EDTA blood, suspended in 200 μ l of PBS, immediately frozen and kept at -20°C until analysis. DNA was extracted using the QIAmp blood DNA extraction kit (Qiagen). For tissue material, lysis was extended to 24 h. DNA was eluted in 200 μ l elution buffer (Macherey), and concentration was measured by UV-spectrometry (NanoDrop Technology, Wilmington).

To detect MCPyV sequences, a sensitive real time PCR assay was designed using primers which encompass a 91 bp fragment of the LT oncoprotein gene, located upstream of the Rb-binding encoding sequence (Table S1) [7]. Amplification was performed on 100 ng DNA with 300 nM each primer and 100 nM probe in 50 μ l Taqman Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf). After a 10 min denaturation step at 95°C , cycling conditions consisted of 50 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C on an ABI 7500 platform (Applied Biosystems). To check for carryover between the samples, mock samples were included in each series. Confirmation LT3 and VP1 PCR assays were performed as described [7]. Absolute quantification of MCPyV viral load in patients' samples was obtained by establishing a calibration curve with ten-fold serial dilutions (from 10^7 to 10^0 copies) of known concentrations of plasmid MCCIC13 which contains 1 copy of the MCPyV genome inserted in the pCR-XL-TOPO vector [18]. To quantify MCPyV DNA in copy number per cell in MCC and non MCC cancer samples, the housekeeping apolipoprotein B gene (hapb) [37] was amplified by real time PCR and the delta-delta Ct method was used.

Detection of BKPyV and JCPyV sequences

To detect BKPyV and JCPyV sequences, real time PCR assays were designed to amplify a 79 and a 110 bp fragment of the LT antigen coding sequence in BKPyV and JCPyV genome respectively (Table S1). Amplification was performed using the same cycling and control conditions as above.

Analysis of MCPyV integration site

To characterize integration of MCPyV, we used the DIPS-PCR technique which amplifies junctions between the host and MCPyV genomes as previously described [18,38]. Briefly, DNA extracted from MCC tumours was digested overnight with Taq I (Invitrogen), an enzyme that does not cleave the MCPV350 sequence (GenBank accession number EU375803), and ligated to adapters. Ligated fragments were subjected to 40 cycles of linear amplification with forward primers sequentially designed along the MCPyV LT gene (Table S1), followed by a 30 cycle exponential amplification using internal primers coupled to a reverse adapter-specific primer. PCR products were visualized and cut from agarose gel, purified with QIAamp gel extraction kit (Qiagen), and directly sequenced using Big-Dye terminator DNA-Sequencing technology (Applied Biosystems).

PCR detection of integrated and non integrated MCPyV genome

To discriminate integrated versus non integrated forms of the MCPyV genome in patients' samples, we amplified short fragments bracketing each of the characterized integration sites. DNA (100 ng) was subjected to PCR using a forward MCPyV-

specific primer located 100 to 300 bp upstream of the integration site, and a reverse downstream primer, specific either to the human integration locus or to the MCPyV non-integrated genome (Table S1). PCR was performed in 50 µl Ampli Taq Gold Master Mix (Applied Biosystems) for 50 cycles with conditions specific to each primer set.

Sequencing

Overlapping fragments of the MCPyV LT encoding gene were amplified using four primer pairs in order to cover the whole second exon of LT (base pair number 861 to 3080 according to the MCV 350 genome (Table S1). PCR was performed on 100 ng DNA by using HotStartTaq Master Mix kit (Qiagen) containing 0.5 µM primers in a final volume of 50 µL. PCR products were then directly sequenced as above.

Statistical methods

The cumulative rates of survival in complete remission relative to MCPyV load in primary MCC (<1 or ≥ 1 copy per cell), and overall survival relative to the presence or absence of MCPyV DNA in PBMC were estimated by the Kaplan-Meier method. Patients with follow-up under 3 months were excluded from analysis. Survival in complete remission was calculated from the date of diagnosis to the date of first tumour recurrence in patients AWD or died of disease (DOD) at last follow-up. Patients in complete remission were censored at their last follow-up visit. Analyses were performed using the XLStat software (Addinsoft, Paris, France). Multivariable analysis of survival in complete remission was done by using a stepwise Cox proportional hazards model that used forward covariate entry to the model. The proportions of patients either CR or AWD, or at stages I or II or III versus IV who had either a MCPyV negative or MCPyV positive PBMC sample were compared using the exact Fischer test. All *P* values were two-sided, and *P* values less than .05 were considered statistically significant.

Results

Clinical findings

Thirty nine patients with MCC attended the Dermatology Departments of Bichat and Cochin hospitals. Six patients without retrieved MCC material were excluded from the study. The remaining 33 patients included 14 males and 19 females (sex ratio = 0.6). Their median age at diagnosis was 77 years (range 39–88). Four patients were immunocompromised, because of corticoid therapy for rheumatoid arthritis, hepatic transplantation, lymphopenia and recurring hairy cell leukaemia. Thirteen (39%) patients had a history of cancer other than MCC (non MCC skin cancer and/or non skin cancer) (Table S2). Primary MCC was localized to the limbs, head, and trunk in 21 (64%), 11 (33%) and 1 (3%) cases respectively. MCC median diameter was 25 mm (range 7–70 mm). At diagnosis, patients were at Allen's stages I, II, III and IV in 9 (27%), 16 (48%), 7 (21%) and 1 (3%) cases respectively [36]. The median delays from diagnosis until inclusion and last follow-up were 7 months (up to 112 months) and 16 months (up to 134 months) respectively. At last follow-up, 18 (54%) patients were in CR, 8 (24%) patients were AWD and 7 (21%) patients had died of disease (DOD) (Table 1).

MCPyV DNA viral load in MCC samples and outcome

We analyzed 43 MCC samples consisting of 26 primary MCC (15 fresh-frozen and 11 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens), 14 skin metastasis (12 fresh-frozen and 2 FFPE specimens) and 3 fresh-frozen regional lymph node metastasis

samples. Viral DNA was detected in 41/43 samples from 31/33 patients, with a median viral load quantified in 37 samples of 3 copies per cell (range 3.10^{-3} to 3.10^3). Negative results observed in one FFPE section and one fresh frozen sample from primary MCC were confirmed using the previously described LT3 and VP1 PCR assays [7]. In twenty four patients with follow up greater than three months, viral load in the primary tumour was analyzed with respect to survival. Median survival in complete remission was longer in patients who had ≥ 1 copy per cell ($n = 15$), than in patients who had no detectable viral DNA ($n = 2$) or <1 copy per cell ($n = 7$) (34 months, 95% CI = 26 to 42 vs 10 months, 95% CI = 7 to 14, Kaplan Meier log-rank $P = 0.037$) (Figure 1). Among clinical parameters analyzed (sex, age, limb site and size of primary tumour, and presence or absence of lymph node metastases at diagnosis), which didn't differ in the two groups, only female sex was associated with a better outcome. Adjusted for sex, the relative hazard for survival in complete remission was 4.8 (95% confidence interval 0.90–26, $P = 0.066$) with primary tumour containing more than 1 copy per cell.

MCPyV DNA in non tumour samples of MCC patients, disease stage and outcome

We then asked if, in MCC patients, MCPyV was restricted to MCC tissue. Viral DNA was detected in 27/28 (96%) nasal swabs from 21/21 patients, with a median load of 3.10^3 copies per sample (range $5-2.10^5$). MCPyV DNA was also found in 22/38 (58%) urine samples from 18/28 (64%) MCC patients, with a median load of 6.10^2 copies/ml (range $100-4.10^5$). In addition, MCPyV was amplified from 20/49 (41%) PBMC samples from 15/30 (50%) patients with a median load of 10^2 copies per ml whole blood (range $10-5.10^4$). MCPyV DNA was detected in 1/6 FFPE non MCC cancer samples from 5 patients (Table S2). We wondered whether the high rate of detection of MCPyV was common to other human Polyomaviruses. BKPyV and JCPyV DNA were amplified from 9% each of nasal swabs, 31% and 7% of urine samples, and 3% and 6% of PBMC respectively.

Since MCPyV DNA was detected infrequently in urine and in the PBMC of about half of the patients, we asked whether MCPyV DNAuria and/or DNAemia were linked to the stage and/or evolution of the disease. No correlation between MCPyV detection in urine was found with any of these parameters. In contrast, detection of MCPyV in PBMC was more frequent in patients sampled alive with disease (AWD) than in patients in complete remission (CR) (18/30 or 60% versus 2/19 or 11%, $P = 0.00083$). Moreover, among AWD patients, MCPyV tended to be more frequently detected in patients with distant metastasis than at less advanced stages of the disease (6/6 MCPyV positive PBMC when sampled at stage IV versus 12/24 or 50% when sampled at stages I, II or III, $P = 0.057$). In twenty eight patients with follow up greater than three months, the detection of MCPyV in PBMC was associated with poorer outcome, since patients with at least one positive sample had a median survival of 28 months (95% IC = 19 to 36) whereas all patients with no detectable MCPyV survived after a median follow-up of 71 months (Kaplan Meier log-rank $P = 0.003$) (Figure 2). All clinical parameters analyzed were comparable in the PBMC-positive and PBMC-negative groups except sex, since significantly more male patients had MCPyV-positive PBMC ($P < 0.009$). Among these parameters, only primary tumour size above 2 cm was associated with higher risk of death. We then looked at PBMC results according to viral load in primary MCC. Among 15 patients with ≥ 1 copy per cell, 4/4 patients who relapsed had positive PBMC, compared with 3/11 disease-free patients. Among 9 patients with <1 copy per cell, 8 had a PBMC sample tested. Two of four patients who relapsed

Table 1. Clinical data of MCC patients.

Case	Sex/Age ^a	Primary MCC data			Inclusion visit			Last follow-up visit		
		Size (mm)	Site	Stage ^b	Delay ^c	Status ^d	Stage ^b	Delay ^c	Status ^d	Stage ^b
1	F/74	40	Thigh	II	10	AWD	III	16	DOD	IV
2 ^e	M/81	10	Ankle	III	30	AWD	III	47	AWD	III
3 ^e	M/78	22	Wrist	II	15	AWD	IV	33	DOD	IV
4	F/73	55	Cheek	III	1	AWD	III	6	CR	III
5	F/61	7	Cheek	I	25	CR	I	26	CR	I
6	M/88	25	Leg	II	0	AWD	II	0	AWD	II
7 ^e	M/84	45	Ear	II	3	AWD	IV	4	DOD	IV
8	F/67	10	Cheek	I	7	CR	I	9	CR	I
9 ^f	M/82	10	Mandible	I	1	CR	I	8	AWD	III
10	F/82	21	Leg	III	23	CR	III	29	CR	III
11	F/77	10	Wrist	I	0	CR	I	0	AWD	I
12	M/55	50	Forearm	III	5	AWD	III	6	AWD	III
13	M/71	30	Arm	III	24	CR	III	24	CR	IV
14 ^{e,f}	M/63	15	Nipple	III	0	AWD	III	31	CR	III
15	F/86	20	Leg	IV	1	AWD	IV	8	AWD	IV
16 ^f	F/77	25	Knee	II	7	AWD	IV	9	DOD	IV
17	F/65	8	Arm	I	1	AWD	I	4	CR	I
18	M/68	20	Thigh	II	41	AWD	IV	41	DOD	IV
19	F/66	30	Thigh	II	48	CR	II	71	CR	II
20	F/85	25	Cheek	II	1	AWD	II	23	CR	II
21	M/60	70	Arm	III	4	AWD	III	5	CR	III
22	F/81	10	Cheek	I	35	CR	I	41	CR	I
23 ^e	M/85	40	Buttock	II	21	AWD	IV	21	DOD	IV
24	F/71	30	Cheek	II	37	CR	II	37	CR	II
25	F/63	10	Cheek	I	0	CR	I	16	CR	II
26	F/39	30	Arm	II	112	CR	II	134	CR	III
27	F/81	15	Thigh	I	34	CR	I	53	CR	I
28	F/58	30	Leg	II	1	AWD	II	10	CR	II
29	F/77	18	Ear	I	1	AWD	I	10	CR	I
30	M/80	40	Vertex	II	1	CR	II	15	AWD	III
31 ^{e,f}	M/84	27	Thigh	II	14	AWD	IV	17	DOD	IV
32	M/60	45	Arm	II	13	AWD	III	19	AWD	IV
33	F/81	30	Arm	II	1	AWD	II	3	CR	II

^aAge at diagnosis.^bDisease stage according to Allen's classification.^cDelay in months from MCC diagnosis.^dDisease status relative to presence (alive with disease or AWD) or absence (complete remission or CR) of tumour and death (died of disease or DOD).^ePatients partly previously reported [18].^fImmunocompromised patients.

doi:10.1371/journal.ppat.1001076.t001

tested positive while two with MCPyV-negative tumours tested negative. The four patients who were disease free at last follow-up had negative PBMC.

MCPyV integration in MCC samples

Using the DIPS-PCR method, we demonstrated the integration of MCPyV DNA in six MCC cases. We first confirmed viral integration in metastatic tissue from two patients, and found virus-host genome junctions identical to those previously reported in their primary tumours [18]. In three new cases, integration of MCPyV was found to interrupt the second exon

of LT downstream from the Rb binding coding sequence, whereas it interrupted the 3' end of the VP1 gene in another one. Integration was located on four distinct chromosomal loci, next to or into known human genes (Table 2). Two of them, PARVA and DENND1A genes, encode proteins involved in cell junctions and in formation of clathrin coated vesicles or cell adhesion and cytoskeleton organization respectively. A third gene, TEAD1, encodes a transcriptional activator reported to be used by the SV40 enhancer to activate expression of the early T oncoprotein gene [39]. Finally, in one case, integration resulted in fusion of the MCPyV LT gene and successive

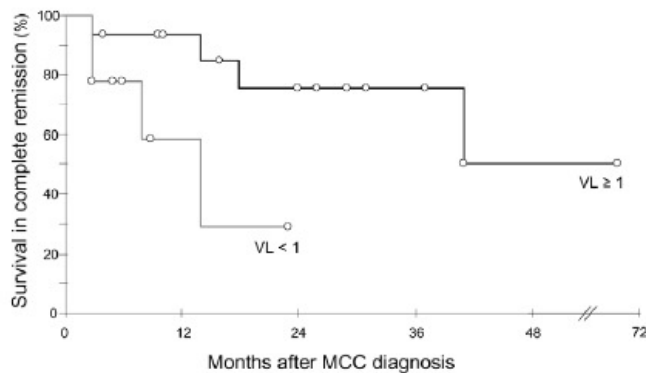


Figure 1. Kaplan Meier analysis of survival in complete remission relative to primary tumour MCPyV load. Patients with ≥ 1 genome copy per cell ($n = 15$, black curve) had longer survival in complete remission than patients with < 1 genome copy per cell ($n = 9$, grey curve). VL : viral load. Open circles indicate patients censored at last follow-up visit. doi:10.1371/journal.ppat.1001076.g001

truncated fragments of the seventh and the tenth introns of the GMD5 gene, two regions separated by approximately 200 kb in the human genome, demonstrating that large rearrangements occurred.

Single nucleotide polymorphisms define patients' strains

We sequenced the whole second exon of LT gene in MCC and non MCC tissues. Fifty-two sequences from 26 patients displayed $>99\%$ homology with prototypes MCC350, MCC339, MKL-1 and TKS published sequences [7,9]. To characterize strain-specific and/or tumour-specific markers, a local consensus reference was constructed by alignment of all sequences, and variations were indicated as silent, non synonymous or stop mutations, deletions or insertions. The total number of silent and non synonymous mutations in MCC and non MCC samples with respect to the consensus differed by three and sixteen fold respectively. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) characterized strain specific signatures in eight patients, and a common single silent mutation was identified in three other patients (Figure 3A).

MCC molecular signature differentiates tumour and non tumour samples

Fourteen MCC sequences (13 complete and 1 partial) were obtained from 12 patients. In two patients, we verified that sequences from distinct metastasis exhibited 100% homology. Mutations which truncate LT were characterized in nine cases, consisting in stop mutations (5 cases), or deletions causing frameshifts which generate stop codons (3 cases) (Figure 3A). In the remaining case, a 250 bp insertion of the third intron of the DENND1A gene was lying inside LT, upstream the VP1-host genome junction identified in the second intron of the same human gene. Overall, mutations preserved the Rb fixation domain but inactivated the helicase domain of the oncoprotein (Figure 3B). In one additional patient, we failed to amplify the 3' end 600 last bp of LT, despite a high viral load and repeated attempts using different sets of primers, suggesting a truncation of this sequence. Finally, in the last two cases, full length sequences were obtained and encoded a non truncated protein. Interestingly, in 5 MCC cases where the DIPS-PCR characterized integrated-truncated LT, a complete LT sequence was amplified downstream the

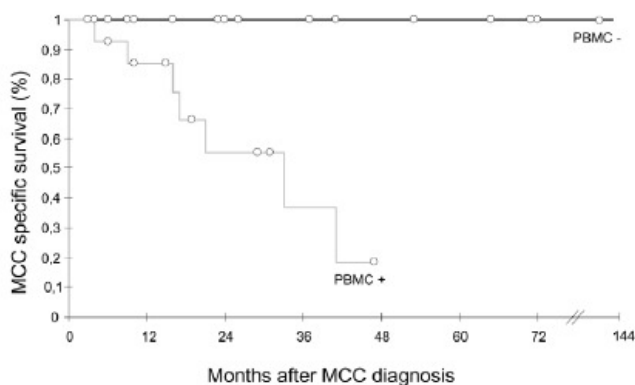


Figure 2. Kaplan Meier analysis of overall survival relative to MCPyV detection in PBMC. Patients who had all MCPyV-negative PBMC ($n = 14$, black curve) had a longer survival than patients who had at least one MCPyV-positive PBMC ($n = 14$, grey curve). Open circles indicate patients censored at last follow-up visit. doi:10.1371/journal.ppat.1001076.g002

Table 2. Identification of four novel integration sites of MCPyV DNA in MCC genome.

Case	MCPyV 3' breakpoints ^a	Chromosome insertion site	Putative target human gene	
			Gene	Distance
4	2166 (LT)	15q14	ATP binding domain 4 isoform 2 (ATPBD4) Hypothetical protein XP_002343377 (mRNA similar to cytochrome c oxidase, subunit VIc)	353 kbp (5') 672 kbp (3')
16	3337 (VP1)	9q33	DENN/MADD domain containing 1A isoform 1 (DENND1A) mir601	2nd intron 600 bp (3')
20	2981 (LT)	11p15	Parvin alpha (PARVA) TEA domain family member 1 (TEAD1) or SV40 transcriptional enhancer factor	8 kbp (5') 228 kbp (3')
29	2594 (LT)	6p24	GDP-mannose 4,6 dehydratase (GMDS)	7th/10th introns

^a3' virus-host junction was characterized by DIPS PCR.

^bBase-pair designations correspond to the prototype MCV 350 (accession number NC_010277). LT = Large T, VP1 = Major viral capsid.

doi:10.1371/journal.ppat.1001076.t002

truncation site, suggesting the coexistence of integrated concatamers or latent episomes of the MCPyV genome and truncated-integrated viral sequences.

Then, we analyzed 16 nasal and 8 urine sequences. All sequences were complete except three obtained from weak positive samples,

probably reflecting sensitivity limits of the method used rather than truncations. Two sequential nasal sequences from the same case showed 100% homology. All full-length sequences were wild-type. None of the 9 non MCC samples from 7 patients who displayed a truncated LT in MCC harboured the tumour-specific molecular

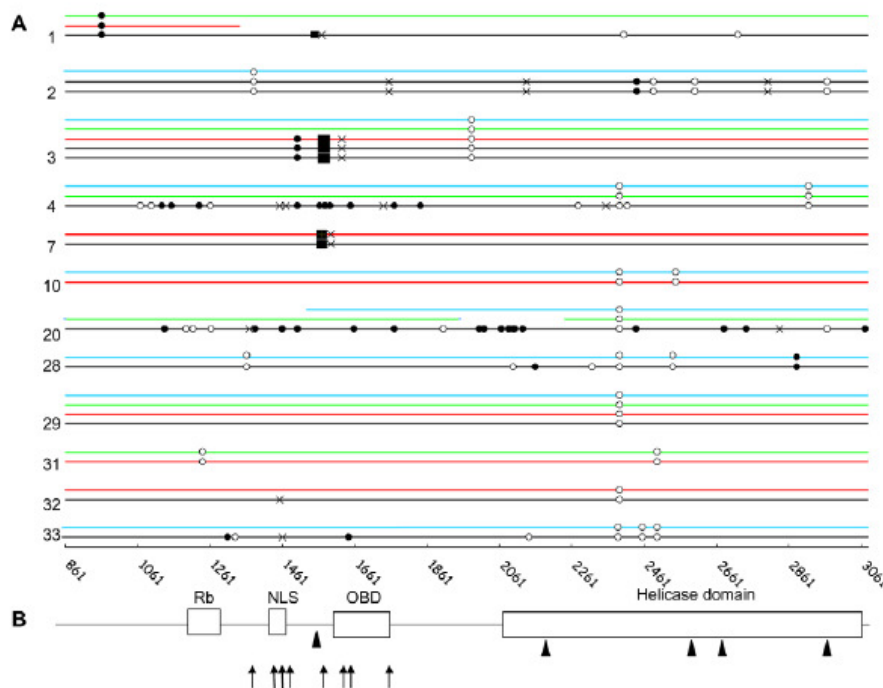


Figure 3. Characterization of MCC patients' strain and tumour signature in MCPyV LT. **A.** Direct PCR sequencing of the second exon of MCPyV LT in MCC tumours. Twelve distinct representative cases (case number indicated on the left) are represented. Sequences from MCC (black), nasal swab (blue), urine (green) and PBMC (red) tissues reveal single nucleotide polymorphisms (SNPs), and tumour-specific mutations: open circle, synonymous; filled circle, non-synonymous; black cross, premature stop codon; filled box, deletions. In cases 1 and 20, weak viral load in PBMC and nasal swab respectively prevented full length amplification of LT. Base pair designation as in Table 2. **B.** Diagram representation of main functional domains encoded by the second exon of LT (Rb = Rb binding domain, NLS = nuclear localization signal, OBD = origin binding domain and helicase domain). Arrows indicate premature truncating mutations determined by direct sequencing and arrowheads indicate the site of integrated viral DNA determined by 3' DIPS-PCR. GenBank accession number: HM587427-HM587448. doi:10.1371/journal.ppat.1001076.g003

signature (Figure 1A). These results suggest that nasal swabs or urine are likely to contain MCPyV DNA from either excreted or episomal virus.

PBMC sequences were obtained in 14 cases, including partial sequences obtained from 7 weak positive samples. Complete PBMC and MCC sequences from 4 patients were compared (Figure 1A). In one case, both PBMC and MCC sequences encoded intact LT antigen open reading frame (ORF). In another case, the premature stop codon observed in MCC LT was absent from MCPyV recovered from PBMC. In contrast, in two other cases, the specific MCC signatures (a 5 and a 25 bp deletion respectively) were recovered from the two patients' PBMC samples. Notably, in one of these patients, sequences from nasal swabs and urine were also analyzed and didn't harbour the tumour signature. Since the two patients presented disseminated metastatic lesions at the time of sampling and were both DOD at the end of the study, we assume that the presence of mutated MCPyV DNA in PBMC reflected circulation of metastatic MCC cells. To further confirm this last hypothesis, we amplified a portion of the LT gene bracketing the predicted integration site and the viral-host junction sequence in tumour and non tumour samples of five patients. Virus-host junction sequences were amplified from MCC tissue in all cases, from PBMC in two cases, but from neither urine nor nasal swabs. Both integrated and non integrated products were amplified from MCC samples, further suggesting the coexistence of integrated-truncated viral sequences and integrated concatemers or episomes in MCC samples. Altogether, these results suggest that MCPyV sequences recovered at peripheral urine and respiratory sites merely correspond to free excreted virus or episomal DNA, whereas the presence in the patients' PBMC of tumour-like sequences argued for the presence of circulating tumour cells.

Discussion

Since the discovery by Feng et al who identified MCPyV in 6/8 MCC [7], several large studies have demonstrated that MCPyV is associated with most cases of MCC except in Australia [11,12,13,17,19,22,24,26,33]. We detected MCPyV in MCC from 31/33 patients. Negative results from FFPE specimens could be due to poor conservation of DNA. Only one fresh frozen tumour tested negative. We estimated MCC median viral load at 3 copies per cell, with a 6 log variation between samples, consistent with other reports [13,18,22,40,41,42,43]. Variations may be due to tissue quality, the proportion of non tumour cells in samples, or mutations in the target viral sequence. However, variations in rates of LT expressing MCC cells were also reported [8,43]. The fact that some MCC cases do not contain MCPyV DNA nor express LT suggests that MCC is a heterogeneous disease with at least two etiologies, despite a lack of phenotypic markers able to distinguish between MCPyV positive and MCPyV negative cases [8,44]. Interestingly, patients with MCC containing at least 1 copy of viral genome per cell had better outcome than patients with lower values of MCPyV. Although the low number of patients studied impairs definite conclusions, it is striking that two previous studies also reported poorer survival rate in patients with the lowest viral DNA load and LT expression in MCC [22,40]. Although the mechanisms of MCC pathogenesis are unknown, variations in MCPyV load and in patients outcome further argue for heterogeneity and variable implication of the virus in the disease [11,12,16,21,45], as previously described in HPV related and unrelated carcinoma [46]. Several observations support the causal role of MCPyV in most MCC. In particular, cell transformation by MCPyV was shown to depend on LT, as in other

polyomaviruses-induced oncogenesis [1]. First, MCPyV LT is able to bind and sequester the tumor-suppressor protein Rb through a conserved LxCxE motif [9]. Second, the transformed phenotype of MCPyV-positive MCC cell lines depends on LT expression, since cells undergo growth arrest and/or death upon LT silencing [47]. However, in two models of adenovirus and polyomavirus-induced oncogenesis, the dependence of transformed cells on viral oncoproteins was reversed upon time, since cells conserved an oncogenic phenotype while viral expression was shut-down in one case and viral sequences were lost in the other [48,49]. These findings suggest that transformed cells acquire subsequent genetic alterations which circumvent their need for a continued expression of viral oncoproteins. Therefore, more cellular genetic alterations may be necessary in virus-unrelated than in virus-related oncogenesis. In this respect, the number of chromosomal alterations and amplifications was significantly higher in HPV-unrelated than in HPV-related carcinomas, and correlated with unfavourable prognosis [46]. Recurrent genomic changes have been described in MCC [16,18], but their link with MCPyV has not yet been extensively investigated.

Monoclonal integration of MCPyV is viewed as a key element in oncogenesis. We identified in metastatic lesions from two patients the same virus-host genome integration characteristics previously described in their primary tumours, sustaining the hypothesis that viral integration constitutes an early event in MCC oncogenesis [7,18]. We also showed the integration of truncated LT in four cases, and in one of these this led to a complex rearrangement between LT, VP1 and the target human gene. All chromosomal integration sites identified so far differ from each other [7,18]. We are currently verifying whether expression of putative target human genes, located in the vicinity or at the site of integration, is modified in tumour cells, notably TEAD1 which was reported to be used by another Polyomavirus, SV40, as a transcriptional enhancer factor. In addition, MCC LT sequences revealed various point or frameshift mutations which preserve the Rb binding domain but truncate the oncoprotein before the helicase domain, as in the tumour-specific molecular signatures previously described [9,50]. Such truncations preserve the transformation ability of LT through Rb sequestration, but prevent viral DNA replication. A similar loss of full-length LT has been observed *in vitro* and *in vivo* in models of SV40 and MPyV-induced carcinogenesis [51,52]. In addition, replication-defective polyomaviruses with loss of LT binding to the origin of replication showed enhanced transforming properties [53]. Our results extend previous observations and reinforce the hypothesis that acquisition of mutations within LT is a common feature and may be a prerequisite for carcinogenesis induced by polyomaviruses. However, in three cases of this series and in two previously reported cases, mutations truncated LT upstream an identified nuclear localization signal, which could prevent nuclear expression of the protein [9]. Lastly, mutations in LT were not observed in all cases in this nor in other studies [43,54]. We can't exclude that these cases display mutations at other sites critical for MCPyV replication. A point mutation in a pentanucleotide sequence of the replication origin was observed in a MCC strain and prevented replication [55]. Finally, the fact that the full length second exon of LT was sequenced in five MCC samples although integration interrupted LT suggests that, as previously observed with Southern Blot analysis [9], truncated/integrated and probably whole genomic copies of MCPyV coexist in tumour cells, as confirmed by PCR assay which discriminates integrated versus non integrated MCPyV genomes.

The lifecycle of MCPyV in the host is unknown. Serological studies showed that infection is common in the general population

and occurs before the third decade [33], long before development of MCC. Routes of transmission and sites of excretion are not completely known. We showed presence of MCPyV in the respiratory tract of most MCC patients, in serial samples drawn at a several-month interval, in contrasts with low detection rate (below 17%) in non MCC patients reported in the literature and observed with our own detection method (data not shown) [4,27,28,50,56,57,58]. MCPyV DNA excretion in urine, which was previously reported in one MCC case [59], was observed in almost half of patients, above rates (below 25%) reported in control subjects [23,26]. Comparative LT sequencing from MCC and non MCC samples revealed strain-specific SNPs. Whereas most MCC sequences displayed tumour-specific molecular signatures, all nasal swabs and urine sequences were wild-type, suggesting that the latter correspond to excreted or episomal virus, whereas the former belong to integrated genomes. Thus, high rates of MCPyV excretion both in the respiratory tract and urine may be a hallmark of MCC patients. Urine excretion of BKPyV or JCPyV is frequent in immune competent subjects and increases with age, during pregnancy or immune suppression [60,61]. Since excretion rates of BKPyV and JCPyV were comparable in MCC patients to rates of non MCC patients [61,62], we hypothesize that patients present a specific failure to control latency of MCPyV but not all Polyomaviruses. This hypothesis is supported by the fact that high levels of antibodies directed towards the major viral capsid protein VP1 of MCPyV but not other human Polyomaviruses were more frequently observed in MCC patients than in the general population [31,34]. Indeed, in the case of BKPyV and JCPyV infection, reactivation and active shedding were positively correlated with serum antibody responses to VP1 [63,64].

Lastly, our results show evidence of high rates of MCPyV DNA in MCC patients' PBMC, in contrast with low rates (0–8%) reported in the serum, whole blood or PBMC of non MCC subjects [17,19,27,29,50]. Moreover, MCPyV DNA detection in PBMC was significantly correlated with the disease stage and outcome since patients with at least one PBMC positive sample had shorter survival in remission than patients in whom MCPyV had not been detected in any PBMC sample. In one patient, MCPyV recovered from PBMC had a wild-type genotype whereas the viral genome recovered from MCC had a LT truncating mutation. We hypothesize that MCPyV DNAemia may correspond to active viral replication following reactivation, as observed with other human polyomaviruses [2,61]. Indeed, MCPyV DNA

detection was reported in activated circulating monocytes of one MCC patient and one control [59]. In two patients in our study however, viral sequences recovered from PBMC displayed the patient's MCC-specific molecular signature. As both patients were sampled at a metastatic stage and subsequently died of their disease, we believe that PBMC viral DNA revealed metastatic circulating cells, since MCC cells were previously identified in the peripheral blood of one MCC patient [65].

Altogether, our results provide new insights in the life cycle of MCPyV during MCC pathogenesis. The low number of cases studied might weaken the statistical power of our results. However, we suggest that quantitative and qualitative molecular analysis of MCPyV in tumour and non tumour sites of MCC patients may be a useful tool to characterize their disease stage and manage their follow-up. We are currently designing a prospective study to confirm these results in large series of patients.

Supporting Information

Table S1 Primers and probes used for PCR, DIPS-PCR and sequencing.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1001076.s001 (0.03 MB XLS)

Table S2 Non MCC cancer data of MCC patients. FFPE samples were tested for MCPyV DNA. Case number as in Table 1. BCC, basal cell carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma. NA, non available.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1001076.s002 (0.02 MB XLS)

Acknowledgments

We thank Drs T. Clerici, M. Faisant, S. Fraiag-Spinner, P. Guinebretiere, A. Levy, I. Moulouguet, R. Picot, and F. Plantier for histological analysis data, Dr D. Fahri for enrolling patients, Drs A. Girod and S. Albert for surgical treatment and skin biopsies. We also thank Dr L. Woolrich Burt for help in editing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: F. Rozenberg. Performed the experiments: H. Laude, B. Jonchère. Analyzed the data: H. Laude, B. Jonchère, E. Maubec, M. Avril, N. Dupin, F. Rozenberg. Contributed reagents/materials/analysis tools: E. Maubec, A. Carloti, E. Marinho, B. Couturaud, M. Peter, X. Sastre-Garau, M. Avril, N. Dupin, F. Rozenberg. Wrote the paper: H. Laude, F. Rozenberg.

References

- Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS (2009) Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol* 19: 218–228.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, et al. (2009) Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 199: 837–846.
- Nguyen NL, Le BM, Wang D (2009) Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis* 15: 1199–1205.
- Sharp CP, Norja P, Anthony I, Bell JE, Simmonds P (2009) Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals. *J Infect Dis* 199: 398–404.
- Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ (2009) The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 384: 266–273.
- White MK, Khalili K (2004) Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* 324: 1–16.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319: 1096–1100.
- Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, et al. (2009) Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 125: 1243–1249.
- Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, et al. (2008) T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16272–16277.
- Lania L, Hayday A, Fried M (1981) Loss of functional large T-antigen and free viral genomes from cells transformed in vitro by polyoma virus after passage in vivo as tumor cells. *J Virol* 39: 422–431.
- Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stuckeler E, et al. (2008) Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 68: 5009–5013.
- Becker JC, Houben R, Uguet S, Trefzer U, Pföhler C, et al. (2009) MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol* 129: 248–250.
- Garneski KM, Waroola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129: 246–248.
- Ridd K, Yu S, Bastian BC (2009) The presence of polyomavirus in non-melanoma skin cancer in organ transplant recipients is rare. *J Invest Dermatol* 129: 250–252.
- Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Bricu N, Guillot B, et al. (2008) Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France. *Emerg Infect Dis* 14: 1491–1493.

16. Paulson KG, Lemos BD, Feng B, Jaimes N, Penas PF, et al. (2009) Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *J Invest Dermatol* 129: 1547–1555.
17. Duncavage EJ, Le BM, Wang D, Heifer JD (2009) Merkel cell polyomavirus: a specific marker for Merkel cell carcinoma in histologically similar tumors. *Am J Surg Pathol* 33: 1771–1777.
18. Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, et al. (2009) Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218: 48–56.
19. Helmbold P, Lahtz C, Enk A, Herrmann-Trost P, Marsch W, et al. (2009) Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mol Carcinog* 48: 903–909.
20. Varga E, Kiss M, Szabo K, Kemeny L (2009) Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas. *Br J Dermatol* 161: 930–932.
21. Touze A, Gaitan J, Maruani A, Le Bidre E, Doussinaud A, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus strains in patients with merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* 15: 960–962.
22. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, et al. (2009) Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101: 938–945.
23. Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, Hoque M, Chuang A, et al. (2009) Quantitative detection of merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer*.
24. Andres C, Belloni B, Puchta U, Sander CA, Flaig MJ (2009) Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. *J Cutan Pathol*.
25. Kassem A, Technau K, Kurz AK, Pantulu D, Loning M, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus sequences are frequently detected in nonmelanoma skin cancer of immunosuppressed patients. *Int J Cancer* 125: 356–361.
26. Wieland U, Mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H (2009) Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* 15: 1496–1498.
27. Kantola K, Sadeghi M, Lahtinen A, Koskenvuo M, Aaltonen LM, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency. *J Clin Virol* 45: 292–295.
28. Goh S, Lindau C, Tivejlung-Lindell A, Allander T (2009) Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis* 15: 489–491.
29. Bhatia K, Modali R, Goedert JJ (2009) Merkel cell polyomavirus is not detected in mesotheliomas. *J Clin Virol* 47: 196–198.
30. Helmbold P, Lahtz C, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH (2009) Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 45: 2207–2211.
31. Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, Moore PS, Chang Y, et al. (2009) Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog* 5: e1000578.
32. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL (2009) Seroprevalence of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5: e1000363.
33. Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, et al. (2009) Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101: 1510–1522.
34. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins EJ, et al. (2009) Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer* 125: 1250–1256.
35. Touze A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Heury MJ (2009) Generation of Merkel cell polyomavirus virus-like particles and their application to the detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol*.
36. Allen PJ, Bowne WB, Jaques DP, Brennan MF, Busam K, et al. (2005) Merkel cell carcinoma: prognosis and treatment of patients from a single institution. *J Clin Oncol* 23: 2300–2309.
37. Sanchez JL, Storch GA (2002) Multiplex, quantitative, real-time PCR assay for cytomegalovirus and human DNA. *J Clin Microbiol* 40: 2381–2386.
38. Luft F, Klaes R, Nees M, Durst M, Hellmann V, et al. (2001) Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 92: 9–17.
39. Zuzarte PC, Farrance IK, Simpson PC, Wildeman AG (2000) Tumor cell splice variants of the transcription factor TEF-1 induced by SV40 T-antigen transformation. *Biochim Biophys Acta* 1517: 82–90.
40. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW (2009) Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer*.
41. Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, et al. (2009) Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 81: 1951–1958.
42. Koljonen V, Kukko H, Pukkala E, Sankila R, Böhling T, et al. (2009) Chronic lymphocytic leukaemia patients have a high risk of Merkel-cell polyomavirus DNA-positive Merkel-cell carcinoma. *Br J Cancer* 101: 1444–1447.
43. Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimohara N, et al. Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Virology*.
44. Fischer N, Brandner J, Fuchs F, Moll I Grundhoff A Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int J Cancer* 126: 2133–2142.
45. Busam KJ, Jungbluth AA, Rekhman N, Coit D, Pulitzer M, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol* 33: 1378–1385.
46. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SM, Stenner M, et al. (2009) Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res* 15: 1779–1786.
47. Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, et al. Merkel cell polyomavirus-infected merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 84: 7064–7072.
48. Ewald D, Li M, Efrat S, Auer G, Wall RJ, et al. (1996) Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273: 1384–1386.
49. Pfeiffer A, Schubert R, Orend G, Hilger-Eversheim K, Doerfler W (1999) Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* 59: 113–127.
50. Dworin AM, Tseng SY, Allain DC, Iwenofu OH, Peters SB, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 129: 2868–2874.
51. Manos MM, Gluzman Y (1984) Simian virus 40 large T-antigen point mutants that are defective in viral DNA replication but competent in oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 4: 1125–1133.
52. Israel MA, Martin MA, Miyamura T, Takemoto KK, Rifkin D, et al. (1980) Phenotype of polyoma-induced hamster tumor cells lines. *J Virol* 35: 252–255.
53. Roberge C, Bastin M (1988) Site-directed mutagenesis of the polyomavirus genome: replication-defective large T mutants with increased immortalization potential. *Virology* 162: 144–150.
54. Foulongne V, Dereure O, Kluger N, Moles JP, Guillot B, et al. (2009) Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. *Br J Dermatol*.
55. Kwun HJ, Guastafiero A, Shuda M, Meinke G, Bohm A, et al. (2009) The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *J Virol* 83: 12118–12128.
56. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Lo Presti A, Greco F, Perno CF, et al. Identification of Merkel cell polyomavirus in the lower respiratory tract of Italian patients. *J Med Virol* 82: 505–509.
57. Bialasiewicz S, Lambert SB, Whitley DM, Nissen MD, Sloots TP (2009) Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg Infect Dis* 15: 492–494.
58. Wetzel CT, Hoefnagel JG, Bakkers JM, Dijkman HB, Blok WA, et al. (2009) Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. *PLoS One* 4: e4958.
59. Mertz KD, Junt T, Schmid M, Pfaltz M, Kempf W (2009) Inflammatory Monocytes Are a Reservoir for Merkel Cell Polyomavirus. *J Invest Dermatol*.
60. Tsai RT, Wang M, Ou WC, Lee YL, Li SY, et al. (1997) Incidence of JC virusuria is higher than that of BK virusuria in Taiwan. *J Med Virol* 52: 253–257.
61. Bialasiewicz S, Whitley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP (2009) Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol* 45: 249–254.
62. Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, et al. (2007) Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 45: 193–198.
63. Randhawa P, Bohl D, Brennan D, Ruppert K, Ramaswami B, et al. (2008) Longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1564–1571.
64. Lundstg A, Stattin P, Persson K, Sasnauskas K, Viscidi RP, et al. (2007) No excess risk for colorectal cancer among subjects seropositive for the JC polyomavirus. *Int J Cancer* 121: 1098–1102.
65. Hartley MA, Tao J, Baz R (2009) Merkel Cell Carcinoma in the Peripheral Blood of a Patient With Concomitant Chronic Lymphocytic Leukemia and Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*.

Résumé du troisième article

Le Polyomavirus de Merkel est un nouveau Polyomavirus à tropisme humain découvert en 2008 dans des MCC, un cancer cutané rare. Le but de notre travail était de rechercher la présence d'Ac spécifiques du MCPyV chez des sujets exempts de MCC et chez des individus atteints de la pathologie. Chez ces derniers, nous avons analysé le lien potentiel entre le taux de ces Ac et les caractéristiques cliniques de la maladie.

Nous avons recherché et quantifié les Ac sériques dirigés contre la protéine virale majeure de capsid VP1 chez 68 sujets atteints de MCC et 82 sujets contrôles.

Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de type ELISA et des pseudo-particules virales constituées de VP1 produites en cellules d'insectes.

Nous avons décelé des Ac sériques anti-VP1 chez tous les sujets atteints de MCC et chez 85 % des sujets contrôles. Cependant, des titres élevés d'Ac ($> 10\,000$) n'ont été que rarement observés chez ces derniers (7,3 %) alors que de tels taux étaient présents chez 64,7 % des sujets atteints de MCC ($p < 0,001$). De plus, le titre moyen des Ac anti-VP1 chez ces derniers était environ 14 fois plus élevé que celui des sujets contrôles ($p < 0,001$).

Les taux d'Ac chez les sujets atteints de MCC n'étaient pas corrélés à la charge virale tumorale et la fréquence des titres élevés d'Ac contrastait avec l'absence d'expression de protéines VP1 dans les MCC.

Des taux élevés d'Ac n'étaient pas associés à des caractéristiques cliniques particulières des sujets ou de la tumeur, mais étaient en revanche corrélés à une survie sans récurrence prolongée ($p = 0,002$).

En conclusion, la plus grande fréquence de taux sériques élevés d'Ac spécifiques de MCPyV chez les sujets atteints de MCC par rapport aux sujets contrôles confirme l'association entre l'infection par MCPyV et la survenue du MCC. Nos résultats suggèrent de plus que la survie sans récurrence est prolongée chez les sujets présentant des titres élevés d'Ac, ce qui permet de supposer l'existence d'au moins deux étiologies différentes pour le MCC, l'une n'étant pas liée à MCPyV.

High Levels of Antibodies Against Merkel Cell Polyomavirus Identify a Subset of Patients With Merkel Cell Carcinoma With Better Clinical Outcome

Antoine Touzé, Emmanuelle Le Bidre, Hélène Laude, Maxime J.J. Fleury, Raphaël Casal, Françoise Arnold, Agnès Carlotti, Eve Maubec, François Aubin, Marie-Françoise Avril, Flore Rozenberg, Mauro Tognon, Annabel Maruani, Serge Guyétant, Gérard Lorette, and Pierre Coursaget

See accompanying editorial on page 1506 and article on page 1539

From the Inserm U618; Université François Rabelais; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours - Hôpital Trousseau, Tours; Centre Hospitalier Régional d'Orléans, Orléans; Assistance Publique des Hôpitaux de Paris; Hôpital Cochin; Université René Descartes; Hôpital Bichat, Paris; Université de Franche Comté et Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France; and the University of Ferrara, Ferrara, Italy.

Submitted June 30, 2010; accepted January 25, 2011; published online ahead of print at www.jco.org on March 21, 2011.

A.T., E.L.B., and H.L. contributed equally to this work.

Terms in blue are defined in the glossary, found at the end of this article and online at www.jco.org.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Pierre Coursaget, PharmD, Laboratoire Vecteurs, Virus, Vaccins, INSERM U618, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31 Ave Monge, 37200 Tours, France; e-mail: coursaget@univ-tours.fr.

© 2011 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/11/2912-1612/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2010.31.1704

ABSTRACT

Purpose

A new human polyomavirus, Merkel cell polyomavirus (MCV), was identified in 2008 in tumor tissue of patients with Merkel cell carcinoma (MCC), a relatively rare human skin cancer. In this study, we investigated patients with MCC and controls for the presence of antibodies against MCV and their association with clinical characteristics.

Patients and Methods

Antibodies against MCV were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay in 68 patients with MCC and 82 controls using VP1 virus-like particles produced in insect cells.

Results

Antibodies against MCV were detected in all patients with MCC and in 85% of controls. However, high antibody titers (> 10,000) were rarely observed in controls (7.3%) and they were detected in 64.7% of patients with MCC ($P < .001$) in contrast to the absence of VP1 expression in tumor samples. In addition, the geometric mean titer of anti-MCV in patients with MCC was around 14 times higher than that observed in MCV-positive controls ($P < .001$) and was not correlated with tumor viral load. High antibody titers were not found to be associated with any subject or tumor characteristics, but better progression-free survival was observed in patients with high antibody titers (hazard ratio, 4.6; 95% CI, 1.7 to 12.2; $P = .002$).

Conclusion

High titers of MCV antibodies in a much higher proportion of patients with MCC than in controls confirmed the association between MCV infection and MCC. The findings also indicated that a better progression-free survival occurred in patients with high MCV antibody titers and suggested that there are at least two distinct etiologic causes of MCC.

J Clin Oncol 29:1612-1619. © 2011 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare but often lethal skin cancer of the elderly, with an annual incidence rate in the United States of approximately 0.3 to 0.4 patients per 100,000, and a threefold increase over the past 20 years.¹⁻³ This aggressive primary cutaneous neuroendocrine carcinoma is associated with high rates of locoregional relapse and nodal recurrence. The 2-year mortality rate for patients with MCC is 28%.⁴ MCC affects men slightly more often than women^{5,6} with a median age at presentation of approximately 70 years. The prognosis is associated with the extent of the disease at presentation, with survival greater than 90% for local disease, decreasing to 52% with nodal involve-

ment and lower than 10% if distant metastatic disease is present.^{3,7,8} Exposure to ultraviolet radiation, advanced age, and immune suppression, have been associated with MCC⁸ and a 10-fold increase after solid organ transplantation and 16-fold increase among HIV-positive patients have been reported.^{1,4,9}

A new polyomavirus, Merkel cell polyomavirus (MCV), was recently discovered in patients with MCC.¹⁰ Clonal integration of the MCV genome within the tumor cell genome, integration occurring before clonal expansion and metastasis,^{10,11} the experimental evidence that large T antigen (T Ag) expression is necessary for maintenance of MCV-positive MCC cell lines,¹² and the presence of deletions or mutations within the TAg gene¹³ suggest

that MCV has a direct oncogenic role, and that viral infection is an early event in the pathogenesis of MCC.

Polyomaviruses are small naked DNA viruses, with a capsid composed of three proteins, VP1, VP2, and VP3. Twenty-four members of the polyomavirus family have been identified to date in mammalian and bird species.¹⁴⁻¹⁶ With the exception of the murine pneumotropic polyomavirus and the avian polyomaviruses, primary infection with polyomaviruses is generally asymptomatic, and clinical symptoms are only observed under severe immunosuppression in humans. In addition to MCV, six other polyomaviruses infect humans, including the ubiquitous BK and JC viruses. Two human polyomaviruses, KI and WU viruses, were isolated in 2007 from pulmonary secretions.^{17,18} Recently, two new polyomaviruses chronically shed from the normal skin were discovered.¹⁶

Serologic studies using recombinant MCV virus-like particles [VLPs] or capsomeres have recently shown that anti-MCV antibodies are detected in 40% to 88% of adults¹⁹⁻²² and in 20% to 43% of 1 to 5-year-old children,^{19,20} suggesting that infection with MCV is very common. In addition, three recent studies investigated anti-MCV antibodies in patients with MCC and demonstrated that such antibodies are detected in higher proportions in patients with MCC than in controls^{19,23} and at much higher titers.²¹

The aims of this study were to investigate anti-MCV antibodies in 68 French patients with MCC and 82 controls to confirm the role of MCV infection in MCC, to analyze the clinical symptoms associated with serologic markers of MCV infection and to investigate whether different levels of MCV antibodies are associated with nodal and metastatic recurrence.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Samples

The 68 patients with MCC included in the study ranged in age from 37 to 91 years (median, 79 years) and included 27 men and 41 women. This historical prospective cohort study included patients with a diagnosis of MCC established between 1998 and 2010. All tissue samples were collected for diagnostic purposes. MCV DNA was present in all tumor tissue samples investigated except for two samples (96.1%). Sixty-seven of 68 patients were observed longer than 1 month after the appearance of disease and nodal and metastatic recurrence was recorded.

Control sera were obtained for 23 patients from the Dermatology Department of Tours University Hospital (Tours, France), including 20 with other skin cancers, two with other skin diseases, and one with a nodal metastasis of small-cell lung carcinoma, and chosen to match the age-range and sex of the patients with MCC. Samples and data from MCC and other patients with skin cancers or skin diseases were collected after obtaining written informed consent and the approval of the local ethics committee. In addition, de-identified samples were obtained from 36 Italian blood donors age 63 to 83 years²² and from 23 patients age 22 to 76 years suffering from infectious diseases (Paris, France). All serum samples were stored at -20°C until tested.

Detection of MCV Viral Markers

Amplification of MCV sequences was performed using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) as previously described²⁴ and the delta-delta Ct method was used to quantify tumoral viral DNA in copy numbers per cell (Fig 1, CONSORT; Appendix, online only). For the immunohistochemical detection of VP1 protein in tumor cells, MCC tissue cut from formalin-fixed paraffin-embedded blocks were incubated with a mouse anti-MCV VP1 polyclonal antibody²² and then stained with the EnVision kit (Dako Cytomation, Trappes, France). In addition, a MCC cell line (MKTC-1) established

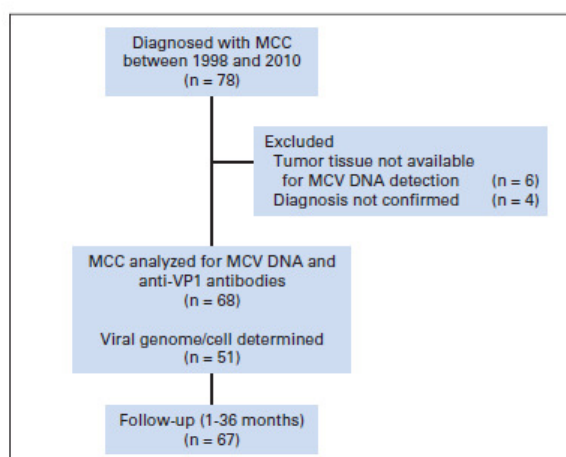


Fig 1. CONSORT diagram. Experimental flow: 78 patients with Merkel cell carcinoma (MCC) from France were enrolled. Ten patients were excluded due to nonconfirmed MCC diagnosis at review or absence of tumor tissue. Merkel cell polyomavirus (MCV) DNA and anti-MCV antibodies were investigated in the remaining 68 patients and viral load was established in only 51 of them. Sixty-seven patients with MCC were observed for nodal and metastatic recurrence for periods between 1 and 36 months after diagnosis (median follow-up, 12 months).

from a MCV DNA-positive patient with MCC was investigated, and Sf9 insect cells with or without infection with VP1 recombinant baculoviruses were used as positive and negative controls, respectively.

Detection of Anti-MCV Antibodies

Detection of anti-VP1 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed using MCV VLPs generated in insect cells as previously described²² and sera were serially diluted threefold from 1:100 to 1:656,100. End point antibody titers were determined as the last of three-fold serial dilutions that yielded a positive result. High anti-MCV antibody titers were set at 10,000 for the analysis since this value is the most discriminating between patients with MCC and controls.

Statistical Methods

Proportional analysis between groups and associations between tumor and patient characteristics with MCV titers were assessed using the χ^2 test. Geometric mean titers (GMT) were compared using the Kruskal-Wallis test. Disease-specific nodal recurrence-free probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank, Wilcoxon, and Tarone-Ware tests. Factors associated with freedom from recurrence on log-rank comparison were entered into a Cox regression analysis.²⁵ All statistical tests were two-tailed, with a 5% type I error, and were performed using the XLStat-Life software (Addinsoft, Paris, France).

RESULTS

Detection of Anti-VP1 Protein Antibodies in Patients With MCC and Controls

MCV antibodies were present in all 68 patients with MCC and in 70 of 82 controls (85.4%; Table 1). However, the antibody titers varied dramatically between the controls and the patients with MCC (Table 1 and Fig 2), with GMT of MCV antibodies of 1,608 in controls and 21,701 in patients with MCC ($P < .001$). High antibody titers ($> 10,000$) were observed in 64.7% of MCC and in only 7.3% of controls ($P < .001$). It should be noted that the patient with MCC for

Table 1. Detection of MCV VP1 Antibodies in 68 Patients With MCC and 82 Controls

Parameter	No.	Sex		Age		Anti-MCV Antibodies				
		Male	Female	Median	Range	Positive		> 10,000		
						No.	%	GMT*	No.	%
Control										
Other skin disease	23	10	13	80	48-90	20	86.9	1,397	2	8.7
Without skin disease	23	10	13	35	22-76	21	91.3	1,409	2	8.7
Blood donors	36	18	18	75	63-83	29	80.6	2,070	2	5.6
Total	82	38	44	73	22-90	70	85.4	1,608	6	7.3
Patients with MCC	68	27	41	79	37-91	68	100.0	21,701	44	64.7
<i>P</i>						.44		< .001		< .001

Abbreviations: MCV, Merkel cell polyomavirus; MCC, Merkel cell carcinoma; GMT, geometric mean titer.
*GMT in anti-MCV positive.

whom the frozen tumor sample was found to be MCV DNA negative had an anti-MCV antibody titer of only 300. No significant variation in GMT or in the frequency of high antibody titers was observed in the three control groups (Table 1). High antibody titers (> 10,000) were only observed in two patients with lymphoma among the patients with other skin diseases. This was in agreement with findings indicating that MCV DNA is not detected in melanoma²⁶ and rarely and at low viral DNA levels in squamous cell carcinoma (SCC).^{27,28}

The detection of high anti-MCV titers in patients with MCC was analyzed in correlation with patient, virological, clinical, and tumor characteristics (Table 2). No statistically significant variation was observed in terms of either proportion of high antibody titers or GMTs according to size of tumor, nodal status, immune deficiency, tumoral viral load, period of sampling, and treatment. High antibody titers were more frequently observed in women than men ($P = .09$); however, the differences in GMT were not statistically different. Similarly, higher anti-MCV GMTs were also found in younger patients ($P = .023$) and a higher proportion of high antibody titers were observed in patients younger than 80 years of age, but the difference was not statistically significant ($P = .056$). High antibody titers were more frequently observed in patients with tumor located on limb (79%) than on the head or neck (50%) or trunk (60%, $P < .001$), and in patients with *cytokeratin 20* (CK20)-positive (67%) rather than

CK20-negative tumors (50%; $P = .016$), but the higher GMTs were not statistically different between these groups.

Detection of VP1 Capsid Protein Expression in MCC Tumors

VP1 capsids are strongly immunogenic, as indicated by the strong immune response elicited in immunized mice.^{21,22} High levels of antibodies in patients with MCC could thus reflect the fact that MCV VP1 protein is expressed by MCC tumor cells. The presence of this viral protein was investigated by immunohistochemical staining in 21 MCC tissue samples from 16 MCV DNA-positive patients with MCC, a MCV DNA-positive MCC cell line, and three MCV DNA-negative patients with non-MCC cutaneous tumors used as negative controls. Insect cells infected with a VP1 recombinant baculovirus and normal insect cells were used as positive and negative controls, respectively. As seen in Figure 3, VP1 protein was detected in the nuclei of insect cells expressing VP1 protein, but not in the 16 MCV DNA-positive MCC tumors or in adjacent normal skin when available (12 patients), or in samples from the three MCV DNA-negative control patients. These results confirmed those reported by Pastrana et al²¹ and indicate that MCC tumors did not produce MCV VP1 capsid protein, or produced it at levels undetectable by immunohistochemical staining, thus suggesting that the strong immune response observed in patients with MCC is not related to VP1 protein expression by tumor cells.

Correlation Between Anti-VP1 Antibodies and Risk of Nodal and Metastatic Recurrence

A total of 67 patients were observed for at least 1 month after diagnosis, and the appearance of nodal and metastatic recurrence was recorded over 36 months after diagnosis (13 patients were still being observed at 36 months). Subjects with high antibody titers (> 10,000) had better progression-free survival than those with low antibody titers since their mean nodal and metastasis recurrence-free period was 26.1 months (95% CI, 21.7 to 30.4) compared to 12.1 months (95% CI, 9.4 to 14.8) in low antibody titer patients ($P = .003$; Fig 4A). A similar analysis was performed for anti-VP1 titers higher than 30,000 (Fig 4B). The mean time to recurrence was 30.1 months (95% CI, 23.2 to 37.1) in patients with high titers and only 13.2 months (95% CI, 11.3 to 15.1) in patients with antibody titers lower than 30,000 ($P = .003$).

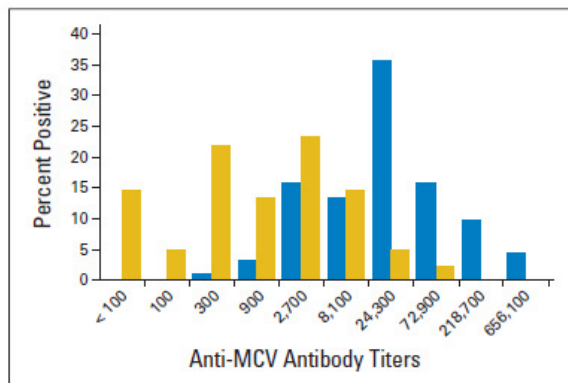


Fig 2. Comparison of anti-Merkel cell polyomavirus (MCV) VP1 antibody titers in 68 patients with Merkel cell carcinoma (MCC; blue) and 82 controls (gold).

Anti-MCV Polyomavirus Antibodies in Patients With MCC

Table 2. Participant and Tumor Characteristics According to MCV Antibody Titers

Characteristic	No.	GMT	P*	Anti-MCV Antibodies				P†
				< 10,000		> 10,000		
				No.	%	No.	%	
Sex			.15					.09
Male	27	16,177		11	40.7	16	59.3	
Female	41	26,334		12	29.3	29	70.7	
Age, years			.023‡					.056
< 80	36	33,993		10	27.8	26	72.2	
≥ 80	32	13,099		13	40.6	19	59.4	
Primary tumor site			.35					< .001‡
Head or neck	22	17,131		11	50.0	11	50.0	
Trunk	10	17,477		4	40.0	6	60.0	
Limb	34	26,773		7	20.6	27	79.4	
Size of primary			.22					.17
≤ 2 cm	28	26,284		8	28.6	20	71.4	
> 2 cm	37	18,602		14	37.8	23	62.2	
Nodal status			.51					.078
Negative	52	20,959		19	36.5	33	63.5	
Regional Node	16	24,300		4	25.0	12	75.0	
Immunocompromised			.47					.53
Yes	8	16,095		3	37.5	5	62.5	
No	60	22,584		20	33.3	40	66.7	
CK20			.84					.016‡
Positive	62	23,041		20	33.2	41	66.8	
Negative	6	11,682		3	50.0	3	50.0	
Viral genome/cell			.83					.82
< 1	13	18,858		5	38.5	8	61.5	
1 to 9	20	15,659		7	35	13	65	
≥ 10	18	14,913		7	38.9	11	61.1	
Diagnosis to blood sampling, months			.73					.782
< 2	22	17,131		8	36.4	14	63.6	
2-12	22	24,300		7	31.8	15	68.2	
> 12	24	24,300		8	33.3	16	66.7	
Surgery			.25					.93
Yes	62	23,873		21	33.9	41	66.1	
No	6	8,100		2	33.3	4	66.7	
Radiotherapy			.26					.57
Yes	39	25,708		14	35.9	25	64.1	
No	28	17,070		9	32.1	19	67.9	
Chemotherapy			.71					.23
Yes	11	14,748		3	27.3	8	72.7	
No	57	23,381		20	35.1	37	64.9	

Abbreviations: MCV, Merkel cell polyomavirus; GMT, geometric mean titer.
 *Kruskal-Wallis.
 † χ^2 test.
 ‡Significant value.

Factors associated with nodal recurrence were identified through the calculation of the hazard ratio (HR) and corresponding 95% CI using Cox proportional hazard regression analysis²⁵ (Table 3). To examine whether the presence of high antibody titers was independently associated with the absence of recurrence, we evaluated this parameter with other factors in a Cox multivariate proportional hazards model. The presence of metastases at diagnosis, age, sex, primary tumor site, size of primary tumor, tumor positivity for CK20 (HR, 1.19; 95% CI, 0.24 to 5.97; $P = .83$), and treatment by radiotherapy or chemotherapy were not associated with nodal recurrence (Table 3), whereas detection of antibody titers lower than 10,000 was clearly associated with recurrence in the multivariate analysis (HR for low titers v high titers, 4.61;

95% CI, 1.74 to 12.18, $P = .002$). In addition, immunosuppression (HR, 3.42; 95% CI, 1.16 to 10.10; $P = .026$) was associated with recurrence.

DISCUSSION

We investigated the presence of anti-MCV antibodies in a series of 68 patients with MCC. We detected MCV VP1 antibodies in 100% of patients with MCC, a slightly higher proportion than the 85% observed in controls. More distinctive features were the fact that the geometric mean titer of MCV antibodies in the control groups was around 13.5-fold lower than in the MCC patient group, that 65% of the patients with MCC and only 7% (six of 82) of the controls had

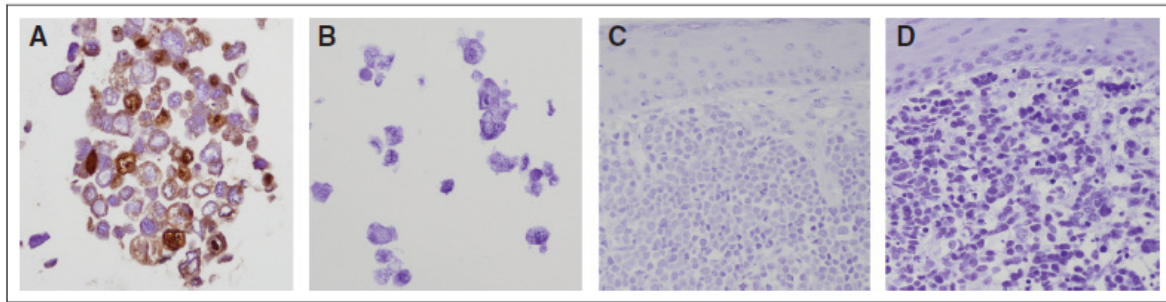


Fig 3. Merkel cell polyomavirus (MCV) VP1 immunohistochemical detection in Merkel cell carcinoma (MCC) tissue and in controls. (A) Sf21 cells infected with VP1 recombinant baculovirus. (B) Mock infected Sf21 cells. (C, D) Tumor tissue from two patients who tested MCC positive for MCV DNA.

antibody titers higher than 10,000 and that only 7% of the control subjects had antibody titers greater than the GMT of the patients with MCC. These findings confirm those of Pastrana et al²¹ and support the virological and serological findings suggesting that MCV infection is a causative factor in the development of most patients with MCC.^{10,11,13,19,23,29,30}

It is paradoxical that the strong antibody response observed in most of the patients with MCC could not abrogate MCV infection, since it has been demonstrated that these antibodies are neutralizing.²¹ However, it has been shown that viral replication for BK virus persists for decades despite a strong immune response, antibody levels being higher in individuals with BK virus replication than in those without BK virus replication, and also that this polyomavirus reactivates from latency in cases of immunosuppression, with a simultaneous increase in anti-VP1 antibodies to high levels.^{31,32} This could also explain the small proportion (7%) of individuals from the control group with elevated antibody titers, this being either a sign of persistent infection, or the sign of a recent period of reactivation from a latent stage. The finding that around one third of patients with MCC had antibody titers similar to those observed in the general population was in agreement with reports that 20% to 30% of MCC tumors lack virological evidence of association with MCV.^{29,30}

The high variation in antibody titers among patients with MCC may reflect either the existence of different serotypes of MCV, or the existence of another etiologic cause for a subset of MCCs, including the role of another polyomavirus,¹⁶ and finally may indicate that patients with MCC with low antibody titers were at a later stage of the disease and those with high antibody titers had active viral replication associated with VP1 production.

Variations in antibody levels may indicate that there is still production of VP1 in tumor or other cells, patients with MCC with low antibody titers possibly being at a later stage of the disease than those with high antibody titers. However, no variation according to age or period of serum sampling since diagnosis was observed, and there is also no correlation between viral load and antibody titers. In addition, in agreement with Pastrana et al,²¹ we observed that VP1 protein was not detected in MCC tumor cells. It thus appeared to be unlikely that the strong anti-VP1 antibody response observed in most of the patients with MCC was due to an immune response boosted by VP1 protein produced by tumor cells. Moreover, there was no evidence that expression of VP1 in other cells had a role in

the maintenance of high levels of antibodies, although it was observed that MCV DNA was detected in the skin of most MCC patients at levels 20 times higher than observed in patients with other skin disease and in the general population.²⁸ The absence of VP1 expression in tumor cells and the presence of T antigen mutations that prevent viral DNA replication¹³ both suggested that detection of MCV in tumor cells is not due to infection secondary to the MCC tumor, but rather indicated a prior history of life-long persistent MCV infection.

The clinical relevance of high viral load and high antibody titers in the general population remains unclear, as demonstrated in several studies including the current study.^{19,21,33,34} However, nodal and metastatic recurrence was 4 times less frequently observed in patients with high antibody titers compared to patients with low antibody titers. Thus, a better progression-free survival was observed in patients with MCC with high antibody titers, just as a better progression-free survival was observed in patients with MCC with high tumor viral load or MCV T Ag detection.^{24,28,29,35-37} This could be due to there being two different causes for the development of MCC, one being MCV. MCCs are clinically and morphologically heterogeneous in the expression of neuroendocrine, epithelial, and oncogenic markers^{38,39} and this is also suggestive of the existence of different etiologic causes, as is the fact that MCV T Ag is not detected in CK20-negative tumors,³⁰ a finding in agreement with the fact that we detected high anti-VP1 titers in only 50.0% (three of six) of CK20-negative tumor patients compared to 66.8% (41 of 62; $P = .016$) of CK20-positive patients. It is also possible that all MCC are a consequence of MCV infection, but with two different types of evolution, corresponding either to the integration of the viral genome in the cell genome, with overexpression of T Ag, or to a hit-and-run phenomenon in T Ag-negative tumors. Such a phenomenon has been reported for adenovirus-transformed hamster cells that lose the integrated viral DNA while retaining the oncogenic phenotype.⁴⁰ As recently suggested by Houben et al,¹² it is possible that such a phenomenon applies to some patients with MCC with no detectable MCV DNA (or low viral load) and low antibody titers.

In conclusion, the strong anti-MCV antibody response in patients with MCC observed in this study and by others^{19,21,23} distinguishes them from asymptomatic-exposed individuals in the general population and supports the hypothesis that MCV infection is a causative factor in the development of the majority of patients with MCC based on MCV DNA and T Ag detection levels. Serologic findings also

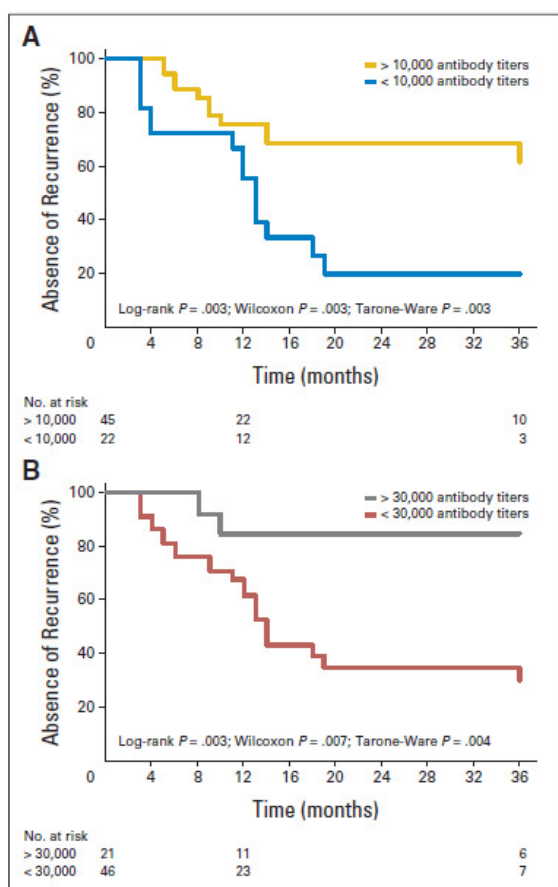


Fig 4. Kaplan-Meier analysis of recurrence among 67 patients observed for 1 to 36 months after diagnosis with either high antibody titers (A) higher than 10,000 and (B) higher than 30,000 or with low antibody titers (A) lower than 10,000 and (B) lower than 30,000 against Merkel cell polyomavirus (MCV). Patients with high anti-MCV titers (> 10,000) had better clinical outcomes (absence of recurrence) than patients with low antibody titers (hazard ratio of recurrence, 4.61; 95% CI, 1.74 to 12.8; $P = .002$) and patients with antibody titers higher than 30,000 had better clinical outcomes than patients with antibody titers lower than 30,000 (hazard ratio of recurrence, 4.78; 95% CI, 0.93 to 24.6, $P = .061$).

support the existence of two different subgroups of MCC, one with a better clinical outcome clearly linked to MCV etiology, as evidenced by the detection of a high viral copy number, the detection of T Ag in tumor tissue and high anti-MCV antibody levels, and the other a group of patients with a high frequency of clinical recurrence that seems to be linked to another etiology, as indicated by the detection of a low MCV viral copy number per cell, the absence of detection of T Ag, and detection of anti-MCV antibody levels similar to those observed in the general population. The limitations of our study are that it is possible that some of the patients may in fact have clinically occult recurrence. Further investigation of the prevalence of anti-MCV antibodies in an enlarged prospective study is necessary to confirm the association between high anti-VP1 antibody titers and reduced risk of nodal and metastatic recurrence, and to determine the potential clinical value of this serological marker.

Covariate	β	SE	HR	95% CI	P
Age	0.039	0.025	1.04	0.99 to 1.09	.13
Sex					
Female v male	-0.822	0.469	0.44	0.18 to 1.10	.08
Anti-MCV titer					
< 10,000 v > 10,000	1.528	0.496	4.61	1.74 to 12.18	.002*
Primary tumor site					
Limb v head or neck or trunk	0.607	0.526	1.84	0.65 to 5.15	.25
Size of primary					
> 2 v \leq 2 cm	0.415	0.515	1.52	0.55 to 4.15	.42
Metastases at time of diagnosis					
Present v absent	0.609	0.703	1.84	0.46 to 7.30	.39
Immunocompromised					
Yes v no	1.231	0.552	3.42	1.16 to 10.10	.026*
CK20					
Positive v negative	0.177	0.822	1.19	0.24 to 5.97	.83
Radiotherapy					
Yes v no	-0.251	0.508	0.78	0.29 to 2.11	.62
Chemotherapy					
Yes v no	0.629	0.645	1.88	0.53 to 6.64	.33

Abbreviations: β , regression coefficient of hazard function; HR, hazard ratio; MCV, Merkel cell polyomavirus.
*Significant value.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Antoine Touzé, Agnès Carlotti, Flore Rozenberg, Serge Guyétant, Gérard Lorette, Pierre Coursaget

Financial support: Pierre Coursaget

Administrative support: Annabel Maruani, Pierre Coursaget

Provision of study materials or patients: Emmanuelle Le Bidre, Héléne Laude, Agnès Carlotti, Eve Maubec, François Aubin, Marie-Françoise Avril, Flore Rozenberg, Mauro Tognon, Annabel Maruani, Serge Guyétant, Gérard Lorette

Collection and assembly of data: Antoine Touzé, Emmanuelle Le Bidre, Héléne Laude, Maxime J.J. Fleury, Raphaël Cazal, Françoise Arnold, Agnès Carlotti, Eve Maubec, François Aubin, Marie-Françoise Avril, Flore Rozenberg, Annabel Maruani, Serge Guyétant, Gérard Lorette, Pierre Coursaget

Data analysis and interpretation: Antoine Touzé, Emmanuelle Le Bidre, Héléne Laude, Maxime J.J. Fleury, Raphaël Cazal, Françoise Arnold, Agnès Carlotti, François Aubin, Serge Guyétant, Gérard Lorette, Pierre Coursaget

Manuscript writing: Antoine Touzé, Emmanuelle Le Bidre, Héléne Laude, Maxime J.J. Fleury, Raphaël Cazal, Françoise Arnold, Agnès Carlotti, Eve Maubec, François Aubin, Marie-Françoise Avril, Flore Rozenberg, Mauro Tognon, Annabel Maruani, Serge Guyétant, Gérard Lorette, Pierre Coursaget

Final approval of manuscript: Antoine Touzé, Emmanuelle Le Bidre, Héléne Laude, Maxime J.J. Fleury, Raphaël Cazal, Françoise Arnold, Agnès Carlotti, Eve Maubec, François Aubin, Marie-Françoise Avril, Flore Rozenberg, Mauro Tognon, Annabel Maruani, Serge Guyétant, Gérard Lorette, Pierre Coursaget

REFERENCES

1. Miller RW, Rabkin CS: Merkel cell carcinoma and melanoma: Etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:153-158, 1999
2. Hodgson NC: Merkel cell carcinoma: Changing incidence trends. *J Surg Oncol* 89:1-4, 2005
3. Agelli M, Clegg LX: Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 49:832-841, 2003
4. Rockville Merkel Cell Carcinoma Group: Merkel cell carcinoma: Recent progress and current priorities on etiology, pathogenesis, and clinical management. *J Clin Oncol* 27:4021-4026, 2009
5. Howard RA, Doros GM, Curtis RE, et al: Merkel cell carcinoma and multiple primary cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1545-1549, 2006
6. Agelli M, Clegg LX, Becker JC, et al: The etiology and epidemiology of Merkel cell carcinoma. *Curr Probl Cancer* 34:14-37, 2010
7. Allen PJ, Bowne WB, Jaques DP, et al: Merkel cell carcinoma: Prognosis and treatment of patients from a single institution. *J Clin Oncol* 23:2300-2309, 2005
8. Heath M, Jaimes N, Lemos B, et al: Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: The AEIOU features. *J Am Acad Dermatol* 58:375-381, 2008
9. Engels EA, Frisch M, Goedert JJ, et al: Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet* 359:497-498, 2002
10. Feng H, Shuda M, Chang Y, et al: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319:1096-1100, 2008
11. Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, et al: Merkel cell carcinoma of the skin: Pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218:48-56, 2009
12. Houben R, Shuda M, Weinkam R, et al: Merkel cell polyomavirus infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol* 84:7064-7072, 2010
13. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, et al: T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16272-16277, 2008
14. Zur Hausen H: Novel human polyomaviruses: Re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* 123:247-250, 2008
15. Groenewoud MJ, Fagrouch Z, van Gessel S, et al: Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran orangutans. *J Gen Virol* 91:653-658, 2010
16. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, et al: Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7:509-515, 2010
17. Allander T, Andreasson K, Gupta S, et al: Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81:4130-4136, 2007
18. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, et al: Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3:e64, 2007
19. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, et al: Human Merkel cell polyomavirus infection II: MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer* 125:1250-1256, 2009
20. Kean JM, Rao S, Wang M, et al: Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5:e1000363, 2009
21. Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, et al: Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog* 5:e1000578, 2009
22. Touzé A, Gaitan J, Arnold F, et al: Generation of Merkel cell polyomavirus virus-like particles and their application to the detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol* 48:1767-1770, 2010
23. Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, et al: Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101:1510-1522, 2009
24. Laude HC, Jonchère B, Maubec E, et al: Distinct Merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog* 6:e1001076, 2010
25. Cox DR: Regression models and life tables (with discussion). *J Royal Stat Soc B* 30:248-275, 1972
26. Giraud G, Ramqvist T, Pastrana DV, et al: DNA from KI, WU and Merkel cell polyomaviruses is not detected in childhood central nervous system tumours or neuroblastomas. *PLoS One* 4:e8239, 2009
27. Dworkin AM, Tseng SY, Allain DC, et al: Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 129:2868-2874, 2009
28. Foulongne V, Dereure O, Kluger N, et al: Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. *Br J Dermatol* 162:59-63, 2010
29. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, et al: Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer* 126:2240-2246, 2010
30. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, et al: Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 125:1243-1249, 2009
31. Randhawa P, Bohl D, Brennan D, et al: Longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 15:1564-1571, 2008
32. Bohl DL, Brennan DC, Ryschewitsch C, et al: BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol* 43:184-189, 2008
33. Foulongne V, Kluger N, Dereure O, et al: Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs. *Emerg Infect Dis* 16:685-687, 2010
34. Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, et al: Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer* 126:2991-2996, 2010
35. Waltari M, Sihto H, Kukko H, et al: Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* [epub ahead of print on October 14, 2010]
36. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, et al: Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101:938-945, 2009
37. Andres C, Belloni B, Puchta U, et al: Re: Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101:1655-1656, 2009
38. Pilotti S, Rilke F, Bartoli C, et al: Clinicopathologic correlations of cutaneous neuroendocrine Merkel cell carcinoma. *J Clin Oncol* 6:1863-1873, 1988
39. Calder KB, Coplowitz S, Schlauder S, et al: A case series and immunophenotypic analysis of CK20-/CK7+ primary neuroendocrine carcinoma of the skin. *J Cutan Pathol* 34:918-923, 2007
40. Pfeffer A, Schubbert R, Orend G, et al: Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* 59:113-127, 1999

Glossary Terms

CK20: Cytokeratin 20 (CK20) is a low-molecular-weight cyto-keratin and a component of the intermediate filament present in the cytoplasm of epithelial cells and its expression is restricted to the small and large intestine and Merkel cells. CK 20 is a valuable diagnostic marker that helps to distinguish different types of carcinomas, notably when presenting as metastases, since CK20 is not expressed in small-cell carcinomas of various sites, but is present in most Merkel cell carcinomas.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): An ELISA is a sensitive, quantitative immunochemical test that involves an enzyme linked to an antibody or antigen to allow detection of a specific protein. Generally, the specimen is added to a surface, on which are immobilized antibodies specific to the protein of interest. If the protein is present, it will bind to the attached antibody layer. The presence of the bound protein is then verified with antibodies that have been tagged with an enzyme, which causes the specimen to change color corresponding to the concentration of the target protein.

Merkel cells: Merkel cells (MC) are universally present in the skin of vertebrates at a low frequency. They are found particularly in sensitive and tactile areas, where, in majority they come into contact with sensory neurons and have thus been associated with the

sense of discrimination between shapes and textures. Merkel cells belong to the neuroendocrine system as they secrete a wide spectrum of hormones and neurotransmitters. They can turn malignant and are then responsible for the development of the skin tumor known as Merkel cell carcinoma.

qPCR (quantitative polymerase chain reaction): Quantitative polymerase chain reaction (qPCR), also known as real-time PCR, consists of detecting PCR products as they accumulate. It can be applied to gene expression quantification by reverse transcription of RNA into cDNA, thus receiving the name of quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). In spite of its name, quantitative, results are usually normalized to an endogenous reference. Current devices allow the simultaneous assessment of many RNA sequences.

VLPs: Virus-like particles (VLPs) are structures resembling viruses. VLPs are obtained by self-assembly of the viral capsid and/or envelope proteins, when expressed in heterologous systems including mammalian, insect, yeast and plant cells. VLPs did not contain any genetic material from the parental virus and are thus non-infectious, but their structural and antigenic properties are very similar to the wild-type viral particle. VLPs are used to develop serologic assays and vaccines for non-cultivable viruses.

Troisième partie
RESULTATS, DISCUSSION
ET REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1 : Détection du génome viral de MCPyV

Dans leur étude princeps, Feng *et al* ont observé la présence du génome de MCPyV dans 8 sur 10 cas de MCC américains (Feng, Shuda *et al.* 2008).

Le premier objectif de notre travail de thèse était de confirmer ces résultats préliminaires suggérant que l'ADN de MCPyV était fréquemment décelé dans les MCC, en étudiant des cas en nombre supérieur et d'origine géographique différente.

Les échantillons analysés provenaient des collections biologiques de notre laboratoire et de celles des équipes des Dr Xavier Sastre-Garau et Pierre Coursaget.

La détection du génome viral a été effectuée dans le laboratoire chez les sujets atteints de MCC (à l'exception de 10 cas) et par les membres de l'équipe du Dr Xavier Sastre-Garau chez les sujets contrôles.

1. Prévalence de l'ADN de MCPyV dans les échantillons biopsiques de MCC

1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

1.1.1. Bref rappel méthodologique

Nous avons étudié la présence de séquences nucléotidiques de MCPyV dans des échantillons biopsiques de MCC congelés ou inclus en paraffine. La présence d'un pourcentage élevé (> 60 %) de cellules tumorales dans les biopsies a été vérifiée systématiquement dans l'étude préliminaire, mais uniquement pour une fraction des cas dans les études suivantes.

Nous avons utilisé deux techniques de PCR en temps réel. Dans l'étude préliminaire, nous avons effectué, à partir de 10 nanogrammes (ou ng) d'ADN extrait, 40 cycles d'amplification à l'aide de 3 jeux d'amorces spécifiques des gènes ST, LT et VP1 amplifiant des amplicons de 165 à 204 pb. Dans les 2 études suivantes, à partir de 50 à 100 ng d'ADN extrait, nous avons réalisé 50 cycles de PCR avec un jeu d'amorces et de sonde spécifiques d'un fragment de 91 pb du gène LT.

1.1.2. Résultats

Nous avons décelé de l'ADN viral dans 13/13 biopsies de 10/10 cas dans l'étude préliminaire, dans 41/43 (95 %) biopsies de 31/33 (94 %) cas – incluant 6 cas communs à l'étude préliminaire – dans la deuxième étude et dans 66/68 (97 %) cas – incluant 22 cas de la deuxième étude – dans la troisième étude. Nous avons donc observé de l'ADN de MCPyV dans la quasi-totalité des cas de MCC. Cela confirmait que MCPyV constituait un agent étiologique potentiel de ce cancer.

Les résultats étaient concordants – tous positifs – dans les prélèvements multiples d'un même sujet dans 2 cas, biopsies de tumeur primitive et de 2 métastases à distance pour l'un et biopsies de 2 métastases locorégionales survenues à quelques mois d'intervalle pour l'autre. Cette concordance suggérait que si le virus était impliqué dans le développement des cellules tumorales de MCC, le virus intervenait précocement dans le développement de la maladie et perdurait dans le temps.

Des résultats négatifs ont été obtenus avec 2 échantillons correspondant à 2 cas, l'un de ces échantillons correspondant à une biopsie congelée provenant d'une tumeur primitive. La qualité de l'ADN extrait à partir de ces échantillons a été vérifiée par amplification d'un gène cellulaire puis l'absence d'ADN viral a été confirmée par PCR standard à l'aide de 2 jeux supplémentaires d'amorces amplifiant des séquences de 309 et 352 pb des gènes LT et VP1 respectivement. Nous avons donc démontré que l'ADN de MCPyV n'était pas présent dans tous les cas de MCC au diagnostic de la maladie.

Comme nous le discuterons à la fin de la troisième partie du manuscrit, nous pouvons formuler deux hypothèses – non exclusives l'une de l'autre – pour expliquer cette absence de génome viral dans une minorité des cas : le MCC serait une pathologie plurifactorielle avec une fraction de cas non liés au virus ; ou bien MCPyV jouerait un rôle dans l'initiation de la maladie mais ne serait pas indispensable à son maintien et serait secondairement éliminé.

1.2. Revue de la littérature

1.2.1. Résultats publiés dans la littérature

La présence d'ADN de MCPyV dans les MCC a été étudiée de manière extensive. En dehors de l'étude princeps et de notre travail, 47 études incluant plus 1300 cas de MCC cutanés ou de métastases extra cutanés sans tumeur primitive identifiée de 13 pays de 4 continents au total. La liste complète de ces études est présentée dans le tableau n° 3 (Andres, Belloni *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*; de Biase, Ragazzi *et al.*; Foulongne, Dereure *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.*; Haitz, Rady *et al.*; Handschel, Muller *et al.*; Houben, Schrama *et al.*; Imajoh, Hashida *et al.*; Jung, Choi *et al.*; Khan, Philip *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Loyo, Schussel *et al.*; Mangana, Dziunycz *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Nakamura, Sato *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*; Paulson, Iyer *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Toracchio, Foyle *et al.*; Viscidi, Rollison *et al.*; Wieland, Silling *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.* 2008; Kassem, Schopflin *et al.* 2008; Andres, Belloni *et al.* 2009; Becker, Houben *et al.* 2009; Busam, Jungbluth *et al.* 2009; Carter, Paulson *et al.* 2009; Duncavage, Zehnbaue *et al.* 2009; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Helmbold, Lahtz *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Koljonen, Kukko *et al.* 2009; Nakajima, Takaishi *et al.* 2009; Paulson, Lemos *et al.* 2009; Ridd, Yu *et al.* 2009; Sihto, Kukko *et al.* 2009; Touze, Gaitan *et al.* 2009; Varga, Kiss *et al.* 2009; Wetzels, Hoefnagel *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

Des taux de détection du génome viral compris entre 40 (2 études) et 100 % (8 études) ont été rapportés, avec un taux moyen de détection de 75 % (ou 1026/1374 échantillons).

Des résultats concordants obtenus à partir de lésions tumorales distinctes d'un même sujet ont de plus été observés par 9 équipes (Bhatia, Goedert *et al.*; Haitz, Rady *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Nakajima, Takaishi *et al.* 2009; Paulson, Lemos *et al.* 2009; Varga, Kiss *et al.* 2009; Wetzels, Hoefnagel *et al.* 2009).

Enfin, deux équipes ont observé des résultats négatifs à partir d'échantillons congelés de MCC, l'absence d'ADN viral ayant été vérifiée à l'aide de multiples techniques incluant des techniques ultrasensibles de PCR en temps réel dans 2/5 de ces cas (Viscidi, Rollison *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009).

Les résultats de la littérature sont donc cohérents avec nos résultats, à ceci près que le taux de prévalence moyen est légèrement inférieur au notre.

De cet ensemble de données publiées, il ressort cependant une grande variabilité – du simple à plus du double – des taux de détection de l'ADN. Cette variabilité pourrait révéler une hétérogénéité réelle de la pathologie, ce que nous discuterons dans un chapitre à la fin de cette troisième partie. Mais cette variabilité des résultats est très probablement liée au moins en partie à la grande diversité des protocoles utilisés dans la littérature.

1.2.2. Variabilité des méthodes utilisées dans la littérature

1.2.2.1. Variabilité de la qualité des échantillons biopsiques

Le pourcentage de cellules tumorales présentes dans les biopsies analysées – rarement mentionné dans les études de la littérature –, ainsi que le mode de conservation des biopsies – précisé dans 41/47 études – peuvent influencer sur les résultats. En effet, un pourcentage faible de cellules tumorales et/ou une dégradation de l'ADN – plus fréquente dans les biopsies incluses en paraffine – dans l'échantillon peuvent générer des résultats faux négatifs. Duncavage *et al* ont ainsi mentionné un cas probable de résultat faux-négatif obtenu à partir d'un échantillon de tumeur primitive d'un cas alors que de l'ADN a été amplifié à partir de la biopsie de reprise d'exérèse tumorale (Duncavage, Zehnbauer *et al.* 2009).

Dans la quasi totalité (39/41) des études, des biopsies incluses en paraffine ont été analysées, en raison de la rareté de la pathologie et la difficulté d'accéder à du matériel congelé. Certaines équipes ayant utilisé exclusivement des échantillons conservés en paraffine ont observé des taux de détection élevés : à titre d'exemple, Sihto *et al* ont rapporté 80 % de résultats positifs à partir de 90 prélèvements (Sihto, Kukko *et al.* 2009). Cependant, la moyenne des taux rapportés dans les 32 études ayant étudié exclusivement des prélèvements inclus en paraffine était légèrement inférieure à celle des taux observés dans les 2 études ayant utilisé exclusivement des prélèvements congelés (82 % versus 71 %). Parmi les 8 équipes ayant utilisé les deux types de biopsies, 3 ont comparé les taux de détection dans les 2 types de prélèvements et ceux-ci étaient soit comparables (Paulson, Lemos *et al.* 2009), soit plus faibles pour les prélèvements en paraffine (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Touze, Gaitan *et al.* 2009). Par conséquent, il semble que l'utilisation d'échantillons en paraffine soit responsable d'un biais avec une diminution des taux de détection mais celle-ci est modeste.

La quantité d'ADN extrait utilisée variait quant à elle de plus d'un log (10 à 600 ng) selon les études. Mais étant donné que les prévalences dans les études ayant utilisé 50 ng ou moins étaient comparables à celles des études ayant utilisé 100 ng ou plus, cette variable ne semble pas avoir introduit de biais.

s	Publication	Continent	Pays	Paraffine	Quantité d'ADN (ng)	Nombre de cycles de PCR	Taille des amplicons	Séquence(s) virale(s)	Confirmation de la spécificité des amplicons	Nombre de techniques	ADN +	ADN -	% ADN +
1	Toracchio S Foyle A 2010	Amérique du Nord	Canada	Paraffine	Non précisé	40+45	70-126	ST, LT	Séquençage	2	2	2	50
2 et 3	Bhatia K Goedert J IJC 2010 Bhatia K Goedert J IJC 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine	10	40	96	ST	Non	1	19	6	76
4	Busam K Jungbluth A 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	Congelé	Non précisé	40	87, 92	NCCR, VP2	Non	2	15	2	88
5	Carter J Paulson K 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine et congelé	Non précisé	Non précisé	130-140	ST et LT	Digestion enzymatique	2	24	7	77
6	Haitz KA Rady PL 2012	Amérique du Nord	Etats-Unis	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	2	0	100
7	Loyo M Guerrero-Preston R 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine et congelé	150	Non précisé	154-160	LT, VP1	Séquençage	2	6	1	86
8	Loyo M Schussel J 2012	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine	150	Non précisé	154-160	LT, VP1	Séquençage	2	16	1	94
9	Paulson K Iyer J 2011	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine et congelé	Non précisé	Non précisé	130-140	ST, LT	Digestion enzymatique	2	59	21	74
10	Paulson K Lemos B 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine et congelé	Non précisé	Non précisé	130-140	ST, LT	Digestion enzymatique	2	16	24	40
11	Duncavage EJ Zehnbauser BA 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	Paraffine	100	35	109-440	LT	Séquençage	3	32	9	78
12	Garneski KM Warcola AH 2008	Amérique du Nord, Océanie	Etats-Unis, Australie	Non précisé	Non précisé	Non précisé	130-140	ST, LT	Digestion enzymatique	2	18	21	46
13	Schrama D Peitsch W 2011	Amérique du Nord, Océanie, Europe	Etats-Unis, Australie, Allemagne	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	149	25	86
14	Jung HS Choi YL 2011	Asie	Corée du Sud	Abstract	Non précisé	Non précisé	Non précisé	ST, LT et VP1	Séquençage	7	12	2	86
15	Woo KJ Choi YL 2010	Asie	Corée du Sud	Paraffine	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	7	0	100
16	Imajoh M Hashida Y 2012	Asie	Japon	Paraffine	500	40	96	ST	Non	1	9	0	100
17	Katano H Ito H 2009	Asie	Japon	Paraffine	100	35 + 25	138-166	ST, LT, VP1-3	Séquençage	7	7	6	54
18 et 19	Kuwamoto S Higaki H 2011 Higaki-Mori H Kuwamoto S 2012	Asie	Japon	Paraffine	20	40	76, 109, 130 et 309	ST et LT	Non	4	24	6	80
20	Nakajima H Takaiishi M 2009	Asie	Japon	Non précisé	Non précisé	35	309-440	ST, LT VP1	Non	3	11	3	79
21	Nakamura T Sato Y 2010	Asie	Japon	Paraffine	Non précisé	40	77	LT	Non	1	11	8	58
22	Ota S Ishikawa S 2012	Asie	Japon	Paraffine	40	35 + 25	138-166	ST, LT, VP1-3	Séquençage	8	9	0	100
23	Wen-Tsao H Te Peng Tseng J 2010	Asie	Taiwan	Paraffine	Non précisé	40	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	1	0	100
24 et 25	Etres C Belloni B 2009 Etres C Belloni B 2009	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	45	138, 191	LT	Southern Blot	2	21	12	64

	Publication	Continent	Pays	Paraffine	Quantité d'ADN (nano grammes)	Nombre de cycles de PCR	Taille des amplicons	Séquence(s) virale(s)	Confirmation de la spécificité des amplicons	Nombre de techniques	ADN +	ADN -	% ADN +
26	Becker JC Houben S 2009	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	Non précisé	Non précisé	LT	Sonde	1	45	8	85
27	Hetschel J Muller D 2010	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	40	308-439	ST, LT et VP1	Non précisé	3	34	25	58
28	Helmhold P Lahtz C 2009	Europe	Allemagne	Paraffine	100-600	40	195	LT	Séquençage	1	90	8	92
29	Houben R Schrama D 2010	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	43	7	86
30	Kassem A Schopflin A 2008	Europe	Allemagne	Paraffine	120	31	178-440	ST,LT, VP1	Séquençage	4	30	9	77
31	Khan G Philip PS 2012	Europe	Allemagne	Paraffine	200	40	141	LT	Séquençage	1	4	2	67
32	Mertz KD Junt T 2009	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	40	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	1	0	100
33	Ridd K Yu S 2009	Europe	Allemagne	Paraffine	50	31	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	7	6	54
34	Wielet U Mauch C 2009	Europe	Allemagne	Non précisé	Non précisé	35 et 35+35	100-300	LT	Séquençage	2	35	4	90
35	Wielet U Scola NL 2012	Europe	Allemagne	Paraffine	Non précisé	31+31	357	NCCR	Non	1	37	6	86
36	Koljonen V Kukko H 2009	Europe	Finlande	Paraffine	50	50	308, 351 et 439	ST, LT et VP1	Séquençage	3	5	0	100
37 et 38	Sihto H Kukko H JNCI 2009 et Waltari M Sihto H 2010	Europe	Finlande	Paraffine	50	45+50	74-440	ST, LT et VP1	Séquençage	4	91	23	80
39 et 40	Foulongne V Kluger N 2008 et Foulongne V Dereure O 2009	Europe	France	Paraffine et congelé	Non précisé	35	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	9	2	82
41	Martel-Jantin C Filippone C 2012	Europe	France	Paraffine et congelé	40-500	45	165-308	ST et LT	Séquençage	2	70	43	62
42	Touze A Gaitan J 2009	Europe	France	Paraffine et congelé	Non précisé	31+31	Non précisé	ST, VP1	Séquençage	2	21	11	66
43	Varga E Kiss M 2009	Europe	Hongrie	Paraffine	500	31	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	7	1	88
44	de Biase D Ragazzi M 2011	Europe	Italie	Paraffine	100	35	109-440	LT	Séquençage	2	18	0	100
45	Viscidi RP Rollison DE 2011	Europe	Italie	Congelé	17,5	40	138	LT	Non	1	6	3	67
46	Wetzels C Hoefnagel J 2009	Europe	Pays-bas	Non précisé	Non précisé	40	250	LT	Séquençage	1	3	4	43
47	Mangana J Dziunycz P 2009	Europe	Suisse	Paraffine	100-120	31	309-440	ST, LT et VP1	Séquençage	3	20	30	40
	Total										1026	348	75

Tableau n° 3 : Détection du génome viral dans les échantillons de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps.

1.2.2.2. Variabilité des techniques de détection de l'ADN

L'influence déterminante du type de PCR utilisée a été démontrée par une dizaine d'équipes ayant effectué des corrélations internes ayant montré des variations considérables de concordance de 13 à 90 % (Mangana, Dziunycz *et al.*; Sihto, Kukko *et al.* 2009).

Dans la littérature, 1 à 7 techniques ont été utilisées pour rechercher la présence de l'ADN viral. L'intérêt de l'utilisation de multiples méthodes de détection s'est avéré variable. A titre d'exemple, Kassem *et al* ont observé un gain de prévalence de 7 % (Kassem, Schopflin *et al.* 2008) alors que la technique la plus sensible permettait d'identifier tous les positifs dans d'autres études (Duncavage, Zehnbaauer *et al.* 2009; Sihto, Kukko *et al.* 2009). Nous pouvons en conclure que si la méthode de détection est adéquate, une technique unique est suffisante.

Le nombre de cycles d'amplification variait d'une série de PCR standard de 31 à 50 cycles jusqu'à deux séries de PCR nichée de 31 à 35 cycles. Toutes études confondues, la prévalence moyenne était significativement supérieure (86 % versus 68 %) dans les études ayant effectué plus de 35 cycles d'amplification.

Différents types d'amorces – et éventuellement de sondes – ont été utilisées, ciblant des fragments de 77 à 439 pb d'un ou plusieurs des 5 gènes viraux. Les études de corrélation ont montré que des différences majeures de taux de détection étaient imputables aux différences de séquences virales ciblées. Kassem *et al* ont observé des taux passant du simple au double en amplifiant le gène codant ST plutôt que LT ou VP1 (Kassem, Schopflin *et al.* 2008) et Duncavage *et al* 3 fois plus de positifs en amplifiant la séquence du gène LT codant la partie N terminale par rapport à l'extrémité C terminale (Duncavage, Zehnbaauer *et al.* 2009). Ces observations sont justifiées par le fait qu'au sein des tumeurs, comme nous le détaillerons ci-après, les différentes parties du génome viral ne sont pas présentes en quantité équivalente et sont fréquemment mutées.

A l'inverse, la prévalence a pu être surévaluée en raison d'un manque de spécificité des méthodes utilisées, puisque la spécificité des amplicons obtenus n'a pas été vérifiée – par digestion enzymatique, ou hybridation à l'aide d'une sonde ou séquençage – dans toutes les études. Or, des faux positifs ont été décrits avec les amorces de PCR dénommées LT3 et VP1 de l'étude princeps, qui ont été les amorces les plus fréquemment utilisées (Andres, Belloni *et al.*; Joh, Jenson *et al.*).

1.3. Conclusion

En conclusion, il ressort de l'analyse comparative de la littérature qu'une harmonisation des résultats pourrait être obtenue par l'utilisation d'une méthode unique de détection répondant à certains critères, tels qu'un nombre de cycles supérieur à 35 et l'amplification de séquences conservées – gène codant ST ou partie proximale de LT.

En dépit des différents biais introduits par les méthodes de détection, nos résultats et ceux de la littérature confirment que de l'ADN viral est présent dans en moyenne $\frac{3}{4}$ des cas de MCC. Cette dernière observation confirme que MCPyV pourrait être impliqué dans cette majorité de cas, à condition que l'association entre le MCC et la présence d'ADN de MCPyV soit spécifique. Dans leur étude princeps, Feng *et al* suggéraient que celle-ci l'était puisque, bien qu'ils aient amplifié de l'ADN viral dans certains échantillons de peau exempts de MCC et de tractus digestif, le pourcentage de positifs après analyse de tissus variés était faible 11 % ou 9/84 échantillons).

Nous avons souhaité confirmer le fait que le génome de MCPyV puisse être présent en dehors des MCC, et dans l'hypothèse où de l'ADN viral y était décelé, évaluer sa prévalence chez les sujets atteints et exempts de MCC.

2. Présence du génome viral de MCPyV dans des échantillons de tissus non tumoraux

2.1. Chez les sujets atteints de MCC

2.1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse.

Nous avons sélectionné les prélèvements à analyser en nous appuyant sur les sites de détection les plus fréquents décrits dans la littérature pour les autres Polyomavirus à tropisme humain. Au moins un échantillon respiratoire – écouvillon nasal – et/ou urinaire et/ou sanguin a été obtenu pour chaque cas inclus dans notre deuxième étude. Dans certains cas, plusieurs prélèvements séquentiels ont été recueillis.

La technique de détection de l'ADN que nous avons utilisée était identique à celle employée pour la recherche du génome de MCPyV dans les MCC.

Nous avons décelé la présence de séquences nucléotidiques virales, par ordre de fréquence décroissante, dans 27/28 (96 %), 22/38 (58 %) et 20/49 (41 %) échantillons respiratoires, urinaires et sanguins respectivement de 21/21, 18/28 (64 %) et 15/30 (50 %) cas respectivement. Chez les sujets ayant eu des prélèvements séquentiels, les résultats de détection étaient concordants dans les prélèvements respiratoires mais de l'ADN a été décelé de manière inconstante dans les échantillons urinaires et sanguins de certains sujets.

Nos résultats montraient donc que l'ADN viral était présent de manière extrêmement fréquente dans au moins 3 types de tissus et ce de manière chronique chez les sujets atteints de MCC. En particulier, la présence d'ADN dans les prélèvements respiratoires était tout aussi fréquente que dans les MCC. Nos observations démontraient donc que la détection d'ADN viral, même avec une fréquence élevée, n'était pas en soi spécifique aux MCC.

Ces résultats contrastaient avec la faible prévalence observée par Feng *et al* dans les tissus non tumoraux de sujets exempts de MCC. Bien que les auteurs n'aient pas étudié les mêmes tissus que nous, cette différence suggérait éventuellement que les sujets atteints de MCC étaient plus fréquemment infectés par MCPyV en dehors de la peau que les sujets exempts de cette pathologie.

2.1.2. Revue de la littérature

La présence de génome viral dans des prélèvements non tumoraux de sujets atteints de MCC a été peu étudiée dans la littérature. Les résultats sont résumés tableau n° 4.

Une étude a rapporté la présence de génome de MCPyV dans l'urine d'un cas, avec de l'ADN présent dans la fraction cellulaire – contenant des cellules desquamées de la muqueuse épithéliale vésicale –, confirmant la capacité de MCPyV d'infecter l'appareil uro-génital chez les sujets atteints de MCC que nous avons observée (Mertz, Junt *et al.*).

Quatre études ont décelé du génome viral dans le sang de 6/24 (25 %) cas au total, avec des taux de détection variant de 8 à 100% (2 études) selon les équipes, en cohérence avec nos résultats montrant une présence relativement fréquente mais inconstante de l'ADN viral dans le sang (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Wieland, Mauch *et al.* 2009). En outre, Mertz *et al* ont montré que dans leur cas positif l'ADN viral était présent à la fois dans le sérum et dans les monocytes inflammatoires circulants.

Ces études confirmaient donc notre observation du fait que chez les sujets atteints de MCC, l'infection par MCPyV n'était pas limitée à la peau.

Six études de la littérature ont démontré que l'ADN de MCPyV était en outre fréquemment présent dans la peau en dehors du cancer chez les sujets atteints de MCC, avec de l'ADN viral dans 15/49 (31 %) biopsies de peau – saine ou porteuse de lésion bénigne – de 14/30 (47 %) cas, les taux de détection dans les échantillons variant de 4 à 100 % (4/6 études). Foulongne *et al* ont montré que le virus infecte probablement toute la surface cutanée puisque de l'ADN était décelé à la fois au niveau du visage, du tronc et des membres supérieurs et inférieurs de la quasi-totalité de leur 5 cas, avec des résultats positifs dans 27/29 (93%) écouvillons cutanés (Foulongne, Kluger *et al.*).

Tous ces prélèvements (biopsies ou écouvillons) cutanés n'ayant pas tous été réalisés alors que les sujets avaient une maladie active, ces résultats confirment également le caractère chronique de l'infection par MCPyV.

Publications	Nature de l'échantillon	Echantillons positifs/totaux (%)	Cas positifs/totaux (%)
Mertz KD Junt T 2009	Urines	1/1	1/1
Martel-Jantin C Filippone C 2012	Sang	2/8	2/8
Tolstov YLPastrana DV 2009	Sang	2/2	2/2
Mertz KD Junt T 2009	Sang	1/1	1/1
Wieland U Mauch C 2009	Sang	1/13 (8 %)	1/13 (8 %)
Total	Sang	6/24 (25 %)	6/24 (25 %)
Bhatia K Goedert J 2010	Peau (biopsies)	1/26 (4%)	1/13 (17 %)
Foulongne V Dereure O 2009	Peau (biopsies)	10/14 (71 %)	10/14 (71 %)
Mertz KD Junt T 2009	Peau (biopsies)	2/3 (67 %)	1/1
Ho WT Te Peng Tseng J 2010	Peau (biopsies)	1/1	1/1
Wieland U Mauch C 2009	Peau (biopsies)	1/5 (20 %)	1/1
Total	Peau (biopsies)	15/49 (31 %)	14/30 (47 %)
Foulongne V Kluger N 2010	Peau (écouvillons)	27/29 (93 %)	5/5

Tableau n° 4 : Détection de l'ADN viral en dehors des MCC chez les sujets atteints de MCC d'après les données de la littérature

En conclusion, nos résultats et ceux de la littérature suggèrent que MCPyV infecte de manière chronique et diffuse les sujets atteints de MCC, dans la peau et en dehors de la peau. Il était donc important de déterminer si cela était spécifique des sujets atteints de MCC ou si l'infection par MCPyV était au contraire répandue dans la population générale.

2.2. Chez les sujets exempts de MCC

2.2.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Nous n'avons étudié la présence du génome de MCPyV chez 6 sujets exempts de MCC. Nous n'avons pas décelé d'ADN viral dans 6 biopsies de tissu sain ou provenant de lésions bénignes.

Ces résultats suggéraient que l'infection active cutanée par MCPyV était moins fréquente chez les sujets exempts de MCC mais le caractère très limité de cette partie du travail ne nous a pas permis de tirer de conclusion définitive.

En revanche, la présence de l'ADN viral dans la population générale a été abondamment étudiée dans la littérature.

2.2.2. Revue de la littérature

2.2.2.1. Prélèvements non tumoraux cutanéomuqueux

2.2.2.1.1. Prévalence globale

En dehors de notre travail et de l'étude princeps, le génome de MCPyV a été amplifié dans 182/1064 (17 %) biopsies cutanées de 18 études au total, avec des prévalences extrêmement variables de 0 (3/18 études) à 81 % (Andres, Belloni *et al.*; Faust, Pastrana *et al.*; Foulongne, Dereure *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.*; Kassem, Pantulu *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Mangana, Dziunycz *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Mogha, Fautrel *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*; Wieland, Silling *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.* 2008; Dworkin, Tseng *et al.* 2009; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Helmbold, Lahtz *et al.* 2009; Kassem, Technau *et al.* 2009; Ridd, Yu *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009). L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau n° 5.

Des taux de détection globalement supérieurs ont été observés à partir d'écouvillons cutanés, avec 451/744 (61 %) résultats positifs de 5 études au total, résumé dans le tableau n° 6 (Foulongne, Kluger *et al.*; Pastrana, Wieland *et al.*; Schowalter, Pastrana *et al.*; Wieland, Silling *et al.*; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

L'ADN viral est également présent dans les sourcils, avec une étude ayant obtenu 8/15 (63%) résultats positifs (Wieland, Mauch *et al.* 2009), et à la surface des muqueuses ano-génitales avec 18/49 (37 %) de résultats positifs dans une étude (Wieland, Mauch *et al.* 2009).

2.2.2.1.2. Association éventuelle avec des lésions cutanées bénignes

Trois équipes ont effectué une analyse comparative des fréquences de détection de l'ADN viral dans la peau saine et dans des lésions bénignes variées sans observer de différence, que ce soit à partir de biopsies ou d'écouvillons (Faust, Pastrana *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.*; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

Si l'on regroupe l'ensemble des données de la littérature, on observe un taux de détection de l'ADN supérieur dans les biopsies effectuées dans la peau saine en périphérie de lésions par rapport à la peau saine à distance (54/117 soit 46 % versus 50/471 soit 11 %). Mais cette différence est essentiellement due à la prévalence très élevée d'une étude (Martel-Jantin, Filippone *et al.*). En outre, aucune différence de fréquence n'est observée lorsque l'on compare les résultats obtenus avec les biopsies de lésions elles-mêmes par rapport à la peau saine (39/238 soit 16 % versus 50/471 soit 11 %) ou encore les écouvillons de lésions par rapport aux écouvillons de peau saine (58/78 ou 74 % versus 367/617 ou 59 %). Les différentes lésions bénignes analysées étaient constituées de kératoses séborrhéiques, de kérato-acanthomes, de papillomes, de verrues, de naevi, de *trichodysplasia spinulosa* et enfin de psoriasis.

2.2.2.1.3. Rôle de l'immunodépression

Des résultats contradictoires ont été publiés sur le fait que les taux de détection de l'ADN de MCPyV dans les biopsies et les écouvillons soient supérieurs ou non chez l'immunodéprimé (Wieland, Silling *et al.*; Kassem, Technau *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

2.2.2.1.4. Origine de l'ADN décelé et aspects de l'infection cutanée

Une équipe a fait mention de deux observations qui permettent de supposer que l'ADN décelé dans la peau correspond au moins en partie à du virus excrété : i) l'amplification de génome viral complet sous forme circulaire dans les écouvillons cutanés de 15 sujets et à plusieurs reprises à 3 mois d'intervalle chez 5 (30%) d'entre eux ; ii) et la mise en évidence d'ADN viral dans des fractions correspondant à de l'ADN associé à des protéines après traitement à la DNase et ultracentrifugation des prélèvements (Schowalter, Pastrana *et al.*).

Trois autres études ont démontré que dans la population générale, l'excrétion d'ADN de MCPyV dans la peau présente, comme c'est le cas chez les sujets atteints de MCC, un caractère diffus et chronique (Faust, Pastrana *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Pastrana, Wieland *et al.*). Pastrana *et al.* ont en particulier effectué des échantillonnages d'un à dix sites cutanés dans un intervalle de 3 mois à 4 ans et ont obtenu des résultats positifs multiples et itératifs chez la quasi-totalité (45/48 soit 94 %) des sujets.

2.2.2.1.5. Conclusion

Ces données de la littérature montrent donc que la présence d'ADN de MCPyV dans la peau n'est pas restreinte aux sujets atteints de MCC mais au contraire répandue dans la population générale. Elle ne semble pas plus fréquente chez les sujets présentant des pathologies cutanées bénignes mais pourrait l'être en revanche chez les immunodéprimés. L'infection cutanée semble de plus revêtir un caractère chronique et diffus chez les sujets atteints de MCC comme dans la population générale.

Publications		Nombre d'échantillons positifs/totaux (%)									
		Tout confondu	Peau saine		Lésion bénigne						
			A distance de toute lésion	En périphérie de lésion	Toute lésion confondue	Kératose séborrhéique	Kérato-acanthome	Naevus	Papillome et verrue	Psoriasis	Trichodysplasie spinulosa
1	Andres C Belloni B 2009				2/12 (27%)						
2	Dworkin AM Tseng SY 2009		11/63 (17%)								
3	Faust H Pastrana D 2011		38/385 (9%)		12/61 (20%)						
4	Foulongne V Dereure O 2008			4/18 (22 %)					1/10 (10 %)		
5	Foulongne V Dereure O 2009		3/24 (13 %)								
6	Foulongne V Kluger N 2010				0/15						
7	Garneski KM Warcola AH 2008		0/15								
8	Helmbold P Lahtz C 2009			3/18 (17%)							
9	Kassem A Pantulu D 2010									12/42 (19 %)	
10	Loyo M Guerrero-Preston R 2010		7/9 (78 %)								
11	Mangana J Dziunycz P 2009		0/11								
12	Martel-Jantin C Filippone C 2012			26/32 (81%)							
13	Mertz KD Junt T 2009		0/7		2/3 (67 %)				0/16		
14	Mogha A Fautrel A 2010		2/20 (10 %)								
15	Ota S Ishikawa S 2012				0/5		0/5				
16	Ridd K Yu S 2009					1/37 (3 %)					
17	Wieland U Mauch C 2009			8/34 (24 %)		3/7 (43 %)		6/25 (24 %)			
18	Wieland U Silling S 2011			2/12 (17%)							
Total		182/1064 (17 %)	50/471 (11 %)	54/117 (46 %)	39/238 (16 %)	16/96 (17 %)	4/44 (11 %)	0/5	6/25 (24 %)	1/26 (4 %)	12/42 (19 %)

Tableau n° 5 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps

Publications	Echantillons positifs/totaux (%)				
	Tout écouvillon	Ecouvillons			Sourcils
		Peau saine	Peau lésée	Muqueuse ano-génitale	
1 Foulongne V Kluger N 2010		56/70 (80 %)	58/78 (74 %)		
2 Pastrana DV Wieland U 2011		46/49 (94 %)			
3 Schowalter RM Pastrana DV 2010		14/35 (40 %)			
4 Wieland U Mauch C 2009		9/14 (64 %)		18/49 (37 %)	8/15 (53%)
5 Wieland U Silling S 2011		242/449 (45 %)			
Total	451/744 (61 %)	367/617 (59 %)	58/78 (74 %)	18/49 (37 %)	8/15 (53%)

Tableau n° 6 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des écouvillons de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps

2.2.2.2. Echantillons non cutanéomuqueux

2.2.2.2.1. Appareil respiratoire

Des séquences nucléotidiques de MCPyV ont été recherchées par six équipes chez des sujets présentant des signes d'infection respiratoire. Les résultats obtenus sont présentés tableau n° 7.

De l'ADN a été décelé dans 169/2551 (7 %) prélèvements respiratoires –écouvillons nasaux, aspirations naso-pharyngées et lavages broncho-alvéolaires –, de 6 études au total avec des taux de détection variant de 0,01 à 17 % (Abedi Kiasari, Valley *et al.*; Babakir-Mina, Ciccozzi *et al.*; Bialasiewicz, Whiley *et al.* 2009; Goh, Lindau *et al.* 2009; Kantola, Sadeghi *et al.* 2009; Sharp, Norja *et al.* 2009).

Des prévalences comparables – entre 0 (1/3 études) et 14 % – du génome de MCPyV ont été obtenues à partir de biopsies pulmonaires avec 4/51 (8 %) résultats positifs de 3 études au total (Joh, Jenson *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Katano, Ito *et al.* 2009).

Ces résultats contrastent nettement avec notre observation de la présence d'ADN de MCPyV dans l'appareil respiratoire de la quasi-totalité des sujets atteints de MCC.

Publications		Echantillons positifs/totaux (%)	
		Écouvillons nasaux, aspirations naso-pharyngées et lavages broncho-alvéolaires	Biopsies
1	Abedi Kiasari B Valley PJ 2011	16/305 (5 %)	
2	Babakir-mina M Ciccozzi M 2010	15/87 (17 %)	
3	Bialasiewicz S Lambert SB 2009	31/ 526 (6 %)	
4	Goh S Lindau C EID 2009	101/635 (16 %)	
5	Joh J, Bennett Jenson A 2010		3/21 (14 %)
6	Kantola K Sadeghia M 2009	5/246 (2 %)	
7	Katano H, Ito H 2009		0/15
8	Loyo M, Guerrero-Preston R 2010		1/15 (7%)
9	Sharp CP Norja P JID 2008	1/752 (0,01 %)	
	Total	169/2551 (7 %)	4/51 (8 %)

Tableau n° 7 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des échantillons respiratoires de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature

2.2.2.2.2. Appareil génito-urinaire

Le génome de MCPyV a été décelé dans 2/69 (3 %) urines de 3 études au total avec des taux de détection variant de 0 (2/4 études) à 13 % et dans aucun cas après analyse de 51 biopsies – vésicales, rénales et prostatiques – au total de 3 autres études (Dang, Bialasiewicz *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Bluemn, Paulson *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009). Ces résultats sont résumés dans le tableau n° 8.

Publications	Echantillons positifs/totaux (%)				
	Urines	Biopsies			
		Tout confondu	Vessie	Rein	Prostate
1 Bluemn EG Paulson KG 2009					0/28
2 Dang X Bialasiewicz S 2011	0/47				
3 Katano H Ito H 2009				0/14	
4 Loyo M Guerrero-Preston R 2010			0/2		
5 Mertz KD Junt T 2009	1/8 (13%)				
6 Wieland U Mauch C 2009	1/14 (7%)				
Total	2/69 (3 %)	0/44	0/2	0/14	0/28

Taleau n° 8 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des échantillons respiratoires de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature à l'exception de l'étude princeps

Ces taux de détection chez les individus sains sont donc au moins trois fois inférieurs à ceux que nous avons observés chez les sujets atteints de MCC.

2.2.2.2.3. Tissu hématopoïétique

Le génome de MCPyV a été mis en évidence dans 32/1382 (2 %) échantillons sanguins de 15 études au total avec des prévalences variant de 0 (7/15 études) à 22%. De l'ADN viral a de plus été décelé dans 20/480 (4 %) biopsies d'organes lymphoïdes de 5 études au total avec des taux de détection de 0 (2/5 études) à 10 %. Ces résultats sont résumés tableau n° 9 (Bhatia, Modali *et al.*; Comar, Cuneo *et al.*; Dang, Bialasiewicz *et al.*; Imajoh, Hashida *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Pancaldi, Corazzari *et al.*; Pantulu, Pallasch *et al.*; Toracchio, Foyle *et al.*; Kassem, Schopflin *et al.* 2008; Duncavage, Zehnbaue *et al.* 2009; Helmbold, Lahtz *et al.* 2009; Helmbold, Lahtz *et al.* 2009; Kantola, Sadeghi *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Sharp, Norja *et al.* 2009; Shuda, Arora *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

Une étude suggérait que la prévalence de l'ADN de MCPyV chez l'immunodéprimé pourrait être plus élevée que chez l'immunocompétent (Shuda, Arora *et al.* 2009).

Le fait que les taux de détection soit en moyenne plus élevés dans les fractions cellulaires et le sang total que dans le sérum suggère que l'ADN viral serait principalement intracellulaire chez les individus témoins, comme cela a été proposé pour les sujets atteints de MCC.

Les taux de détection sont donc trois fois inférieurs à ceux que nous avons observés chez les sujets atteints de MCC.

2.2.2.2.4. Autres tissus

Le génome de MCPyV ne semble pas présent dans les selles (Kantola, Sadeghi *et al.* 2009) mais il a été décelé dans des lavages buccaux et la salive avec 1/12 (ou 8 %) et 10/10 résultats positifs respectivement. Dans des prélèvements biopsiques – de tractus digestif, foie et pancréas – la prévalence variait de 0 (1 étude) à 30 % avec de l'ADN décelé dans 15/139 (11 %) biopsies de 3 études au total (Campello, Comar *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Dworkin, Tseng *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009).

MCPyV semble quasiment absent du système nerveux central puisqu'il n'a été mis en évidence que dans un échantillon de liquide céphalo-rachidien (ou LCR) après analyse de 91 LCR et 72 biopsies cérébrales de 6 études au total (Dang, Bialasiewicz *et al.*; Lam, Leung *et al.*; Rubin, Giraud *et al.*; Focosi, Maggi *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

Pour finir, Matsushita *et al.* ont recherché de l'ADN de MCPyV de manière systématique dans l'organisme après autopsie d'une trentaine d'adultes. Leurs résultats montrent que le virus infecte la population de façon quasi-ubiquitaire avec du génome décelé chez trois quart des sujets (29/39 ou 74 %). Leurs résultats montrent également que le virus est capable d'infecter une variété de tissus plus grande encore que ceux susmentionnés, avec la détection de séquences nucléotidiques notamment dans les tissus glandulaire (thyroïde et glandes surrénales) et vasculaire (aorte et coeur) (Matsushita, Kuwamoto *et al.*).

2.2.2.2.5. Conclusion

Comme c'est le cas chez les sujets atteints de MCC, MCPyV est capable d'infecter la population générale dans une variété de tissus en dehors de la peau.

L'analyse comparative de nos résultats et de ceux de la littérature suggère cependant que si la présence d'ADN viral au niveau de la peau est banale dans la population générale, sa présence dans l'appareil génito-urinaire et le tissu sanguin est plus spécifique (mais non exclusive) des sujets atteints de MCC. Cela nous permet de formuler l'hypothèse que les sujets atteints de MCC présentent un défaut de contrôle de l'infection par MCPyV, favorisant une répllication chronique à bas bruit en dehors du réservoir tissulaire principal qu'est la peau.

Nous avons donc souhaité déterminer si les sujets atteints de MCC présentaient un défaut de contrôle spécifique de l'infection par MCPyV ou bien des infections par les Polyomavirus humains en général.

3. Présence de l'ADN de BKPyV et JCPyV chez les sujets atteints de MCC

Nous avons recherché la présence d'ADN de BKPyV et JCPyV dans les échantillons respiratoires, urinaires et sanguins des sujets atteints de MCC inclus dans notre deuxième étude.

Nous avons employé pour ce faire une technique comparable à celle utilisée pour le génome de MCPyV, par PCR en temps réel à l'aide de jeux d'amorces et de sondes spécifiques de ces virus.

De l'ADN a été amplifié dans 9 % des échantillons respiratoires pour les 2 virus, et dans 31 et 7 % urines et 3 et 6 % des échantillons sanguins pour BKPyV et JCPyV respectivement. Ces taux sont donc comparables à ceux de la population générale et très inférieurs à ceux que nous avons obtenus pour MCPyV dans les mêmes types de prélèvements.

4. Conclusion

Nos résultats et les données de la littérature montrent que MCPyV est un virus quasi-ubiquitaire capable d'infecter une grande variété de tissus, chez les sujets atteints de MCC comme chez les sujets exempts de cette pathologie. Chez les deux types d'individus, la peau constitue probablement le réservoir principal de virus. En dehors de la peau, une infection productive à MCPyV avec des taux décelables pourrait être plus fréquemment – mais pas exclusivement – observée chez les sujets atteints de MCC, ce qui n'est pas le cas des autres Polyomavirus. Ceci permet de supposer que le développement du MCC pourrait être lié à une capacité moindre de certains sujets atteints de MCC à contrôler la réplication de MCPyV.

Nos résultats et les données de la littérature permettent également de conclure que la détection d'ADN de MCPyV chez les sujets atteints de MCC ne peut suffire à attribuer la pathologie au virus. Afin d'impliquer formellement MCPyV, il apparaissait crucial à ce stade du travail de mettre en évidence des marqueurs distinctifs entre les 2 types d'infections, asymptomatique dans la population générale et transformante chez les sujets atteints de MCC. Bien que l'étude princeps sur la découverte de MCPyV n'ait fourni aucun élément de quantification virale, nous avons émis l'hypothèse que l'un de ces marqueurs distinctifs pouvait être la quantité d'ADN viral présent dans les MCC.

Publications	Echantillons positifs/totaux (%)									
	Prélèvements sanguins				Biopsies					
	Tout confondu	Serum	Sang total	Cellules mononuclées du sang	Tout confondu	Ganglion	Amygdale	Rate	Moelle osseuse	
1	Bhatia Modali R 2010			0/20						
2	Comar M Cuneo A 2012		0/80							
3	Dang X Bialasiewicz S 2011		0/13						0/13	
4	Duncavage EJ Zehnbauer BA 2009		0/40							
5	Helmbold P Lahtz C 2009			0/18						
6	Helmbold P Lahtz C 2009		1/26 (4 %)							
7	Imajoh M Hashida Y 2012		1/18							
8	Kantola K Sadeghia M 2009	1/840 (0,1 %)					8/229 (4%)			
9	Kassem A Schopflin A 2008		0/45							
10	Katano H Ito H 2009					0/12		0/19		
11	Martel-Jantin C Filippone C 2012			1/10 (10 %)						
12	Mertz KD Junt T 2009		1/14 (7 %)							
13	Pancaldi C Corazzari V 2011			13/60 (22 %)						
14	Pantulu N Pallasch C 2011		11/82 (13 %)							
15	Sharp CP Norja P 2008					0/11		1/86 (1 %)		
16	Shuda M Arora R 2009		1/10	2/105 (2 %)						
17	Toracchio S Foyle A 2010					11/110 (10 %)				
18	Wieland U Mauch C 2009		0/1							
	Total	32/1382 (2 %)	1/840 (0,1 %)	15/329 (5 %)	16/213 (8 %)	20/480 (4 %)	11/133 (8 %)	8/229 (4%)	1/105 (1 %)	0/13

Tableau n° 9 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de peau non tumorale de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature en dehors de l'étude princeps

Chapitre 2 : Quantification du génome de MCPyV

Les résultats de cette partie du travail ont été publiés successivement dans les trois articles présentés.

Les échantillons analysés provenaient des collections biologiques de notre laboratoire et des équipes du Dr Xavier Sastre–Garau et du Dr Pierre Coursaget.

La quantification du génome viral a été effectuée dans le laboratoire chez les sujets atteints de MCC (à l'exception de 10 cas) et par les membres de l'équipe du Dr Xavier Sastre–Garau chez les sujets contrôles.

1. Quantification du génome de MCPyV dans les MCC

1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

1.1.1. Bref rappel méthodologique

Nous avons quantifié le génome viral avec les techniques de PCR en temps réel que nous avons utilisées pour la détection de l'ADN de MCPyV, puisqu'il s'agissait de méthodes quantitatives.

Pour chaque échantillon, nous avons mesuré la quantité d'ADN viral et la quantité de cellules, cette dernière ayant été quantifiée à l'aide d'amorces et de sonde spécifiques d'un gène cellulaire.

Pour une fraction minoritaire des échantillons, le calcul de la charge virale en copies de génome viral par cellule (ou c/c) a été obtenu par la méthode basée sur le rapport des seuils de positivité (dite de Δct). Pour les autres échantillons, le chiffre de Ct a été traduit en nombre de copies ou de cellules grâce à l'utilisation d'une gamme de plasmide contenant le génome de MCPyV fourni par l'Institut Curie et d'une gamme de cellules humaines.

1.1.2. Résultats

1.1.2.1. Charge virale médiane et variabilité

Nous avons quantifié le génome viral chez 49 cas dont le MCC contenait de l'ADN de MCPyV au total.

La charge virale tumorale (ou CVT) médiane – estimée dans les 2 premières études incluant 10 et 28 cas (dont 22 nouveaux cas) – était de 3 c/c dans les 2 cas.

Nous avons observé des différences notables à la fois en termes de variabilité inter-cas et de répartition des valeurs de CVT. Dans l'étude initiale, nous avons obtenu une variabilité de 2 log avec des valeurs comprises entre 0,6 à 62 c/c. Dans la deuxième étude, la variabilité était de 6 log avec des chiffres de CVT à la fois plus élevés et plus faibles, compris entre $3 \cdot 10^{-3}$ et $3 \cdot 10^3$ c/c.

Nous avons détaillé la répartition des CVT dans 3 études. Dans la première étude, la quasi-totalité (9/10 ou 90 %) des cas présentaient une CVT élevée, (comprise entre 1 et 10 c/c), le dernier cas ayant une CVT intermédiaire (inférieure à 1 c/c mais supérieure ou égale à 0,1 c/c).

Dans la deuxième étude, la majorité des cas (18/28 ou 64 %) avaient également une CVT élevée et notamment 2/28 (ou 7 %) cas avaient CVT très élevée (supérieure à 100 c/c). Dans les cas restant, des CVT intermédiaires ou faibles (inférieures à 0,1 c/c) ont été mesurées, dans 3 et 5/28 (soit 11 et 18 %) cas respectivement.

Dans la troisième étude, la plupart des cas (36/49 ou 73 %) avaient également une CVT élevée ou très élevée.

1.1.2.2. Interprétation des résultats

Nos résultats montraient la présence de l'équivalent d'au moins une copie de génome viral par cellule dans environ $\frac{3}{4}$ des cas de MCC. Ce niveau de CVT est compatible avec l'hypothèse selon laquelle MCPyV joue un rôle dans la survenue du cancer.

Les CVT intermédiaires sont également éventuellement compatibles avec cette hypothèse, car la présence dans les biopsies analysées de cellules péri tumorales – dans l'hypothèse où celles-ci sont abondantes et pauvres en ADN viral – peut résulter en une sous-estimation de la CVT.

Le fait que les CVT soit rarement très élevées permet de supposer que dans les MCC le génome de MCPyV persiste probablement sous la forme de quelques copies intégrées dans la majorité des cas et plus rarement également ou exclusivement sous la forme de grandes quantités d'épisomes libres.

En revanche, nous avons observé dans une minorité de cas (moins de 20 %) des CVT faibles (inférieures à 0,1 c/c). Concernant ces cas, il est plus difficile d'imaginer que MCPyV puisse jouer un rôle dans le processus de cancérogenèse.

Ces CVT faibles pourraient être dues à des artefacts techniques. Cependant, étant donné que 4/5 de ces CVT ont été obtenues à partir de biopsies congelées, la qualité de l'ADN extrait dans ces 4 cas n'est pas à mettre en cause. De plus, la concordance (évaluée pour 6 cas) entre les résultats obtenus par l'équipe de l'Institut Curie et notre laboratoire était satisfaisante avec moins de 0,5 log de différence. A noter cependant que dans un cas la CVT était classée intermédiaire (0,6 c/c) alors qu'elle était regroupée parmi les CVT élevées dans la deuxième étude (2 c/c), soulignant la difficulté du choix d'un seuil. Nous avons pu obtenir des séquences de LT pour tous ces cas. Dans un cas seulement, la présence d'un mésappariement d'une base avec l'amorce antisens pouvait être responsable d'une sous-quantification de la CVT.

Une fraction au moins de CVT faibles reflète donc très probablement la réalité, de la même manière que certains cas de MCC semblaient réellement dépourvus d'ADN. Comment faut-il alors considérer ces cas ? Sont-ils assimilables aux cas de MCC exempts d'ADN ? Ou bien faut-il considérer 3 voies physiopathologiques, non, faiblement et étroitement liées à l'infection par MCPyV ? Cela sera discuté dans un chapitre à la fin de cette troisième partie.

1.2. Revue de la littérature

1.2.1. Résultats de la littérature

En dehors de notre travail, vingt études de quantification de la CVT de MCPyV dans les MCC ont été publiées dans la littérature, incluant 492 échantillons au total (Bhatia, Goedert *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*; Haitz, Rady *et al.*; Houben, Schrama *et al.*; Imajoh, Hashida *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Loyo, Schussel *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Nakamura, Sato *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Toracchio, Foyle *et al.*; Viscidi, Rollison *et al.*; Wieland, Scola *et al.*; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Koljonen, Kukko *et al.* 2009; Shuda, Arora *et al.* 2009; Sihto, Kukko *et al.* 2009). Les résultats de ces études sont présentés dans le tableau n° 10.

La variabilité des CVT entre les cas au sein de chaque étude a été précisée dans 18 études et était comprise entre 1 log (6 études) et 7 log (2 études). D'autres équipes ont donc observé comme nous une grande dispersion des valeurs même si en moyenne la variabilité était inférieure à la nôtre.

Les valeurs extrêmes de CVT dans ces 18 études s'évaluaient de 3.10^{-4} et 4.10^3 c/c et englobaient donc les valeurs extrêmes que nous avons observées. Des valeurs très élevées (≥ 100 c/c) ont été signalées dans 5 études et des valeurs faibles ($< 0,1$ c/c) dans 11 études. En particulier, deux études ont observé comme nous de faibles valeurs dans des prélèvements congelés (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009).

Le détail de la répartition des résultats de CVT a été publié par 15 équipes. Au total, des CVT très élevées/élevées, intermédiaires et faibles ont été observées dans respectivement 187/340 (ou 55 %), 90/340 (ou 26 %) et 63/340 (ou 19 %) échantillons. Ainsi, si la proportion de CVT très élevées/élevées et intermédiaires différait légèrement de nos résultats, le pourcentage de CVT faibles était similaire au notre. Les données de la littérature confirmaient donc le fait que des CVT faibles pouvaient être observées et avec une fréquence comparable à la nôtre.

Treize études ont précisé la médiane des CVT observée. Celle-ci était en moyenne de 2 c/c, c'est-à-dire comparable à la nôtre mais les médianes différaient considérablement en fonction des études, avec jusqu'à près 2 log de différence, de 0,07 à 5 c/c. Huit études rapportaient une médiane élevée (supérieure ou égale à 1 c/c) comparable à la nôtre. Parmi les 5 études restantes, 3 études ont rapporté des médianes intermédiaires comprises entre 0,1 et moins de 1) et 2 études des médianes faibles (entre 0,01 et moins de 0,1). Ces disparités entre les médianes suggèrent l'existence de biais méthodologiques.

	Publications	Calcul	Gène		Echantillons		Résultats de CVT en c/c			Nombre d'échantillons avec une CVT (en c/c)		
			Cellulaire	Cible	Nature	Nombre	Médiane	Moyenne	Valeurs extrêmes	≥1	≥0,1-1	< 0,1
1+2	Bhatia K Goedert J 2010 et Bhatia K Goedert J 2010	Gamme	Rnase P	ST	Paraffine	17	0,07	0,2	0,0005-1	2	3	12
3	Garneski KM Warcola AH 2008	ΔCt	TPO	ST et LT	Non précisé	16	Non précisé	Non précisé	0,005-15	2	5	9
4	Haitz KA Rady PL 2012	Non précisé	Non précisé	LT	Non précisé	1	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
5	Houben R Schrama D 2010	ΔCt	LINE-1	Non précisé	Paraffine	43	1	Non précisé	0,001-1000	21	11	11
6	Imajoh M Hashida Y 2012	Gamme	Rnase P	ST	Paraffine	9	Non précisé	Non précisé	1-8	9	0	0
7	Katano H Ito H 2009	Gamme	β actin	LT	Paraffine	7	0,1	0,2	0,04-0,4	0	4	3
8	Koljonen V Kukko H 2009	ΔCt	PTPRG	LT	Paraffine	5	5	Non précisé	0,9-444	Non précisé	Non précisé	Non précisé
9	Kuwamoto S Higaki H 2011	Quantification sur gel	PTPRG	LT	Paraffine	19	0,7	0,9	0,3-3	4	15	0
10	Loyo M Guerrero-Preston R 2010	Gamme	β actin	LT et VP1	Congelé et paraffine	6	2	10	0,05-173	Non précisé	Non précisé	Non précisé
11	Loyo M Schussel J 2012	Gamme	β actin	LT et VP1	Paraffine	16	1,4	Non précisé	1,3-1,6	16	0	0
12	Martel-Jantin C Filippone C 2012	ΔCt	ZNF277	LT	Congelé et paraffine	39	4	7	0,01-95	32	5	2
13	Nakamura T Sato Y 2010	Gamme	β actin	LT	Paraffine	11	0,07	1	0,01-12	1	4	6
14	Ota S Ishikawa S 2012	Gamme	Rnase P	ST	Paraffine	9	1	Non précisé	0,1-43	6	3	0
15	Schrama D Peitsch W 2011	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Paraffine	149	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	9
16	Shuda M Arora R 2009	ΔCt	β actin/Rnase P	LT et VP2	Congelé	9	3	4	0,001-14	6	1	2
17	Sihto H Kukko H 2009	ΔCt	PTPRG	LT	Paraffine	91	Non précisé	Non précisé	0,0003-4224	57	25	9
18	Toracchio S Foyle A 010	ΔCt	Non précisé	ST	Paraffine	2	0,3	0,3	0,02-0,6	1	1	0
19	Viscidi RP Rollison DE 2011	Gamme	Non précisé	LT	Congelé	6	11	Non précisé	8-16	6	0	0
20	Wieland U Scola NL 2012	Gamme	β globin	LT	Paraffine	37		57	0,0003-1523	24	13	0
	Tous résultats confondus					492	2	9	0,0003-4424	187	90	63

Tableau n° 10 : Quantification de l'ADN de MCPyV dans les MCC d'après les données de la littérature

1.2.2. Diversité des méthodes utilisées dans la littérature

Plusieurs observations suggèrent que la qualité de conservation de l'ADN a influé sur les résultats. Deux équipes ayant utilisé à la fois des biopsies congelées et incluses en paraffine ont mentionné des CVT médianes significativement inférieures dans ces dernières (Foulongne, Dereure *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*). Cela ne signifie pas pour autant que toutes les différences étaient attribuables au mode de conservation de la biopsie. A titre d'exemple, dans le cas de l'étude de Martel-Jantin *et al.*, alors que les auteurs ont observé une variabilité de 4 log des CVT, la différence de médiane entre les résultats obtenus à partir de biopsies congelées et incluses en paraffine n'était que de 0,2 log.

Concernant les biais introduits par les méthodes utilisées, la majorité des équipes (19/20) ont employé la technique de précision qu'est la PCR en temps réel, mais deux méthodes de calcul différentes de la CVT ont été utilisées, à l'aide de gammes ou *via* la méthode de ΔCt , cette dernière offrant une moins bonne reproductibilité. De plus, différents gènes cellulaires ont été choisis pour évaluer le nombre de cellules. Enfin, une équipe a utilisé une méthode de quantification très marginale, en déduisant la CVT d'après la taille des amplicons et la mesure de la quantité d'ADN obtenue après migration puis extraction sur gel des produits de PCR (Kuwamoto, Higaki *et al.*).

Le biais attribuable aux méthodes utilisées est difficilement mesurable en l'absence d'études de corrélations internes effectuées par les équipes. Mais le fait que les CVT aient été sous quantifiées dans certaines études est fortement suggéré par la comparaison des résultats des différences de près de 2 log entre les médianes de CVT d'équipes qui ont travaillé à partir de matériel conservé dans les mêmes conditions. A titre d'exemple, Bhatia *et al* ont rapporté 12/15 (80 %) de CVT faibles alors que Kuwamoto *et al* n'en ont observées aucune sur 19 cas.

1.3. Conclusion

En résumé, nos résultats et ceux de la littérature confirment dans environ $\frac{3}{4}$ des MCC la présence de CVT compatibles avec l'implication de MCPyV dans la pathologie du MCC. Le fait que ces CVT soient le plus souvent de l'ordre de quelques copies suggère que l'ADN viral persiste le plus souvent sous la forme de quelques copies intégrées. La description de rares cas avec des CVT avec plus de 100 copies par cellule permet néanmoins de supposer que dans certains cas l'ADN de MCPyV est également présent sous la forme de grandes quantités d'épisomes libres.

La quantification du génome viral pourrait donc constituer potentiellement un marqueur de la pathologie. Une étude suggère que la quantification pourrait en effet être utilisée pour le suivi des individus atteints de MCC. Cette étude a mentionné un cas de régression clinique d'une lésion de MCC traitée par interféron et corrélée à une décroissance de la CVT (Nakajima, Takaishi *et al.* 2009). Cependant, pour valider ce marqueur, étant donné que de l'ADN viral est également présent dans des tissus non tumoraux, il est nécessaire de comparer les CVT avec la quantité de virus présent dans les autres tissus.

2. Quantification du génome de MCPyV dans les prélèvements non tumoraux

2.1. Résultats obtenus au cours de travail de thèse

Nous avons quantifié le génome de MCPyV dans des échantillons de tissus non tumoraux d'origine extra-cutanée de sujets atteints de MCC.

Nous avons obtenu des charges virales médianes – par ordre de quantité décroissante – de 3.10^3 (5 à 2.10^6), 6.10^2 (100 à 4.10^5) et 10^2 (10 à 5.10^4) copies par millilitres (ou c/mL) dans les échantillons respiratoires (n=27), urinaires (n=22) et sanguins (n=20) respectivement. C'est donc dans l'appareil respiratoire que la quantité d'ADN viral était la plus élevée, d'environ 1 log.

Etant donné que nous avons exprimé les CVT des MCC en c/c et les charges virales dans les autres échantillons en c/mL, nous ne pouvons comparer directement nos résultats. Nous pouvons cependant effectuer une comparaison très grossière en nous référant aux valeurs des seuils de détection (ou Ct), qui étaient, en moyenne, plus faibles à partir des MCC qu'à partir des autres échantillons, suggérant que les quantités d'ADN étaient plus élevées dans ces derniers.

2.2. Revue de la littérature

2.2.1. Echantillons de tissus non tumoraux et non cutanés

L'ADN de MCPyV présent dans l'appareil respiratoire a été quantifié par 3 équipes qui ont toutes rapportées de très faibles quantités d'ADN. Deux études ont rapportés des Ct très faibles (de l'ordre de 38 à 40 cycles) dans 115 échantillons respiratoires au total (Bialasiewicz, Whiley *et al.* 2009; Goh, Lindau *et al.* 2009) et une étude une charge virale de 0,001 c/c dans une biopsie pulmonaire (Loyo, Guerrero-Preston *et al.*).

Dans le tissu hématopoïétique, une étude a également observé des charges virales très faibles, inférieures à 0,01 c/c dans 8 échantillons de cellules mononuclées du sang (Pancaldi, Corazzari *et al.*).

Aucune étude n'a quantifié l'ADN de MCPyV dans des tissus non tumoraux de l'appareil uro-génital.

C'est dans l'appareil digestif que les quantités d'ADN décelées étaient les plus importantes, tout en restant inférieures à celles observées dans les MCC : une étude a rapporté des charges virales faibles (< 0,1 c/c) dans 15 échantillons biopsiques d'oesophage, colon et foie (Loyo, Guerrero-Preston *et al.*).

En conclusion, les rares études qui ont quantifié l'ADN de MCPyV dans des échantillons non tumoraux extra cutanés montrent de manière univoque que l'ADN viral est présent en très faible quantité, du moins dans les 3 types de tissus analysés. Ces très faibles quantités contrastent avec les CVT obtenues dans la majorité des cas de MCC. De plus, dans le cas des prélèvements respiratoires, les quantités d'ADN chez les sujets témoins semblent inférieures à celle que nous avons observées chez les individus atteints de MCC.

2.2.2. Echantillons non tumoraux cutanéomuqueux

Dans les prélèvements cutanéomuqueux, les résultats de quantification de MCPyV publiés dans la littérature sont plus contrastés.

Les charges virales observées dans les biopsies étaient le plus souvent faibles. Trois études ont exprimé leurs résultats par comparaison aux CVT des MCC et ont observé des charges virales légèrement (0,3 log) ou nettement (2 à 10 log) inférieures (Foulongne, Dereure *et al.*; Haitz, Rady *et al.*; Kassem, Pantulu *et al.*). Trois autres études ont mesuré les charges virales en c/c. Deux équipes ont observé des charges virales exclusivement inférieures à 0,01 c/c (Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Mogha, Fautrel *et al.*) mais la troisième une charge virale moyenne plus élevée de 0,5 c/c, avec cependant un seul prélèvement avec une charge virale supérieure à 1 (Faust, Pastrana *et al.*).

Dans les prélèvements de type écouvillon en revanche, les charges virales observées dans 3 études étaient toutes du même ordre de grandeur que les CVT dans les MCC (Foulongne, Kluger *et al.*; Pastrana, Wieland *et al.*; Wieland, Silling *et al.*). Notamment, une de ces études a rapporté des charges virales > 1 c/c chez 34/46 (74 %) individus prélevés au niveau de différents sites à plusieurs reprises. Deux de ces études enfin ont rapporté des charges virales très élevées (> 1000 c/c).

3. Conclusion

Nos résultats et les données de la littérature montrent donc que des charges virales élevées sont observées dans la peau des sujets exempts de MCC, confirmant la supposition selon laquelle la peau constituerait le principal réservoir de MCPyV. En dehors de la peau, chez les sujets exempts de MCC, de très faibles quantités d'ADN viral sont présentes dans les tissus extra cutanés. Ces quantités seraient plus faibles que celle observées chez les sujets atteints de MCC, au moins dans le tissu respiratoire, en accord avec notre hypothèse d'un défaut de contrôle de la réplication chronique de MCPyV chez les sujets atteints de MCC.

Ces résultats démontrent donc que l'observation d'une charge virale élevée ne peut constituer un critère suffisant à lui seul pour attribuer un rôle à MCPyV dans les MCC, puisque des CVT faibles sont observées dans une fraction de cas de MCC, et que *a contrario*, des charges virales cutanées élevées sont observées dans la peau saine exempte de MCC.

Considérant que ni la détection, ni la quantification du génome viral ne suffisaient à établir fermement l'implication du MCPyV dans la pathologie du MCC, nous avons étudié la pertinence d'autres marqueurs moléculaires potentiels tels que la présence de génome viral intégré.

Chapitre 3 : Etude de l'intégration du génome de MCPyV

Dans leur étude princeps, Feng *et al* avaient démontré la présence de génome de MCPyV intégré dans 5 cas avec certitude et éventuellement 2 cas supplémentaires sur 8 cas au total de MCC contenant de l'ADN viral.

Nous avons souhaité confirmer et caractériser ce phénomène d'intégration de MCPyV dans les MCC de notre cohorte.

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Dr Sastre-Garau et a été publié en deux parties dans les 2 premiers articles.

Les expériences de FISH, de RT-PCR, de CGH-Array et de PCR inverse ont été effectuées par les membres de l'équipe du Dr Sastre-Garau. La mise en évidence de séquences intégrées par DIPS-PCR a été réalisée en partie par cette équipe et en partie dans le laboratoire. Les PCR dites de jonction ont été effectuées dans le laboratoire

1. Etude de l'intégration du génome de MCPyV dans les MCC

1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

1.1.1. Bref rappel méthodologique

Deux méthodes ont été utilisées pour analyser l'intégration de MCPyV. La technique de FISH consiste à visualiser l'ADN de MCPyV au sein de chaque noyau cellulaire à l'aide d'une sonde colorée spécifique du génome viral. L'aspect du marquage – diffus ou punctiforme – permet de conclure à la présence d'ADN viral libre épisomal ou intégré respectivement. Cette méthode permet ainsi à la fois de visualiser le nombre de sites d'intégration dans une cellule donnée et d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales ayant intégré de l'ADN viral.

La seconde méthode qui a été utilisée est celle de détection de séquences intégrées de Papillomavirus (ou Detection of Integrated Papillomavirus Sequences, DIPS-PCR) adaptée aux Polyomavirus. Cette technique consiste à amplifier de manière spécifique les séquences d'ADN contenant à la fois du génome cellulaire et du génome viral, c'est-à-dire les séquences nucléotidiques virales intégrées jouxtant des 2 côtés – en 5' et en 3' – l'ADN cellulaire. Cette méthode permet ainsi d'identifier à la fois le(s) locus chromosomique(s) au sein desquels l'ADN viral s'est inséré et de caractériser une partie des séquences virales intégrées. Un schéma explicatif est représenté figure n° 9.

1.1.2. Etude de l'intégration par la technique de FISH.

Nous avons pu observer dans un cas que l'ADN viral était intégré au niveau d'un seul site par cellule. Etant donné que la CVT de ce cas était de 6 c/c, nous pouvons supposer que le génome viral intégré était sous la forme de copies de génomes viraux disposées en tandem.

Nous avons pu démontrer que l'ADN de MCPyV était intégré dans environ 90 % des cellules tumorales, ce qui suggérait que les cellules tumorales porteuses du génome viral intégré formaient une population monoclonale et donc que l'intégration s'était produite précocement dans le processus de cancérogenèse.

Enfin, les cellules péri-tumorales ne contenaient pas d'ADN viral intégré, suggérant que l'intégration du génome était spécifiquement associée aux cellules tumorales.

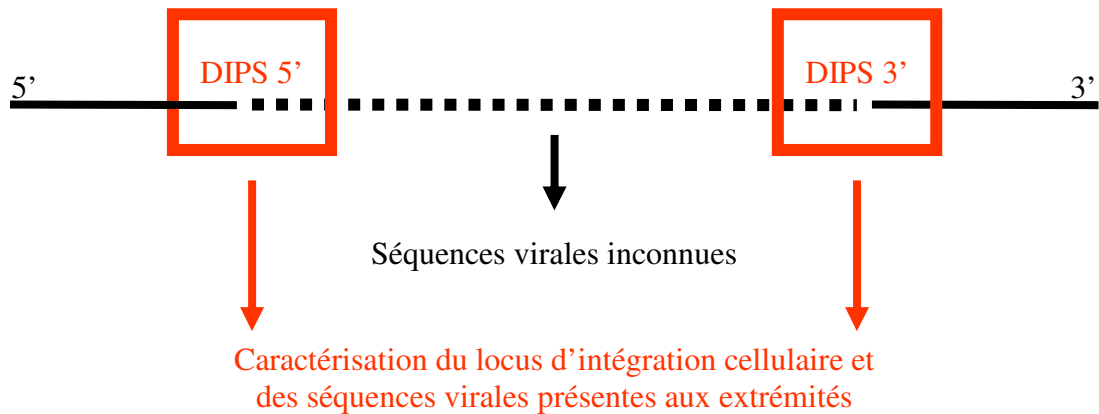


Figure n° 9 : Schéma représentatif du principe de la DIPS-PCR. Les séquences cellulaires sont représentées par un trait noir continu et les séquences virales intégrées par un trait noir en pointillés.

1.1.3. Etude de l'intégration par la technique de DIPS-PCR

La technique de DIPS-PCR nous a permis de démontrer l'intégration de MCPyV dans 16 biopsies de MCC correspondant à 14 cas et incluant le cas analysé par FISH.

1.1.3.1. Caractère monoclonal de l'intégration

Nous n'avons identifié qu'un seul événement d'intégration dans tous les cas, ce qui était cohérent avec notre résultat de FISH. Cependant, dans le cas de la technique de DIPS-PCR, nous ne pouvons exclure qu'il ait existé des séquences intégrées à d'autres endroits du génome que nous n'ayons pas réussi à mettre en évidence.

Les séquences amplifiées étaient spécifiques à chaque échantillon, à l'exception de 4 séquences identiques 2 à 2 et provenant de différentes lésions de MCC d'un même sujet. Cette dernière observation confirmait le caractère monoclonal de l'intégration.

1.1.3.2. Caractéristiques des intégrations au niveau du génome cellulaire

1.1.3.2.1. Identification des locus et des séquences impliquées

Les séquences cellulaires flanquant l'ADN viral étaient différentes dans tous les cas. Nous n'avons pas non plus observé de motifs nucléotidiques communs aux différentes séquences ou encore de séquences répétées. En revanche, de très courtes homologies (< 5pb) entre les séquences cellulaires et virales ont parfois été observées.

Les séquences virales étaient intégrées au niveau de locus chromosomiques – identifiés dans 13/14 cas – distincts entre eux et de celui de l'étude princeps. Au total, une insertion d'ADN viral a été démontrée dans 12 chromosomes différents. Des intégrations ont été observées dans 2 cas dans le chromosome 6 et dans un cas dans les chromosomes 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 20 et Y. L'intégration était survenue dans le bras long des chromosomes à l'exception de 2 cas.

1.1.3.2.2. Conséquences de l'intégration sur l'expression du génome cellulaire

L'insertion de matériel viral s'était produite dans la quasi totalité (11/13 soit 85 %) des cas dans des régions non codantes. Les séquences virales étaient alors situées à plusieurs kpb (entre 8 et 700 kpb) de distance de gènes identifiés, à l'exception d'une intégration à environ 600 pb d'un gène codant un micro ARN.

Dans les 2 cas où l'insertion d'ADN de MCPyV s'était produite dans un gène cellulaire, elle avait eu lieu dans des séquences introniques.

Le fait que l'intégration ait été mise en évidence dans des régions non codantes aussi bien que dans des régions codantes suggérait *a priori* que le site d'intégration chromosomique ne jouait pas un rôle déterminant dans le processus de cancérogenèse induit par les MCPyV. Nous avons cependant cherché à déterminer qu'elles étaient les conséquences de l'insertion des séquences virales pour le génome cellulaire.

1.1.3.2.3. Identification des gènes au voisinage

Les gènes identifiés au voisinage ou au sein du site d'intégration codaient pour des protéines de différentes fonctions. Pour certaines, il était tentant d'imaginer que la perturbation de leur expression pouvait éventuellement participer au cancer.

A titre d'exemple, une intégration s'était produite à proximité du gène TEAD1 qui encode un activateur transcriptionnel pouvant activer l'expression de LT de SV40 d'après les données de la littérature.

Deux autres intégrations s'étaient produites au voisinage des gènes PARVA et DENND1A qui codent pour des protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires et dans l'adhésion cellulaire respectivement.

Enfin, l'insertion de l'ADN viral avait eu lieu dans 2 cas à proximité de 2 gènes codant pour des protéines déjà impliquées dans d'autres cancers humains, le récepteur de l'insuline IL20RA et le proto-oncogène cellulaire MYC.

1.1.3.2.4. Remaniements du génome cellulaire

Trois observations suggéraient que des remaniements des séquences cellulaires s'étaient produits au moment – ou au décours – de l'intégration.

Dans le cas unique où les deux zones de jonction ont été amplifiées, nous avons observé une différence d'environ 1000 pb entre les séquences cellulaires situées en 5' et 3' de la séquence virale, ce qui correspondait à une délétion d'une taille d'environ 20 % de celle du génome viral complet.

Dans un cas où l'ADN était inséré au sein d'un gène, nous avons observé une intégration dans le 2^{ème} intron du gène, mais comme nous le discuterons, lorsque nous avons séquencé le gène viral LT, nous avons observé dans la séquence virale une insertion d'une séquence cellulaire correspondant au 3^{ème} intron du gène identifié lors de l'intégration.

Enfin, dans le second cas d'intégration au sein d'un gène cellulaire, la séquence cellulaire contenait des fragments accolés des 7^{ème} et 10^{ème} introns du gène, normalement distants d'environ 200 kpb, suggérant que dans ce cas précis, un remaniement conséquent avait eu lieu.

Afin d'étudier de manière systématique la présence de réarrangements en rapport avec l'intégration virale dans les MCC, nous avons recherché la présence d'aberrations chromosomiques dans 10 cas par la technique de CGH-Array.

Nous n'avons observé aucune anomalie visible dans 3 cas (30 %).

Dans les 7 cas restant, des déséquilibres récurrents conformes à ceux décrits dans la littérature ont été visualisés, mais aucune anomalie n'était présente au voisinage du site d'intégration.

Ces résultats suggéraient donc que si des remaniements du génome cellulaire s'étaient produits au cours de l'intégration virale, ils étaient dans ces 10 cas de taille inférieure à 40 kpb, cette taille correspondant au seuil de sensibilité de la technique .

1.1.3.2.5. Etude de l'expression de gènes cellulaires au voisinage

Afin d'évaluer les conséquences éventuelles de l'intégration – que celle-ci soit ou non accompagnée ou non de remaniements importants du génome cellulaire – nous avons étudié l'expression de 2 gènes situés au voisinage de l'intégration, MYC et IL20RA, *via* la méthode de RT-PCR. Aucune dérégulation de la synthèse d'ARNm correspondant à ces gènes n'a été observée.

1.1.3.3. Caractéristiques des intégrations au niveau du génome viral

Symétriquement à ce que nous avons observé au niveau des séquences cellulaires, les séquences virales impliquées dans l'intégration étaient spécifiques à chaque cas et dépourvues de motifs nucléotidiques communs aux différentes séquences ou de séquences répétées. Cela signifiait que des séquences spécifiques de MCPyV n'étaient pas impliquées dans l'intégration du génome viral. Si les séquences différaient, elles correspondaient néanmoins à des profils particuliers.

1.1.3.3.1. Cassures en dehors du gène LT

Dans un cas, l'interruption de l'ADN de MCPyV avait eu lieu au niveau de l'espace entre les régions codantes précoces et tardives, ce qui nous permet de supposer que dans ce cas de figure, l'intégration n'avait pas eu d'autres conséquences que d'abolir les possibilités de répllication du génome viral secondairement à la perte de circularité du génome.

Dans 2 cas, nous avons observé une cassure du génome viral correspondant à l'extrémité 5' au niveau du gène codant VP1. Dans cette situation (représentée figure n° 10), les protéines VP1 éventuellement synthétisées à partir de cette copie de génome tronquée seraient en théorie dépourvues de leur extrémité C terminale – amputées de 12 à 60 % de leur taille – suggérant fortement qu'elles seraient incapables de former des particules virales.

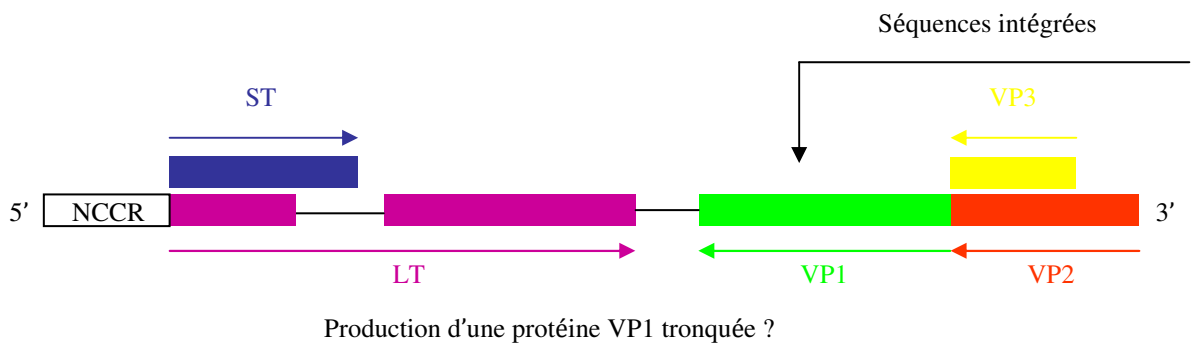


Figure n° 10 : Schéma représentatif d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie d'une troncature des protéines de structures éventuellement synthétisées. La région non codante est représentée en blanc, les séquences codantes des protéines précoces ST et LT en bleu et violet respectivement et les séquences codantes des protéines structurales en vert, orange et jaune.

Dans 3 autres cas, nous avons mis en évidence une cassure du génome viral correspondant cette fois à l'extrémité 3' au niveau du gène codant VP1 dans 2 cas, représenté schématiquement figure n° 11, soit dans la partie de la NCCR jouxtant la région codante tardive. Il résulte très probablement de ces 2 situations une abolition complète de la synthèse des protéines VP1, en raison de la perte des séquences promotrices ou de la partie initiale du cadre de lecture.

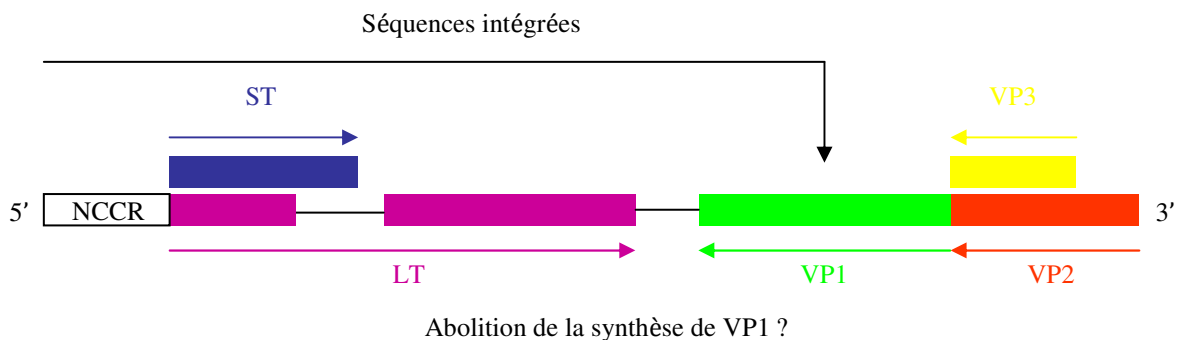


Figure n° 11 : Schéma représentatif d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie d'une abolition de la synthèse des protéines de structures.

Au final, dans ces 5 derniers cas, il découle vraisemblablement de l'intégration de MCPyV une perte de la capacité du virus à produire des particules virales. La synthèse de particules virales, même non infectieuses, pouvant être responsable d'une lyse cellulaire, la limitation de leur production constituerait un gain potentiel pour la survie des cellules tumorales infectées.

1.1.3.3.2. Cassures dans le gène LT

Dans 9 cas, nous avons observé une cassure du génome viral correspondant à l'extrémité 3' au niveau du gène codant LT, avec des cassures survenues systématiquement au sein du second exon du gène (représenté schématiquement figure n° 12). Les sites d'interruption couvraient la quasi totalité de l'exon (2000/2200 pb), mais dans 7/9 cas l'interruption était survenue au niveau de la région codant la moitié C terminale de LT.

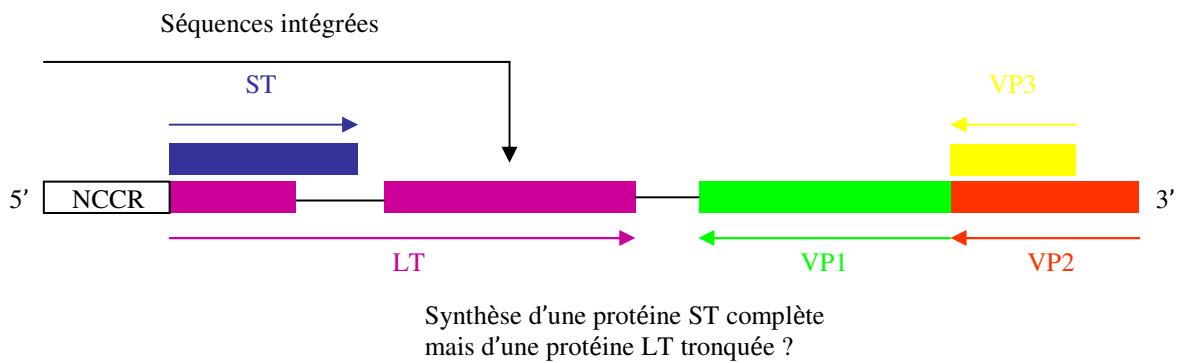


Figure n° 12 : Schéma d'une intégration du génome viral s'accompagnant en théorie de l'expression d'une protéine ST complète mais d'une protéine LT tronquée.

Ces profils étaient compatibles avec une conservation du gène codant ST d'une part et d'autre part des domaines fonctionnels de LT impliqués dans l'oncogénicité situés en N-terminal, notamment le domaine d'interaction avec la protéine Rb.

Ces profils montraient par ailleurs une élimination d'au moins un des domaines fonctionnels de LT associés à la réplication virale localisés en C terminal avec une perte du domaine hélicase dans tous les cas éventuellement associée à l'élimination du domaine de liaison à l'origine de réplication dans 2/9 cas.

Dans l'hypothèse où les séquences virales intégrées contiendraient une origine de réplication virale fonctionnelle, l'expression de protéines LT fonctionnelles pour la réplication virale pourrait être théoriquement responsable de l'initiation aberrante de fourches de réplication dans le génome cellulaire et générer des anomalies génomiques. Une trop grande instabilité génomique étant délétère, la perte de la fonction hélicase, voire de la capacité de LT à se lier à l'ADN viral constituerait un avantage sélectif pour la cellule tumorale infectée. Le fait que l'OBD ne soit éliminé que 2 fois sur 9 suggère que l'élimination du domaine hélicase serait suffisante pour conférer un avantage à la cellule tumorale.

1.1.3.3.3. Abolition concomitante des 2 types de fonction

Nous n'avons pu amplifier les deux extrémités du génome viral inséré que dans un cas. L'interruption du génome s'était produite en 5' au niveau de VP1 et en 3' au niveau de LT démontrant que les deux mécanismes, élimination des capacités de production des particules virales d'une part, et de formation de fourches aberrantes de réplication d'autre part, sont probablement nécessaires.

Néanmoins, nous avons observé des cas où l'intégration pouvait éventuellement avoir conservé une ou les deux fonctions. En effet, dans le cas où la troncature s'était produite en 3' dans la NCCR, la séquence de LT, qui est localisée en amont, pourrait avoir été intégrée sous forme complète. Enfin dans le cas où l'interruption correspondant à l'extrémité 3' du génome viral intégré avait eu lieu entre les deux régions codantes, le génome viral pourrait contenir tous les gènes viraux.

1.1.4. Conclusion

Nos résultats montraient que MCPyV était intégré de manière monoclonale dans la population tumorale, et suggéraient donc que l'événement d'intégration se produisait de manière précoce au cours du processus de cancérogenèse.

Nos résultats suggéraient également que l'ADN viral s'intégrait aléatoirement dans le génome cellulaire. L'insertion des séquences virales pouvait induire des remaniements cellulaires mais s'accompagnait probablement de peu de conséquences fonctionnelles, suggérant que les phénomènes de mutagenèse insertionnelle ne sont pas déterminants dans la pathogénie de MCPyV.

Du côté des séquences virales, nous avons observé la dominance de profils conservant les fonctions des oncoprotéines impliquées dans la transformation cellulaire et abolissant les capacités de production de particules virales et d'induction d'instabilité génomique. Cela suggérait que ces profils auraient été sélectionnés car ils s'accompagnaient d'un gain prolifératif pour la cellule contenant l'ADN viral intégré.

1.2. Revue de la littérature

1.2.1. Observations confirmant nos résultats

L'étude de l'intégration virale a été peu étudiée dans la littérature, très probablement en raison de la difficulté de l'accès au matériel congelé en quantité suffisante et de la lourdeur des techniques à mettre en œuvre.

En dehors de l'étude princeps et de notre travail, 25 cas d'intégration virale dans les MCC ont été décrits dans 4 études : Haugg *et al* dans 3 cas grâce à la technique de FISH (Haugg, Speel *et al.*), Martel–Jantin *et al* dans 19 cas par DIPS–PCR (Martel–Jantin, Filippone *et al.*) et enfin deux équipes par la technique de digestion enzymatique suivie d'une hybridation par Southern Blot à l'aide d'une sonde spécifique du virus dans 3 lignées cellulaires dérivées de MCC (Houben, Shuda *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008).

En dehors de notre travail, l'étude de Martel–Jantin *et al* est la seule à avoir fourni des indications sur les sites d'intégrations.

De manière comparable à la nôtre, en ce qui concerne les séquences cellulaires, l'équipe a observé i) un site d'intégration unique et spécifique dans chaque cas ; ii) des intégrations dans des locus chromosomiques distincts de ceux que nous avons décrit et différents dans chaque cas, à l'exception de 2 intégrations en 5q11.2 mais à 300 kpb de distance ; iii) des intégrations récurrentes dans certains chromosomes : chromosome 5 dans 4 cas, 1 et 4 dans 3 cas, et 19 et 6 – que nous avons également identifié comme cible récurrente – dans 2 cas ; iv) une intégration préférentielle dans le bras long des chromosomes (11/17 ou 65 % cas); v) des intégrations à la fois dans des régions non codantes et codantes, avec cependant une fréquence supérieure d'intégration dans ces dernières (9/17 ou 53 % des cas) par rapport à nos observations.

Les résultats de leur études sont également convergent avec nos observations en ce qui concerne les séquences cellulaires, avec : i) des sites de cassure du génome viral spécifiques à chaque cas et différents de ceux que nous avons décrits, à l'exception d'un site situé à 3 pb d'un site identifié dans notre travail; ii) la présence dans la majorité des cas de profils associés à la perte des capacités d'initiation de fourches de réplication – 11 cas de troncature en 3' dans LT en amont des domaines OBD et hélicase et un cas en 5' en aval – et de profils associés à une abolition des capacités de synthèse des capsides virales – 2 cas de troncature en 3' dans VP1, un cas de troncature en 5' dans VP1, un cas de troncature en 3' dans VP2/VP3 et enfin un cas de troncature en 5' dans VP2/VP3, démontrant en outre que le génome pouvait également être interrompu au niveau de ce troisième gène ; iii) enfin, la présence de profils préservant l'une ou l'autre de ces fonctions avec un cas de troncature en 5' de LT et un cas de troncature en 5' de VP1.

1.2.2. Observations atypiques

Martel–Jantin *et al* ont en revanche observé un troisième type de profil qui se singularise de nos résultats. Parmi 2 cas susmentionnés de troncature en 3' dans LT, l'interruption était survenue en amont du domaine d'interaction avec la protéine pRb, signifiant que dans ce cas ce domaine crucial pour l'oncogénicité du virus n'avait pas été préservé lors de l'intégration. Plus surprenant, dans un autre cas, l'interruption s'était produite en 5' dans le gène codant ST, suggérant que l'intégralité du gène LT et la partie C-terminale de ST – incluant le domaine d'interaction avec PP2A – auraient été éliminés. Ces observations suggèrent ainsi que dans certains cas l'intégration abolit des fonctions cruciales pour la transformation tumorale.

Une autre équipe a également émis l'hypothèse que l'intégration pourrait parfois s'accompagner d'une diminution des capacités transformantes de LT. Nakamura *et al* ont identifié le signal de localisation intranucléaire de la protéine LT (Nakamura, Sato *et al.*). Celui-ci serait localisé entre le domaine d'interaction avec la protéine pRb et l'OBD, ce qui signifie que dans 2 cas de notre travail et 3 cas de Martel–Jantin *et al* pour lesquels la troncature s'était produite en 3' dans LT, celle-ci avait eu lieu en amont du signal de localisation. Ces troncatures pourraient avoir pour conséquence de réduire les capacités de la protéine LT à regagner le noyau, lieu où elle exerce ses fonctions oncogènes.

Ces dernières observations signifient que les intégrations de MCPyV au sein des MCC ne correspondraient pas systématiquement à des événements préservant les fonctions des oncoprotéines. En revanche, cela ne signifie pas obligatoirement que les oncoprotéines ne sont pas fonctionnelles dans ces cas particuliers de MCC, puisque la présence de copies tronquées de génome viral jouxtant les séquences cellulaires n'exclue pas la présence concomitante de copies plus complètes. Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, nous avons d'ailleurs dans notre travail démontré la présence de copies de différentes tailles, en amplifiant avec succès par PCR la région du génome viral éliminée par la troncature lors de l'intégration. Ce résultat a également été observé dans l'étude de Martel–Jantin *et al.*

1.3. Conclusion

Au total, nos résultats et les données de la littérature suggèrent que l'intégration du génome de MCPyV dans les MCC surviendrait précocement dans l'histoire du développement de la tumeur et que les séquences virales intégrées persisteraient dans le temps. Le mécanisme d'intégration est vraisemblablement aléatoire. A l'heure actuelle, nous ne pouvons exclure qu'il en résulte des phénomènes de mutagenèse insertionnelle mais ceux-ci n'apparaissent pas déterminants. En revanche, la transformation tumorale serait liée à certains profils d'intégration du point de vue des séquences virales, ces profils étant associés à l'acquisition d'avantages pour la cellule en termes de prolifération et de survie, d'une part *via* la préservation de fonctions virales impliquées dans la prolifération cellulaire et par l'abolition de fonctions virales délétères pour la cellule d'autre part.

L'intégration semblait donc constituer un événement essentiel dans la transformation tumorale. Pour confirmer l'importance ou non de la mise en évidence de séquences intégrées, nous avons voulu déterminer si cet événement se produisait spécifiquement dans les MCC.

2. Recherche de l'intégration virale dans les tissus sains

2.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Afin de rechercher la présence d'ADN viral intégré dans les échantillons non tumoraux de sujets atteints de MCC, nous avons utilisé une méthode de PCR dite de jonction. Nous avons sélectionné 5 cas de MCC avec un site d'intégration identifié, et nous avons dessiné pour chaque cas des amorces de PCR permettant d'amplifier spécifiquement les séquences virales accolées au génome cellulaire au niveau d'une des extrémités de cassure du génome viral.

Nous avons amplifié de l'ADN hybride (contenant à la fois des séquences cellulaires et virales) dans 5 cas dans les MCC mais dans aucun cas dans les échantillons respiratoires ou urinaires de ces sujets. En revanche, des résultats positifs ont été obtenus dans 2/5 cas dans les échantillons sanguins. Etant donné que ces 2 cas présentaient une maladie au stade métastatique, la présence dans le sang de séquences virales intégrées correspondait très probablement à la présence de métastases circulantes ou d'ADN tumoral circulant.

Nous avons donc démontré que si la présence d'ADN viral, même en abondance, ne constituait pas un marqueur spécifique des MCC, au contraire, la présence de séquences de MCPyV intégrées était spécifiquement associée aux MCC.

2.2. Revue de la littérature

A ce jour, en dehors de notre travail, aucune étude de la littérature n'a été publiée sur la recherche de séquences intégrées dans les tissus sains.

En revanche, deux études ont montré que l'ADN viral présent dans la peau saine des sujets exempts de MCC était vraisemblablement présent sous forme épisomale (Mogha, Fautrel *et al.*; Schowalter, Pastrana *et al.*)

3. Mise en évidence de génomes viraux complets dans les MCC

Dans l'étude princeps, Feng *et al* avaient observé dans les MCC certains profils compatibles avec la présence de molécules virales épisomales.

Nous avons donc voulu déterminer si l'ADN viral dans les MCC de notre cohorte était présent exclusivement sous forme intégrée.

3.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Nous avons utilisé la technique de PCR inverse qui permet en théorie l'amplification sélective de formes circulaires libres grâce à l'utilisation d'amorces orientées dos à dos.

Nous avons amplifié un génome circulaire complet dans un cas chez lequel nous avons par ailleurs mis en évidence de l'ADN viral intégré.

Cette observation suggérait que les 2 modes de persistance – sous forme intégrée et sous forme épisomale – pouvaient coexister dans les MCC. Etant donné que la CVT de ce cas était élevée (> 60 c/c), cette observation confirmait de plus l'hypothèse que nous avons émise dans le chapitre sur la quantification du génome viral, selon laquelle la variabilité de la CVT dans les MCC pourrait être en partie due à la quantité de formes épisomales présente au sein des cellules tumorales.

3.2. Revue de la littérature

Plusieurs études en dehors de notre travail et de l'étude princeps ont mis en évidence des génomes complets coexistant avec des formes intégrées au sein de MCC ou de lignées dérivées de MCC (Houben, Shuda *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008). Dans l'une de ces études, les CVT – évaluées dans 3/4 cas – étaient également élevées (8 à 15 c/c) et l'amplification de ces génomes complets par la technique de PCR inverse suggérait qu'ils correspondaient bien à des formes épisomales et non pas des copies complètes linéarisées et intégrées (Martel-Jantin, Filippone *et al.*).

4. Conclusion

Nos observations et les données de la littérature montrent que la présence de séquences intégrées de MCPyV constitue un marqueur spécifique des MCC.

Elles nous permettent en outre de formuler des hypothèses concernant le mécanisme de transformation tumorale lié à MCPyV. L'intégration du génome de MCPyV surviendrait précocement dans le processus de transformation cellulaire et résulterait d'un processus aléatoire. Si les phénomènes de mutagenèse insertionnelle ne semblent pas jouer un rôle dominant, nous ne pouvons exclure le fait que l'insertion de génome viral, qui s'accompagne de remaniements des séquences virales et cellulaires, puisse néanmoins perturber l'expression de gènes cellulaires et participer au processus de transformation tumorale.

Bien que l'intégration se produise de manière aléatoire, certains profils d'intégrations semblent avoir sélectionnés dans les MCC parce qu'ils conféreraient un avantage prolifératif et permettrait l'émergence d'une population monoclonale. Ces profils sont ceux qui éliminent la fonction hélicase de LT et la capacité de production de particules virales.

Nos résultats et les données de la littérature montraient également que le processus d'intégration n'aboutissait pas systématiquement à l'élimination de ces fonctions virales potentiellement délétères pour la cellule tumorale. Ceci nous amenait à formuler la question suivante : existait-il d'autres mécanismes permettant de contrecarrer ces fonctions ?

Enfin, nous avons observé que des génomes épisomaux de MCPyV pouvaient coexister avec les séquences virales intégrées. Comment persistaient les formes libres épisomales au fur et à mesure des divisions cellulaires ?

Ces deux questions pouvaient se résumer en une seule : existait-il au sein des MCC des formes moléculaires ayant conservé leur capacités répliquatives ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué un travail de séquençage des protéines virales présentes dans les MCC.

Chapitre 4 : Mutations du génome de MCPyV

Dans leur article princeps, Feng *et al* avaient mis en évidence des mutations du gène codant LT dans deux cas de MCC.

Nous avons souhaité déterminer si des mutations du génome de MCPyV, dans LT et/ou dans d'autres gènes viraux, étaient également présentes dans les cas de MCC de notre cohorte.

Ce travail a été publié en deux parties dans les 2 premiers articles.

Les expériences de séquençage de ST ont été réalisées par les membres de l'équipe du Dr Sastre–Garau et celles de LT dans notre laboratoire à l'exception de 2 cas.

1. Etude de la présence de mutations de ST

Nous avons utilisé une méthode de séquençage direct après amplification par PCR de l'intégralité du gène codant ST, soit 561 pb.

Nous avons analysé les échantillons de MCC des 10 cas de la cohorte initiale. Dans tous les cas, nous avons obtenus des séquences virales codant pour des protéines complètes. Cette observation est en accord avec les résultats présentés dans les précédents chapitres sur la détection et l'intégration du génome viral, qui suggéraient que les séquences codant ST étaient préservées dans la quasi-totalité des cas de MCC.

Dans la littérature, aucune étude n'a rapporté à ce jour la présence de mutations au niveau du gène ST. Foulongne *et al* ont mentionné l'absence de mutations non synonymes ou tronquantes de ST dans 2/2 cas (Foulongne, Dereure *et al.*). Enfin, sur 29 séquences complètes de MCPyV référencées dans la base de données Pubmed, aucune ne comporte de mutation tronquante.

2. Etude de la présence de mutations de LT

2.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

2.1.1. Bref rappel méthodologique

Nous avons également utilisé une méthode de séquençage direct. Nous avons choisi de n'amplifier que la région codante correspondant au second exon de LT, puisque c'est cette partie qui code pour les domaines de liaison à la protéine pRb, OBD et hélicase de la protéine. En raison de la taille de cet exon (2200 pb), nous avons effectué des amplifications par PCR à l'aide de 4 paires d'amorces chevauchantes. Etant donné qu'il n'existait pas de souche de référence de MCPyV au moment où le travail a été effectué, nous avons comparé les séquences obtenues à une séquence consensus définie après alignement de l'ensemble de nos séquences.

2.1.2. Résultats

2.1.2.1. Variabilité virale

Nous avons analysé la séquence du second exon de LT dans 52 échantillons provenant de sujets atteints de MCC : 16 biopsies de MCC correspondant à 14 cas et 36 échantillons non tumoraux – respiratoires (n=16), sanguins (n=14) et urinaires (n=8) – correspondant à 26 sujets au total. Nous avons de plus analysé 3 séquences obtenues par DIPS-PCR contenant des séquences partielles de LT et enfin une séquence complète de PCR inverse contenant le génome viral complet.

2.1.2.2. Mise en évidence de souches virales

La comparaison de ces 52 séquences les unes avec les autres ainsi qu'avec les 2 séquences (MCC339 et MCC350) publiées dans l'étude princeps a révélé une homologie supérieure ou égale à 99 %, suggérant que le MCPyV était un virus présentant une faible variabilité, ce qui est assez commun chez les Polyomavirus et chez les virus à ADN en général.

Dans 8 cas, nous avons mis en évidence la présence de polymorphismes spécifiques définissant des souches virales. Ces polymorphismes étaient présent dans toutes les séquences – tumorales et non tumorales – issues de chacun des cas, démontrant que la même souche virale avait infecté les différents tissus. Cela suggérait que la survenue du cancer dans la peau, mais pas dans les autres tissus, n'était pas due à une infection cutanée par un génotype particulier de MCPyV à haut risque oncogène.

2.1.2.3. Mise en évidence de mutations additionnelles dans l'ADN viral tumoral

Nous avons observé des variations synonymes et non synonymes dans les deux types – tumoral et non tumoral – de séquences. En revanche, les variations synonymes et non synonymes étaient respectivement 3 et 16 fois plus fréquentes dans les séquences tumorales. De plus, nous avons observé des mutations non sens et des décalages du cadre de lecture générant des codons stop dans une majorité des séquences tumorales mais dans aucune séquence provenant des échantillons respiratoires et urinaires. Ces deux observations suggéraient ainsi que si le même virus avait infecté les différents tissus au départ, l'ADN dans la tumeur avait subi une évolution spécifique.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons comparé au cas par cas les séquences tumorales et non tumorales. Dans 7 cas, nous avons analysé au moins une séquence issue de MCC et d'échantillon respiratoire et/ou urinaire. Les séquences d'un même cas provenant d'échantillons respiratoires et urinaires étaient identiques entre elles – incluant 2 séquences de 2 prélèvements respiratoires prélevés à quelques mois d'intervalle. Dans certains cas, toutes les variations étaient communes à l'ensemble des séquences – tumorales et non tumorales –, démontrant bien que la même souche virale avait infecté au départ les différents tissus. Dans d'autres cas, certains des polymorphismes synonymes et non synonymes n'étaient présents que dans les MCC, démontrant que des modifications additionnelles – ne s'accompagnant pas toutes de modification de la composition en acides aminés de LT– s'étaient produites exclusivement dans les MCC.

Enfin, dans les 7 cas où la séquence issue du MCC présentait une mutation stop, celle-ci n'était jamais présente dans la séquence provenant des échantillons respiratoires et urinaires, démontrant que les modifications tronquantes étaient survenues exclusivement dans les MCC.

Dans 4 cas, nous avons analysé au moins une séquence issue de MCC et d'échantillon sanguin. Dans 2 cas présentant un stade localisé de la maladie, les séquences du sang codaient pour des protéines LT complètes. En revanche, dans les 2 cas restant les séquences étaient porteuses d'une mutation tronquante identique à celle de la tumeur correspondante. Dans ces 2 cas, les sujets présentaient des métastases à distance, suggérant que l'ADN viral présent dans le sang correspondait à des métastases circulantes ou à de l'ADN tumoral circulant.

La présence d'ADN tumoral circulant n'explique cependant probablement pas tous les cas d'ADNémie chez les sujets atteints de MCC, puisque dans un cas une séquence codant une protéine complète a été isolée dans le sang d'un sujet avec une mutation tronquante dans la tumeur. La présence d'ADN viral tumoral circulant pourrait néanmoins expliquer en partie pourquoi nous avons observé une différence significative dans la médiane de survie spécifique des sujets chez lesquels de l'ADN viral a été détecté en comparaison avec les sujets chez qui la recherche a toujours été négative.

Nos résultats démontraient donc que l'ADN viral associé aux MCC présentait des signatures moléculaires spécifiques. Nous avons analysé ces signatures en détail pour essayer de comprendre leur mécanisme de survenue.

2.1.2.4. Analyse détaillée des mutations des séquences associées aux MCC

2.1.2.4.1. Caractère monoclonal des mutations

Nous avons observé des variations spécifiques dans chacun des 14 cas, ce qui signifiait que chaque sujet avait été infecté par une souche différente et confirmait que le développement des MCC n'était pas en rapport avec une infection par un génotype particulier – à haut risque cancérogène – de MCPyV.

Dans 2 cas, les séquences provenant de lésions de tumeurs primitives et de métastases du même MCC d'un même cas présentaient 100 % d'homologie. Cette observation confirmait les données de l'intégration virale sur le caractère monoclonal de la population tumorale ayant porteuse de l'ADN viral.

2.1.2.4.2. Types de mutations

Lorsque des séquences complètes avaient été obtenues – dans 13/14 cas –, nous avons observé des mutations résultant en la production d'une protéine LT tronquée dans la quasi totalité (11/13) des cas. Les mutations tronquantes étaient donc non seulement exclusives des MCC mais également très fréquentes.

Ces mutations tronquantes étaient de 3 types mutuellement exclusifs. Dans la majorité des cas (7/11), il s'agissait de mutations ponctuelles de type faux sens. Dans les cas restant, il s'agissait de décalages du cadre de lecture générant un codon stop. Ces décalages du cadre de lecture étaient dus dans 3 cas à des délétions (de 5, 25 et 79 pb respectivement) et à une insertion de 250 pb de génome cellulaire dans le dernier cas.

Les séquences présentant des délétions/insertions avait toutes moins de 3 variations additionnelles, alors que le nombre de ces dernières tendait à être supérieur chez les séquences porteuses de mutations non sens, avec notamment 2 séquences porteuses de 17 et 22 polymorphismes sur 2200 nucléotides au total soit des taux de variation de 0,8 à 1 %.

Cette observation suggérait que les 2 types de mutations surviendraient éventuellement *via* deux mécanismes différents, les mutations non sens sous l'effet d'un agent mutagène générant indifféremment des mutations ponctuelles synonymes et non synonymes et les décalages du cadre de lecture lors de remaniements contemporains de l'intégration par exemple.

2.1.2.4.3. Sièges des mutations

Les mutations tronquantes étaient localisées exclusivement dans une région de moins de 300 pb entre le domaine de liaison à la protéine pRb et l'OBD. Elles étaient donc moins disséminées que les sites de cassure du génome viral secondaires à l'intégration.

En revanche, comme les troncatures du génome viral lors de l'intégration, les mutations préservait le domaine de liaison à la protéine pRb et étaient parfois localisées en amont du signal de localisation intranucléaire. Mais alors que la majorité des sites de cassure épargnait l'OBD, les mutations tronquantes l'éliminaient systématiquement. Enfin, alors que les sites de cassure de chaque cas étaient relativement éloignés les uns des autres, les positions des mutations étaient parfois communes à plusieurs cas. Deux cas possédaient une mutation stop en commun et les séquences tumorales de 2 autres étaient porteuses d'une délétion située au même endroit mais dont la taille différait.

Les mutations pourraient donc résulter d'un mécanisme plus ciblé que celui relativement aléatoire des interruptions du génome viral

2.1.2.5. Mise en évidence de séquences codant une protéine LT complète

En dépit de cette multiplicité des mécanismes aboutissant à la troncature de LT, nous avons mis en évidence des séquences codant pour des protéines LT complètes dans 3 cas.

Dans 2/3 de ces cas, nous avons prouvé que les séquences complètes de LT coexistaient avec des séquences intégrées et tronquées de LT. Dans l'un de ces cas, la séquence complète de LT était vraisemblablement portée par du génome épisomal.

Ces séquences codant pour une protéine LT complète étaient parfois porteuses de polymorphismes non synonymes, pouvant potentiellement altérer des domaines fonctionnels sans tronquer la protéine. A titre d'exemple, nous avons observé un cas où l'une des deux mutations non synonyme était absente de la séquence provenant de l'échantillon urinaire du même cas et était localisée dans la région codant le domaine hélicase.

Cependant, nous avons isolé dans un autre cas de MCC une séquence dépourvue de tout polymorphisme et codant par conséquent pour une protéine LT native fonctionnelle. La présence de ces séquences natives, comme nous l'avons discuté dans le chapitre sur l'intégration, pose la question des conséquences pour les cellules tumorales de la survenue d'un cycle de réplication viral éventuellement lytique.

2.1.2.6. Redondance des processus de troncature de LT

Nous avons observé une redondance dans les processus de troncature de LT avec 3 types de profils.

Dans 2 cas, nous avons observé, au sein du même MCC, d'une part des séquences tronquées par l'intégration et d'autre part des séquences mutées. Nous pouvons supposer que cela réponde à une nécessité pour la cellule d'empêcher toute production de LT fonctionnelle pour la réplication, avec, lorsque plusieurs copies de génome viral sont intégrées, des copies tronquées aux extrémités flanquant des copies complètes mais mutées.

Dans un cas, nous avons observé une séquence à la fois mutée et tronquée, avec l'observation d'un codon stop dans la séquence virale en amont de la séquence cellulaire. L'adjonction d'une mutation stop à une séquence déjà tronquée ne conférant *a priori* aucun avantage prolifératif à la cellule, il est difficile d'expliquer pourquoi cet événement rare aurait été sélectionné. Mais nous pouvons expliquer ce phénomène en imaginant un processus en 2 temps. Tout d'abord, la mutation se produit, ce qui permet à la cellule infectée d'échapper à la mort par lyse cellulaire. Ensuite, l'intégration du génome viral survient et s'accompagne d'une hyperexpression de LT induisant la transformation tumorale. Ce modèle pose néanmoins la question du maintien du génome viral muté et incompetent pour la réplication pendant la période de temps où il n'est pas encore intégré.

Enfin, dans 3 cas, nous avons observé la présence de mutations non sens multiples – jusqu'à 4 – dans la même séquence tumorale. Il est difficile de supposer que de tels profils résultent d'une sélection secondaire d'un événement rare, puisque la présence de plusieurs mutations tronquantes ne semble pas constituer de manière évidente un avantage pour la cellule. Mais nous pouvons supposer à l'inverse que dans ces cas la survenue des mutations est très fréquente, en raison de la présence d'un agent mutagène exogène ou endogène ou encore un déficit des voies de réparation de l'ADN, avec des mutations tout aussi fréquentes dans leur ADN somatique. Parmi 3 de ces séquences, 2 présentaient en effet un grand nombre de mutations additionnelles de type synonymes et non synonymes. Ces mutations additionnelles étaient absentes des séquences issues des échantillons non tumoraux, démontrant qu'il s'était bien produit de multiples mutations de l'ADN viral associé à la tumeur et non pas que les sujets avaient été infectés par des souches virales variantes.

2.2. Revue de la littérature

2.2.1. Données de la littérature en accord avec nos résultats

Nos observations sur les mutations du génome viral dans les MCC ont été largement confirmées dans la littérature.

Deux analyses phylogénétiques réalisées à partir de génomes viraux complets de tissus tumoraux et non tumoraux ont montré que le MCC n'est pas lié à une infection par un génotype particulier de MCPyV à haut risque cancérigène. Les différents génotypes de MCPyV connus à l'heure actuelle se répartissent en effet en deux groupes reliés uniquement à l'origine géographique – caucasienne ou asiatique – des sujets, les souches virales issues des MCC étant dispersées au sein des souches provenant d'échantillons de tissus sains (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Schowalter, Pastrana *et al.*).

Quatre études ont confirmé le caractère clonal des mutations (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008; Nakajima, Takaishi *et al.* 2009). Schrama *et al.* ont notamment décrit des séquences strictement identiques dans 4 échantillons de tumeur primitive et de métastases d'un même cas. En revanche, un second travail de cette même équipe a montré des séquences différentes dans 2 tumeurs primitives survenues à distance dans l'espace et dans le temps, signifiant que 2 tumeurs peuvent se développer à partir de 2 clones distincts chez un même sujet (Schrama, Thiemann *et al.*).

La plus grande fréquence des polymorphismes synonymes et non synonymes et la présence exclusive de mutations tronquantes dans les tissus tumoraux ont également été observées par une équipe, bien que les auteurs aient comparé les séquences virales de MCC à des séquences virales provenant de tissus sains de sujets exempts de MCC et non, comme nous l'avons fait, de prélèvements non tumoraux de sujets atteints de MCC (Shuda, Feng *et al.* 2008).

Deux études ont confirmé l'existence de séquences de MCC présentant un nombre élevé de mutations ponctuelles dans 3 cas au total (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008).

Les 2 types de mutations tronquantes, ponctuelles ou remaniements avec délétions/insertions ont été décrits dans la littérature, avec, comme nous l'avons observé, leur caractère exclusif et une dominance des mutations de type ponctuel : un étude a rapporté 1 cas de délétion (Nakajima, Takaishi *et al.* 2009), une autre 5 cas de mutations non sens (Nakamura, Sato *et al.*), une troisième étude 5 cas de mutations ponctuelles et 2 cas de délétions (Shuda, Feng *et al.* 2008) et enfin une dernière étude 10 cas de mutations stop et 7 cas de délétions ou insertions (Martel-Jantin, Filippone *et al.*).

Ces mutations ponctuelles étaient également parfois partagées entre les cas. En particulier, des mutations étaient communes à des cas de différentes études de la littérature (incluant notre travail), excluant un biais causé par des contaminations et favorisant l'hypothèse selon laquelle certaines bases sont préférentiellement mutées (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008).

Comme nous l'avons observé, les mutations tronquantes entraînaient la perte systématique du domaine hélicase, parfois de l'OBD, mais préservaient le domaine d'interaction avec pRb.

Deux équipes ont également observé une redondance des mécanismes de troncature de LT avec la coexistence de séquences intégrées et mutées, la présence de séquences à la fois mutées et tronquées et enfin la présence de mutations non sens multiples (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008).

Enfin, la présence de séquences codant des protéines LT fonctionnelles pour la réplication au sein des tumeurs a été rapportée par 2 équipes (Foulongne, Dereure *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*). Dans un cas, la séquence présentait des variations non synonymes mais le fait que celles-ci soient communes à la peau saine suggérait qu'il s'agissait bien de marqueurs de souche virale et donc que la protéine LT codée était probablement fonctionnelle (Foulongne, Dereure *et al.*). Dans un autre cas, une séquence ne comportait pas de polymorphisme (Martel-Jantin, Filippone *et al.*).

2.2.2. De nouvelles informations apportées par la littérature

2.2.2.1. Profils atypiques

Deux équipes ont mentionné des profils que nous n'avons pas observés, consistant en des délétions ou des insertions multiples de très petite taille (1 à 3 nucléotides) (Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Nakajima, Takaishi *et al.* 2009).

2.2.2.2. Recherches de mutations dans l'ADN somatique

Une étude a analysé plus de 1500 séquences d'ARNm cellulaires d'un cas de MCC afin de déterminer si ce sujet présentait un défaut dans les voies de réparation de l'ADN pouvant favoriser la survenue de mutations somatiques comme virales. Les séquences cellulaires n'étaient pas anormalement mutées dans ce cas, ce qui allait à l'encontre de cette hypothèse (Shuda, Feng *et al.* 2008). Cependant, la séquence virale issue de la tumeur de ce cas ne présentait pas un profil avec mutations multiples.

2.2.2.3. Fonctionnalité du domaine de fixation à pRb de LT

Les hypothèses que nous avons formulées pour interpréter nos résultats d'intégration et de mutations des séquences de MCPyV dans les MCC reposaient sur des fonctions présumées de LT de MCPyV, prédites par la comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine LT de MCPyV avec celles des autres Polyomavirus. Une étude de la littérature a démontré dans un modèle *in vitro* que le domaine de fixation à la protéine pRb de la forme native de LT était effectivement capable de se lier à la protéine pRb cellulaire. Ce travail démontrait également que les protéines LT correspondant à de 2 cas de MCC présentant des troncatures en aval de ce domaine de liaison à pRb n'affectaient pas la fonction de liaison à la protéine cellulaire (Shuda, Feng *et al.* 2008).

Une autre étude a démontré dans un modèle *in vitro* que la capacité proliférative des cellules de lignées dérivées de MCC était bien dépendante de la fonctionnalité de ce domaine de fixation à pRb (Houben, Adam *et al.*).

2.2.2.4. Fonctionnalité du domaine hélicase

Il a également été démontré que *in vitro* la réplication virale est effectivement abolie lorsque le domaine hélicase seul ou le domaine hélicase et l'OBD sont tronqués (Shuda, Feng *et al.* 2008). La démonstration du fait que l'élimination du domaine hélicase était suffisante permettait ainsi de comprendre pourquoi *in vivo* les cassures lors de l'intégration ou les mutations épargnaient régulièrement l'OBD.

Cette même équipe a fait une observation qui suggère fortement que LT, si elle est fonctionnelle, est effectivement capable de générer des fourches de réplication aberrantes en initiant la réplication de l'ADN viral intégré (Shuda, Feng *et al.* 2008). Les auteurs ont utilisé un modèle *in vitro* de lignée cellulaire dérivée de MCC, la lignée MKL-1. Dans ces cellules tumorales, le génome complet de MCPyV est présent et possède une origine de réplication virale fonctionnelle. Le profil d'intégration déterminé par Southern Blot suggère que le génome complet est intégré, et non pas présent sous forme épisomale. Lorsque les auteurs ont effectué une transfection de ces cellules MKL-1 par un plasmide contenant la séquence codante de la protéine LT native, l'expression de LT dans les cellules MKL-1 qui en découlait était capable d'activer la réplication des séquences virales déjà intégrées.

Cependant, bien que les collisions lors de la réplication génère des cassures doubles brins, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence une augmentation d'histone γ H2AX qui témoigne de la présence de ces cassures.

2.2.2.5. Fonctionnalité de l'OBD

Une équipe a identifié une région minimale de 71 pb de la NCCR indispensable à la réplication du génome viral *in vitro*, contenant notamment 7 séquences pentanucléotidiques au niveau desquels se fixe LT, 4 de ces pentamères s'avérant jouer un rôle critique dans la réplication virale (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009). Ces auteurs ont montré que le domaine hélicase de LT joue un rôle dans la fixation de LT à l'origine de réplication virale *in vitro* puisque la souche MCC339 porteuse d'une mutation tronquante respectant le domaine hélicase mais éliminant l'OBD présente un défaut de fixation à l'origine de réplication virale. Cela expliquerait pourquoi il ne serait pas nécessaire d'éliminer également l'OBD pour prévenir la formation de fourches de réplication aberrantes.

2.2.2.6. Autres domaines de LT

Ces mêmes auteurs ont également démontré que la présence d'une protéine LT fonctionnelle était indispensable et suffisante à la réplication virale *in vitro* (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009). La coexpression de ST et LT permettait d'améliorer le rendement mais l'expression de ST seule ne permettait pas d'observer une réplication virale. Les auteurs ont en outre montré que des domaines protéiques distincts étaient impliqués dans le processus de réplication : le domaine DnaJ de LT *via* le recrutement de Hsc70 et le domaine de liaison à la protéine PP2A de ST. Ces auteurs ont enfin démontré que les mutations de LT observées dans les MCC abolissaient bien les capacités de réplication virale et que l'élimination du domaine hélicase suffisait.

Une autre équipe a observé que la forme tronquée de LT est capable d'inhiber *in vitro* la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN, au contraire de la forme native de LT. Cette observation suggère ainsi que les troncatures de LT ne résultent pas seulement en une perte de fonctionnalités potentiellement délétères pour la cellule. Les troncatures pourraient également générer des gains de fonctions. Les auteurs ont formulé l'hypothèse selon laquelle la survenue de mutations perturbant le signal de localisation intranucléaire et résultant éventuellement en une répartition cellulaire différente de la protéine pourrait expliquer cette acquisition de nouvelles fonctions (Demetriou, Ona-Vu *et al.*).

2.2.3. Données de la littérature en contradiction avec nos résultats

Deux études de la littérature ont rapporté la présence de mutations tronquantes dans les tissus sains, en complète contradiction avec nos résultats. Dans une étude est décrite une mutation tronquante dans un échantillon sanguin d'un donneur sain (Pancaldi, Corazzari *et al.*). Mais cette insertion d'1 pb au tout début de l'exon 2 entraînait un décalage précoce du cadre de lecture ne préservant pas le domaine de fixation à la protéine pRb, au contraire de ce que l'on observe dans les MCC. Une seconde équipe a mentionné la présence de mutations tronquantes de type non sens dans 7/10 biopsies de peau saine. Cependant, cette mutation non sens était commune aux 7 prélèvements ainsi qu'à 19/19 biopsies de SCC et à leur témoin positif, ce qui fait craindre des problèmes de contamination (Dworkin, Tseng *et al.* 2009).

2.3. Conclusion

En conclusion, nos résultats et les données de la littérature montrent que le développement du MCC n'est pas lié à une infection par un génotype particulier de MCPyV à haut risque cancérigène. En effet, différentes souches infectent les sujets atteints et au sein d'un même individu la même souche infecte les différents tissus.

Cependant, nos résultats et les données de la littérature montrent que l'ADN viral associé aux MCC a subi des modifications additionnelles et spécifiques. L'analyse de ces modifications montre deux types de mutations exclusifs l'un de l'autre, avec des mutations ponctuelles plus fréquentes que les remaniements. Ces mutations pourraient en outre survenir de manière non aléatoire, puisque certains nucléotides semblent mutés préférentiellement, comme en témoigne la présence de mutations communes à différents cas. ; iii)

Ces mutations ont fréquemment pour conséquence de tronquer la protéine LT de la même manière que les cassures lors de l'intégration, c'est-à-dire en préservant les fonctions associées à la stimulation de la prolifération cellulaire mais en éliminant celles susceptibles de générer de l'instabilité génomique en induisant des foyers de réplifications aberrants, les conséquences du maintien ou de l'abolition de ces fonctionnalités ayant été démontré dans des modèles *in vitro*.

Enfin, en dépit des mécanismes multiples de troncature de LT, des séquences codant des formes natives étaient présentes dans les tumeurs. Il s'agissait alors de déterminer si LT était le seul gène concerné par les mutations ou bien si d'autres régions du génome l'étaient aussi.

3. Présence de mutations en dehors de la région codante précoce

3.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Nous n'avons pas analysé de manière extensive la présence de mutations sur d'autres régions du génome. Dans un cas cependant nous avons amplifié le génome complet par PCR inverse.

Le séquençage de ce génome viral a montré que la NCCR présentait 100 % d'homologie avec la séquence NCCR de MCC339, mais 2 variations nucléotidiques ponctuelles par rapport à MCC350. Dans ce cas, le gène correspondant à LT codait pour une protéine complète. La fonctionnalité de LT dans ce cas n'était donc pas contrecarrée par le fait que le génome présentait un défaut dans l'origine de répllication le rendant incompetent pour la répllication.

Le gène codant VP1 était complet mais présentait des différences par rapport aux 2 souches de l'article princeps avec notamment 2 variations non synonymes qui n'étaient présentes ni chez MCC339 ni chez MCC350.

Pour expliquer le fait que des génomes compétents pour la répllication soient présents dans les MCC, nous pouvons formuler 2 hypothèses. Le génome natif pourrait provenir des cellules péri-tumorales, puisqu'il a été démontré que des charges virales élevées pouvaient être observées dans la peau saine. Si au contraire le génome provenait bien des cellules tumorales, il pourrait n'être répliqué et exprimé qu'à bas bruit ou bien par une fraction minoritaire des cellules tumorales, ce qui ne mettrait pas en péril la survie de la population tumorale dans son ensemble.

3.2. Revue de la littérature

3.2.1. Mutations de la NCCR

Aucune étude de la littérature n'a étudié de manière systématique la présence de mutations au niveau de la NCCR.

Une équipe a décrit une mutation ponctuelle au niveau de l'un des pentanucléotides de la région minimale de réplication de la souche MCC350 (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009). Cette mutation abolissait la réplication du génome viral *in vitro* en rapport avec un défaut de fixation de la protéine LT. Cette mutation semblait absente des tissus exempts de MCC et rare dans les MCC, puisque les auteurs ne l'ont identifié que dans 1/10 cas analysés. Une autre équipe a démontré que cette mutation avait également des conséquences sur la production de particules virales *in vitro* (Feng, Kwun *et al.*). La mutation n'avait pas de conséquences sur la production de LT mais elle abolissait la synthèse à la fois de ST et de VP1.

A noter que cette souche MCC350 était également porteuse de mutations tronquant LT et amputant l'OBD, ce qui signifiait une redondance du mécanisme visant à abolir la fixation de LT de MCPyV à l'origine de réplication virale.

Une équipe a défini une séquence NCCR consensus à partir de l'alignement de 24 séquences référencées dans la base de données Pubmed (Neumann, Borchert *et al.*). Les auteurs ont ainsi pu décrire la présence de 3 types de variations, substitutions ponctuelles de nucléotides, délétions et insertions de petite taille dans les souches virales caractérisées par plusieurs équipes et issues à la fois de MCC et d'échantillons de peau saine.

L'une de ces variations, une substitution d'un unique nucléotide situé en dehors de la zone minimale de réplication dans une séquence issue de peau saine était associée à une diminution des capacités de réplication *in vitro*. Ces auteurs ont donc démontré que des variations à l'extérieure de la zone minimale de réplication pouvait néanmoins avoir des conséquences sur les capacités de réplication virale. Au contraire des mutations de LT, les variations de la NCCR ne seraient donc pas spécifiquement associées aux MCC.

3.2.2. Présence de mutations au niveau de la région codante tardive

Aucune étude de la littérature n'a étudié de manière systématique la présence de mutations au niveau de la région codante tardive, mais plusieurs études ont rapporté de manière ponctuelle des cas de MCC dont les séquences codant VP1 présentaient des mutations. Deux types de mutations ont été rapportés.

Deux équipes ont mentionné la présence de délétions dans la région codant VP1 dans des échantillons de MCC de 2 cas. La séquence comportait une délétion de 3 et 90 pb respectivement sans décalage du cadre de lecture résultant en la perte de 1 et 30 acides aminés – soit une perte de 0,2 et 7 % de la longueur totale respectivement – au niveau du tiers N-terminal de la séquence protéine (Feng, Kwun *et al.*; Kassem, Schopflin *et al.* 2008).

En outre, la séquence avec une délétion de 90 pb coexistait avec une séquence sans délétion codant éventuellement pour une protéine VP1 native, de manière comparable à ce qui a été observé dans le cas des séquences codant des protéines LT tronquées ou mutées coexistant avec des gènes codant des protéines natives.

Dans un 3^{ème} cas, la séquence comportait une délétion de 200 pb résultant en un décalage du cadre de lecture induisant une perte des 157 acides aminés C-terminaux correspondant à une perte de 37 % de la longueur totale de la protéine (Feng, Kwun *et al.*).

Dans un 4^{ème} cas, la séquence comportait une mutation ponctuelle de type non sens résultant en la production d'une protéine tronquée en C terminale ayant perdu 71 % de sa longueur (Carter, Paulson *et al.* 2009).

Dans un 5^{ème} cas, la séquence comportait 3 mutations non synonymes au niveau d'acides aminés conservés dans les séquences provenant des autres cas de MCC. Deux équipes ont montré qu'il résultait de ces mutations faux sens une abolition des capacités de la protéine à produire des pseudo-particules virales *in vitro*, au contraire d'autres séquences issues de MCC codant des VP1 natives (Touze, Gaitan *et al.*; Pastrana, Tolstov *et al.* 2009). Une troisième équipe a montré que 2 des 3 mutations non synonymes étaient impliquées dans une moindre réactivité *in vitro* des Ac sériques anti-VP1 des sujets infectés par MCPyV (Carter, Paulson *et al.* 2009).

Le fait que ces 3 mutations non synonymes soient également présentes au niveau de la séquence tronquée de 90 pb décrite par une autre équipe suggérait que, éventuellement, comme dans le cas des mutations de LT, les mutations ponctuelles surviendraient préférentiellement au niveau de certaines régions du gène. Ces mutations préférentielles se produiraient soit parce que certains nucléotides constitueraient des cibles plus souvent mutées, soit parce que les mutations associées à un avantage prolifératif seraient secondairement sélectionnées. Le fait que ces mutations partagées aient des conséquences sur la capacité de VP1 à former des particules virales favorise la seconde explication. Cette observation démontrait en outre que les mécanismes abolissant les fonctionnalités de la protéine VP1 sont redondants, de manière comparable à ceux tronquant LT. Cela nous amène de nouveau à proposer un modèle en 2 temps, avec la survenue de mutations rendant VP1 incompétente pour la formation de particules suivie d'une intégration.

Notons que la souche MCC350 décrite dans l'article princeps présentait à la fois de multiples mutations – incluant une mutation stop – au niveau du gène codant LT, une mutation ponctuelle au niveau de la NCCR et 3 mutations ponctuelles au niveau de VP1.

Comme dans le cas des mutations de LT et de la NCCR, les mutations de VP1 n'étaient pas systématiquement observées puisqu'au moins 3 séquences issues de MCC codant pour des VP1 natives ont été décrites dans la littérature. (Kwun, Guastafierro *et al.* 2009)

Enfin, aucune mutation tronquant VP1 dans un tissu sain n'a été rapportée dans la littérature.

4. Conclusion

Bien que de l'ADN de MCPyV soit présent dans de nombreux tissus, l'ADN viral associé aux MCC est fréquemment muté, en particulier au niveau du gène codant LT. Des mutations du gène codant VP1 et de la NCCR surviendraient également mais ces mutations ont été moins bien étudiées dans la littérature et pourraient être moins spécifiques des MCC dans le cas de la NCCR.

La présence de mutations au niveau de LT préservant systématiquement certains domaines dont celui de fixation à pRb suggère que l'expression de LT joue un rôle important dans la survenue du cancer. En revanche, les mutations au niveau de VP1 suggèrent que cette protéine ne serait pas exprimée ou serait non fonctionnelle dans les MCC.

Nous avons donc souhaité confirmer ces hypothèses en étudiant l'expression des protéines virales dans les MCC.

Chapitre 5 : Expression du génome viral

Dans leur article princeps, Feng *et al* avaient montré que dans un cas de MCC le génome intégré de MCPyV était vraisemblablement exprimé puisqu'un transcrit de fusion comportant à la fois des séquences virales et cellulaires avait été isolé.

Nous avons souhaité confirmer cette observation initiale et la compléter en étudiant l'expression des autres protéines virales

Ce travail a été publié en 2 parties dans le 1^{er} et le 3^{ème} article.

Les expériences de RT-PCR ont été réalisées par l'équipe du Dr Sastre-Garau et l'IHC (ou IHC) par celle du Dr Coursaget.

1. Expression des gènes codants les protéines précoces dans les MCC

1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

L'expression des protéines virales précoces de MCPyV a été étudiée par la technique de RT-PCR à l'aide d'amorces ciblant les 2 oncoprotéines ST et LT. Les ARN extraits ont été traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN viral également reconnu par les amorces et l'expression des ARNm a été comparée à celle d'un gène de ménage.

Huit échantillons correspondant à 8 cas de la cohorte initiale ont été analysés. La synthèse d'ARNm de ST et de LT a été observée dans tous les cas. Les quantités d'ARNm de LT étaient systématiquement supérieures à celles de ST, de 7 à 16 fois selon les cas.

Les niveaux d'expression étaient comparables entre les cas avec des expressions de ST entre 0,2 et 0,4 fois celles du gène de ménage pour ST et de 1 à 6 fois celles du gène de ménage pour LT, à l'exception d'un cas avec des niveaux plus élevés d'expression de 3 et 22 fois celle du gène de ménage pour ST et LT respectivement. A noter que dans ce cas, l'échantillon analysé provenait d'une métastase d'un sujet qui est décédé de la pathologie.

Nous n'avons pas observé de corrélation entre la quantité d'ARNm produite et la CVT, ce que nous pouvons expliquer de 2 manières. Dans les cas où toutes les copies de génome viral sont intégrées, le niveau d'expression des ARNm pourrait dépendre plus étroitement du promoteur viral (éventuellement remanié lors de l'intégration ou muté) et/ou des séquences promotrices et enhanceurs cellulaires au voisinage que du nombre de copies intégrées. Dans les cas où coexistent des formes intégrées et épisomales, ces dernières pourraient n'être pas ou peu exprimées.

Nous n'avons pas confirmé le fait que ces ARNm étaient bien traduits en protéines.

1.2. Revue de la littérature

1.2.1. Etude de la littérature sur l'expression des ARNm précoces

En dehors de l'étude princeps et du travail présenté, 2 études de la littérature ont mis en évidence l'expression d'ARNm de ST et LT de MCPyV dans 16 cas de MCC et une lignée cellulaire dérivée de MCC au total (Jung, Choi *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008).

Dans un modèle *in vitro*, Shuda *et al* ont caractérisé les différents ARNm précoces synthétisés par le gène LT natif (Shuda, Feng *et al.* 2008). Deux ARNm correspondraient à ST et LT proprement dit, et 2 autres à des transcrits résultant d'un épissage alternatif de ST et LT. Ces 4 transcrits coderaient *a priori* pour 3 types de protéines, ST, LT et une 3^{ème} protéine analogue à 17kT de SV40. L'équipe a montré que ces 4 types de transcrits étaient bien synthétisés dans 4 cas de MCC mais que le transcrit correspondant à la protéine analogue à 17kT de SV40 n'était pas produit dans une lignée cellulaire, suggérant ainsi que son rôle était accessoire dans la transformation tumorale.

1.2.2. Expression des protéines précoces

1.2.2.1. Expression de protéines tronquées

Deux Ac monoclonaux murins ont été développés dans la littérature (Houben, Shuda *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008). L'Ac CM2B4 est spécifique d'un épitope codé par le 2^{ème} exon du gène LT et l'Ac CM8E6 est spécifique d'un épitope commun à ST, 57kT et LT codé par le 1^{er} exon du gène LT. Dans des modèles *in vitro*, avec la technique de Western Blot, les auteurs ont démontré que ces Ac permettaient de mettre en évidence les 3 protéines virales natives : CM2B4 une protéine d'environ 120 kilo Dalton (ou kDa) correspondant à LT proprement dit et une autre d'environ 57 kDa – dénommée 57kT – correspondant à la protéine analogue à 17 kT de SV40, et enfin CM8E6 à une troisième protéine d'environ 18 kDa correspondant à ST.

A noter qu'une réactivité non spécifique en Western Blot a été observée avec les 2 Ac, avec des bandes non spécifiques – parfois intenses – de taille distinctes de celles attendues dans des cellules dépourvues d'ADN de MCPyV.

La spécificité des Ac a été validée dans un modèle *in vitro* de cellules de rein d'embryon humain (cellules 293T) transfectées par un plasmide contenant une séquence consensus du génome de MCPyV.

Une équipe a d'ailleurs montré à l'aide de ces Ac que la synthèse des protéines précoces étaient séquentielle dans le temps, avec une expression précoce de LT et 57kT puis de ST, la synthèse de ST et dans une moindre mesure de 57kT étant régulée par le processus de réplication du génome viral (Feng, Kwun *et al.*).

A l'aide de ces Ac, 2 équipes ont démontré l'expression de protéines ST complètes dans des lignées cellulaires dérivées de 5 cas MCC et de protéines LT tronquées dans 3 cas de MCC et de lignées cellulaires dérivées de MCC (Houben, Shuda *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008). Les protéines LT tronquées correspondant aux différents cas avaient des tailles différentes et cohérentes avec les positions respectives des mutations tronquantes du gène LT. Cependant, le poids apparent des protéines était légèrement supérieur à celui prédit par les troncatures, et de multiples bandes spécifiques étaient présentes dans certains cas, suggérant que des épissages aberrants ou des modifications post-traductionnelles s'étaient produits.

1.2.2.2. Études de grande ampleur de l'expression des protéines précoces

1.2.2.2.1. Résultats globaux

Des études de l'expression de LT de grande ampleur ont été réalisées en utilisant une technique d'IHC. Cette technique est en effet beaucoup moins lourde que celle du Western Blot et présente l'avantage de montrer l'expression protéique par la population tumorale dans son ensemble. A l'exception d'une étude ayant utilisé un Ac polyclonal de lapin (Nakamura, Sato *et al.*), toutes les équipes ont utilisé l'unique Ac commercialisé CM2B4 spécifique des protéines 57kT et LT.

Des résultats positifs ont été observés dans 450/711 (64 %) des cas de 19 études au total (Adhikari, McCalmont *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*; Erovic, Al Habeeb *et al.*; Hall, Pincus *et al.*; Houben, Schrama *et al.*; Iyer, Afanasiev *et al.*; Jung, Choi *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Ly, Walsh *et al.*; Nakamura, Sato *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Reisinger, Shiffer *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Sihto, Kukko *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Wieland, Scola *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009; Shuda, Arora *et al.* 2009). Ces résultats sont résumés dans le tableau n° 11.

Dans toutes les études, les auteurs ont observé dans la majorité des cas positifs un marquage nucléaire de forte intensité dans plus de 75 % des cellules. Cependant, plusieurs études ont rapporté des cas où le marquage était soit intense mais ne concernant qu'une minorité des cellules tumorales (jusqu'à moins de 30 %), soit observé dans la majorité des cellules mais hétérogène ou de faible intensité. Certaines études ont également mentionné un marquage du cytoplasme (Nakamura, Sato *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009).

Ces observations montrant que l'expression de 57kT/LT n'était pas observée dans tous les cas de MCC d'une part et, d'autre part, que lorsqu'elle était observée elle était parfois faible, confirmaient les données de détection et de quantification montrant une hétérogénéité de l'implication de MCPyV dans les MCC.

Le pourcentage de résultats positifs était également variable selon les études, de 18 à 100 % avec 4/17 études ayant observé des prévalences inférieures à 60 %. Ces variations de prévalences pouvaient être dues, comme nous l'avons mentionné dans les chapitres sur la détection et la quantification du génome viral, soit à des différences réelles de prévalence parmi les populations de cas étudiés, ce que nous discuterons dans le chapitre sur l'étiologie du MCC, soit à des artefacts techniques.

Publications		MCC					
		Tous cas	ADN MCPyV +	ADN MCPyV -	CVT > 1	0.1 < CVT < 1	CVT < 0.1
1	Adhikari LA McCalmont TH 2012	1/1	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
2	Bhatia K Goedert J 2010	9/23 (39 %)	9/17 (53 %)	0/6	2/2	3/3	4/12
3	Busam K Jungbluth A 2009	40/54 (74 %)	10/13 (77 %)	0/2	9/10	0/0	1/3
4	Erovic B Al Habeeb A 2012	25/26 (96 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
5	Hall BJ Pincus LB 2012	17/36 (47 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
6	Houben R Schrama D 2010	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
7	Iyer JG Afanasiev OK 2011	24/33 (72 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
8	Jung HS Choi YL 2011	11/13 (85 %)	9/11 (82 %)	2/2	Non précisé	Non précisé	Non précisé
9	Kuwamoto S Higaki H 2011	20/26 (77 %)	19/20 (95 %)	1/6 (17 %)	4/4	15/15	0/0
10	Ly T Walsh NM 2012	17/42 (40 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
11	Nakamura T Sato Y 2010	8/18 (44 %)	7/10 (70 %)	0/8	1/1	3/3	3/6
12	Ota S Ishikawa S 2012	8/9 (89 %)	8/9 (89 %)	0/0	8/8	0/1	Non précisé
13	Paik J Hall G 2011	19/104 (18 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
14	Reisinger DM Shiffer JD 2010	15/20 (75 %)	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
15	Schrama D Peitsch W 2011	149/174 (86 %)	1	0/25	Non précisé	Non précisé	9/9
16	Shuda M Arora R 2009	21/36 (58 %)	6/10 (60 %)	Non précisé	5/6	1/1	0/3
17	Sihto H Kukko H 2011	61/91 (67 %)	59/71 (83 %)	2/20 (10 %)		59/59	0/5
18	Tolstov Y Arora R 2010	2/2	2/2	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé
19	Wieland U Scola NL 2012	3/3	1/3 (33 %)	0/0	3/3	Non précisé	Non précisé
	Total	450/711 (64 %)	281/315 (89 %)	5/69 (7 %)	32/34 (94 %)	81/82 (99 %)	16/38 (42 %)

Tableau n° 11 : Mise en évidence de l'expression de 57kT/LT de MCPyV dans des biopsies de MCC d'après les données de la littérature

1.2.2.2.2. Corrélations en les résultats d'IHC et de détection/quantification de l'ADN viral

Neuf équipes ont effectué des corrélations entre la présence d'ADN viral et l'expression de 57kT/LT.

Des résultats positifs en IHC ont été observés dans 5/69 (7 %) cas de MCC négatifs en PCR au total, avec seulement 3/9 études ayant mentionné des discordances.

Ces discordances peuvent être dues soit à un manque de sensibilité de la PCR, soit à un manque de spécificité de l'Ac. Une étude a mentionné un marquage des cellules péri-tumorales, tels que les lymphocytes, les cellules des glandes sudorales et les cellules endothéliales, y compris dans des échantillons contrôles non MCC et exempts d'ADN. Ceci suggère que – comme observé avec la méthode de Western Blot – CM2B4 réagit avec des protéines autres que 57kT/LT et donc qu'une partie des discordances au moins est attribuable à un défaut de spécificité de l'Ac, même si la spécificité de l'IHC est globalement supérieure à 90 %.

Des résultats négatifs en IHC ont été observés dans 34/315 soit 11 % des cas de MCC positifs en PCR au total, avec seulement 4/9 études ayant observé plus de 25 % de discordance.

Ces discordances peuvent s'expliquer soit par un manque de spécificité de la PCR, soit par un défaut de sensibilité de l'Ac, ce dernier étant potentiellement attribuable à 2 causes : i) l'Ac est incapable de se fixer à 57kT/LT en raison des modifications subies par la protéine (mutation et/ou troncature); ii) les protéines virales sont exprimées en trop faibles quantités. Les résultats des corrélations entre la technique d'IHC et la quantification du génome viral de 7 équipes favorisent cette dernière hypothèse. Tous résultats confondus, le pourcentage de résultats positifs en IHC était significativement plus élevé (113/116 ou 97 % versus 16/38 ou 42 %) dans les cas avec CVT élevée ou intermédiaire par rapport aux cas avec CVT faibles (< 0,1 c/c).

1.2.3. Dépendance des cellules tumorales à l'expression des protéines virales

Deux types d'observations suggèrent que le maintien de l'expression des oncoprotéines virales est nécessaire au maintien du phénotype tumoral.

In vivo, toutes les études ayant étudié l'expression de 57kT/LT en IHC dans différents échantillons tumoraux du même cas ont observé une concordance parfaite des résultats.

In vitro, Houben *et al* ont montré que chez 5 lignées dérivées de MCC et exprimant ST et LT, l'index de prolifération et/ou de survie diminuait après inhibition de l'expression de ST et LT par si RNA (Houben, Shuda *et al.*). Cette équipe a cependant observé une hétérogénéité dans les lignées quand aux conséquences de l'inhibition, l'importance respective des phénomènes de perte de prolifération et de mort cellulaire variant selon les lignées. A noter que les auteurs n'ont pas mis en évidence de lien entre l'action des oncoprotéines et avec la voie p53, ce qui est cohérent avec les observations de conservation du domaine Rb mais pas de celui d'interaction avec p53 dans la majorité des protéines LT tronquées.

Dans une seconde étude, la même équipe a démontré que l'inhibition de LT mais pas de ST était suffisante pour altérer le phénotype tumoral *in vitro* et *in vivo* – après injection de cellules tumorales à la souris – et que le domaine d'interaction avec pRb de LT était effectivement impliqué dans la survie tumorale (Houben, Adam *et al.*). De plus, par des expériences de co-injections à la souris de cellules exprimant ou n'exprimant pas LT, les auteurs ont observé que l'expression de LT par des cellules avoisinantes ne permettait pas aux cellules n'exprimant pas LT de survivre. Cette expérience va à l'encontre de l'hypothèse d'un mécanisme paracrine qui a été évoqué dans la littérature pour justifier les observations de faibles CVT dans certains cas de MCC.

Enfin, dans une troisième étude, les auteurs ont démontré que, comme cela a été observé dans le cadre d'infection par d'autres PyV humains, l'expression des oncoprotéines virales serait sensible à l'action de l'interféron (Willmes, Adam *et al.*).

2. Expression des gènes codants les protéines tardives dans les MCC

2.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Nous avons utilisé une technique de marquage par IHC à l'aide d'un Ac polyclonal murin spécifique de VP1 de MCPyV. Celui-ci a été obtenu par injection à la souris de pseudo-particules virales constituées de protéines VP1.

Nous n'avons pas observé d'expression de VP1 dans des prélèvements biopsiques de MCC et de peau saine péri-tumorale correspondant à 16 et 12 sujets atteints de MCC et dont la tumeur contenait de l'ADN viral. L'absence d'expression de VP1 dans les MCC est en cohérence avec les interruptions de séquences contemporaines de l'intégration que nous avons observées et les mutations décrites dans la littérature de la région codant VP1 dans les MCC.

2.2. Revue de la littérature

En dehors de notre travail, une étude a étudié l'expression de VP1 dans les MCC par IHC à l'aide d'un Ac polyclonal de lapin obtenu après injection de pseudo-particules virales contenant à la fois des protéines VP1 et VP2 (Pastrana, Tolstov *et al.* 2009). En accord avec nos résultats, Pastrana *et al* n'ont observé d'expression de VP1 chez aucun des 10 cas analysés, exprimant par ailleurs les protéines 57kT/LT.

L'expression de VP2 et VP3 n'a pas été étudiée dans la littérature. Mais Pastrana *et al* ont suggéré que chez MCPyV, VP3 ne serait pas fonctionnelle (Pastrana, Tolstov *et al.* 2009).

Une étude est cependant en contradiction avec nos résultats et l'étude de Pastrana *et al*, puisque les auteurs ont visualisé des particules virales en microscopie électronique au sein des cellules tumorales dans un cas de MCC contenant de l'ADN de MCPyV (Wetzels, Hoefnagel *et al.* 2009). Néanmoins, la qualité médiocre de conservation de la biopsie analysée rend l'interprétation de l'image très délicate, et aucune étude n'a confirmé cette observation.

3. Expression des gènes viraux dans les tissus non tumoraux

3.1. Expression des ARNm viraux

Une étude a mis en évidence l'expression contemporaine d'ARNm de ST, LT et VP1 de MCPyV dans des biopsies de peau saine d'un sujet exempt de MCC, l'expression de ST étant favorisée par l'exposition aux ultra-violets (Mogha, Fautrel *et al.*). Cette observation signifiait 3 choses : i) la présence d'ARNm de ST ou LT ne peut constituer un marqueur spécifique du MCC ; ii) MCPyV effectuée dans la peau des cycles complets de réplication, ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle la peau constitue le réservoir de virus ; iii) le pouvoir oncogène de MCPyV serait éventuellement amplifié par l'action d'un autre agent carcinogène qu'est l'exposition solaire. La nécessité d'une action conjointe pourrait expliquer la localisation préférentielle des MCC au niveau de zones exposées au soleil et la rareté de la pathologie chez les sujets à peau mate.

3.2. Expression des protéines virales

Une équipe a recherché l'expression des protéines 57kT/LT dans 12 biopsies de peau saine contenant de l'ADN de MCPyV (Reisinger, Shiffer *et al.*).

Ces résultats négatifs sont en apparence contradiction avec le fait que le virus synthétise des ARNm et se réplique vraisemblablement dans la peau. Pour résoudre ce paradoxe, nous pouvons faire l'hypothèse que la réplication du virus dans la peau s'effectue à bas bruit avec une production de LT étroitement régulée et en deçà du seuil de détection de la technique.

Cette hypothèse est renforcée par une observation *in vitro*. Après transfection du génome de MCPyV dans différents types de cellules primaires humaines, Neumann *et al* ont pu mettre en évidence la réplication du génome viral mais n'ont pas visualisé d'expression de 57kT/LT en Western Blot (Neumann, Borchert *et al.*). Leur observation suggérait ainsi que des quantités de 57kT/LT étaient produites en deçà du seuil de détection de leur technique et que celles-ci suffisaient à la réplication du génome viral.

La forte positivité du marquage immunohistochimique dans les MCC s'expliquerait alors par une dérégulation de l'expression de LT probablement secondaire à l'intégration du génome viral. La détection de 57kT/LT en IHC constituerait donc un outil diagnostique potentiel pour la pathologie du MCC.

4. Conclusion

Nos résultats et les données de la littérature montrent que dans les MCC les protéines virales de structure sont vraisemblablement pas ou peu exprimées. Cela suggère que la transformation survient dans le cadre d'une infection non ou peu productive, en dépit du fait que des formes compétentes pour la réplication soient éventuellement présentes.

En revanche, les protéines précoces sont fortement exprimées et sous une forme tronquée dans le cas de LT. Le marquage immunohistochimique par l'unique Ac anti-57kT/LT commercialisé pourrait constituer un outil diagnostique précieux dans la pathologie du MCC, puisqu'il semble spécifique de la pathologie et non pas de l'infection par MCPyV en général. Il nécessite néanmoins du matériel tumoral disponible ce qui n'est pas toujours le cas en pratique. Nous nous sommes donc intéressés à d'autres types de marqueurs, notamment sériques, puisque ce type d'échantillon est plus accessible.

Chapitre 6 : Marqueurs sérologiques de l'infection par MCPyV

Au début du travail de thèse, aucune donnée sérologique n'était disponible concernant l'infection à MCPyV.

Nous avons cependant souhaité étudier la réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre MCPyV, en nous basant sur les connaissances concernant les autres Polyomavirus.

Ce travail a été publié dans le 3^{ème} article.

Les échantillons analysés provenaient des collections biologiques de notre laboratoire et de celui du Dr Coursaget. Les dosages sérologiques ont été réalisés par l'équipe du Dr Coursaget.

1. Réponse immunitaire humorale dirigée contre MCPyV

1.1. Présence d'Ac anti-VP1 chez les MCC et dans la population générale

1.1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

1.1.1.1. Bref rappel méthodologique

Les dosages sérologiques ont été réalisés à l'aide de VLP virales produites en cellules d'insectes et constituées exclusivement de VP1. La séquence codante virale qui a été utilisée a été isolée d'une tumeur d'un cas.

1.1.1.2. Résultats

Nous avons observé la présence d'Ac sériques spécifiques de VP1 de MCPyV chez 70/82 ou 85 % de sujets atteints de MCC. Cette prévalence n'était pas supérieure à celles observées chez les sujets contrôles atteints de pathologies cutanées ou infectieuses autres que le MCC (20 et 21/23 ou 87 et 91 % respectivement) ou chez les sujets sains (29/36 ou 81 % donneurs de sang volontaires).

Ces résultats confirment le caractère ubiquitaire de l'infection par MCPyV dans la population générale que les études de détection du génome viral avaient objectivé.

En revanche, les taux d'Ac différaient de manière significative entre les populations de sujets atteints de MCC et contrôles. En effet, le taux moyen d'Ac était supérieur d'1 log chez ces derniers et des taux élevés (> 10 000) d'Ac étaient présents chez 65 % des sujets atteints de MCC mais seulement 7 % des contrôles.

Chez les sujets atteints de MCC, le taux d'Ac anti-VP1 reflète très probablement l'importance de l'excrétion cutanée et non pas la CVT puisque, comme nous l'avons rapporté dans le chapitre précédent, les cellules de MCC n'expriment pas de VP1. Or, comme nous l'avons mentionné en introduction, dans le cas des infections par les autres PyV humains, le taux d'Ac anti-VP1 reflète l'importance de la réplication virale au cours de l'infection chronique. Les taux élevés d'Ac chez les sujets atteints de MCC s'accordent donc avec nos résultats précédents qui suggéraient une réplication chronique de MCPyV plus importante chez ces sujets que chez les sujets contrôles.

1.1.2. Revue de la littérature

1.1.2.1. Diversité des techniques utilisées dans la littérature

En dehors de notre travail, 16 études sur la détection d'Ac anti-VP1 de MCPyV (incluant une précédente de l'équipe de Pierre Coursaget) ont été publiées dans la littérature (Chen, Hedman *et al.*; Faust, Pastrana *et al.*; Pastrana, Wieland *et al.*; Paulson, Carter *et al.*; Robles, Poloczek *et al.*; Rollison, Giuliano *et al.*; Carter, Paulson *et al.* 2009; Giraud, Ramqvist *et al.* 2009; Kean, Rao *et al.* 2009; Pastrana, Tolstov *et al.* 2009; Sadeghi, Riipinen *et al.*; Schowalter, Pastrana *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Touze, Gaitan *et al.*; Viscidi, Rollison *et al.*; Tolstov, Pastrana *et al.* 2009). Les résultats de ces études sont présentés tableau n° 12.

Plusieurs méthodes ont été utilisées selon les équipes. Les séquences virales codant VP1 différaient mais celle de la tumeur MCC339 décrite par l'article princeps a été la plus utilisée. Les sources de protéines virales étaient constituées de VLP formées de VP1 produites en cellules d'insectes dans 5 études de la littérature. Dans 7 autres études, des VLP contenant des protéines produites en cellules humaines ont été utilisées et contenaient de plus de la protéine VP2 associée à VP1. Enfin, dans les 3 dernières études, des protéines virales fusionnées à la GST ont été produites en bactéries.

1.1.2.2. Résultats de la littérature

1.1.2.2.1. Prévalence dans la population générale

La présence d'Ac anti-VP1 de MCPyV a été décelée chez 3129/5526 (57 %) de sujets sains – donneurs de sang, volontaires sains, femmes enceintes ou sujets hospitalisés – de 7 pays et de 2 continents de 12 études au total. Les prévalences variaient de 46 à 88 % selon les études.

Ces valeurs sont cohérentes avec nos résultats – bien que nous ayons observé une prévalence supérieure à la moyenne de l'ensemble des études –, et confirment le caractère quasi-ubiquitaire de l'infection que faisaient soupçonner les études sur la prévalence de l'ADN dans les écouvillons cutanés.

Par ailleurs, le caractère neutralisant de ces Ac anti-VP1 a été démontré par 5 études (Faust, Pastrana *et al.*; Pastrana, Wieland *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Giraud, Ramqvist *et al.* 2009; Pastrana, Tolstov *et al.* 2009).

1.1.2.2.2. Lien avec l'âge

Les études de la littérature ont montré que l'infection par MCPyV se produirait avant l'âge adulte (Touze, Gaitan *et al.*; Carter, Paulson *et al.* 2009) et probablement dans la petite enfance (Chen, Hedman *et al.*; Viscidi, Rollison *et al.*; Kean, Rao *et al.* 2009; Tolstov, Pastrana *et al.* 2009) comme c'est le cas pour BKPyV, KIPyV et WUPyV, alors que JCPyV survient un peu plus tard à l'adolescence.

Une étude a montré une diminution du taux d'Ac avec l'âge (Pastrana, Tolstov *et al.* 2009).

		Continent	Pays	Technique				Sujets atteints de MCC	Contrôles		
				Présentation de la protéine	Cellule utilisée pour la production	Clone	Cible de l'Ac		Adultes	Enfants	Autres pathologies
1	Carter J Paulson K 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	GST	Bactérie	w162	VP1	36/41 (88%)	308/527 (58%)		
5	Kean J Rao S 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	GST	Bactérie	339	VP1		390/1501 (46 %)	245/721 (34 %)	
6	Pastrana D Tolstov Y 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2	25/27 (89 %)	42/48 (88 %)		
7	Pastrana DV Wieland U 2011	Amérique du Nord	Etats-Unis	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2		40/49 (80 %)		
8	Paulson K Carter J 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	GST	Non précisé	Non précisé	VP1	127/139 (91 %)	349/530 (66 %)		
10	Rollison DE Giuliano AR 2011	Amérique du Nord	Etats-Unis	GST	Non précisé	344	VP1		220/300 (73 %)		
12	Schowalter RM Pastrana DV 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2		58/95 (61 %)		
13	Tolstov Y Arora R 2010	Amérique du Nord	Etats-Unis	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2				22/36 (61 %)
14	Tolstov YL Pastrana DV 2009	Amérique du Nord	Etats-Unis	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2	24/27 (89 %)	170/266 (64 %)		
3	Faust H Pastrana D 2011	Europe	Autriche et Suède	VLP	Cellule humaine	Not specified	VP1 et VP2				283/434 (65 %)
15	Touzé A Gaitan J 2010	Europe	Belgique et Italie	VLP	Cellule d'insecte	MKT-21	VP1		227/295 (77 %)		
9	Robles C Poloczeczek A 2012	Europe	Espagne	VLP	Cellule d'insecte	339	VP1		448/552 (81%)		
2	Chen T Hedman L 2010	Europe	Finlande	VLP	Cellule d'insecte	339	VP1			53/375 (14 %)	
11	Sadeghi M Riipinen A 2010	Europe	Finlande	VLP	Cellule d'insecte	339	VP1		212/462 (46 %)		
16	Viscidi RP Rollison DE 2011	Europe	Italie	VLP	Cellule d'insecte	339	VP1	30/33 (91 %)	665/901 (74%)		
4	Giraud G Ramqvist T 2009	Europe	Suède	VLP	Cellule humaine	339 modifié	VP1 et VP2				
Total								242/267 (91%)	3129/5526 (57 %)	298/1096 (27 %)	305/470 (65 %)

Tableau n° 12 : Mise en évidence de la présence d'Ac sériques anti-VP1 de MCPyV chez les sujets atteints de MCC et des populations contrôles

1.1.2.2.3. Comparaison de la fréquence entre différentes populations

Quatre études ont étudié la présence d'Ac chez des sujets atteints de pathologies autres que le MCC (cutanées, hématologiques et neurologiques). Comme c'était le cas dans notre travail, ces études n'ont pas montré une prévalence – comprise entre 44 et 81 % – supérieure chez ces sujets par rapport aux sujets sains (Faust, Pastrana *et al.*; Rollison, Giuliano *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Giraud, Ramqvist *et al.* 2009).

Les résultats des études ayant comparé la prévalence des Ac chez les sujets atteints de MCC versus sujets sains ne sont pas univoques. Quatre études, incluant 2 études ayant apparié selon l'âge et le sexe les populations d'individus atteints de MCC et témoins, ont montré que la prévalence des Ac était significativement plus élevée dans la population de sujets MCC, ce que nous n'avons pas observé dans nos travaux sur deux populations non appariées (Paulson, Carter *et al.*; Viscidi, Rollison *et al.*; Carter, Paulson *et al.* 2009; Tolstov, Pastrana *et al.* 2009). Mais comme nous, une dernière étude n'a pas observé de différence (Pastrana, Tolstov *et al.* 2009). Lorsque l'on regroupe les résultats de la littérature, les Ac sont cependant plus fréquemment décelés chez les sujets atteints de MCC (242/267 ou 91% versus 3129/5526 ou 57 %).

De manière univoque et en cohérence avec nos résultats, ces 5 études ont observé, que les taux d'Ac anti-VP1 étaient plus élevés chez les sujets atteints de MCC.

1.1.2.2.4. Démonstration du lien entre taux d'Ac anti-VP1 et excrétion virale cutanée

Pastrana *et al.* ont démontré que la règle observée chez les autres Polyomavirus, selon laquelle les taux d'Ac reflètent les niveaux de réplication chronique, est respectée dans le contexte particulier de l'infection par MCPyV. Ces auteurs ont en effet montré que chez le sujet sain, le taux d'Ac est corrélé à la quantité d'ADN viral présent dans la peau après écouvillonnage – donc *a priori* excrété – la peau étant suspectée de constituer le réservoir principal de virus (Pastrana, Wieland *et al.*).

Pastrana *et al.* ont également observé que de rares (4/46 soit 9 %) individus porteurs d'ADN de MCPyV ne produisent pas d'Ac. Cette dernière observation pourrait éventuellement suggérer qu'il s'agirait d'individus récemment infectés et que la réponse immunitaire humorale anti MCPyV s'établirait lentement dans le temps.

1.1.2.2.5. Comparaison avec les taux d'Ac spécifiques des autres Polyomavirus humains

Sept études ont comparé les taux d'Ac anti-VP1 spécifiques des autres Polyomavirus humains chez les sujets atteints de MCC par rapport à la population générale (Faust, Pastrana *et al.*; Paulson, Carter *et al.*; Tolstov, Arora *et al.*; Touze, Gaitan *et al.*; Carter, Paulson *et al.* 2009; Kean, Rao *et al.* 2009; Pastrana, Tolstov *et al.* 2009). Les taux étaient comparables, signifiant que les sujets atteints de MCC ont un taux de réplication de MCPyV supérieur mais pas un taux de réplication plus important des autres Polyomavirus, ce qui corrobore notre hypothèse selon laquelle le défaut de contrôle de l'infection chez les MCC pourrait être spécifiquement dirigé contre MCPyV.

1.2. Conclusion

Nos résultats et les données de la littérature confirment le caractère ubiquitaire du virus. Ils montrent de plus que, comme cela est observé pour les autres Polyomavirus, les Ac anti-VP1 sont neutralisants *in vitro* mais ne permettent pas le contrôle de la réplication chronique *in vivo* puisque les taux les plus élevés sont observés chez les sujets qui excrètent le plus de virus au niveau de la peau.

Ces résultats suggèrent en outre que le fait que les taux d'Ac anti-VP1 de MCPyV soient plus élevés chez les sujets atteints de MCC ne s'explique pas par l'âge avancé de la plupart des sujets mais parce que les sujets atteints de MCC réplique de manière chronique MCPyV. Le fait que les taux élevés d'Ac anti-VP1 ne concernent que les Ac spécifiques de MCPyV et pas les Ac dirigés contre d'autres Polyomavirus humains corrobore notre hypothèse selon laquelle l'infection par MCPyV est spécifiquement mal contrôlée chez les sujets atteints de MCC.

Si le taux élevé d'Ac anti-VP1 permet de formuler des hypothèses quant au mécanisme de la maladie, il ne constitue cependant pas un très bon marqueur de la pathologie, puisque des Ac élevés sont également présents dans une fraction de la population générale. Cela est très probablement en rapport avec le fait que ces Ac anti-VP1 sont produits en cas d'infection productive et sont donc peu spécifiques de l'infection transformante.

2. Présence d'Ac anti-LT

2.1. Des marqueurs du MCC

Une étude dans la littérature a recherché la présence d'Ac spécifiques des oncoprotéines ST et LT de MCPyV, qui sont en théorie plus étroitement associés au cancer, chez des sujets atteints de MCC et des sujets contrôles (Paulson, Carter *et al.*). Les résultats de cette étude ont montré une différence drastique de prévalence de ces Ac, avec des taux de détection des Ac anti-ST et LT de 83 et 53/205 (soit 41 et 26 %) respectivement chez les sujets atteints de MCC versus 9 et 5/530 (soit 2 et 1 %) respectivement chez les sujets contrôles.

De plus, chez les sujets atteints de MCC, le taux moyen d'Ac était supérieur de 3 et 1 log pour les Ac anti-ST et LT respectivement, avec des taux élevés (> 15 000) observés chez 9 et 21 /530 (soit 2 et 4 %) des sujets atteints de MCC pour LT et ST respectivement. De tels taux n'ont été observés chez aucun des sujets contrôles.

Les Ac anti-LT et surtout ST, et *a fortiori* des taux élevés de ces Ac, quasi-absents de la population générale, semblent donc constituer des marqueurs spécifiques du MCC. Cependant, ils ne constituent pas des marqueurs sensibles car ils sont présents chez moins de la moitié des cas.

2.2. Lien avec l'évolution de la maladie

Paulson *et al* ont fait trois observations qui suggèrent que chez les sujets atteints de MCC, les Ac anti-ST et LT reflètent la charge tumorale. Premièrement, dans le cadre de l'infection par d'autres Polyomavirus humains, qui ne développent chez l'Homme, *a priori*, que des infections productives et non transformantes, les Ac anti-ST et LT étaient quasiment absents du sérum des sujets infectés : des Ac anti-ST et LT de BKPyV étaient observés chez moins de 2% des sujets versus 73 % pour les Ac anti-VP1.

Deuxièmement, la présence des Ac anti-ST était fortement corrélée à la fois à la présence d'ADN dans la tumeur et à l'expression de 57kT/LT par les cellules tumorales. En effet, 10/17 (59 %) des sujets avec des CVT intermédiaires ou élevées avaient des Ac anti-ST versus 0/8 sujets avec CVT indétectable et 9/14 (64 %) des sujets exprimant fortement 57kT/LT avaient des Ac anti-ST versus 0/7 des sujets n'exprimant pas LT.

Troisièmement, les taux d'Ac étaient plus élevés en moyenne de plus d'un log chez les sujets dont le diagnostic avait été effectué il y a moins de 3 mois (23 cas), par rapport à ceux dont la maladie était en rémission depuis plus de 2 ans (7 cas). Chez les sujets dont la maladie était active, le taux d'Ac était également supérieur de plus d'un log quand la maladie était métastatique (12 cas) par rapport aux sujets dont la maladie était localisée à la tumeur primitive (10 cas). Enfin, lorsque des sérums itératifs dans le temps avaient été analysés, Paulson *et al* montraient que les taux d'Ac diminuaient – avec une décroissance d'environ 10 % du taux initial par mois – chez les sujets dont la maladie était en rémission, alors que le taux augmentait chez les sujets dont la maladie progressait, l'ascension des Ac pouvant précéder de 1 à 6 mois le diagnostic clinique de la récurrence. Les taux d'Ac anti-VP1 montraient en revanche une stabilité dans le temps.

3. Réponse immunitaire cellulaire dirigée contre MCPyV

Nous n'avons pas étudié la réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre MCPyV.

Des observations de la littérature suggèrent néanmoins que celle-ci joue un rôle à la fois dans le contrôle de l'infection productive et la défense anti-tumorale.

Certaines études ont suggéré que l'infection chronique par MCPyV se développait plus fréquemment chez les sujets présentant un déficit de l'immunité cellulaire. Kassem *et al* ont décelé de l'ADN de MCPyV deux fois plus souvent dans la peau chez l'immunodéprimé (Kassem, Technau *et al.* 2009). Shuda *et al* ont suggéré que du génome de MCPyV serait plus fréquemment présent dans le sang des sujets immunodéprimés (Shuda, Arora *et al.* 2009). Wieland *et al* ont mentionné des charges virales cutanées environ 10 fois supérieures chez les sujets infectés par le VIH avec des taux de CD4 bas par rapport aux sujets sains (Wieland, Silling *et al.*).

D'autres études ont montré que l'immunité cellulaire joue un rôle dans le contrôle de la pathologie cancéreuse.

Une équipe a observé que l'infiltration cellulaire par des lymphocytes T CD8 était corrélée au pronostic de la maladie (Paulson, Iyer *et al.*).

Chez l'animal, la réponse anti-tumorale est amoindrie après déplétion des lymphocytes T CD4 et CD8 chez des souris préalablement immunisées par injection de protéines LT (Zeng, Gomez *et al.*).

Enfin une équipe a mis en évidence une réponse lymphocytaire T CD8 et CD4 spécifique de LT (Iyer, Afanasiev *et al.*). Ces lymphocytes spécifiques de LT sont plus fréquemment présent dans le sang des sujets atteints de MCC que chez les sujets contrôles. De plus, le pourcentage de lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de MCPyV est plus élevé – 20 fois supérieur dans le cas des CD8 – dans le sang des sujets atteints de MCC que dans le sang des sujets atteints de MCC (4% versus 0,2 %). De plus, seuls les lymphocytes issus de la tumeur produisent de l'interféron γ après stimulation *in vitro*.

4. Conclusion

Nos résultats et les études de la littérature concernant la réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre MCPyV confirment le caractère ubiquitaire du virus. Ils montrent également que les sujets atteints de MCC ont un profil particulier de réponse immunitaire spécifique de VP1 et corrobore notre hypothèse d'une infection chronique par MCPyV chez ces sujets.

De plus, la réponse immunitaire dirigée contre les oncoprotéines virales présente un profil spécifique chez les sujets atteints de MCC, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de l'implication du MCPyV dans la pathologie du MCC.

Bien que les Ac anti-ST et LT constituent des marqueurs spécifiques du MCC, leur mise en évidence est difficilement applicable en pratique pour le diagnostic en raison de leur présence chez une minorité de cas. En revanche, ces Ac pourraient constituer des outils précieux pour l'évaluation du pronostic de la maladie.

Chapitre 7 Le carcinome de Merkel a-t-il plusieurs étiologies ?

Il ressort de l'ensemble de nos résultats et de l'analyse de la littérature que le MCC pourrait être une pathologie hétérogène impliquant plusieurs voies physiopathologiques. En effet, comme nous l'avons mentionné, de l'ADN ou des protéines virales ne sont pas décelés dans tous les cas de MCC et ces résultats négatifs ne peuvent pas tous être expliqués par des artéfacts techniques.

De plus, des liens semblent exister entre l'obtention de résultats négatifs pour la recherche du virus et des caractéristiques de la maladie ou son pronostic.

1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

1.1. Lien entre la charge virale tumorale et le pronostic de la maladie

Dans une étude préliminaire incluant 24 cas – publiée dans le deuxième article –, nous avons observé que les sujets dont la charge virale tumorale était élevée (supérieure ou égale à 1 c/c) avaient une survie sans récurrence prolongée par rapport à ceux dont la charge virale était intermédiaire, faible ou indétectable. En revanche, nous n'avons pas observé de différence sur la survie globale.

Ces résultats suggéraient que, paradoxalement, la présence du virus oncogène ne constituait pas un désavantage. Trois hypothèses permettent d'expliquer ce paradoxe.

Dans les deux premiers cas, le MCC correspondrait à deux maladies, l'une serait liée au virus et l'autre serait indépendante de l'infection par MCPyV. Le fait que le pronostic soit plus favorable lorsque le MCC serait lié au virus pourrait s'expliquer, selon une première hypothèse, par le fait que la synthèse de protéines virales stimulerait le système immunitaire qui serait ainsi plus à même de repérer et éliminer les cellules tumorales. Selon une deuxième hypothèse, la différence de pronostic serait due au fait que lorsque la maladie ne serait pas liée au virus, elle serait associée à des perturbations génétiques plus importantes.

Selon la troisième hypothèse, tous les cas de MCC seraient liés au MCPyV, mais la persistance de l'agent ne serait pas indispensable au maintien du phénotype tumoral dans tous les cas. Les cas dépourvus de virus correspondraient alors à des cas plus évolués au moment du diagnostic, avec des cellules tumorales ayant acquis un nombre supérieur d'anomalies génétiques expliquant la différence de sévérité de la maladie. Ces anomalies génétiques pourraient être induites par le virus lui-même, et en interférant avec des voies clés de contrôle du cycle cellulaire, permettraient à la cellule tumorale de s'affranchir secondairement de leur dépendance à l'expression des oncoprotéines.

1.2. Lien entre le taux d'Ac anti-VP1 et le pronostic de la maladie

Dans notre troisième article, nous avons observé que les sujets atteints de MCC dont le taux d'Ac anti-VP1 était élevé avaient une survie globale plus prolongée.

Si l'on retient l'hypothèse selon laquelle dans le cadre de l'infection par MCPyV, la maladie survient secondairement à une réplication prolongée, ces résultats peuvent signifier que chez les sujets qui ont des taux d'Ac bas, le MCC n'est pas attribuable au MCPyV mais à d'autres causes dont le pronostic serait plus sévère.

Cependant, une observation dans notre travail suggère que dans certains cas de MCC, le virus aurait pu être impliqué au départ puis éliminé. En effet, nous n'avons pas observé de corrélation entre la CVT et le taux d'Ac anti-VP1. Plus précisément, des taux d'Ac élevés (> 10 000) – qui témoigneraient en théorie de l'implication du virus dans la pathologie – ont été observés avec la même fréquence chez les sujets avec des CVT < 1 (62 %), ≥ 1 (65 %) ou > 10 (61 %). Cela suggère que parmi les CVT faibles, certains cas seraient liés aux virus et que les CVT sont faibles parce que le virus est en cours d'élimination au moment du diagnostic.

2. Revue de la littérature

2.1. Corrélations avec le pronostic de la maladie

2.1.1. Présence de métastases au diagnostic

Des résultats contradictoires ont été publiés dans la littérature sur le lien entre la présence du virus (ADN ou protéine) et l'absence plus fréquente de métastases au diagnostic (Handsichel, Muller *et al.*; Andres, Belloni *et al.* 2009).

2.1.2. Survie

Les observations faisant état d'un lien entre la survie et la présence du virus sont également contradictoires.

Des corrélations ont été observées par certains auteurs entre une moins bonne survie spécifique et des CVT faibles ou négatives ou encore une absence d'expression de LT (Bhatia, Goedert *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Sihto, Kukko *et al.*; Sihto, Kukko *et al.* 2009). Mais ces corrélations ont été contredites par d'autres études (Hall, Pincus *et al.*; Handsichel, Muller *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*).

Waltari *et al* ont observé une corrélation entre moins bon pronostic et expression de p53 et KIT, qui seraient associés selon certains auteurs à l'absence de virus (Waltari, Sihto *et al.*). De même, une corrélation inverse (mais non significative) a été observée entre l'importance des altérations génomiques en CGH-Array et la médiane de survie (Van Gele, Speleman *et al.* 1998; Larramendy, Koljonen *et al.* 2004; Paulson, Lemos *et al.* 2009). Or Paulson *et al* ont observé une tendance vers plus d'altérations génomiques en l'absence d'ADN viral dans la tumeur.

En conclusion, le débat sur l'intérêt des marqueurs viraux dans l'évaluation du pronostic de la maladie n'est pas clos. Cette différence de pronostic en fonction de la présence du virus, si elle s'avère réelle, serait attribuable, comme nous l'avons vu, au fait que des cas minoritaires de MCC seraient soit non liés au MCPyV, soit se seraient affranchis de la dépendance au virus. Diverses études de la littérature étouffent ces hypothèses.

2.2. Etudes en faveur de deux étiologies, virale et non virale

2.2.1. Concordance intra cas

Les études de l'expression des protéines virales en IHC ont montré une concordance parfaite entre les différents prélèvements d'un même sujet avec plus d'une cinquantaine de cas analysés au total (Handsichel, Muller *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Ly, Walsh *et al.*; Reisinger, Shiffer *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*). Cette concordance ne favorise pas l'hypothèse selon laquelle le virus pourrait être éliminé.

En outre, des liens ont été observés entre la présence de MCPyV et de certaines caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la maladie.

2.2.2. Corrélations avec l'exposition au soleil : origine géographique des sujets et siège de la tumeur primitive

Deux études ont montré que la prévalence des cas de MCC associés au MCPyV pourrait être plus faible en Australie où l'exposition au soleil est importante (Paik, Hall *et al.*; Garneski, Warcola *et al.* 2009). Mais cette différence de prévalence n'a pas été confirmée par une troisième étude (Schrama, Peitsch *et al.*).

Certaines études ont établi un lien entre le siège de la tumeur primitive – au niveau de zones cutanées exposées ou non au soleil – et la présence de virus, mais dans l'ensemble les données de la littérature sont contradictoires. Sept études ont rapporté des taux de détection d'ADN ou d'expression de 57kT/LT plus faibles dans les tumeurs primitives localisées au niveau des extrémités, mais la différence n'était significative que dans 2 de ces études (Mangana, Dziunycz *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Sihto, Kukko *et al.*; Andres, Belloni *et al.* 2009; Paulson, Lemos *et al.* 2009; Sihto, Kukko *et al.* 2009) et trois études n'ont pas observé de différence (Bhatia, Goedert *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009).

Une équipe a observé que les MCC étaient plus fréquemment dépourvus de virus en IHC lorsque les sujets avaient des antécédents d'autres cancers induits par l'exposition solaire (Schrama, Peitsch *et al.*).

Quatre études ont observé que les tumeurs mixtes, comportant des composantes SCC et MCC étaient significativement plus fréquemment dépourvues d'ADN viral et/ou exprimeraient moins fréquemment ST/LT, avec une différence significative pour 3 études (Kuwamoto, Higaki *et al.*; Ly, Walsh *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009).

Enfin, 3 études ont observé une présence plus fréquente de MCPyV chez les femmes (Andres, Belloni *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*; Sihto, Kukko *et al.*).

2.2.3. Corrélation avec l'aspect anatomopathologique

Deux études ont fait mention de variations morphologiques des cellules tumorales en fonction de la présence du virus. Katano *et al.* ont observé une morphologie plus polymorphe – suggérant la présence d'altérations génétiques plus importantes – dans les cas dépourvus d'ADN de MCPyV ou n'exprimant pas 57kT/LT (Kuwamoto, Higaki *et al.*; Katano, Ito *et al.* 2009).

In vitro, deux équipes ont observé que les lignées cellulaires dépourvues d'ADN viral avaient tendance à être adhérentes et avoir un taux de prolifération supérieur, mais la différence n'était pas significative (Houben, Shuda *et al.*; Shuda, Feng *et al.* 2008) et cela n'a pas été observé par une troisième étude (Fischer, Brandner *et al.*).

D'autres études ont observé un lien entre l'expression de marqueurs immunohistochimiques et la présence du virus.

Des données contradictoires ont été publiées concernant le lien entre MCPyV et l'expression de CK20 *in vivo* ou *in vitro* (Houben, Shuda *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009; Shuda, Arora *et al.* 2009). Certaines divergences entre ces études pourraient être expliquées par le fait que l'expression de CK20 peut varier dans le temps *in vitro* et que le CK20 n'est parfois pas exprimé par les cellules métastatiques provenant d'une tumeur primitive positive pour ce marquage.

Bhatia *et al* ont observé une expression plus fréquente du CD44, de pRb, de TdT et une plus faible expression de p53 dans les tumeurs avec CVT les plus élevées (> 0,01 c/c) et exprimant LT (Bhatia, Goedert *et al.*; Bhatia, Goedert *et al.*). Les associations entre MCPyV et p53 et pRb ont été confirmées par trois études (Kuwamoto, Higaki *et al.*; Sihto, Kukko *et al.*; Waltari, Sihto *et al.*) mais infirmées par deux autres études (Houben, Schrama *et al.*; Schrama, Peitsch *et al.*).

2.2.4. Corrélation avec les résultats sérologiques

Des Ac anti-VP1 de MCPyV sont moins fréquemment décelés dans le sérum des sujets dont la tumeur ne contient pas d'ADN viral (3/6 versus 21/21, $p < 0,05$), suggérant que certains sujets atteints de MCC pourraient effectivement ne pas être infectés par le virus (Tolstov, Pastrana *et al.* 2009). De même, Paulson *et al* ont montré que des Ac anti-ST étaient moins fréquemment décelés dans le sérum des sujets dont les tumeurs n'exprimaient pas le CK20 (Paulson, Carter *et al.*), absence d'expression qui serait, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, plus fréquente dans les tumeurs non liées au virus selon certains auteurs.

2.2.5. Conclusion

Des données publiées dans la littérature suggèrent l'existence de deux étiologies éventuelles pour la maladie, avec des cas liés au virus et des cas non liés à l'infection par MCPyV.

Ces cas indépendants de MCPyV seraient liés à une importante exposition solaire, seraient donc plus fréquents en Australie, seraient localisés plus fréquemment au niveau de la tête et du cou et seraient plus souvent de type mixte, c'est-à-dire contenant un contingent de cellules de SCC. Leur profil immunohistochimique serait atypique avec une expression de CK20 faisant le plus souvent défaut. La morphologie cellulaire serait plus irrégulière, en rapport avec la présence d'un nombre supérieur d'altérations génétiques. Enfin, le pronostic de cette maladie non liée au virus serait plus sévère.

Néanmoins, les observations de la littérature sont conflictuelles et d'autres observations suggèrent que certains cas de MCC pourraient être liés initialement à l'infection par MCPyV mais que les tumeurs pourraient s'affranchir de la dépendance au virus.

2.3. Etudes en faveur d'une élimination du virus

Si les études en IHC sont unanimes, des discordances de résultats entre les différents échantillons d'un même cas ont été rapportées dans les études de détection de l'ADN, avec notamment des cas où l'échantillon de tumeur primitive contenait de l'ADN viral mais pas les biopsies métastatiques (Handschel, Muller *et al.*; Duncavage, Zehnbauer *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Wetzels, Hoefnagel *et al.* 2009). Ces observations seraient éventuellement compatibles avec une élimination du virus au cours du temps.

De plus, si *in vivo* la proportion de cas de MCC dépourvus de virus est faible, la moitié des lignées dérivées de MCC décrites dans la littérature sont dépourvues de virus, et certaines lignées positives ont un faible nombre de copies qui ne peut pas être attribuable à la présence de cellules péri-tumorales abaissant artificiellement la charge virale. Cela suggère également que le virus aurait pu ou serait en train d'être secondairement éliminé dans ces lignées (Fischer, Brandner *et al.*).

Tolstov *et al.* ont observé, de manière cohérente avec nos résultats, des taux d'Ac anti-VP1 élevés chez les sujets dont la tumeur était dépourvue d'ADN viral. La proportion de sujets avec des Ac élevés ne différait pas entre les populations de cas de MCC avec de l'ADN décelé (9/21) et sans ADN décelé (3/3) dans la tumeur. La moyenne des taux d'Ac était également comparable dans les deux populations (Tolstov, Pastrana *et al.* 2009).

La même observation a été faite pour les Ac anti-ST et LT – dont la spécificité bien supérieure à celle des Ac anti-VP1 a été démontrée – qui sont présents dans le sérum d'un quart des sujets dont la tumeur contient de faibles quantités de génome viral (3/12) ou exprimeraient faiblement les protéines 57kT/LT (2/8) (Paulson, Carter *et al.*). Enfin, une équipe a observé une réponse lymphocytaire spécifique de MCPyV chez 1/6 sujets avec une tumeur négative (Iyer, Afanasiev *et al.*).

Une étude sur l'instabilité génétique des MCC a analysé en parallèle différents prélèvements d'un même cas d'une part et, d'autre part, des échantillons source et des lignées dérivées (Van Gele, Speleman *et al.* 1998): Chez les différents prélèvements d'un même cas, les anomalies étaient partiellement discordantes dans 2/3 cas. Dans les lignées, des pertes de matériel génétique étaient présentes dans les lignées dérivées alors qu'elles n'avaient pas été observées dans le prélèvement source dans 6/7 cas. Cela signifiait que les génomes des cellules tumorales sont instables au cours du temps et que des pertes de matériel viral pourraient donc se produire au de l'évolution de la maladie.

Enfin, une étude a caractérisé une lignée tumorale à partir d'un cas possédant toutes les caractéristiques d'un MCC lié à l'infection virale : des taux d'Ac anti-VP1 et LT élevés ; une CVT supérieure à 1 c/c, de l'ADN viral muté au niveau de LT et engendrant une protéine tronquée, des séquences nucléotidiques intégrées et enfin une expression de LT par la majorité des cellules démontrée en IHC dans le prélèvement tumoral initial. *In vitro*, au contraire de 7 autres lignées décrites par cette équipe, une lignée ne présentait pas de diminution de ses capacités prolifératives après inhibition de l'expression de LT par siRNA (Houben, Grimm *et al.*). Cette observation est ainsi compatible avec une acquisition *in vitro* d'altérations génomiques supplémentaires qui aurait permis aux cellules tumorales de perdre leur dépendance à LT.

3. Conclusion

Nos résultats et les données de la littérature suggèrent donc que le MCC est une pathologie hétérogène. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par le fait que la majorité et non pas tous les cas de MCC seraient attribuables à l'infection par MCPyV, mais les données de la littérature sont conflictuelles à ce sujet. Les conséquences sur le pronostic de la maladie de la présence de MCPyV le sont tout autant.

Cette discordance entre les différents résultats de la littérature pourrait être expliquée en partie par le fait que dans certains cas de MCC liés au virus, ce dernier aurait pu être éliminé au moment du diagnostic, ce qui mènerait à classer improprement ces cas de MCC dans le groupe des pathologies non liées au MCPyV.

Quoi qu'il en soit, le caractère oncogène chez l'Homme de MCPyV semblant avéré dans une majorité des cas de MCC, nous avons souhaité déterminer si ce virus était également impliqué dans d'autres cancers chez l'Homme.

Chapitre 8 : Le MCPyV est-il impliqué dans d'autres cancers humains ?

Dans leur article princeps, Feng *et al* avaient mis en évidence de l'ADN viral dans 4 biopsies cutanées, 3 de ces échantillons correspondant à des sarcomes de Kaposi.

Nous avons donc souhaité compléter leur observation initiale en déterminant si MCPyV pouvait être impliqué dans d'autres cancers humains que le MCC.

Cette partie du travail a été publiée dans le 1^{er} et le 2^{ème} article.

La détection du génome viral dans les cancers non MCC des sujets atteints de cette pathologie a été effectuée dans le laboratoire et la recherche dans les cancers de sujets exempts de MCC par l'équipe du Dr Sastre-Garau.

1. Rôle de l'infection à MCPyV dans d'autres cancers chez les sujets atteints de MCC

1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Considérant que les individus atteints de MCC sont infectés par MCPyV de manière chronique et que ces sujets présentent très fréquemment d'autres cancers, avant, après ou au moment du MCC, nous nous sommes notamment demandé si d'autres cancers chez ces individus étaient attribuables à MCPyV.

Nous avons recherché la présence d'ADN de MCPyV dans des échantillons biopsiques de cancers cutanés non MCC – des carcinomes basocellulaires (ou Basal Cell Carcinoma, BCC) – de 4 cas et de cancers non cutanés digestifs, – colon (n=2) et estomac – de 3 cas. Nous avons obtenu des résultats négatifs pour tous les échantillons. Ces résultats ne concernant qu'un faible nombre de cas ne nous permettait pas de conclure formellement mais suggéraient que MCPyV ne semblait pas impliqué dans la survenue d'autres cancers chez les sujets atteints de MCC.

1.2. Revue de la littérature

En dehors de notre travail, une étude a recherché de l'ADN de MCPyV dans des cancers cutanés non MCC d'un sujet atteint de MCC. Un échantillon sur deux provenant d'un mélanome contenait de l'ADN viral (Haitz, Rady *et al.*).

Deux autres études n'ont pas observé d'expression de 57kT/LT dans des échantillons tumoraux – BCC et SCC – de 26 cas (Ly, Walsh *et al.*; Reisinger, Shiffer *et al.*).

Ces données de la littérature étaient donc cohérentes avec nos observations mais le nombre limité de cas étudiés au total ne pouvait permettre d'exclure formellement que MCPyV puisse induire d'autres cancers.

Nous avons donc recherché une association du virus avec d'autres cancers dans la population générale.

2. Rôle de l'infection à MCPyV dans d'autres cancers chez les sujets exempts de MCC

2.1. Autres cancers cutané-muqueux

2.1.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Nous n'avons pas mis en évidence d'ADN viral dans 26 biopsies provenant pour moitié de BCC et de mélanomes malins, ce qui suggérait que MCPyV n'était *a priori* pas impliqué dans la survenue de cancers cutanés autres que le MCC.

2.1.2. Revue de la littérature

Symétriquement aux travaux réalisés pour impliquer MCPyV dans les MCC, des études de l'ADN viral (détection, quantification et mutations), de l'expression des protéines et des études sérologiques ont été réalisées.

Etant donné que la peau constitue probablement le réservoir principal de MCPyV, le rôle cancérogène du virus dans les cancers cutanés autres que le MCC a été le plus largement analysé dans les études de la littérature. Pour deux types de raisons, l'implication de MCPyV dans la survenue du SCC a été recherchée en particulier : i) il constitue un problème de santé publique puisqu'il est le cancer cutané le plus fréquent ; ii) sa physiopathologie présente des points communs avec le MCC, puisqu'il est également favorisé par l'exposition au soleil et que le développement de tumeurs mixtes MCC/SCC n'est pas exceptionnel.

2.1.2.1. Détection de l'ADN

De l'ADN de MCPyV a été décelé dans 28/187 (15 %) biopsies de lésions précancéreuses de kératose actinique et 326/1632 (20 %) biopsies de cancers cutanés non MCC de 27 études au total (Andres, Belloni *et al.*; Faust, Pastrana *et al.*; Imajoh, Hashida *et al.*; Jung, Choi *et al.*; Kassem, Pantulu *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Loyo, Schussel *et al.*; Mangana, Dziunycz *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Mertz, Junt *et al.*; Murakami, Imajoh *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*; Rollison, Giuliano *et al.*; Toracchio, Foyle *et al.*; Wieland, Scola *et al.*; Wieland, Silling *et al.*; Foulongne, Kluger *et al.* 2008; Giraud, Ramqvist *et al.* 2008; Becker, Houben *et al.* 2009; Dworkin, Tseng *et al.* 2009; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Kassem, Technau *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Ridd, Yu *et al.* 2009; Varga, Kiss *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009). Les résultats de ces études sont présentés tableau n° 13.

De l'ADN de MCPyV était très rarement présent dans les mélanomes et absent des lymphomes cutanés, ce qui permettait d'exclure le fait que MCPyV puisse jouer un rôle dans ces cancers en particulier.

En revanche, de l'ADN viral était présent dans une fraction substantielle – entre 16 et 52 % au total de cas de SCC ou de cancers apparentés, de BCC et enfin de sarcomes de Kaposi.

Cependant, des variations importantes étaient observées entre les études avec notamment des études ne mentionnant aucun cas positif.

De plus, une étude a observé une concordance des résultats inférieure à 30 % chez les sujets qui développent des SCC multiples (Kassem, Technau *et al.* 2009).

Sept études ont mentionné des prévalences de l'ADN de MCPyV comparables voire inférieures dans les échantillons tumoraux par rapport aux prélèvements non tumoraux (Faust, Pastrana *et al.*; Foulongne, Dereure *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Martel-Jantin, Filippone *et al.*; Dworkin, Tseng *et al.* 2009; Garneski, Warcola *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

Enfin, trois études ont montré que chez 38 à 75 % des cas avec un résultat positif dans l'échantillon tumoral, le tissu sain contenait aussi de l'ADN (Faust, Pastrana *et al.*; Dworkin, Tseng *et al.* 2009; Wieland, Mauch *et al.* 2009).

2.1.2.2. Quantification du génome viral et recherche de mutations

Six études ont quantifié le génome viral présent dans la peau en dehors des MCC.

Deux études ont exprimé leurs résultats en *c/c* : les CV étaient toutes < 0,01 *c/c* dans une étude alors que dans la seconde la CV médiane était de 0,5 *c/c*, mais seul un prélèvement avait une CV > 1 *c/c* (Faust, Pastrana *et al.*; Katano, Ito *et al.* 2009).

Quatre études ont exprimé leurs résultats en comparaison avec les CVT dans les MCC et ont toutes observé des charges virales inférieures avec 0,3 à 10 log de différence (Foulongne, Dereure *et al.*; Kassem, Pantulu *et al.*; Becker, Houben *et al.* 2009; Kassem, Technau *et al.* 2009).

2.1.2.3. Mutations de l'ADN viral

Sur les 19 études ayant décelé des séquences d'ADN viral dans les cancers non MCC, 3 seulement ont mentionné la présence de mutations tronquant LT sachant que les résultats de deux d'entre elles pourraient éventuellement être attribués à des contaminations (Jung, Choi *et al.*; Nakamura, Sato *et al.*; Dworkin, Tseng *et al.* 2009). En effet, Nakamura *et al.* ont décrit une séquence issue de sarcome de Kaposi porteuse d'une délétion d'une pb engendrant un décalage du cadre de lecture, mais une délétion identique était présente dans 2 des cas de MCC de leur étude. Dworkin *et al.* ont décrit des mutations non sens dans 7 séquences issues de SSC, mais la mutation était identique dans les 9 cas et partagée avec 9 autres séquences provenant de peau saine et la séquence du contrôle positif de leur étude.

2.1.2.4. Expression du génome viral

Une étude a mentionné l'absence d'ARNm de MCPyV dans 9 échantillons de SCC contenant de l'ADN viral (Jung, Choi *et al.*).

Cependant, trois études ont observé une expression de 57kT/LT par IHC dans 6/92 (7 %) échantillons au total (Imajoh, Hashida *et al.*; Ly, Walsh *et al.*; Ota, Ishikawa *et al.*).

Publication	Pré cancer	Cancer									
	Kératose actinique	Tous cancers	SCC cutané	Maladie de Bowen	SCC ano-génital	SCC oral	BCC	Mélanome	Sarcome de Kaposi	Lymphome cutané	
	Détection de l'ADN de MCPyV nombre de positifs/nombre total (% de résultats positifs)										
1	Andres C Belloni B 2009						0/11	0/10	0/12		
2	Becker JC Houben S 2008						3/24 (13 %)				
3	Dworkin AM Tseng SY 2009			26/177 (15 %)							
4	Faust H Pastrana D 2011	12/78 (15%)		11/67 (16 %)			22/137 (14 %)				
5	Foulongne V Dereure O 2008	1/1							2/3 (67 %)		
6	Garneski KM Warcola AH 2008			2/15 (13 %)							
7	Giraud G Ramqvist T 2009							0/37			
8	Imajoh M Hashida Y 2012			9/48 (19 %)							
9	Jung HS Choi YL 2011			9/24 (38 %)				0/12			
10	Kassem A Pantulu D 2010						5/26 (19 %)				
11	Kassem A Technau K 2009			20/ 53 (38 %)	13/36 (36 %)		49/114 (43 %)				
12	Katano H Ito H 2009								3/49 (6 %)		
13	Kuwamoto S Higaki H 2011			0/1				0/1			
14	Loyo M Guerrero-Preston R 2010			3/12 (25 %)			19/47 (40 %)				
15	Loyo M Schussel J 2012			2/19 (11 %)							
16	Mangana J Dziunycz P 2009			0/8							
17	Martel-Jantin C Filippone C 2012								11/21 (52%)		
18	Mertz KD Junt T 2009	0/1		0/8	3/6 (50 %)						
19	Murakami M Imajoh M 2011			4/30 (13 %)			0/10				
20	Ota S Ishikawa S 2012	3/52 (6%)			0/34		1/46 (2 %)	0/5		0/5	
21	Ridd K Yu S 2009	0/6		0/85	0/28						
22	Rollison DE Giuliano AR 2011			66/179 (37 %)							
23	Toracchio S Foyle A 2010							0/4			
24	Varga E Kiss M 2009			0/16			0/10	0/3			
25	Wieland U Mauch C 2009	0/7		1/6	1/4 (25 %)	12/43 (30%)	3/21 (14 %)	2/12 (17%)			
26	Wieland U Scola N L 2012	12/42 (29%)		14/52 (27 %)							
27	Wieland U Silling S 2011			10/61 (16 %)							
	Total	28/187 (15 %)	326/1632 (20 %)	177/861 (21 %)	17/108 (16 %)	12/43 (30%)	19/47 (40 %)	83/399 (21 %)	2/84 (2 %)	16/85 (19 %)	0/5

Tableau n° 13 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de lésions précancéreuses et cancéreuses cutanées de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature
dehors de l'étude princeps

en

2.1.2.5. Séroprévalence et présence d'ADN dans le sang

Deux études ont étudié la séroprévalence de MCPyV chez les sujets atteints de pathologies cutanées autres que le MCC. Comme nous l'avons déjà mentionné, il n'a pas été observé de différence significative de prévalence avec la population générale (Faust, Pastrana *et al.*; Rollison, Giuliano *et al.*). Rollison *et al* ont observé que les sujets atteints de SCC et ayant au moins un SCC contenant de l'ADN viral avaient en moyenne des taux d'Ac anti-VP1 de MCPyV plus élevés que chez les sujets ayant des SCC dépourvus d'ADN. Mais cette différence était faible (moins d'un log) et les auteurs n'ont pas comparé leur population de sujets avec SCC contenant de l'ADN de MCPyV avec des sujets exempts de SCC mais porteurs du virus. Faust *et al*, qui ont effectué cette comparaison, ont montré que chez les sujets porteurs d'ADN dans la peau, les taux d'Ac ne différaient pas entre les sujets atteints de cancers cutanés et les contrôles. Les différences de taux étaient corrélées à la charge virale cutanée de la même manière dans les deux populations.

Enfin, Dworkin *et al* ont montré qu'au contraire de ce que nous avons observé dans les cas de MCC, l'ADN viral n'était pas décelé dans le sang chez 57 patients atteints de SCC (Dworkin, Tseng *et al.* 2009).

2.1.3. Conclusion

En conclusion, nos résultats et les données actuelles de la littérature ne permettent pas d'impliquer formellement MCPyV dans la survenue d'autres cancers cutanés que les MCC. Nous ne pouvons cependant exclure que le virus joue un rôle accessoire dans une minorité de cas de certains types de cancers cutanés non MCC tels que les SCC.

2.2. Autres cancers non cutanéomuqueux

2.2.1. Résultats obtenus au cours du travail de thèse

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous n'avons pas décelé d'ADN de MCPyV dans 1209 échantillons tumoraux de divers tissus non cutanés, incluant l'appareil digestif, l'appareil génito-urinaire, le sein, les os, les muscles et le cerveau.

Ces résultats univoques ne sont pas en faveur d'un rôle joué par MCPyV dans les cancers extra-cutanés. Nous n'avons cependant pas examiné certains types de tissus, tels que l'appareil respiratoire et le tissu sanguin.

2.2.2. Revue de la littérature

2.2.2.1. Cancers pulmonaires

2.2.2.1.1. Détection de l'ADN

En dehors de la peau, c'est dans les cancers de l'appareil respiratoire que le rôle de MCPyV a été le plus analysé dans la littérature, là encore en raison de 2 types d'arguments. Tout d'abord, le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent dans le monde. Ensuite, le MCC présente des similarités avec la forme particulière de cancer pulmonaire non lié à l'exposition tabagique que constitue le carcinome pulmonaire à petites cellules (ou Small Cell Lung Carcinoma, SCLC). En effet, le SCLC constitue également une pathologie agressive se développant préférentiellement chez le sujet âgé et un cancer de type neuro-endocrine composé histologiquement de petites cellules morphologiquement très proches de celles du MCC.

Douze études ont recherché la présence d'ADN de MCPyV dans des cancers de l'appareil respiratoire (Bhatia, Modali *et al.*; de Biase, Ragazzi *et al.*; Gheit, Munoz *et al.*; Joh, Jenson *et al.*; Kuwamoto, Higaki *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Andres, Ihrler *et al.* 2009; Duncavage, Le *et al.* 2009; Helmbold, Lahtz *et al.* 2009; Katano, Ito *et al.* 2009; Touze, Gaitan *et al.* 2009; Wetzels, Hoefnagel *et al.* 2009). Les résultats de ces études sont présentés tableau n° 14.

Les prévalences rapportées variaient de 0 (6/12 études) à 39 % des cas, avec des résultats positifs dans 31/309 (10 %) biopsies au total.

La présence de génome viral n'était pas plus fréquente dans les cancers pulmonaires de type neuro-endocrines (SCLC) avec 9/107 (8 %) résultats positifs au total pour les SCLC versus 11/132 (8 %) pour les cancers pulmonaires non à petites cellules (ou Non Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC). En revanche l'ADN viral a été très rarement décelé dans un troisième type de cancer, le mésothéliome (1/42 ou 2 %).

Bien que ces prévalences soient faibles, une étude comparative unique a néanmoins montré une prévalence de l'ADN viral deux fois supérieure dans les tumeurs par rapport au tissu péri-tumoral, avec de l'ADN en péri-tumoral chez seulement 1/7 des cas positifs (Joh, Jenson *et al.*).

		Détection de l'ADN de MCPyV				
		nombre de positifs/nombre total (% de résultats positifs)				
		Tous	Varié	SCLC	NSCLC	Mésothéliome
1	Andres C Ihrler S 2009			2/30 (7%)		
2	Bhatia K Modali R 2010					1/42 (2%)
3	de Biase D Ragazzi M 2011			0/12		
4	Duncavage EJ Le BM 2009			0/16	0/16	
5	Gheilt T Munoz JP 2012				4/86 (5 %)	
6	Helmbold P Lahtz C 2009			7/18 (39 %)		
7	Joh J Bennett Jenson A 2010				7/30 (23 %)	
8	Katano H Ito H 2009			0/15 (0%)		
9	Kuwamoto S Higaki H 2011			0/1 (0%)		
10	Loyo M Guerrero-Preston R I2010		10/28 (36%)			
11	Touze A Gaitan J 2009			0/5		
12	Wetzels C Hoefnagel J 2009			0/10		
	Total	31/309 (10 %)	10/28 (36%)	9/107 (8%)	11/132 (5%)	1/42 (2%)

Tableau n° 14 : Détection de l'ADN de MCPyV dans des biopsies de cancers pulmonaires de sujets exempts de MCC d'après les données de la littérature

2.2.2.1.2. Quantification de l'ADN et expression du génome viral

Deux études de quantification ont été réalisées dans la littérature – incluant 11 prélèvements de cancers pulmonaires positifs au total – et ont observé de très faibles quantités (< 0,001 c/c) d'ADN de MCPyV.

Une étude a observé la synthèse d'ARNm correspondant à LT dans un cas (Gheit, Munoz *et al.*).

Trois études ont montré l'absence d'expression de 57kT/LT dans les cancers pulmonaires avec 1 seul cas avec faible expression sur 76 SCLC et 16 cancers non à petites cellules (Ly, Walsh *et al.*; Paik, Hall *et al.*; Busam, Jungbluth *et al.* 2009).

Les données actuelles de la littérature ne sont donc pas en faveur d'un rôle joué par MCPyV dans les cancers pulmonaires.

2.2.2.2. Hémopathies

2.2.2.2.1. Détection et quantification de l'ADN viral

La présence de génome viral de MCPyV a été étudiée avec attention dans les hémopathies et en particulier dans la leucémie lymphoïde chronique (ou LLC) en raison du fait que cette pathologie est environ 15 fois plus fréquente chez les patients MCC que dans la population générale (Koljonen, Kukko *et al.* 2009).

Cinq études ont étudié la prévalence de l'ADN de MCPyV dans les LCC et ont observé des prévalences entre 2 et 33%, avec détection de génome viral dans 35/194 (18 %) des échantillons au total (Cimino, Bahler *et al.*; Comar, Cuneo *et al.*; Pantulu, Pallasch *et al.*; Teman, Tripp *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009).

Cimino *et al* ont effectué un tri des cellules tumorales et observé que dans 3 de leur 6 cas, l'ADN viral n'était présent ni dans les lymphocytes T ni dans les lymphocytes B, suggérant que dans ces cas le virus était présent dans d'autres lignées cellulaires que les lymphocytes et n'était donc pas impliqué dans la LLC.

Comar *et al* ont montré que dans leur unique cas positif, l'échantillon était positif à 1 mois du diagnostic mais pas au moment du diagnostic et que le patient était également porteur du virus dans les amygdales et une lésion cutanée. Cela suggérait que le sujet était infecté par MCPyV mais que ce dernier n'était pas impliqué dans la survenue de la LLC.

Alors que 2 de ces équipes ont effectué des analyses comparatives, une seule a observé une prévalence supérieure dans les échantillons de LLC par rapport au sang des sujets contrôles (Pantulu, Pallasch *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009).

Enfin, dans 2 études, les quantités de génome viral étaient inférieures en moyenne de 2 à 4 log à celles observées dans les MCC (Teman, Tripp *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009)

Dans les hémopathies malignes en dehors de la LCC, l'ADN a été décelé moins fréquemment, dans 2 et 7 % des cas dans 2 études, avec au total 19/488 (4 %) échantillons cancéreux positifs, la prévalence dans les échantillons contrôles étant comparable ou supérieure, et des charges virales très faibles (< 0,01 c/c) dans tous les échantillons positifs (Toracchio, Foyle *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009).

2.2.2.2.2. Mutations de l'ADN viral

Deux études de la littérature ont mentionné la présence de mutations du génome de MCPyV associé à des hémopathies malignes. Pantulu *et al* ont en effet mis en évidence des mutations tronquantes de la séquence codante de LT dans 6/19 échantillons de LCC contenant de l'ADN de MCPyV (Pantulu, Pallasch *et al.*). Cependant, cette mutation, une délétion de 246 pb, était identique dans les 6 cas, ce qui est contraire à ce que nous avons observé dans les MCC : si les mutations non sens étaient parfois communes à différents cas, les délétions étaient toujours spécifiques d'un cas. Or, une délétion identique était également présente dans un échantillon de MCC analysé par cette équipe, ce qui pose la question d'une contamination éventuelle. Cette même équipe a néanmoins publié un second travail sur l'analyse de l'intégration du génome viral par la méthode de FISH montrant que dans 4/6 de ces cas l'ADN de MCPyV était intégré (Haugg, Speel *et al.*)

2.2.2.2.3. Expression de l'ADN viral

L'expression de 57kT/LT dans les hémopathies malignes semble rare. Pantulu *et al* ont décrit deux cas de LCC positifs (sans précision du nombre de cas totaux analysés) alors que 12 cas analysés par Shuda *et al* étaient négatifs (Pantulu, Pallasch *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009)

Tolstov *et al* ont de plus analysé 2 cas de tumeurs ganglionnaires mixtes dans lesquelles seul le contingent cellulaire de type MCC – exprimant la cytokératine 20 – était positif après marquage par un Ac spécifique de 57kT/LT de MCPyV (Tolstov, Arora *et al.*)

Dans les lymphomes, seul 1/153 cas de deux études était positif (Toracchio, Foyle *et al.*; Shuda, Arora *et al.* 2009)

2.2.2.2.4. Etudes sérologiques

Tolstov *et al* ont observé des séroprévalences et des taux d'Ac anti-VP1 chez les sujets atteints de LCC ou de leucémie aiguë comparables entre eux et à ceux de la population générale (Tolstov, Arora *et al.*). Robles *et al* ont étudié la séroprévalence chez des sujets atteints de diverses hémopathies, incluant 108 sujets avec des LLC. Analysées séparément, seuls les sujets avec des lymphomes B diffus à large cellules avait significativement plus d'Ac, mais leur taux d'Ac n'était pas supérieur (Robles, Poloczek *et al.*)

2.2.2.2.5. Conclusion

Les données actuelles de la littérature sur l'implication éventuelle de MCPyV dans les hémopathies malignes sont conflictuelles et on ne peut exclure à l'heure actuelle un rôle du virus dans certaines LLC. L'association de MCPyV apparaît cependant moins forte qu'avec les MCC.

2.2.2.3. Cancers digestifs

Cinq études ont étudié l'association entre l'infection par MCPyV et les cancers digestifs. Des prévalences de 0 (2 études) à 31 % ont été observées, avec au total de l'ADN présent dans 25/281 soit 9% (incluant 0/12 tumeurs neuro-endocrines) biopsies de cancer du tractus digestif et 10/16 (63 %) biopsies d'hépatocarcinomes (Campello, Comar *et al.*; Jung, Choi *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Duncavage, Le *et al.* 2009; Kassem, Technau *et al.* 2009).

Deux études ont comparé la prévalence dans des tissus sains et cancéreux sans observer de différence (Comar, Cuneo *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*)

Bien que ce soit dans l'appareil digestif que Loyo *et al* aient observé les CV les plus élevées en dehors des MCC, celles-ci étaient inférieures de 1 à 2 log par rapport aux CVT dans les MCC (Loyo, Guerrero-Preston *et al.*).

Une étude n'a pas observé d'expression de 57kT/LT en IHC dans 15 tumeurs neuro-endocrines digestives (Ly, Walsh *et al.*).

Enfin, Campello *et al* n'ont pas observé d'ADN dans le sang des sujets avec un cancer colique, contrairement à ce que nous avons observé pour les MCC (Campello, Comar *et al.*).

Les données de la littérature ne sont donc pas en faveur d'un rôle de MCPyV dans les cancers digestifs.

2.2.2.4. Autres cancers

Cinq études ont étudié la présence de l'ADN de MCPyV dans les cancers de l'appareil uro-génital. Les prévalences variaient de 0 (3/5 études) à 25 % avec la détection de génome viral dans 16/131 (12 %) biopsies au total, incluant 0/8 tumeurs neuro-endocrines (Jung, Choi *et al.*; Khan, Philip *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*; Bluemn, Paulson *et al.* 2009; Duncavage, Le *et al.* 2009).

Dans le détail, si l'on regroupe l'ensemble des résultats, du génome viral a été décelé, par ordre de prévalence décroissante, dans 6/8 cancers vésicaux, 3/16 cancers du rein, 6/34 cancers prostatiques et 1/9 cancer testiculaire.

Du génome viral n'a été décelé que dans 3/223 ((1 %) biopsies de cancer du sein (Jung, Choi *et al.*; Khan, Philip *et al.*; Loyo, Schussel *et al.*)

Enfin, 2 études incluant 61 échantillons a montré que l'absence d'ADN de MCPyV dans les cancers cérébraux (Giraud, Ramqvist *et al.* 2009).

En conclusion, MCPyV ne semble pas impliqué dans la survenue de cancers dans ces 3 types de tissu.

3. Conclusion

A l'heure actuelle, MCPyV n'a pas été associé à d'autres cancers humains de manière aussi forte que dans le cas des MCC. Le virus ne serait donc pas cancérogène dans la peau ou les tissus neuro-endocrines en général.

Dans le cas de certains cancers, tels que les cancers des appareils respiratoire, digestif, et génito-urinaire ou encore les cancers cérébraux, les données de la littérature permettent raisonnablement d'exclure un rôle du virus. En revanche, les études publiées dans la littérature concernant d'autres cancers, notamment les SCC et les LLC, ne permettent pas formellement d'exclure que le virus puisse jouer un rôle dans une minorité des cas.

Quatrième partie
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

1. L'infection par MCPyV est ubiquitaire, persistante et le plus souvent asymptomatique

1.1. MCPyV infecte la population générale

Notre travail et les données de la littérature ont clairement établi que, bien qu'il ait été découvert en tant qu'agent oncogène potentiellement impliqué dans un cancer cutané rare, MCPyV présente un caractère ubiquitaire.

En effet, toutes les études sérologiques réalisées à ce jour ont montré que la majorité des individus de la population générale possède des Ac spécifiques de la protéine structurale majeure de MCPyV.

Ce caractère ubiquitaire du virus a été confirmé par les études de la littérature sur la détection de l'ADN de MCPyV après écouvillonnage de sites cutanés multiples et à différentes périodes dans le temps, même si le nombre de ces études est plus restreint et que celles-ci incluaient un nombre plus limité d'individus que les études sérologiques.

Ce caractère ubiquitaire de MCPyV est cohérent avec les connaissances sur les autres virus de la même famille infectant l'Homme. Les études sérologiques de la littérature ont d'ailleurs montré que, comme pour les autres Polyomavirus à tropisme humain, l'infection par MCPyV survient dans l'enfance.

1.2. MCPyV infecte de nombreux tissus

Notre travail et les données de la littérature ont également clairement établi que MCPyV infecte de nombreux tissus en dehors de la peau. De multiples études sur la détection de l'ADN viral incluant un grand nombre d'individus ont en effet mis en évidence la présence de MCPyV dans des tissus variés, tels que les appareils digestifs, respiratoires, génito-urinaires et le tissu sanguin.

Ce caractère disséminé de l'infection par MCPyV est semblable à ce qui est observé pour les autres Polyomavirus humains qui partagent cette capacité à infecter des tissus variés. En revanche, MCPyV se distingue d'autres virus à tropisme cutané, tels que les Papillomavirus, puisque ces derniers développent une infection locale strictement limitée à la peau.

Quelques études de la littérature ont suggéré que parmi les tissus infectés par MCPyV, c'est la peau qui constituerait le réservoir principal de virus, ce qui est cohérent avec le fait que MCPyV soit associé à un cancer cutané.

Ce tropisme préférentiel pour la peau distingue MCPyV des autres Polyomavirus. Jusqu'en 2010, MCPyV était en effet le seul Polyomavirus humain – et le seul Polyomavirus de mammifères à l'exception de HaPyV – à présenter un tropisme cutané. Mais depuis la découverte de MCPyV, 5 nouveaux Polyomavirus infectant l'Homme ont été découverts : les 6^{ème} et 7^{ème} Polyomavirus humains (ou Human Polyomavirus 6 et 7, HPyV6 et 7) (Schowalter, Pastrana *et al.*), le Polyomavirus associé à la *Trichodysplasia Spinulosa* (ou Trichodysplasia Spinulosa Associated Polyomavirus, TSPyV) (van der Meijden, Kazem *et al.*) en 2010, le 9^{ème} Polyomavirus (ou Human Polyomavirus, HPyV9) en 2011 (Scuda, Hofmann *et al.*) et le Polyomavirus MW (ou MW Polyomavirus, MWPyV) en 2012 (Siebrasse, Reyes *et al.*). Les 4 premiers virus ont été découverts dans la peau. Le dernier a été mis en évidence dans un échantillon de selles mais sa prévalence dans ce type de prélèvements est faible ce qui suggère que l'appareil digestif ne constitue pas forcément le réservoir principal de MWPyV. Ainsi, actuellement, plus de la moitié des Polyomavirus connus pour infecter l'Homme ont un tropisme cutané. Il est donc possible que, comme la famille des Papillomavirus, les Polyomavirus humains constituent une large famille de virus à tropisme cutané dont la majorité des membres resterait à découvrir.

1.3. Caractère persistant de l'infection

Nos résultats et les données de la littérature ont clairement démontré la capacité de MCPyV à établir une infection persistante. En effet, les études sérologiques ont montré que le virus était acquis dans l'enfance alors que le MCC qui lui est lié se développe très tardivement dans la vie. En outre, notre travail et celui d'autres équipes ont montré que de l'ADN viral est présent à plusieurs mois d'intervalle chez les sujets infectés, que ceux-ci soient ou non atteints de MCC. MCPyV partage cette propriété à établir une infection persistante avec les autres Polyomavirus humains.

1.4. Une infection le plus souvent asymptomatique

Comme nous le détaillerons ci-après, notre travail et les données de la littérature sont en faveur du rôle étiologique de MCPyV dans les MCC. Mais en dehors de cette pathologie rare, l'infection par MCPyV semble être asymptomatique chez la majorité de sujets infectés. A titre d'exemple, les études concernant le pouvoir pathogène de MCPyV dans l'appareil respiratoire ont montré que lorsque de l'ADN de MCPyV était décelé, du génome viral d'autres virus à tropisme respiratoire était fréquemment présent. De plus, le suivi sur plusieurs années d'enfants ayant présenté un épisode d'infection respiratoire haute n'a pas montré un taux supérieur de séroconversion pour MCPyV chez ces derniers par rapport à un groupe contrôle (Chen, Hedman *et al.*).

Cela est cohérent avec ce qui est observé avec les autres Polyomavirus humains, qui sont non ou rarement pathogènes. En ce qui concerne les Polyomavirus à tropisme cutané en particulier, MCPyV et TSPyV sont les seuls à être impliqués dans une pathologie à l'heure actuelle. Comme MCPyV, TSPyV est associé à une prolifération cutanée chez l'immunodéprimé, mais bénigne dans le cas de ce dernier. Les autres virus ont été découverts dans la peau de sujets asymptomatiques. Il est donc probable que les Polyomavirus humains comprennent une variété de virus constituant des commensaux cutanés, de la même manière que nous cohabitons en bons termes avec de multiples Papillomavirus cutanés.

2. Mode de transmission et de dissémination du virus

2.1. Mode de transmission

Le mode de transmission du MCPyV n'est à l'heure actuelle pas connu.

Les données de la littérature ont permis d'éliminer certains mode de transmission. Ainsi, il a été démontré que MCPyV n'est pas transmis voie verticale, puisque bien que la moitié environ des femmes enceintes soient porteuses d'Ac spécifiques du virus, de l'ADN de MCPyV n'a pu être décelé que chez 0,2 % de plus de 300 prélèvements fœtaux (Sadeghi, Riipinen *et al.*). Les études de séroprévalence chez l'enfant ont de plus montré que l'infection par MCPyV est rare chez le nourrisson (Chen, Hedman *et al.*).

Etant donné que la peau semble constituer le réservoir principal de virus, la contamination par MCPyV pourrait se faire par voie cutanée, par contact direct ou indirect (puisque le virus est dépourvu d'enveloppe et relativement résistant), de manière comparable au mode de transmission des Papillomavirus cutanés. En faveur de cette hypothèse, une équipe a montré que de l'ADN de MCPyV est fréquemment présent sur des surfaces environnementales et qu'une fraction au moins de cet ADN correspondant probablement à du virus infectieux puisqu'il était inclus dans des particules virales (Foulongne, Courgnaud *et al.*). Si ce mode de contamination est confirmé, il serait en cohérence avec la banalité de l'infection, mais il rendrait caduque tout espoir de limiter la dissémination chez l'Homme de ce virus oncogène.

Mais d'autres études de la littérature que nous avons préalablement mentionnées ont proposé d'autres modes de transmission, telles que les voies salivaires (Foulongne, Kluger *et al.*; Loyo, Guerrero-Preston *et al.*), oro-fécale (Loyo, Guerrero-Preston *et al.*) ou encore respiratoire (Kantola, Sadeghi *et al.* 2009).

2.2. Mode de dissémination et tropisme cellulaire

Nous ne savons pas non plus à l'heure actuelle comment MCPyV dissémine dans l'organisme infecté. Si le virus pénètre dans l'organisme au niveau de la surface cutanée comme supposé, les moyens par lesquels il disséminerait dans les autres tissus à partir de la peau ne sont pas connus. Mertz *et al* ont suggéré que le virus pourrait gagner la circulation sanguine *via* les monocytes-macrophages résidant dans la peau (Mertz, Junt *et al.*). Ainsi, comme le HIV, MCPyV utiliserait les cellules du système immunitaire pour disséminer dans l'organisme.

Les cellules que MCPyV infecte n'ont pas non plus été identifiées. Dans la peau, le fait que MCPyV soit impliqué dans les MCC suggère que le virus infecte soit les cellules de Merkel, soit les cellules progénitrices de celles-ci. Mais étant donné la rareté de ces deux types de cellule dans la peau normale, et le fait que ces cellules soient localisées dans la couche basale de l'épiderme alors que du virus est vraisemblablement excrété à la surface de la peau, il est probable que MCPyV infecte d'autres types cellulaires. Comme nous l'avons mentionné, l'ADN de MCPyV est beaucoup moins fréquemment décelé dans les mélanomes que dans les SCC ou les BCC, ce qui permet de suspecter que les kératinocytes, mais pas les mélanocytes, constitueraient des cibles potentielles du virus.

Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné, les modèles de réplication *in vitro* qui ont été testés à l'heure actuelle, incluant une vingtaine de lignées cellulaires en monocouches, ne permettent d'obtenir que des rendements faibles de production virale. Cela permet de supposer que la réplication de MCPyV dans la peau est liée au processus de différenciation cellulaire comme cela est observé pour les Papillomavirus.

Enfin, les supports moléculaires du tropisme de MCPyV ne sont pas connus. Des études de la littérature ont montré que comme les autres Polyomavirus, MCPyV utilise de manière séquentielle deux types de récepteurs cellulaires, des gangliosides et des glycoprotéines contenant des acides sialiques (Neu, Hengel *et al.*; Schowalter, Pastrana *et al.*; Schowalter, Reinhold *et al.*; Erickson, Garcea *et al.* 2009). Cependant, comme c'est le cas pour d'autres Polyomavirus humains, ces molécules sont exprimées dans une grande variété de tissus et ne permettent pas d'expliquer la spécificité du tropisme cutané de MCPyV.

3. MCPyV constitue également très probablement un agent oncogène chez l'Homme

3.1. MCPyV est vraisemblablement impliqué dans la survenue des MCC

Notre travail et les données actuelles de la littérature fournissent des arguments forts en faveur du rôle de MCPyV dans les MCC. Si l'on se réfère aux critères mentionnés dans l'introduction générale pour incriminer un agent infectieux dans un cancer, plusieurs d'entre eux sont en effet remplis à l'heure actuelle.

L'association entre MCPyV et MCC est forte, puisque environ $\frac{3}{4}$ des tumeurs contiennent de l'ADN viral. Cette association est consistante puisque elle a été observée dans de multiples études incluant de nombreux cas. Enfin, elle est spécifique, en dépit du caractère ubiquitaire du virus.

En effet, bien que de l'ADN viral soit fréquemment présent en dehors des MCC et ce parfois en grande quantité, l'ADN de MCPyV associé aux MCC présente plusieurs spécificités. L'ADN viral est intégré au génome des cellules tumorales, et ce de manière monoclonale, révélant que l'événement d'intégration se produit précocement. L'ADN de MCPyV est muté, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse d'une présence passagère du virus. Enfin, les gènes codant les protéines précoces sont fortement exprimées, comme en témoignent les études d'IHC.

De plus, bien que des Ac spécifiques de MCPyV soient présents chez la majorité de la population générale, le pourcentage de sujets séropositifs semble plus élevé chez les sujets atteints de MCC. Ces derniers présentent en outre un profil sérologique spécifique, puisque les taux d'Ac anti-VP1 sont plus faibles dans la population générale que chez les individus atteints de MCC et que les Ac anti-ST et LT sont présents quasi-exclusivement chez ces derniers.

L'association entre MCPyV et MCC est également cohérente. En effet, l'infection par MCPyV survient avant le développement du cancer. L'association est de plus justifiée rationnellement. Les mécanismes qui sous-tendent la transformation cancéreuse, que nous discuterons ci-dessous, présentent des analogies avec ceux décrits chez d'autres Polyomavirus oncogènes chez l'animal. Enfin, des études préliminaires *in vitro* apportent des informations en faveur du caractère oncogène de la protéine LT de MCPyV.

Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude de transformation par MCPyV *in vitro* chez l'Homme n'a été rapportée dans la littérature. Une étude a cependant montré le caractère transformant *in vitro* de ST de MCPyV dans des cellules de rongeurs (Shuda, Kwun *et al.*). Des travaux d'induction de tumeurs secondaires à des injections de MCPyV chez l'animal n'ont pas non plus été réalisés. Ces études sont en effet délicates à mener en raison des difficultés rencontrées pour cultiver le virus. Aucune particule virale n'a été isolée à l'heure actuelle et les transfections *in vitro* de génome viral aboutissent à de faibles rendements de production de virus. La réalisation de ces études serait néanmoins nécessaire pour établir de manière définitive le caractère oncogène de MCPyV chez l'Homme. Dans l'attente de ces études, les experts de l'IARC ont actuellement classé MCPyV comme étant un agent "probablement cancérigène chez l'Homme".

3.2. Autres cancers

Si le rôle étiologique de MCPyV dans une majorité des MCC semble avéré, ce virus ne semble pas à l'heure actuelle clairement associé à d'autres cancers chez l'Homme.

Nos résultats et les données de la littérature permettent raisonnablement d'exclure que MCPyV soit impliqué dans certains cancers, notamment d'autres cancers cutanés tels que les mélanomes malins et d'autres cancers neuro-endocrines tels que les SCLC. Cela montre que MCPyV ne constitue pas un agent oncogène dans les tissus cutanés et neuro-endocrines en général.

En revanche, de rares études de la littérature sont en faveur d'une implication éventuelle de MCPyV dans une minorité de cas d'autres types de cancers. L'étude la plus troublante à ce sujet parmi celles que nous avons mentionnées est celle ayant rapporté la présence d'ADN viral intégré dans des cellules de LLC. Néanmoins, ces données méritent à l'heure actuelle d'être confirmées.

4. Conséquences de l'implication de MCPyV dans les MCC pour la pratique clinique

La découverte du rôle de MCPyV dans les MCC a des conséquences pour la pratique clinique.

4.1. Conséquences pour le diagnostic

La mise en évidence du virus peut tout d'abord constituer un outil pour le diagnostic de la maladie, qui, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, peut être délicat en raison de la confusion possible avec d'autres tumeurs neuro-endocrines et l'expression inconstante des marqueurs immunohistochimiques de la maladie. La mise en évidence d'autres virus, tels que HHV8 ou les HR-HPV sont en effet actuellement utilisés en routine pour le diagnostic de cancers qui leur sont liés. A noter cependant que dans le cas de MCPyV, la mise en évidence du virus constitue un outil potentiel pour le diagnostic positif mais ne permettrait pas l'exclusion du diagnostic en l'absence de composants viraux décelés puisque ceux-ci sont manquant dans environ ¼ des cas de MCC. La situation est donc différente de celle des cancers du col utérin chez lesquels de l'ADN de HR-HPV sont décelés dans la quasi-totalité des cas, mais comparable au cas des cancers oro-pharyngés qui ne sont associés aux HR-HPV que dans environ la moitié des cas.

4.1.1. Mise en évidence de l'ADN viral

Nos observations et les résultats de la littérature ont montré que le caractère ubiquitaire de l'infection par MCPyV ne permet pas d'utiliser la simple détection d'ADN viral comme marqueur de la maladie.

L'analyse comparative des données de la littérature a montré que la quantification du génome viral est également problématique. En effet, les charges virales tumorales sont le plus souvent de l'ordre de quelques copies de génome viral. La quantification de ces charges virales – relativement modestes par rapport à d'autres cancers – est donc particulièrement sensible à des défauts de conservation de l'ADN, notamment dans les échantillons conservés en paraffine qui sont fréquemment utilisés en pratique, ou à des mutations des séquences qui sont de fait associées aux MCC. Cette situation est donc différente de celles des cancers viro-induits par EBV ou HHV8 chez lesquels sont observées des charges virales massives qui ne sont pas mises en évidence chez le sujet sain.

Pour résoudre les problèmes de contamination de l'ADN viral tumoral par des séquences nucléotidiques de MCPyV présentes dans la peau saine, des techniques de décapage de la peau superficielle préalablement à la biopsie ou "*stripped biopsy*", comme cela a été fait dans le cas des Papillomavirus cutanés, pourraient être utilisées mais n'ont pour l'instant pas été évaluées dans le cas des MCC (Forslund, Lindelof *et al.* 2004).

Les signatures moléculaires de l'ADN de MCPyV associé au MCC pourraient également être mises à profit pour le diagnostic de la maladie.

Considérant les faits que la séquence codant l'extrémité N terminale de LT soit préservée dans les tumeurs au contraire de la séquence codant l'extrémité C terminale de cette protéine qui présente fréquemment des troncatures et/ou des mutations, Schmitt *et al* Schmitt M, Wieland U IJC 2012 ont montré que le calcul du rapport du nombre de séquences N terminales sur le nombre de séquences T terminales était plus spécifique des MCC que la simple détection d'ADN de MCPyV par PCR (Schmitt, Wieland *et al.*). Ce type de calcul a déjà été évalué dans le cas des cancers liés aux HR-HPV, puisque dans ces cas le gène viral codant l'oncoprotéine E6 est préservé au contraire du gène codant E2 qui est fréquemment éliminé dans les tissus tumoraux (Boulet, Benoy *et al.* 2009).

De même, le fait que les séquences de MCPyV soient intégrées au sein des MCC pourrait également être utilisé pour le diagnostic dans le futur. Les méthodes de FISH et de DIPS-PCR que nous avons présenté dans notre travail constituent des méthodes lourdes exigeant du matériel congelé, mais une technique de mise en évidence de séquences virales intégrées dans des tissus en paraffine a été récemment décrite (Duncavage, Magrini *et al.*)

4.1.2. Mise en évidence des protéines virales

La méthode qui semble la plus rapidement applicable en pratique clinique est celle de la détection des oncoprotéines virales par IHC. Les données de la littérature ont en effet montré que cette technique semble spécifique des MCC, probablement en raison du fait que les oncoprotéines virales sont fortement exprimées par les cellules tumorales au contraire des quantités faibles en deçà du seuil de détection produites lors de l'infection productive. Néanmoins, un seul Ac monoclonal est actuellement commercialisé et plusieurs études ont rapporté une spécificité imparfaite de cet Ac, puisqu'il réagissait fréquemment avec des composants non tumoraux tels que les lymphocytes matures, les glandes sudoripares et l'endothélium. Un travail d'évaluation de l'intérêt de l'IHC par rapport à la technique de PCR dans notre cohorte de cas est en cours au laboratoire.

4.1.3. Marqueurs sérologiques

Notre travail et les données de la littérature ont montré que le profil sérologique de la réponse immunitaire dirigée contre MCPyV présente des spécificités chez les sujets atteints de MCC. Un taux élevé d'Ac anti-VP1 constitue un marqueur sensible puisque celui-ci est observé chez une majorité d'individus atteints de MCC. Il est moins spécifique en revanche que les Ac anti-ST ou LT qui sont présents quasi-exclusivement chez les sujets atteints de MCC, la mise en évidence de ces derniers Ac constituant en revanche une méthode de sensibilité médiocre puisque ces Ac sont absents dans plus de la majorité des cas de MCC. A l'heure actuelle, une seule étude a montré l'intérêt potentiel de ces Ac, mais un travail de confirmation est en cours dans le laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr Coursaget. Ces marqueurs sérologiques, qui pourraient être utilisés en combinaison (anti-VP1 et anti-ST/LT), présentent l'avantage de ne pas nécessiter de matériel tumoral, mais leur détection n'est pas facilement applicable en pratique en l'absence de tests commercialisés.

4.2. Conséquences pour l'évaluation du pronostic

Nos résultats ont montré un lien entre la présence de quantités élevées d'ADN viral dans les MCC et le pronostic de la maladie, mais des observations contradictoires ont été publiées concernant l'association entre le MCPyV et la sévérité du MCC. Les divergences rapportées par les différentes études de la littérature sont probablement en rapport avec des artefacts techniques que nous avons mentionnés, l'absence à l'heure actuelle de critères consensuels d'attribution de la maladie au MCPyV et enfin le fait que des tumeurs initialement dues au virus pourraient avoir perdu leur dépendance à l'expression des oncoprotéines virales. Dans le cas des cancers oro-pharyngés dont une fraction seulement est liée à l'infection par les HR-HPV, il a été montré que les cancers viro-induits ont un pronostic plus favorable (Klussmann, Mooren *et al.* 2009). Mais dans le cas du MCC, il n'est à l'heure actuelle pas clairement démontré que la mise en évidence d'ADN de MCPyV ou des protéines virales précoces présente un intérêt pour l'évaluation du pronostic de la maladie.

Nos résultats ont également montré un lien entre la mise en évidence d'ADN viral dans le sang et un pronostic défavorable de la maladie. Nous avons montré que cette association s'expliquait dans certains cas par le fait que l'ADNémie virale révélait la présence d'ADN ou de cellules tumorales circulants. Ce travail n'a pour l'instant pas été confirmé ou infirmé par d'autres équipes. Un travail complétant cette étude préliminaire est en cours au laboratoire afin d'évaluer l'intérêt en pratique de ce marqueur. En effet, il présente *a priori* l'inconvénient de n'être pas assez spécifique puisque une minorité seulement des sujets ADNémiques récidivent. De plus, nos travaux préliminaires ne permettaient pas de déterminer si la présence d'ADN viral dans le sang constituait un facteur prédictif à l'avance de la récurrence.

Notre travail a montré un lien entre le taux d'Ac anti-VP1 et le pronostic des MCC mais aucune autre étude de la littérature n'a confirmé ou infirmé cette observation. Une étude de la littérature a montré que les Ac anti-ST et LT seraient également prédictifs de la sévérité de la maladie. En outre, la quantification de ces Ac présenterait l'intérêt précieux de prédire les récurrences de MCC. Cette situation serait ainsi comparable à ce qui est observé dans le cas des cancers induits par les HR-HPV, puisqu'il a été montré que les taux d'Ac spécifiques des oncoprotéines virales de ces virus, E6 et E7, étaient corrélés au stade de la maladie (Zumbach, Kissel'jov *et al.* 2000). Un travail de confirmation de l'intérêt du dosage des Ac anti-ST et LT, en particulier de l'apport de ces Ac pour la prédiction de la récurrence, qui ne repose actuellement que sur une dizaine de cas, est en cours dans le laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr Coursaget.

5. Compréhension des mécanismes associés au pouvoir cancérogène de MCPyV

5.1. Un lien entre l'importance de la réplication de MCPyV et le développement des MCC

Notre travail et les données de la littérature suggèrent que le MCC survient au décours d'une infection par MCPyV productive et chronique. Cette situation est comparable à celle observée dans le cas des cancers du col de l'utérus induits par les HR-HPV. En effet, dans les deux cas, il existe un délai très long entre la primo-infection et le développement du cancer. Dans le cas des HR-HPV, environ 30 ans s'écoulent entre l'infection au début de l'activité sexuelle et l'apparition du cancer vers l'âge de 50 ans. Dans le cas de MCPyV, ce délai serait encore plus long puisque la contamination se produirait dans l'enfance alors que le MCC se développe beaucoup plus tard que le cancer du col, vers l'âge de 75 ans en moyenne.

Dans le cas du cancer du col de l'utérus, celui-ci survient chez seulement une minorité des femmes qui développent une infection chronique productive. Cela semble être également le cas pour MCPyV puisque les données de la littérature ont montré que des individus exempts de MCC peuvent développer une infection par MCPyV de type chronique. Notons cependant que la survenue du cancer au décours de cette réplication chronique est beaucoup moins fréquente dans le cas de MCPyV que dans le cas des HR-HPV puisque le MCC est rare alors que parmi les cancers induits par les HR-HPV, le cancer du col de l'utérus représente à lui seul le deuxième cancer de la femme dans le monde.

Les données de la littérature suggèrent que le fait que MCPyV induise un cancer au niveau de la peau alors qu'il infecte de multiples tissus est probablement lié au fait que les niveaux de réplication les plus élevés ont été rapportés dans la peau.

De la même manière, nos résultats et les données de la littérature suggèrent que si le MCC ne se développe que chez une minorité d'individus, c'est en raison du fait que les niveaux de réplication chronique sont plus importants chez les sujets atteints de MCC. En effet, chez ces derniers, les taux élevés d'Ac anti-VP1 ainsi que la fréquente détection d'ADN viral en dehors de la peau – dans les voies respiratoires et dans une moindre mesure dans les voies génito-urinaires et le tissu sanguin –. témoignent d'un niveau de réplication et/ou d'une dissémination du virus plus importants que dans la population générale. Des études complémentaires, notamment des études avec des populations témoins appariées selon l'âge, seraient néanmoins nécessaires pour confirmer que la présence d'ADN de MCPyV en dehors de la peau serait plus fréquente chez les sujets atteints de MCC que dans la population générale.

Ces éléments sont à rapprocher de ce qui est observé dans un modèle murin de tumeurs induites par MPyV que nous avons mentionné, avec des cancers qui se développent dans les tissus qui présentent les taux les plus élevés de réplication à distance de l'infection aiguë.

5.2. Lien entre le système immunitaire et le développement des MCC

Les causes de cette réplication chronique de MCPyV à des niveaux plus importants chez les sujets atteints de MCC et du cancer qui en découle ne sont pas encore élucidées.

Cette infection chronique productive à des taux plus élevés est probablement liée à un défaut global du système immunitaire puisque les sujets atteints de MCC sont à de rares exceptions près tous immunodéprimés et/ou immunosénescents. Des études de la littérature que nous avons mentionnées ont en outre montré que chez les immunodéprimés en général, de l'ADN de MCPyV avait tendance à être décelé plus fréquemment et/ou en plus grande quantité.

Cependant, d'autres facteurs interviennent probablement puisque des niveaux de réplifications élevés de MCPyV ne sont observés que chez une faible proportion de sujets immunodéprimés et inversement des études de la littérature ont montré que des individus immunocompétents peuvent également développer une infection chronique par MCPyV, comme en témoigne la présence de taux élevés d'Ac anti-VP1 chez une fraction de la population générale ou encore la détection d'ADN de MCPyV à plusieurs mois d'intervalle au niveau de la peau de sujets sains (Schowalter, Pastrana *et al.*; Pastrana, Tolstov *et al.* 2009).

Pour finir, un déficit global du système immunitaire ne permet pas d'expliquer à lui seul pourquoi chez les sujets atteints de MCC la réplication de MCPyV mais pas des autres virus infectant l'individu de manière persistante, tels que les Polyomavirus BKPyV et JCPyV est plus importante. Cette dernière observation serait éventuellement compatible avec un défaut de la réponse immunitaire ciblée vis-à-vis de MCPyV chez les sujets atteints de MCC. Cela est en effet observé pour d'autres maladies, telles que l'encéphalite herpétique qui survient chez des individus immunocompétents néanmoins incapables de lutter contre la dissémination dans le système nerveux central d'un pathogène en particulier, le virus Herpes Simplex de type 1.

5.3. Facteurs viraux

5.3.1. Génotypes

Notre travail et les données de la littérature ont montré qu'au contraire de ce qui est observé dans le cas des cancers induits par les HR-HPV, les MCC ne sont pas attribuables à une infection par des génotypes particuliers de MCPyV à haut risque oncogène.

MCPyV ne semble pas non plus appartenir à un groupe à part de Polyomavirus humains. En effet, si au moment de la découverte de MCPyV, celui-ci était le seul des Polyomavirus humains à appartenir au sous-groupe apparenté à MPyV, cela n'est plus vrai à l'heure actuelle puisque c'est également le cas de TSPyV et HPyV9.

5.3.2. Fonctions des protéines précoces de MCPyV

Les connaissances actuelles sur les fonctions des protéines précoces de LT reposent essentiellement sur des prédictions théoriques et des analogies avec les fonctions des protéines des autres Polyomavirus oncogènes chez l'animal.

Certaines des fonctions prédites des protéines de MCPyV ont néanmoins été démontrées *in vitro*, telle que les capacités d'interaction avec pRb.

Cependant, les protéines de MCPyV possèdent probablement des fonctions propres que ne partagent pas les autres Polyomavirus non oncogènes chez l'Homme, mais peu d'études ont été publiées à ce sujet. Shuda *et al* ont néanmoins montré que ST de MCPyV interagit avec un facteur d'initiation de la transcription cellulaire, 4E-BP1, ce qui n'a pas été décrit pour d'autres Polyomavirus à tropisme humain (Shuda, Kwun *et al.*).

Les rôles respectifs de ST et de LT de MCPyV, qui varient dans le cas des autres membres de la famille des Polyomavirus en fonction des virus et des modèles, n'ont pas non plus été déterminés à l'heure actuelle.

5.3.3. Dépendance du phénotype tumoral vis-à-vis de l'expression des oncoprotéines

Nos résultats et les études publiées dans la littérature ont montré que l'ADN de MCPyV était absent, ou présent en faibles quantités dans une minorité de cas de MCC. Comme nous l'avons discuté, cette observation est compatible avec l'existence de deux étiologies distinctes au MCC, l'une n'étant pas liée au virus.

Mais comme nous l'avons également mentionné, certaines de nos observations, telles que la présence d'Ac anti-VP1 à taux élevés chez des sujets dont le MCC était dépourvu d'ADN viral, suggère une troisième explication : le fait que la maladie soit bien liée au virus mais que celui-ci ait été éliminé au moment du diagnostic.

Des données de la littérature vont également en ce sens, telles que la présence d'Ac anti protéines virales précoces chez des sujets atteints de MCC avec absence d'ADN viral tumoral au diagnostic, ou encore la prolifération *in vitro* de manière indépendante de l'expression de LT d'une lignée dérivée de MCC.

Le fait que les protéines LT des autres Polyomavirus soient capables d'induire des aberrations chromosomiques, que ces aberrations soient observées au sein des MCC et que celles-ci aient tendance à être plus fréquentes en présence d'ADN viral suggère que LT de MCPyV est également capable de générer ce type d'anomalies. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si ces aberrations jouent un rôle majeur dans la physiopathologie du MCC et si elles seraient suffisantes pour que les cellules tumorales puissent s'affranchir *in vivo* de leur dépendance à LT. Dans le cas des cancers induits par les HR-HPV, il a été montré que l'expression des protéines virales génèrent de l'instabilité génomique (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007).

Afin de répondre à ces questions de dépendance des cellules tumorales vis-à-vis de l'expression des oncoprotéines virales, un travail sur la persistance et l'expression des séquences virales intégrées dans le temps est actuellement en cours au laboratoire, via l'étude de différentes lignées cellulaires dérivées de MCC.

5.3.4. Remaniements du génome viral

Si de grandes quantités de génome viral ne semblent pas obligatoires pour le développement du MCC, notre travail et les données de la littérature ont clairement établi que des modifications du génome viral semblent nécessaires à l'établissement du cancer. Le fait que ces mutations et ces intégrations se produisent exclusivement dans les MCC et soient de type monoclonal suggèrent que celles-ci se produisent tôt dans le développement du cancer et jouent un rôle important. Cette observation est en partie comparable à ce qui est observé pour les cancers induits par les HR-HPV, puisque des séquences intégrées de ces virus sont associées spécifiquement au cancer. De plus, dans ce dernier modèle, il a été montré que l'intégration précède bien la transformation tumorale.

Comme dans le cas des cancers induits par les HR-HPV, ces modifications du génome viral semblent associées à des gains en terme de prolifération et de survie pour la cellule tumorale.

Comme c'est le cas pour les HR-HPV, l'intégration a très probablement pour conséquence une hyperexpression des oncoprotéines virales. Si le lien entre l'intégration et les niveaux d'expression des protéines virales précoces n'a pas encore été démontré pour MCPyV, les études d'IHC de la littérature ont clairement démontré que 57kT/LT étaient en effet fortement exprimées dans la majorité des tumeurs. Le gain en terme de prolifération associé à cette hyperexpression a été démontré *in vitro*.

Mais l'intégration du génome viral s'accompagne peut-être également de phénomènes de mutagenèse insertionnelle. Bien que les séquences virales ne soient pas systématiquement intégrées dans des régions codantes, notre travail a montré que des remaniements du génome cellulaire peuvent être associés à l'intégration virale. Mais à l'heure actuelle, l'intégration du génome viral n'a été détaillée que dans un faible nombre de cas et les conséquences éventuelles de l'insertion des séquences virales dans le génome cellulaire sur l'expression de celui-ci ont été très peu étudiées. Un travail de caractérisation des sites d'intégration du virus est donc actuellement poursuivi dans le laboratoire.

Par ailleurs, nos résultats et les données de la littérature suggèrent que les remaniements du génome viral sont également associés à un gain en terme de survie pour la cellule, en rapport avec l'élimination de fonctions virales délétères pour celle-ci. Cela a été démontré *in vitro* dans le cas de certaines mutations par quelques études de la littérature.

Mais les connaissances actuelles concernant ces mutations du génome viral sont encore limitées. Si les données de la littérature ont montré que 3 régions du génome viral sont concernées – les gènes codant LT et VP1 et la NCCR – l'importance respective de ces mutations et leur interdépendance n'ont pas été systématiquement étudiées. De plus, dans le cas particulier de LT, différents types de mutations ont été décrites – emportant ou non l'OBD, localisées en amont ou en aval du NLS – et les conséquences fonctionnelles de ces différentes mutations doivent être précisées.

5.4. Autres facteurs

D'autres facteurs que l'immunodépression et MCPyV interviennent probablement dans la survenue du MCC.

L'exposition solaire, qui est un facteur de risque avéré du MCC, pourrait constituer un facteur favorisant de la réplication virale. En effet, comme nous l'avons mentionné, une étude a montré que les ultraviolets pourrait stimuler l'expression du génome viral (Mogha, Fautrel *et al.*).

Nous pouvons également envisager une interaction entre plusieurs virus, les cellules de la peau étant par exemple susceptibles d'être infectées par plusieurs Polyomavirus (Duncavage and Pfeifer) ou à la fois par MCPyV et des Papillomavirus. Un virus comportant un génome hybride avec une région codante tardive homologue à celle des Papillomavirus mais une région codante précoce homologue à celle des Polyomavirus a d'ailleurs été mis en évidence au sein de cancers cutanés d'un marsupial australien (Woolford, Rector *et al.* 2007).

Enfin, les événements de mutation et d'intégration de MCPyV constituent des accidents dans le cycle de propagation du virus, puisqu'ils ne font pas partie de son cycle normal de réplication et qu'il en découle vraisemblablement une perte des capacités répliquatives virales. Etant donné que le MCPyV ne code pas pour une intégrase, au contraire des Rétrovirus, chez qui le processus d'intégration fait partie intégrante du cycle de réplication, l'insertion des séquences nucléotidiques de MCPyV fait forcément appel à des éléments extérieurs. De même, le MCPyV ne code pas pour une ADN polymérase. Les mutations au sein de son génome qui sont observées ne peuvent donc être attribuées à des erreurs produites par une polymérase peu faible, comme c'est le cas pour les virus à ARN en général et notamment le HIV.

L'intégration et la mutation du génome viral dépendent donc vraisemblablement d'éléments mutagènes extérieurs au virus et éventuellement d'origine cellulaire. Notre travail et les données de la littérature ont montré que si le phénomène d'intégration semble se produire de manière aléatoire, les mutations du génome viral semblent être plus ciblées puisque des mutations récurrentes partagées par différents cas ont été décrites.

L'étude détaillée de ces mutations nous a permis d'observer que certains nucléotides sont en effet préférentiellement mutés et notamment les nucléotides comportant des bases de type cytosine. L'analyse du contexte nucléotidique entourant ces bases mutées suggère qu'une famille cellulaire particulière d'agents mutagènes, celles des APOBEC (pour Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic) pourrait être impliquée, ce qui fera l'objet de mes travaux de recherches à venir.

Cinquième partie
BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abedi Kiasari, B., P. J. Vallely, *et al.* (2008). "Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection." J Clin Virol **43**(1): 123-5.
- Abedi Kiasari, B., P. J. Vallely, *et al.* "Merkel cell polyomavirus DNA in immunocompetent and immunocompromised patients with respiratory disease." J Med Virol **83**(12): 2220-4.
- Adhikari, L. A., T. H. McCalmont, *et al.* "Merkel cell carcinoma with heterologous rhabdomyoblastic differentiation: the role of immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus large T-antigen in confirmation." J Cutan Pathol **39**(1): 47-51.
- Allander, T., K. Andreasson, *et al.* (2007). "Identification of a third human polyomavirus." J Virol **81**(8): 4130-6.
- Allander, T., M. T. Tammi, *et al.* (2005). "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(36): 12891-6.
- Allen, P. J., W. B. Bowne, *et al.* (2005). "Merkel cell carcinoma: prognosis and treatment of patients from a single institution." J Clin Oncol **23**(10): 2300-9.
- An, K., E. T. Gillock, *et al.* (1999). "Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles." J Gen Virol **80** (Pt 4): 1009-16.
- Andea, A. A., D. G. Coit, *et al.* (2008). "Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis." Cancer **113**(9): 2549-58.
- Andres, C., B. Belloni, *et al.* "Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors." J Cutan Pathol **37**(1): 28-34.
- Andres, C., B. Belloni, *et al.* (2009). "Re: Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **101**(23): 1655-6; author reply 1656-7.
- Andres, C., S. Ihrler, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus is prevalent in a subset of small cell lung cancer: a study of 31 patients." Thorax **64**(11): 1007-8.
- Atencio, I. A., F. F. Shadan, *et al.* (1993). "Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration." J Virol **67**(3): 1424-32.
- Azzi, A., S. Cesaro, *et al.* (1999). "Human polyomavirus BK (BKV) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients." J Clin Virol **14**(2): 79-86.
- Babakir-Mina, M., M. Ciccozzi, *et al.* (2009). "Identification of the novel KI and WU polyomaviruses in human tonsils." J Clin Virol **46**(1): 75-9.
- Babakir-Mina, M., M. Ciccozzi, *et al.* "Identification of Merkel cell polyomavirus in the lower respiratory tract of Italian patients." J Med Virol **82**(3): 505-9.

- Barcena-Panero, A., J. E. Echevarria, *et al.* "BK polyomavirus with archetypal and rearranged non-coding control regions is present in cerebrospinal fluids from patients with neurological complications." J Gen Virol **93**(Pt 8): 1780-94.
- Basilico, C., S. Gattoni, *et al.* (1979). "Loss of integrated viral DNA sequences in polyomatransformed cells is associated with an active viral A function." Cell **17**(3): 645-59.
- Becker, J. C., R. Houben, *et al.* (2009). "MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients." J Invest Dermatol **129**(1): 248-50.
- Bernier, G., M. Morin, *et al.* (1981). "A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent." Avian Dis **25**(4): 1083-92.
- Bhatia, K., J. J. Goedert, *et al.* "Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome." Int J Cancer **127**(6): 1493-6.
- Bhatia, K., J. J. Goedert, *et al.* "Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression." Int J Cancer **126**(9): 2240-6.
- Bhatia, K., R. Modali, *et al.* "Merkel cell polyomavirus is not detected in mesotheliomas." J Clin Virol **47**(2): 196-8.
- Bialasiewicz, S., D. M. Whiley, *et al.* (2009). "Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples." J Clin Virol **45**(3): 249-54.
- Birg, F., R. Dulbecco, *et al.* (1979). "State and organization of polyoma virus DNA sequences in transformed rat cell lines." J Virol **29**(2): 633-48.
- Black, P. H. and W. P. Rowe (1963). "An Analysis of Sv40-Induced Transformation of Hamster Kidney Tissue *in vitro*. I. General Characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **50**: 606-13.
- Bluemn, E. G., K. G. Paulson, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus is not detected in prostate cancers, surrounding stroma, or benign prostate controls." J Clin Virol **44**(2): 164-6.
- Bocchetta, M., I. Di Resta, *et al.* (2000). "Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10214-9.
- Botchan, M., B. Ozanne, *et al.* (1974). "Viral DNA in transformed cells. III. The amounts of different regions of the SV40 genome present in a line of transformed mouse cells." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(10): 4183-7.
- Botchan, M., W. Topp, *et al.* (1976). "The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cells." Cell **9**(2): 269-87.

- Boulet, G. A., I. H. Benoy, *et al.* (2009). "Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(11): 2992-9.
- Brugge, J. S. and J. S. Butel (1975). "Role of simian virus 40 gene A function in maintenance of transformation." J Virol **15**(3): 619-35.
- Busam, K. J., A. A. Jungbluth, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas." Am J Surg Pathol **33**(9): 1378-85.
- Campbell, P. J., P. J. Stephens, *et al.* (2008). "Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing." Nat Genet **40**(6): 722-9.
- Campello, C., M. Comar, *et al.* "A molecular case-control study of the Merkel cell polyomavirus in colon cancer." J Med Virol **83**(4): 721-4.
- Carter, J. J., K. G. Paulson, *et al.* (2009). "Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **101**(21): 1510-22.
- Chang, T. H., F. A. Ray, *et al.* (1997). "Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells." Oncogene **14**(20): 2383-93.
- Chang, Y., E. Cesarman, *et al.* (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." Science **266**(5192): 1865-9.
- Chartrand, P., N. Gusew-Chartrand, *et al.* (1981). "Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells." J Virol **39**(1): 185-95.
- Chen, B. J. and W. J. Atwood (2002). "Construction of a novel JCV/SV40 hybrid virus (JCSV) reveals a role for the JCV capsid in viral tropism." Virology **300**(2): 282-90.
- Chen, T., L. Hedman, *et al.* "Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood." J Clin Virol **50**(2): 125-9.
- Chenciner, N., G. Meneguzzi, *et al.* (1980). "Integrated and free viral DNA in hamster tumors induced by BK virus." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(2): 975-9.
- Chia, W. and P. W. Rigby (1981). "Fate of viral DNA in nonpermissive cells infected with simian virus 40." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(11): 6638-42.
- Cimino, P. J., Jr., D. W. Bahler, *et al.* "Detection of Merkel cell polyomavirus in chronic lymphocytic leukemia T-cells." Exp Mol Pathol.
- Clayson, E. T., L. V. Brando, *et al.* (1989). "Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis." J Virol **63**(5): 2278-88.
- Coleman, D. V., S. D. Gardner, *et al.* (1983). "Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation." Clin Exp Immunol **53**(2): 289-96.

- Comar, M., A. Cuneo, *et al.* "Merkel-cell polyomavirus (MCPyV) is rarely associated to B-chronic lymphocytic leukemia (1 out of 50) samples and occurs late in the natural history of the disease." J Clin Virol.
- Conrad, S. E., C. P. Liu, *et al.* (1982). "Fragment spanning the SV40 replication origin is the only DNA sequence required in cis for viral excision." Science **218**(4578): 1223-5.
- Corallini, A., M. Pagnani, *et al.* (1987). "Association of BK virus with human brain tumors and tumors of pancreatic islets." Int J Cancer **39**(1): 60-7.
- Cotsiki, M., R. L. Lock, *et al.* (2004). "Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 947-52.
- Dang, X., S. Bialasiewicz, *et al.* "Infrequent detection of KI, WU and MC polyomaviruses in immunosuppressed individuals with or without progressive multifocal leukoencephalopathy." PLoS One **6**(3): e16736.
- de Biase, D., M. Ragazzi, *et al.* "Extracutaneous Merkel cell carcinomas harbor polyomavirus DNA." Hum Pathol **43**(7): 980-5.
- Dean, F. B., P. Bullock, *et al.* (1987). "Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 16-20.
- DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, *et al.* (1988). "SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene." Cell **54**(2): 275-83.
- Del Valle, L., J. Gordon, *et al.* (2001). "Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the central nervous system." Cancer Res **61**(10): 4287-93.
- Demengeot, J., J. Jacquemier, *et al.* (1990). "Pattern of polyomavirus replication from infection until tumor formation in the organs of athymic nu/nu mice." J Virol **64**(11): 5633-9.
- Demetriou, S. K., K. Ona-Vu, *et al.* "Defective DNA repair and cell cycle arrest in cells expressing Merkel cell polyomavirus T antigen." Int J Cancer **131**(8): 1818-27.
- Deppert, W., K. Hanke, *et al.* (1980). "Simian virus 40 T-antigen-related cell surface antigen: serological demonstration on simian virus 40-transformed monolayer cells in situ." J Virol **35**(2): 505-18.
- Digweed, M., I. Demuth, *et al.* (2002). "SV40 large T-antigen disturbs the formation of nuclear DNA-repair foci containing MRE11." Oncogene **21**(32): 4873-8.
- Dorries, K., G. Loeber, *et al.* (1987). "Association of polyomaviruses JC, SV40, and BK with human brain tumors." Virology **160**(1): 268-70.
- Dubensky, T. W. and L. P. Villarreal (1984). "The primary site of replication alters the eventual site of persistent infection by polyomavirus in mice." J Virol **50**(2): 541-6.

- Dugan, A. S., S. Eash, *et al.* (2005). "An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus." J Virol **79**(22): 14442-5.
- Dugan, A. S., S. Eash, *et al.* (2006). "Update on BK virus entry and intracellular trafficking." Transpl Infect Dis **8**(2): 62-7.
- Duncavage, E. J., B. M. Le, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus: a specific marker for Merkel cell carcinoma in histologically similar tumors." Am J Surg Pathol **33**(12): 1771-7.
- Duncavage, E. J., V. Magrini, *et al.* "Hybrid capture and next-generation sequencing identify viral integration sites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue." J Mol Diagn **13**(3): 325-33.
- Duncavage, E. J. and J. D. Pfeifer "Human polyomaviruses 6 and 7 are not detectable in Merkel cell polyomavirus-negative Merkel cell carcinoma." J Cutan Pathol **38**(10): 790-6.
- Duncavage, E. J., B. A. Zehnbauser, *et al.* (2009). "Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma." Mod Pathol **22**(4): 516-21.
- Dworkin, A. M., S. Y. Tseng, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals." J Invest Dermatol **129**(12): 2868-74.
- Egli, A., L. Infanti, *et al.* (2009). "Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors." J Infect Dis **199**(6): 837-46.
- Elphick, G. F., W. Querbes, *et al.* (2004). "The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells." Science **306**(5700): 1380-3.
- Enam, S., L. Del Valle, *et al.* (2002). "Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin." Cancer Res **62**(23): 7093-101.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, *et al.* (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." Lancet **1**(7335): 702-3.
- Erickson, K. D., R. L. Garcea, *et al.* (2009). "Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus." J Virol **83**(19): 10275-9.
- Eriksson, M., K. Andreasson, *et al.* "Murine polyomavirus virus-like particles carrying full-length human PSA protect BALB/c mice from outgrowth of a PSA expressing tumor." PLoS One **6**(8): e23828.
- Erovic, B. M., A. Al Habeeb, *et al.* "Significant overexpression of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) large T antigen in Merkel cell carcinoma." Head Neck.
- Ewald, D., M. Li, *et al.* (1996). "Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen." Science **273**(5280): 1384-6.

- Fahrbach, K. M., R. B. Katzman, *et al.* (2008). "Role of SV40 ST antigen in the persistent infection of mesothelial cells." Virology **370**(2): 255-63.
- Faust, H., D. V. Pastrana, *et al.* "Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin." J Infect Dis **203**(8): 1096-100.
- Fedele, C. G., C. Polo, *et al.* (2006). "Analysis of the transcriptional control region of JC polyomavirus in cerebrospinal fluid from HIV-negative patients with progressive multifocal leukoencephalopathy." J Med Virol **78**(10): 1271-5.
- Feng, H., H. J. Kwun, *et al.* "Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication." PLoS One **6**(7): e22468.
- Feng, H., M. Shuda, *et al.* (2008). "Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma." Science **319**(5866): 1096-100.
- Ferringer, T., H. C. Rogers, *et al.* (2005). "Merkel cell carcinoma in situ." J Cutan Pathol **32**(2): 162-5.
- Fischer, N., J. Brandner, *et al.* "Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus." Int J Cancer **126**(9): 2133-42.
- Focosi, D., F. Maggi, *et al.* (2009). "Polyomaviruses other than JCV are not detected in progressive multifocal leukoencephalopathy." J Clin Virol **45**(2): 161-2.
- Forslund, O., B. Lindelof, *et al.* (2004). "High prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on the top of skin tumors but not in "Stripped" biopsies from the same tumors." J Invest Dermatol **123**(2): 388-94.
- Foulongne, V., V. Courgnaud, *et al.* "Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces." J Med Virol **83**(8): 1435-9.
- Foulongne, V., O. Dereure, *et al.* "Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases." Br J Dermatol **162**(1): 59-63.
- Foulongne, V., N. Kluger, *et al.* (2008). "Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France." Emerg Infect Dis **14**(9): 1491-3.
- Foulongne, V., N. Kluger, *et al.* "Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs." Emerg Infect Dis **16**(4): 685-7.
- Gardner, S. D., A. M. Field, *et al.* (1971). "New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation." Lancet **1**(7712): 1253-7.
- Garneski, K. M., A. H. Warcola, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors." J Invest Dermatol **129**(1): 246-8.
- Gattoni, S., V. Colantuoni, *et al.* (1980). "Relationship between integrated and nonintegrated viral DNA in rat cells transformed by polyoma virus." J Virol **34**(3): 615-26.

- Gaynor, A. M., M. D. Nissen, *et al.* (2007). "Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections." PLoS Pathog **3**(5): e64.
- Gheit, T., J. P. Munoz, *et al.* "Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung carcinomas from Chile." Exp Mol Pathol **93**(1): 162-6.
- Girardi, A. J., B. H. Sweet, *et al.* (1962). "Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacuolating virus, SV-40." Proc Soc Exp Biol Med **109**: 649-60.
- Giraud, G., T. Ramqvist, *et al.* (2009). "DNA from KI, WU and Merkel cell polyomaviruses is not detected in childhood central nervous system tumours or neuroblastomas." PLoS One **4**(12): e8239.
- Giraud, G., T. Ramqvist, *et al.* (2008). "DNA from BK virus and JC virus and from KI, WU, and MC polyomaviruses as well as from simian virus 40 is not detected in non-UV-light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes." J Clin Microbiol **46**(11): 3595-8.
- Gjoerup, O. and Y. Chang "Update on human polyomaviruses and cancer." Adv Cancer Res **106**: 1-51.
- Goh, S., C. Lindau, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions." Emerg Infect Dis **15**(3): 489-91.
- Graessmann, A., M. Graessmann, *et al.* (1979). "Retransformation of a simian virus 40 revertant cell line, which is resistant to viral and DNA infections, by microinjection of viral DNA." J Virol **32**(3): 989-94.
- Graffi, A., T. Schramm, *et al.* (1968). "Virus-associated skin tumors of the Syrian hamster: preliminary note." J Natl Cancer Inst **40**(4): 867-73.
- Grandpeix, C., S. Bonvalot, *et al.* (2006). "[Continued complete remission of Merkel cell carcinoma with in-transit metastasis after treatment with isolated limb perfusion regional chemotherapy]." Ann Dermatol Venereol **133**(8-9 Pt 1): 700-3.
- Greenman, C., P. Stephens, *et al.* (2007). "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes." Nature **446**(7132): 153-8.
- Gross, L. (1951). "'Spontaneous' leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos." Proc Soc Exp Biol Med **76**(1): 27-32.
- Gross, L. (1953). "A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice." Proc Soc Exp Biol Med **83**(2): 414-21.
- Habel, K., F. Jensen, *et al.* (1965). "Specific Complement-Fixing Tumor Antigen in Sv40-Transformed Human Cells." Proc Soc Exp Biol Med **118**: 4-9.
- Hahn, W. C., S. K. Dessain, *et al.* (2002). "Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation." Mol Cell Biol **22**(7): 2111-23.

- Haitz, K. A., P. L. Rady, *et al.* "Merkel cell polyomavirus DNA detection in a patient with Merkel cell carcinoma and multiple other skin cancers." Int J Dermatol **51**(4): 442-4.
- Halata, Z., M. Grim, *et al.* (2003). "Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **271**(1): 225-39.
- Hall, B. J., L. B. Pincus, *et al.* "Immunohistochemical prognostication of Merkel cell carcinoma: p63 expression but not polyomavirus status correlates with outcome." J Cutan Pathol **39**(10): 911-7.
- Handschel, J., D. Muller, *et al.* "The new polyomavirus (MCPyV) does not affect the clinical course in MCCs." Int J Oral Maxillofac Surg **39**(11): 1086-90.
- Harle, M., N. Arens, *et al.* (1996). "Comparative genomic hybridization (CGH) discloses chromosomal and subchromosomal copy number changes in Merkel cell carcinomas." J Cutan Pathol **23**(5): 391-7.
- Haugg, A. M., E. J. Speel, *et al.* "Fluorescence in situ hybridization confirms the presence of Merkel cell polyomavirus in chronic lymphocytic leukemia cells." Blood **117**(21): 5776-7.
- Hayday, A. C., F. Chaudry, *et al.* (1983). "Loss of polyoma virus infectivity as a result of a single amino acid change in a region of polyoma virus large T-antigen which has extensive amino acid homology with simian virus 40 large T-antigen." J Virol **45**(2): 693-9.
- Helmbold, P., C. Lahtz, *et al.* (2009). "Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma." Mol Carcinog **48**(10): 903-9.
- Helmbold, P., C. Lahtz, *et al.* (2009). "Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer." Eur J Cancer **45**(12): 2207-11.
- Hirai, K. and V. Defendi (1972). "Integration of simian virus 40 deoxyribonucleic acid into the deoxyribonucleic acid of permissive monkey kidney cells." J Virol **9**(4): 705-7.
- Hodgson, N. C. (2005). "Merkel cell carcinoma: changing incidence trends." J Surg Oncol **89**(1): 1-4.
- Houben, R., C. Adam, *et al.* "An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells." Int J Cancer **130**(4): 847-56.
- Houben, R., J. Grimm, *et al.* "Merkel cell carcinoma and Merkel cell polyomavirus: evidence for hit-and-run oncogenesis." J Invest Dermatol **132**(1): 254-6.
- Houben, R., D. Schrama, *et al.* "Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma." Int J Cancer **126**(3): 796-8.

- Houben, R., M. Shuda, *et al.* "Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens." J Virol **84**(14): 7064-72.
- Howley, P. M. and D. M. Livingston (2009). "Small DNA tumor viruses: large contributors to biomedical sciences." Virology **384**(2): 256-9.
- Hu, W. Y., F. D. Bushman, *et al.* (2004). "RNA interference against retroviruses." Virus Res **102**(1): 59-64.
- Huang, K. C., E. F. Yamasaki, *et al.* (1999). "Maintenance of episomal SV40 genomes in GM637 human fibroblasts." Virology **262**(2): 457-69.
- Imajoh, M., Y. Hashida, *et al.* "Detection of Merkel cell polyomavirus in cervical squamous cell carcinomas and adenocarcinomas from Japanese patients." Virology **9**(1): 154.
- Imajoh, M., Y. Hashida, *et al.* "Novel human polyomaviruses, Merkel cell polyomavirus and human polyomavirus 9, in Japanese chronic lymphocytic leukemia cases." J Hematol Oncol **5**: 25.
- Israel, M. A., D. F. Vanderryn, *et al.* (1980). "Characterization of polyoma viral DNA sequences in polyoma-induced hamster tumor cell lines." J Biol Chem **255**(8): 3798-805.
- Iyer, J. G., O. K. Afanasiev, *et al.* "Merkel cell polyomavirus-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood." Clin Cancer Res **17**(21): 6671-80.
- Jeffers, L. K., V. Madden, *et al.* (2009). "BK virus has tropism for human salivary gland cells *in vitro*: implications for transmission." Virology **394**(2): 183-93.
- Joh, J., A. B. Jenson, *et al.* "Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer." Exp Mol Pathol **89**(3): 222-6.
- Johne, R., D. Enderlein, *et al.* (2005). "Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR." J Virol **79**(6): 3883-7.
- Johne, R. and H. Muller (2007). "Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family." J Virol **81**(21): 11554-9.
- Johne, R., W. Wittig, *et al.* (2006). "Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes." J Virol **80**(7): 3523-31.
- Johnsen, J. I., O. M. Seternes, *et al.* (1995). "Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics." J Gen Virol **76** (Pt 7): 1571-81.
- Jung, H. S., Y. L. Choi, *et al.* "Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinomas and small cell carcinomas by PCR and immunohistochemistry." Histol Histopathol **26**(10): 1231-41.

- Kadaja, M., A. Sumerina, *et al.* (2007). "Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery." Embo J **26**(8): 2180-91.
- Kantarci, G., Z. Eren, *et al.* "JC virus-associated nephropathy in a renal transplant recipient and comparative analysis of previous cases." Transpl Infect Dis **13**(1): 89-92.
- Kantola, K., M. Sadeghi, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency." J Clin Virol **45**(4): 292-5.
- Kassem, A., D. Pantulu, *et al.* "Merkel cell polyomavirus in naevoid basal cell carcinoma syndrome-associated basal cell carcinomas and sporadic trichoblastomas." J Dermatol Sci **59**(2): 140-2.
- Kassem, A., A. Schopflin, *et al.* (2008). "Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene." Cancer Res **68**(13): 5009-13.
- Kassem, A., K. Technau, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus sequences are frequently detected in nonmelanoma skin cancer of immunosuppressed patients." Int J Cancer **125**(2): 356-61.
- Katano, H., H. Ito, *et al.* (2009). "Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma." J Med Virol **81**(11): 1951-8.
- Kean, J. M., S. Rao, *et al.* (2009). "Seroepidemiology of human polyomaviruses." PLoS Pathog **5**(3): e1000363.
- Ketner, G. and T. J. Kelly, Jr. (1976). "Integrated simian virus 40 sequences in transformed cell DNA: analysis using restriction endonucleases." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1102-6.
- Khan, G., P. S. Philip, *et al.* "No evidence for the involvement of XMRV or MCV in the pathogenesis of breast cancer." Br J Cancer **106**(6): 1166-70.
- Kleinschmidt-DeMasters, B. K. and K. L. Tyler (2005). "Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis." N Engl J Med **353**(4): 369-74.
- Klussmann, J. P., J. J. Mooren, *et al.* (2009). "Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications." Clin Cancer Res **15**(5): 1779-86.
- Koljonen, V. (2006). "Merkel cell carcinoma." World J Surg Oncol **4**: 7.
- Koljonen, V., H. Kukko, *et al.* (2009). "Chronic lymphocytic leukaemia patients have a high risk of Merkel-cell polyomavirus DNA-positive Merkel-cell carcinoma." Br J Cancer **101**(8): 1444-7.
- Koralnik, I. J., D. Boden, *et al.* (1999). "JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy." Neurology **52**(2): 253-60.

- Kuwamoto, S., H. Higaki, *et al.* "Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in Merkel cell carcinoma." Hum Pathol **42**(5): 632-40.
- Kwun, H. J., A. Guastafierro, *et al.* (2009). "The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication." J Virol **83**(23): 12118-28.
- Lam, W. Y., B. W. Leung, *et al.* "Survey for the presence of BK, JC, KI, WU and Merkel cell polyomaviruses in human brain tissues." J Clin Virol **48**(1): 11-4.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-3.
- Langer-Gould, A. and L. Steinman (2006). "Progressive multifocal leukoencephalopathy and multiple sclerosis: lessons from natalizumab." Curr Neurol Neurosci Rep **6**(3): 253-8.
- Lania, L., A. Hayday, *et al.* (1980). "Organization and expression of integrated polyoma virus DNA sequences in transformed rodent cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **44 Pt 1**: 597-603.
- Lania, L., A. Hayday, *et al.* (1981). "Loss of functional large T-antigen and free viral genomes from cells transformed *in vitro* by polyoma virus after passage *in vivo* as tumor cells." J Virol **39**(2): 422-31.
- Larramendy, M. L., V. Koljonen, *et al.* (2004). "Recurrent DNA copy number changes revealed by comparative genomic hybridization in primary Merkel cell carcinomas." Mod Pathol **17**(5): 561-7.
- Lasickiene, R., A. Gedvilaite, *et al.* "The use of recombinant pseudotype virus-like particles harbouring inserted target antigen to generate antibodies against cellular marker p16INK4A." ScientificWorldJournal **2012**: 263737.
- Lee, W. H., K. Bister, *et al.* (1980). "Fujinami sarcoma virus: an avian RNA tumor virus with a unique transforming gene." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 2018-22.
- Lemos, B. and P. Nghiem (2007). "Merkel cell carcinoma: more deaths but still no pathway to blame." J Invest Dermatol **127**(9): 2100-3.
- Lemos, B. D., B. E. Storer, *et al.* "Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system." J Am Acad Dermatol **63**(5): 751-61.
- Liu, J., G. Kaur, *et al.* (2009). "Role of SV40 integration site at chromosomal interval 1q21.1 in immortalized CRL2504 cells." Cancer Res **69**(19): 7819-25.
- Loyo, M., R. Guerrero-Preston, *et al.* "Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission." Int J Cancer **126**(12): 2991-6.
- Loyo, M., J. Schussel, *et al.* "Detection of Merkel cell virus and correlation with histologic presence of Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes." Br J Cancer **106**(7): 1314-9.

- Ly, T. Y., N. M. Walsh, *et al.* "The spectrum of Merkel cell polyomavirus expression in Merkel cell carcinoma, in a variety of cutaneous neoplasms, and in neuroendocrine carcinomas from different anatomical sites." Hum Pathol **43**(4): 557-66.
- Major, E. O., D. A. Vacante, *et al.* (1987). "Owl monkey astrocytoma cells in culture spontaneously produce infectious JC virus which demonstrates altered biological properties." J Virol **61**(5): 1435-41.
- Mangana, J., P. Dziunycz, *et al.* "Prevalence of Merkel cell polyomavirus among Swiss Merkel cell carcinoma patients." Dermatology **221**(2): 184-8.
- Mannova, P., D. Liebl, *et al.* (2002). "Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins." J Gen Virol **83**(Pt 9): 2309-19.
- Manos, M. M. and Y. Gluzman (1984). "Simian virus 40 large T-antigen point mutants that are defective in viral DNA replication but competent in oncogenic transformation." Mol Cell Biol **4**(6): 1125-33.
- Martel-Jantin, C., C. Filippone, *et al.* "Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma." Virology **426**(2): 134-42.
- Matsushita, M., S. Kuwamoto, *et al.* "Detection of Merkel Cell Polyomavirus in the Human Tissues from 41 Japanese Autopsy Cases Using Polymerase Chain Reaction." Intervirology.
- Mazur, S., J. Feunteun, *et al.* (1995). "Episomal amplification or chromosomal integration of the viral genome: alternative pathways in hamster polyomavirus-induced lymphomas." J Virol **69**(5): 3059-66.
- Melnick, J. L., K. S. Khera, *et al.* (1964). "Papovavirus Sv40: Failure to Isolate Infectious Virus from Transformed Hamster Cells Synthesizing Sv40-Induced Antigens." Virology **23**: 430-2.
- Mendoza, S. M., T. Konishi, *et al.* (1998). "Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA." Oncogene **17**(19): 2457-62.
- Mertz, K. D., T. Junt, *et al.* "Inflammatory monocytes are a reservoir for Merkel cell polyomavirus." J Invest Dermatol **130**(4): 1146-51.
- Miller, J., P. Bullock, *et al.* (1984). "Simian virus 40 T antigen is required for viral excision from chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7534-8.
- Mizutani, S., D. Boettiger, *et al.* (1970). "A DNA-dependent DNA polymerase and a DNA endonuclease in virions of Rous sarcoma virus." Nature **228**(5270): 424-7.
- Mogha, A., A. Fautrel, *et al.* "Merkel cell polyomavirus small T antigen mRNA level is increased following *in vivo* UV-radiation." PLoS One **5**(7): e11423.
- Monaco, M. C., P. N. Jensen, *et al.* (1998). "Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection." J Virol **72**(12): 9918-23.

- Moreland, R. B., L. Montross, *et al.* (1991). "Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1." J Virol **65**(3): 1168-76.
- Munoz, P., M. Fogeda, *et al.* (2005). "Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants." Clin Infect Dis **41**(12): 1720-5.
- Murakami, M., M. Imajoh, *et al.* "Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma." J Clin Virol **50**(1): 37-41.
- Murakami, Y., C. R. Wobbe, *et al.* (1986). "Role of DNA polymerase alpha and DNA primase in simian virus 40 DNA replication *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2869-73.
- Nakajima, H., M. Takaishi, *et al.* (2009). "Screening of the specific polyoma virus as diagnostic and prognostic tools for Merkel cell carcinoma." J Dermatol Sci **56**(3): 211-3.
- Nakamura, T., Y. Sato, *et al.* "Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma." Virology **398**(2): 273-9.
- Neu, U., H. Hengel, *et al.* "Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection." PLoS Pathog **8**(7): e1002738.
- Neumann, F., S. Borchert, *et al.* "Replication, gene expression and particle production by a consensus Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) genome." PLoS One **6**(12): e29112.
- Nicol, J. T., A. Touze, *et al.* "Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9." Emerg Infect Dis **18**(8): 1329-32.
- Norja, P., I. Ubillos, *et al.* (2007). "No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease." J Clin Virol **40**(4): 307-11.
- Offit, P. A. (2005). "The Cutter incident, 50 years later." N Engl J Med **352**(14): 1411-2.
- Ota, S., S. Ishikawa, *et al.* "Quantitative analysis of viral load per haploid genome revealed the different biological features of Merkel cell polyomavirus infection in skin tumor." PLoS One **7**(6): e39954.
- Ozer, H. L., M. L. Slater, *et al.* (1981). "Replication of simian virus 40 DNA in normal human fibroblasts and in fibroblasts from xeroderma pigmentosum." J Virol **39**(2): 481-9.
- Padgett, B. L., D. L. Walker, *et al.* (1971). "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." Lancet **1**(7712): 1257-60.
- Paik, J. Y., G. Hall, *et al.* "Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population." Hum Pathol **42**(10): 1385-90.
- Pancaldi, C., V. Corazzari, *et al.* "Merkel cell polyomavirus DNA sequences in the buffy coats of healthy blood donors." Blood **117**(26): 7099-101.

- Pantulu, N. D., C. P. Pallasch, *et al.* "Detection of a novel truncating Merkel cell polyomavirus large T antigen deletion in chronic lymphocytic leukemia cells." Blood **116**(24): 5280-4.
- Parkin, D. M. (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002." Int J Cancer **118**(12): 3030-44.
- Pastrana, D. V., Y. L. Tolstov, *et al.* (2009). "Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus." PLoS Pathog **5**(9): e1000578.
- Pastrana, D. V., U. Wieland, *et al.* "Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer." Med Microbiol Immunol **201**(1): 17-23.
- Paulson, K. G., J. J. Carter, *et al.* "Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients." Cancer Res **70**(21): 8388-97.
- Paulson, K. G., J. G. Iyer, *et al.* "Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival." J Clin Oncol **29**(12): 1539-46.
- Paulson, K. G., B. D. Lemos, *et al.* (2009). "Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc." J Invest Dermatol **129**(6): 1547-55.
- Perez-Losada, M., R. G. Christensen, *et al.* (2006). "Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts." J Virol **80**(12): 5663-9.
- Poulin, D. L. and J. A. DeCaprio (2006). "Is there a role for SV40 in human cancer?" J Clin Oncol **24**(26): 4356-65.
- Radford, A. D., D. Chapman, *et al.* "Application of next-generation sequencing technologies in virology." J Gen Virol **93**(Pt 9): 1853-68.
- Ray, F. A., J. Meyne, *et al.* (1992). "SV40 T antigen induced chromosomal changes reflect a process that is both clastogenic and aneuploidogenic and is ongoing throughout neoplastic progression of human fibroblasts." Mutat Res **284**(2): 265-73.
- Ray, F. A., D. S. Peabody, *et al.* (1990). "SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts." J Cell Biochem **42**(1): 13-31.
- Reisinger, D. M., J. D. Shiffer, *et al.* "Lack of evidence for basal or squamous cell carcinoma infection with Merkel cell polyomavirus in immunocompetent patients with Merkel cell carcinoma." J Am Acad Dermatol **63**(3): 400-3.
- Ricciardiello, L., M. Baglioni, *et al.* (2003). "Induction of chromosomal instability in colonic cells by the human polyomavirus JC virus." Cancer Res **63**(21): 7256-62.
- Ridd, K., S. Yu, *et al.* (2009). "The presence of polyomavirus in non-melanoma skin cancer in organ transplant recipients is rare." J Invest Dermatol **129**(1): 250-2.

- Robles, C., A. Poloczek, *et al.* "Antibody response to merkel cell polyomavirus associated with incident lymphoma in the epilymph case-control study in Spain." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(9): 1592-8.
- Rollison, D. E., A. R. Giuliano, *et al.* "Case-control study of Merkel cell polyomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(1): 74-81.
- Rous, P. (1911). "A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells." J Exp Med **13**(4): 397-411.
- Rubin, J., G. Giraud, *et al.* "No detection of BK virus, JC virus, KI, WU and Merkel cell polyomaviruses in cerebrospinal fluid of patients with neurological complications after hematopoietic stem cell transplantation." Anticancer Res **31**(10): 3489-92.
- Sadeghi, M., A. Riipinen, *et al.* "Newly discovered KI, WU, and Merkel cell polyomaviruses: no evidence of mother-to-fetus transmission." Virology **7**: 251.
- Sadiq, S. A., L. M. Puccio, *et al.* "JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab." J Neurol **257**(6): 954-8.
- Sambrook, J., H. Westphal, *et al.* (1968). "The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells." Proc Natl Acad Sci U S A **60**(4): 1288-95.
- Scherneck, S., V. Delmas, *et al.* (1987). "Induction of lymphomas by the hamster papovavirus correlates with massive replication of nonrandomly deleted extrachromosomal viral genomes." J Virol **61**(12): 3992-8.
- Schmitt, M., U. Wieland, *et al.* "C-terminal deletions of Merkel cell polyomavirus large T-antigen, a highly specific surrogate marker for virally induced malignancy." Int J Cancer **131**(12): 2863-8.
- Schowalter, R. M., D. V. Pastrana, *et al.* "Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry." PLoS Pathog **7**(7): e1002161.
- Schowalter, R. M., D. V. Pastrana, *et al.* "Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin." Cell Host Microbe **7**(6): 509-15.
- Schowalter, R. M., W. C. Reinhold, *et al.* "Entry tropism of BK and Merkel Cell Polyomaviruses in cell culture." PLoS One **7**(7): e42181.
- Schrama, D., W. K. Peitsch, *et al.* "Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma." J Invest Dermatol **131**(8): 1631-8.
- Schrama, D., A. Thiemann, *et al.* "Distinction of 2 different primary Merkel cell carcinomas in 1 patient by Merkel cell polyomavirus genome analysis." Arch Dermatol **146**(6): 687-9.
- Scuda, N., J. Hofmann, *et al.* "A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus." J Virol **85**(9): 4586-90.

- Sharp, C. P., P. Norja, *et al.* (2009). "Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals." J Infect Dis **199**(3): 398-404.
- Shope, R. E. (1932). "A Filtrable Virus Causing a Tumor-Like Condition in Rabbits and Its Relationship to Virus Myxomatosum." J Exp Med **56**(6): 803-22.
- Shope, R. E. (1932). "A Transmissible Tumor-Like Condition in Rabbits." J Exp Med **56**(6): 793-802.
- Shuda, M., R. Arora, *et al.* (2009). "Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors." Int J Cancer **125**(6): 1243-9.
- Shuda, M., H. Feng, *et al.* (2008). "T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16272-7.
- Shuda, M., H. J. Kwun, *et al.* "Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator." J Clin Invest **121**(9): 3623-34.
- Siebrasse, E. A., A. Reyes, *et al.* "Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool." J Virol **86**(19): 10321-6.
- Siguiet, M., P. Sellier, *et al.* "BK-virus infections: a literature review." Med Mal Infect **42**(5): 181-7.
- Sihto, H., H. Kukko, *et al.* "Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma." Clin Cancer Res **17**(14): 4806-13.
- Sihto, H., H. Kukko, *et al.* (2009). "Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma." J Natl Cancer Inst **101**(13): 938-45.
- Small, M. B., Y. Gluzman, *et al.* (1982). "Enhanced transformation of human fibroblasts by origin-defective simian virus 40." Nature **296**(5858): 671-2.
- Smith, H. S., L. D. Gelb, *et al.* (1972). "Detection and quantitation of simian virus 40 genetic material in abortively transformed BALB-3T3 clones (mice-diploid cells-virus equivalents)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(1): 152-6.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, *et al.* (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." Nature **260**(5547): 170-3.
- Stewart, N. and S. Bacchetti (1991). "Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells." Virology **180**(1): 49-57.
- Stolt, A., K. Sasnauskas, *et al.* (2003). "Seroepidemiology of the human polyomaviruses." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1499-504.

- Stringer, J. R. (1982). "DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA integration." Nature **296**(5855): 363-6.
- Sundsford, A., A. R. Spein, *et al.* (1994). "Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients." J Clin Microbiol **32**(5): 1390-4.
- Swanson, P. A., 2nd, A. E. Lukacher, *et al.* (2009). "Immunity to polyomavirus infection: the polyomavirus-mouse model." Semin Cancer Biol **19**(4): 244-51.
- Sweet, B. H. and M. R. Hilleman (1960). "The vacuolating virus, S.V. 40." Proc Soc Exp Biol Med **105**: 420-7.
- Talmage, D. A., R. Freund, *et al.* (1992). "Heterogeneity in state and expression of viral DNA in polyoma virus-induced tumors of the mouse." Virology **187**(2): 734-47.
- Teman, C. J., S. R. Tripp, *et al.* "Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma." Leuk Res **35**(5): 689-92.
- Testa, J. R., M. Carbone, *et al.* (1998). "A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas." Cancer Res **58**(20): 4505-9.
- Toker, C. (1972). "Trabecular carcinoma of the skin." Arch Dermatol **105**(1): 107-10.
- Tolstov, Y. L., R. Arora, *et al.* "Lack of evidence for direct involvement of Merkel cell polyomavirus (MCV) in chronic lymphocytic leukemia (CLL)." Blood **115**(23): 4973-4.
- Tolstov, Y. L., D. V. Pastrana, *et al.* (2009). "Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays." Int J Cancer **125**(6): 1250-6.
- Toracchio, S., A. Foyle, *et al.* "Lymphotropism of Merkel cell polyomavirus infection, Nova Scotia, Canada." Emerg Infect Dis **16**(11): 1702-9.
- Touze, A., J. Gaitan, *et al.* "Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies." J Clin Microbiol **48**(5): 1767-70.
- Touze, A., J. Gaitan, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus strains in patients with merkel cell carcinoma." Emerg Infect Dis **15**(6): 960-2.
- Trabanelli, C., A. Corallini, *et al.* (1998). "Chromosomal aberrations induced by BK virus T antigen in human fibroblasts." Virology **243**(2): 492-6.
- Trentin, J. J., Y. Yabe, *et al.* (1962). "The quest for human cancer viruses." Science **137**(3533): 835-41.
- Tsai, B. and M. Qian "Cellular entry of polyomaviruses." Curr Top Microbiol Immunol **343**: 177-94.

- van der Meijden, E., S. Kazem, *et al.* "Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus." Emerg Infect Dis **17**(8): 1355-63.
- Van Gele, M., J. H. Leonard, *et al.* (2002). "Combined karyotyping, CGH and M-FISH analysis allows detailed characterization of unidentified chromosomal rearrangements in Merkel cell carcinoma." Int J Cancer **101**(2): 137-45.
- Van Gele, M., F. Speleman, *et al.* (1998). "Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in Merkel cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization." Cancer Res **58**(7): 1503-8.
- Vanchiere, J. A., S. Abudayyeh, *et al.* (2009). "Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults." J Clin Microbiol **47**(8): 2388-91.
- Varga, E., M. Kiss, *et al.* (2009). "Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in Merkel cell carcinomas." Br J Dermatol **161**(4): 930-2.
- Verschoor, E. J., M. J. Groenewoud, *et al.* (2008). "Molecular characterization of the first polyomavirus from a New World primate: squirrel monkey polyomavirus." J Gen Virol **89**(Pt 1): 130-7.
- Viscidi, R. P., D. E. Rollison, *et al.* "Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus." Clin Vaccine Immunol **18**(10): 1737-43.
- Walker, D. L., B. L. Padgett, *et al.* (1973). "Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters." Science **181**(4100): 674-6.
- Wallenburg, J. C., A. Nepveu, *et al.* (1984). "Random and nonrandom integration of a polyomavirus DNA molecule containing highly repetitive cellular sequences." J Virol **50**(3): 678-83.
- Wallenburg, J. C., A. Nepveu, *et al.* (1987). "Integration of a vector containing rodent repetitive elements in the rat genome." Nucleic Acids Res **15**(19): 7849-63.
- Waltari, M., H. Sihto, *et al.* "Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma." Int J Cancer **129**(3): 619-28.
- Wetzels, C. T., J. G. Hoefnagel, *et al.* (2009). "Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung." PLoS One **4**(3): e4958.
- White, M. K. and K. Khalili (2004). "Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis." Virology **324**(1): 1-16.
- White, M. K., M. Safak, *et al.* (2009). "Regulation of gene expression in primate polyomaviruses." J Virol **83**(21): 10846-56.
- Wieland, U., C. Mauch, *et al.* (2009). "Merkel cell polyomavirus DNA in persons without merkel cell carcinoma." Emerg Infect Dis **15**(9): 1496-8.

- Wieland, U., N. Scola, *et al.* "No evidence for a causal role of Merkel cell polyomavirus in keratoacanthoma." J Am Acad Dermatol **67**(1): 41-6.
- Wieland, U., S. Silling, *et al.* "Merkel cell polyomavirus infection in HIV-positive men." Arch Dermatol **147**(4): 401-6.
- Willmes, C., C. Adam, *et al.* "Type I and II IFNs inhibit Merkel cell carcinoma *via* modulation of the Merkel cell polyomavirus T antigens." Cancer Res **72**(8): 2120-8.
- Wirth, J. J., L. G. Martin, *et al.* (1997). "Oncogenesis of mammary glands, skin, and bones by polyomavirus correlates with viral persistence and prolonged genome replication potential." J Virol **71**(2): 1072-8.
- Wognum, A. W., C. J. Sol, *et al.* (1984). "Isolation and characterization of a papovavirus from cynomolgus macaque kidney cells." Virology **134**(1): 254-7.
- Woods, C., C. LeFeuvre, *et al.* (1994). "Induction of genomic instability in SV40 transformed human cells: sufficiency of the N-terminal 147 amino acids of large T antigen and role of pRB and p53." Oncogene **9**(10): 2943-50.
- Wooff, J. C., J. R. Trites, *et al.* "Complete spontaneous regression of metastatic merkel cell carcinoma: a case report and review of the literature." Am J Dermatopathol **32**(6): 614-7.
- Woolford, L., A. Rector, *et al.* (2007). "A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (*Perameles bougainville*) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae." J Virol **81**(24): 13280-90.
- Zeng, Q., B. P. Gomez, *et al.* "Development of a DNA vaccine targeting Merkel cell polyomavirus." Vaccine **30**(7): 1322-9.
- Zumbach, K., F. Kisseljov, *et al.* (2000). "Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia." Int J Cancer **85**(3): 313-8.