

Thesis, COLLÉGIALITÉ, FRANZEN Rachelle

Auteur : Miceli, Sarah

Promoteur(s) : Herfs, Michael

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/23302>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Déchiffrer le détournement des mécanismes de réparation de l'ADN de l'hôte par **le polyomavirus de Merkel** et ses vulnérabilités thérapeutiques associées



Sarah Miceli

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade
de Master en Sciences Biomédicales

Promoteurs : Dr Michaël Herfs et Dr Pascale Hubert

Laboratoire de Pathologie Expérimentale

Année académique 2024-2025

Remerciements

Michael, avant toute chose merci de m'avoir donné la chance de réaliser mon mémoire au sein du laboratoire ! Merci d'avoir cru en moi, parfois plus que je ne croyais en moi-même. Ce fut un plaisir de t'avoir comme promoteur.

Pascale, merci pour ton soutien tout au long de ce mémoire et merci pour tes mots réconfortants lorsque tu me sentais trop nerveuse.

Patrick, j'ai dû prononcer ton prénom mille fois durant ce mémoire et pourtant tu as toujours été super patient et disponible pour m'aider ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour tes conseils et pour ta gentillesse.

Diane, merci pour tes idées innovantes et tes conseils. Merci pour ta disponibilité et le temps que tu as pris pour relire mon manuscrit. Et finalement merci d'avoir été présente jusqu'à la fin et de t'être assurée que tout allait bien. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée.

Florian, ce fut un plaisir de passer ce mémoire à tes côtés ! Merci pour ton éternelle bonne humeur et j'espère pouvoir regoûter un jour à ta fameuse charlotte.

Marie, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Malgré le fait qu'on se connaissait depuis peu, j'ai été triste de te voir dire au revoir au laboratoire et de ne pas passer mon dernier mois de mémoire en ta présence.

Michael, merci pour ton chaleureux accueil. J'ai particulièrement apprécié le fait que tu t'es toujours intéressé à mon projet et que tu ne manquais pas de poser des questions pour savoir ce que je faisais et comment ça allait.

Margaux, merci pour tes précieux conseils. Tes anecdotes ont égayé chaque temps de midi de ce mémoire.

Romane, merci d'être devenue mon binôme de laboratoire. Le jour où je t'ai demandé de devenir mon binôme en cours de biochimie, je n'aurai jamais pensé qu'on aurait fini par passer le reste de nos études ensemble et finalement par réaliser notre mémoire au même endroit ! Merci d'avoir égayé mes journées au laboratoire, je suis contente d'avoir vécu cette aventure avec toi.

Je tiens également à remercier Noure, merci pour ton éternelle présence, merci d'avoir la patience de me supporter et merci de savoir toujours quoi dire dans n'importe quelle situation. Merci aussi à Luca, j'ai de la chance d'avoir un ami comme toi, tu as égayé ces 5 années d'étude. Finalement, je tiens à remercier les personnes qui sont les plus précieuses à mes yeux : mes parents et ma sœur, Alessia. Merci pour votre soutien et votre présence. Cela n'a peut-être pas toujours été facile pour moi, mais cela ne l'était pas pour vous non plus.

Abréviations

4E-BP1 = Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1

ARF = ADP Ribosylation Factors

ATOH 1 = ATOH Homolog 1

BCA = Bicinchoninic Acid

Pb = Paire de base

BSA = Bovine Serum Albumin

CCM = Carcinome à Cellules de Merkel

CDK = Cyclin Dependent Kinase

CK = CytoKératine

DAB = 3',3'-DiAminoBenzidine

DDR = DNA Damage Repair

DMEM = Dulbecco's Modified Essential Medium

DTS = Digital Transcriptome Subtraction

ECL = Enhance Chemiluminescence

EDTA = EthyleneDiamineTetraAcetic acid

FDA = Food and Drug Administration

FBW7 = F-Box/WD repeat-containing protein 7

GADPH = GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

H&E = Hématoxyline & Eosine

HRP = HorseRadish Peroxidase

HSC70 = Heat Shock Protein of 70 KDa

IHC = ImmunoHistoChimie

IRES = Internal Ribosome Entry Site

KDa = KiloDalton

LDS = Lithium Dodecyl Sulfate

LSD = LT Stabilization Domain

LT = Large T (antigène T de grande taille)

LTtrunc = Large T truncated (Large T tronqué)

Luc = Luciférase

MCPyV = Merkel Cell PolyomaVirus

MDB = Membrane Desalting Buffer

MCT-1 = MonoCarboxylate Transporter 1

MMP = Matrix MetalloProteinase

MMEJ = Microhomology-Mediated End Joining

MUR = Merkel cell polyomavirus Unique Region

NCCN = National Comprehensive Cancer Network

NEMO = NF- κ B Essential MOdulator

NHEJ = Non-Homologous End-Joining

NF = NeuroFilament

NLS = Nuclear Localization Signal

NSE = Neuron-Specific Enolase

O.N. = Over Night

OBD = Origin Biding Domain

PBS = Phosphate-Buffered Saline

PD-1 = Programmed Cell Death Protein 1

PD-L1 = Programmed Cell Death Protein Ligand 1

PLL = Poly-L-Lysine

PMSF = PhenylMethylSulfonyl Fluoride

POU4F3 = POU domain, class 4, transcription Factor 3

PVDF = PolyVinylidène DiFluoride

RIPA = RadiolImmunoPrecipitation Assay

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

RT = Room Temperature

(RT-)PCR = (Reverse Transcription-)Polymerase Chain Reaction

SCF = Skp1, Cullin, F-box

SDS = Sodium Dodécyl Sulfate

SLNB = Sentinel Lymph Node Biopsy

SOX 2 = SRY-box 2

ST = Small T (antigène T de petite taille)

TBS-T = Tris Buffered Saline-Tween

TEM = Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TTF-1 = Thyroid Transcription Factor 1

VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

VP = Viral Particles

WT = Wild Type

Résumé

Le carcinome à cellules de Merkel est un cancer neuroendocrinien rare et agressif de la peau qui touche principalement les personnes âgées et/ou immunodéprimées. Dans 80 % des cas, il est causé par une intégration accidentelle du polyomavirus de Merkel dans le génome de l'hôte. Dans 20 % des cas, il est causé par une surexposition aux UV menant à des mutations inactivatrices touchant, par exemple, la protéine Rb.

Le polyomavirus de Merkel est un virus ADN double brin possédant un génome circulaire. Il possède un promoteur central bidirectionnel lui permettant de transcrire une région précoce puis une région tardive. La région précoce code pour les antigènes T dont il résulte plusieurs protéines dû à un épissage alternatif : l'antigène Large T, l'antigène 57 kT et l'antigène Small T.

Le but de ce virus, comme tous les autres virus, est de se répliquer. En raison de sa petite taille, il utilise la machinerie de son hôte. Cette stratégie de réplication peut mener à une intégration accidentelle du génome viral au niveau du génome de l'hôte. L'intégration ne se fait pas toujours au même endroit dans le génome de l'hôte mais la délétion retrouvée au niveau du génome viral est constante. En effet, celle-ci touche l'oncoprotéine Large T qui devient Large T tronqué à la suite de la perte de sa partie C-terminale, où se situent les domaines indispensables à la réplication virale. Cependant, son domaine de liaison au gène suppresseur de tumeur Rb1 est préservé et le virus va s'y lier de manière constitutive. L'intégration du virus mène à une expression constitutive des oncoprotéines virales qui cause une prolifération cellulaire incontrôlée et finalement une transformation cancéreuse.

Sachant que le carcinome à cellules de Merkel viro-induit présente un meilleur pronostic et en supposant que le polyomavirus de Merkel détourne les mécanismes de réparation à l'ADN de son hôte, le but de ce mémoire est d'investiguer si la sensibilité à la radiothérapie est différente entre les patients atteints d'un carcinome à cellules de Merkel positif ou négatif pour le virus.

Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules cancéreuses infectées par le virus présentaient une tendance à la surexpression des protéines γ -H2AX et Rad51, signifiant qu'ils étaient prédisposés à être plus radiosensibles que leurs homologues non infectées.

Ensuite, la différence de radiosensibilité a été évaluée entre des cellules de patients positives pour le polyomavirus et des cellules viro-négatives. Des ajustements expérimentaux sont requis pour pouvoir conclure à une différence.

Finalement, afin de connaître le rôle de chaque oncoprotéine du virus dans la radiosensibilité, des kératinocytes (HaCaT) ont été transduits avec les oncoprotéines virales afin de créer des modèles isogéniques. Malheureusement, la transduction pour l'antigène ST a échoué et la suite des expériences n'a pas pu être menée.

Abstract

Merkel cell carcinoma is a rare and aggressive human cutaneous neuroendocrine cancer that typically affects elderly and/or immunosuppressed individuals. About 80 % of Merkel cell carcinomas are caused by the accidental integration of the Merkel cell polyomavirus into the host genome. In 20 % of cases, UV overexposure leads to inactivating mutations, notably in the Rb1 gene.

Merkel cell polyomavirus is a double-stranded DNA virus with a circular genome. It possesses a central bidirectional promoter that drives the transcription of both an early and late regions. The early region encodes T antigens, which translate into several proteins through alternative splicing: the Large T antigen, the 57 kT antigen and the Small T antigen.

The goal of the virus, like all others, is to replicate. Since it is a small virus, it uses the host machinery. However, there is a risk of accidental integration of the virus into the host's genomic DNA. The integration does not occur at a specific site in the host genome, but a recurrent deletion is consistently observed in the viral genome. This genomic alteration affects the Large T oncoprotein, leading to a truncated form due to the loss of its C-terminal domain, where the viral replication domains are located. However, the domain responsible for binding the tumor suppressor gene Rb1 is preserved, allowing the virus to bind to it constitutively. Viral integration leads to the constitutive expression of viral oncoproteins, resulting in uncontrolled cellular proliferation through its interaction with Rb1, leading ultimately to malignant transformation.

Given that Merkel cell carcinoma with a viral etiology has a better prognosis, and assuming that the Merkel cell polyomavirus hijacks the host's DNA repair mechanisms, the aim of this master thesis is to investigate whether the sensitivity to radiotherapy differs between virus-positive and virus-negative cancer patients.

First, it was shown that virus-infected tumors show a tendency toward overexpression levels of γ -H2AX and Rad51 proteins, suggesting a predisposition to increased radiosensitivity compared to their virus-negative counterparts.

Next, the difference in radiosensitivity was evaluated between virus-positive and virus-negative patient-derived cells. Experimental adjustments are required before any conclusions can be made.

Finally, to determine the role of each viral oncoprotein in radiosensitivity, HaCaT cells were transduced with the viral oncoproteins in order to create isogenic cellular models. Unfortunately, transduction of the ST antigen failed, and the next experiments could not be done.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Epidémiologie	1
1.2 Etiologies du carcinome à cellules de Merkel	2
1.3 Polyomavirus de Merkel (MCPyV).....	3
1.4 Les oncoprotéines virales de MCPyV	4
1.4.1 L'antigène T de grande taille (LT).....	4
1.4.2 L'antigène T de petite taille (ST)	6
1.4.3 L'antigène 57 kT.....	7
1.5 Origine du CCM.....	8
1.6 Mode d'infection du polyomavirus de Merkel (MCPyV)	9
1.7 Facteurs de risque	11
1.8 Diagnostic	11
1.9 Traitements	17
1.9.1 Chirurgie	17
1.9.2 Radiothérapie.....	17
1.9.3 Immunothérapie.....	18
2. But du projet	19
3. Matériel et méthodes.....	20
3.1 Immunohistochimie	20
3.1.1 Immunohistochimie sur coupes tissulaires.....	20
3.1.2 Quantification	22
3.1.3 Statistiques	22
3.2 Culture cellulaire	22
3.2.1 Lignées cellulaires	22
3.2.2 Vérification de la transduction.....	23
3.2.2.1 Extraction d'ARN	23
3.2.2.2 Dosage.....	24
3.2.2.3 Rétro-transcription	24
3.2.2.4 PCR.....	24
3.2.3.5 Extraction protéique	28
3.2.3.6 Dosage.....	29
3.2.3.7 Western blot.....	29
3.2.3.8 Imagerie par bioluminescence	31
3.3 Radiosensibilité des lignées de carcinome de Merkel	31

3.3.1 Soft agar assay + irradiation	31
3.3.2 Test clonogénique + irradiation	32
4. Résultats	33
4.1 Immunohistochimie	33
4.2 Transduction de la lignée HaCaT (création de modèles isogéniques)	35
4.2.1 Vérification au niveau génomique de la transduction des lignées.....	35
4.2.2 Expression protéique des gènes transduits	37
4.2.3 Imagerie par bioluminescence	38
5. Discussion	40
6. Références bibliographiques.....	45

1. Introduction

Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer neuroendocrinien rare et agressif de la peau touchant principalement les personnes âgées et/ou immunodéprimées¹⁻³. Un scientifique du nom de Cyril Toker l'a décrit pour la première fois en 1972, le définissant sous le terme de carcinome trabéculaire⁴. En 1980, ils ont été nommés « carcinome à cellules de Merkel » à la suite de l'analogie cytologique et cytochimique des cellules tumorales et des cellules de Merkel^{2,5,6}. Cependant, l'hypothèse avançant que les cellules de Merkel sont les cellules d'origine a été récemment remise en question et des recherches sont toujours en cours pour déterminer l'origine exacte de cette tumeur^{1,7-10}. Cette maladie se développe principalement sur les zones cutanées les plus exposées au soleil, notamment la tête, le cou, les extrémités et le tronc¹¹. Au niveau de la peau, la tumeur envahit très souvent le derme et l'hypoderme¹².

1.1 Epidémiologie

Le taux d'incidence global du CCM oscille aux alentours de 0,1 à 2,5 cas pour 100 000 habitants par an. Ces chiffres ont été établis *via* des études dans différents pays tels que l'Allemagne, l'Australie, le Danemark, l'Espagne, les États-Unis, la Finlande, la France, la Grande-Bretagne, l'Irlande, l'Italie, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, les Pays-Bas et la Suède¹³. Bien que ce taux soit faible, une augmentation du nombre de cas diagnostiqués a été rapportée depuis le milieu des années 1990. Cette hausse s'explique à la fois par le vieillissement de la population, mais aussi par les progrès réalisés dans le diagnostic^{14,15}. L'incidence globale précise du CCM est compliquée à estimer en raison de la rareté de ce cancer et du nombre limité d'études épidémiologiques qui ont été menées. De plus, son incidence présente une forte variabilité d'un point de vue géographique¹². La plus haute incidence décrite est en Australie avec 3,9 cas pour 100 000 habitants chez l'homme et 1,5 pour la femme et la plus petite incidence décrite est en Norvège avec 0,45 cas pour 100 000 habitants chez l'homme et 0,22 chez la femme¹³. Malgré sa « relative » rareté, il est important de noter que, parmi tous les cancers cutanés, le CCM présente le taux de mortalité le plus élevé et c'est la deuxième cause de décès annuel par cancer de la peau, après le mélanome^{16,17}. En effet, selon les dernières données de GLOBOCAN, le nombre de patients souffrant du mélanome, en 2020, était aux alentours 325 000 cas pour 57 000 décès soit une mortalité d'environ 18% ; alors que le CCM présente une incidence plus faible mais un tiers des patients en décèdent, le rendant deux fois plus léthal que le mélanome^{18,19}.

1.2 Etiologies du carcinome à cellules de Merkel

Le développement du CCM peut être lié à deux facteurs (Figure 1)²⁰.

En 2008, Yuan Chang et Patrick S. Moore ont identifié un nouveau virus, le polyomavirus de Merkel (MCPyV), et ils ont mis en évidence son rôle dans l'étiologie du CCM. Ce virus est, en effet, détecté dans environ 80 % des cas. Leur découverte a été rendue possible grâce à une technique de soustraction numérique du transcriptome (DTS), une méthodologie qu'ils ont développée permettant d'identifier des transcrits étrangers grâce à l'utilisation de données de séquençage à haut débit d'ADN complémentaire humain². La carcinogenèse survient à la suite de l'intégration du MCPyV dans le génome l'hôte qu'il infecte. La conséquence de cette intégration est une troncature d'une oncoprotéine du virus, l'antigène T de grande taille (LT). Cette troncature mène à une expression constitutive des oncoprotéines virales et en une séquestration de la protéine du rétinoblastome (pRb), un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation de l'entrée en phase S du cycle cellulaire^{15,21,22}. Bien que la fonction de pRb soit altérée, son gène reste intact et conserve sa structure²³. L'expression des oncoprotéines virales est à la fois nécessaire et suffisante pour induire la tumorigénèse²⁴.

Dans environ 20 % des cas, la carcinogenèse résulte seulement d'une exposition aux rayons UV. Cette exposition va entraîner des mutations inactivatrices de pRb et de p53^{23,25,26}.

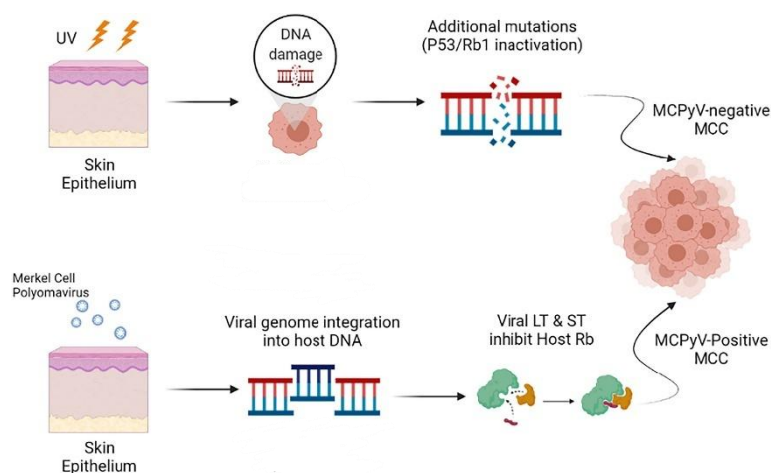


Figure 1: **La pathogénèse du CCM.** 80 % des cas de CCM sont la conséquence de l'intégration accidentelle du MCPyV au sein du génome de l'hôte alors que 20 % des cas sont uniquement causés par une surexposition aux rayons UV conduisant à des mutations dans des gènes « clés » tels que Rb1 ou TP53 (figure adaptée de Hernander *et al.*, 2021)²⁰.

Les méthodes les plus courantes pour différencier les deux étiologies consistent à réaliser une immunohistochimie utilisant un anticorps ciblant l'antigène LT ou une real-time PCR sur l'ADN du virus^{27,28}.

Ce travail va se concentrer principalement sur le CCM causé par l'intégration du MCPyV.

1.3 Polyomavirus de Merkel (MCPyV)

Environ 15 % des cancers dans le monde sont d'origine virale²⁹. En 1953, la découverte du polyomavirus murin (MuPyV) par Gross a permis de démontrer que les polyomavirus possédaient un rôle oncogène *via* le développement de tumeurs dans des modèles animaux². A ce jour, une centaine de polyomavirus ont été découverts³. Quinze ont été isolés chez l'Homme. Les premiers à avoir été découverts, en 1971, sont BKPyV et JCPyV^{30,31}. Par la suite, en 2007, KIPyV et WUPyV ont été décrits^{32,33}, suivis en 2008 par l'identification du MCPyV^{2,32,34}. Au fil des années, d'autres polyomavirus ont été détectés, tels que HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, HPyV10, STLPyV, HPyV12, NJPyV, LIPyV et finalement QPyV³⁴⁻⁴². L'abréviation PyV fait référence au mot polyomavirus et le préfixe précise de quel polyomavirus il s'agit. La manière de choisir le préfixe est très variable. Pour BK et JC, il s'agit de l'initiale du premier patient chez qui le virus a été détecté. Pour KI, WU, STL et LIP, ce sont les initiales de l'institut de recherche qui a découvert le virus. Pour le MC, c'est en référence aux cellules de Merkel. TSP est en lien avec la maladie à laquelle il est associé. NJP et Q font référence à la ville où les virus ont été découverts. Et finalement HP signifie human polyomavirus^{2,30-42}. Pour le moment, seulement quatre d'entre eux sont associés à des pathologies humaines et seul le MCPyV a un rôle oncogénique avéré (Tableau 1)³.

Tableau 1 : Les principaux polyomavirus impliqués dans des pathologies touchant l'homme³.

Principaux polyomavirus provoquant des pathologies chez l'Homme	Pathologies
BKPyV	Cystite hémorragique et néphropathie
JCPyV	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
MCPyV	Carcinome à cellules de Merkel
TSPyV	Trichodysplasie spinulosique

Les polyomavirus sont de petits virus à ADN double brin non enveloppés, dont le génome circulaire mesure environ 5 à 6 Kb de longueur³. Celui-ci comprend une origine de réplication et un promoteur central bidirectionnel, situés au niveau d'une région appelée « région de contrôle non codante ». Cette dernière permet de transcrire une région précoce, puis une région tardive à partir de brins opposés du génome^{3,43,44}. La région précoce code pour les antigènes tumoraux, plus communément connus sous le nom d'antigènes T. Quant aux protéines de structure de la capside, elles sont synthétisées à partir de la région tardive située sur le brin opposé du génome (Figure 2)⁴⁴.

La région précoce permet la production de plusieurs protéines : l'antigène T de grande taille (LT), l'antigène T de petite taille (ST) et l'antigène 57 kT pour le MCPyV⁴⁴. On retrouve également ALTO, un cadre de lecture alternatif de l'antigène LT²² (Figure 4).

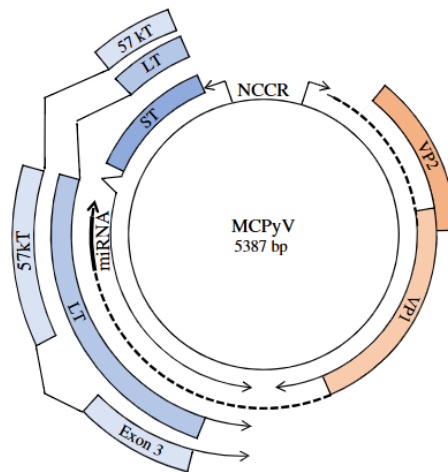


Figure 2 : Composition du MCPyV. Ce polyomavirus mesure 5387 pb. Il est composé d'une origine de réplication et d'un promoteur central bidirectionnel lui permettant de transcrire une région précoce codant pour les antigènes LT, ST et 57 kT et une région tardive codant pour les protéines de la capsid²².

La région tardive code pour les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3³. Bien que MCPyV, lui, ne produise que VP1 et VP2²². Ce sont de petits virus, d'environ 50 nm, et possédant une capsid icosaédrique non enveloppée constituée de VP1 et VP2, VP1 étant la protéine majeure et VP2 la protéine mineure de capsid (Figure 3)^{16,45}.

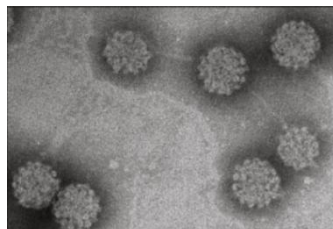


Figure 3 : Représentation du MCPyV par microscopie électronique. Le MCPyV possède une capsid icosaédrique non enveloppée constituée des protéines de capsid VP1 et VP2. Echelle de l'image = 100 nm⁴⁵.

1.4 Les oncoprotéines virales de MCPyV

1.4.1 L'antigène T de grande taille (LT)

L'action principale de l'antigène LT, dans le cycle viral, est d'initier la réplication du virus en se liant à l'origine de réplication du génome viral, en séparant les deux brins d'ADN *via* son domaine hélicase et en recrutant la machinerie de réplication cellulaire de l'hôte⁴⁶. L'antigène LT permet d'induire la prolifération cellulaire *via* la séquestration de pRb⁴⁷. Dans le CCM, ses domaines permettant la réplication virale sont perdus mais il continue de séquestrer pRb, de manière constitutive, afin d'induire une prolifération cellulaire incontrôlée^{21,22}.

L'antigène LT se localise principalement dans le noyau⁴⁶. Il contient plusieurs domaines communs à tous les antigènes LT des polyomavirus. Ces domaines servent de points d'ancrage pour diverses protéines cellulaires impliquées dans la régulation de sa fonction (Figure 4)⁴⁸ :

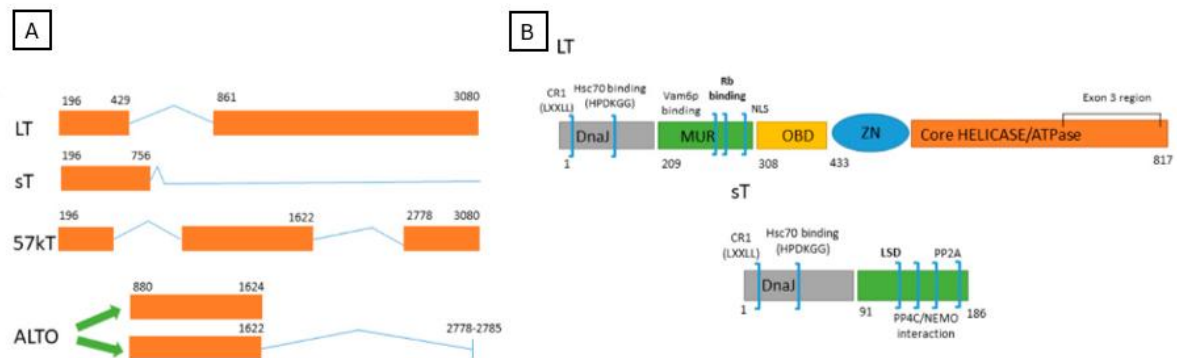


Figure 4 : **Domaines composant les antigènes du MCPyV.** (A) Régions communes à l'antigène T de grande taille (LT), l'antigène T de petite taille (sT) et l'antigènes 57 kT. ALTO est exprimé à partir de l'antigène LT dans un cadre de lecture alternatif. (B) Domaines composant LT et sT (figure adaptée de Pietropaolo *et al.*, 2020)⁴⁸.

LT possède un domaine **LxCxE** qui lui permet de se fixer à la protéine pRb et, en conséquence, d'induire la prolifération cellulaire⁴⁹. Son interaction avec pRb mène à une augmentation de l'expression d'ARF, un inhibiteur de MDM2. MDM2 est un régulateur négatif de p53 et son inhibition entraîne donc une augmentation de l'activation de p53²⁶.

Il contient également un domaine **DnaJ** situé au niveau de son extrémité N-terminale. Ce domaine interagit avec la protéine Hsc70. Cette liaison favorise l'interaction entre LxCxE et pRb⁴⁹. L'interaction de l'antigène LT avec Hsc70 est essentielle au maintien de la prolifération cellulaire⁵⁰. Comme mentionné précédemment, l'antigène LT subit une troncature après son intégration dans le génome de l'hôte donnant naissance à une forme tronquée²². A l'aide du domaine DnaJ, l'antigène LTtrunc augmente l'expression de plusieurs microARN, notamment miR-375, miR-30a-3p et miR-30a-5p. Ces microARN sont impliqués dans la régulation de gènes inhibant l'autophagie, bien que le mécanisme précis de cette régulation ne soit pas connu⁵¹.

LT présente également des domaines **MUR 1 et 2** (Merkel cell polyomavirus unique region), dont la fonction est méconnue à ce jour. Ces domaines, qui n'ont jamais été observés dans un antigène LT auparavant, entourent le domaine de liaison à pRb. En revanche, il est connu que la protéine Vam6p, impliquée dans l'agrégation des lysosomes, interagit avec cette région^{49,50}.

Il renferme un signal de localisation nucléaire **NLS**⁴⁹. Ce domaine NLS est présent pour l'antigène LT, mais pas nécessairement chez tous les antigènes LT tronqués.

En effet, dans certaines lignées cellulaires de CCM, comme la lignée WAGA, des mutations STOP entraînent des coupures dans leur domaine NLS lors de l'intégration dans le génome de l'hôte. Une localisation cytoplasmique et nucléaire est donc possible pour les antigènes T ne possédant pas de NLS ou possédant une version tronquée de celui-ci. Une hypothèse suggère que les antigènes LT tronqués dépourvus de NLS pourraient quand même entrer dans le noyau en raison de leur petite taille⁵⁰.

Un domaine **OBD** lui permet de se lier à l'origine de réplication virale⁴⁹.

Enfin, il dispose d'une région **hélicase** afin de séparer les deux brins d'ADN lors de la réplication virale⁴⁹.

1.4.2 L'antigène T de petite taille (ST)

Dans le cycle de vie du MCPyV, l'antigène ST joue un rôle clé dans le soutien des fonctions de réplication de l'antigène LT. Il est essentiel pour activer la réplication virale et l'expression de gènes viraux après l'initiation de la réplication virale (Figure 5)⁴⁶. Dans le CCM, il est impliqué dans la transformation cellulaire^{24,43}. Contrairement à l'antigène LT qui se localise principalement dans le noyau, l'antigène ST est localisé tant au niveau du cytoplasme que du noyau. Cela suggère qu'il pourrait interagir avec diverses protéines, cytoplasmiques et nucléaires, afin de réaliser ses fonctions de régulation de la réplication virale et de transformation cellulaire⁴⁶.

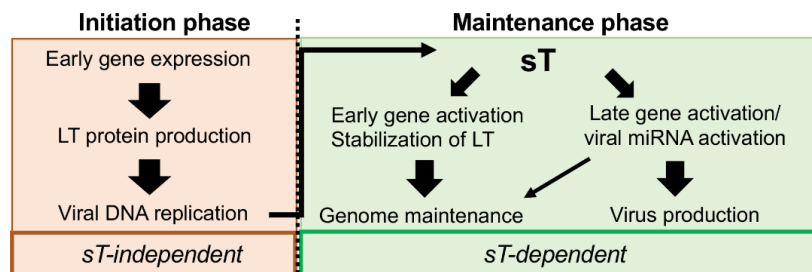


Figure 5 : Schématisation des rôles des antigènes LT et ST dans la réplication virale. L'antigène LT est essentiel pour la phase d'initiation à la réplication virale, cette phase est indépendante de l'antigène ST. En revanche, l'antigène ST va maintenir la réplication en stabilisant l'antigène LT⁴⁶.

L'antigène ST exerce plusieurs fonctions *via* ses différents domaines (Figure 4B)⁴⁹ :

Grâce à son domaine **LSD** (domaine de stabilisation de l'antigène LT), il induit l'hyperphosphorylation du régulateur de la traduction 4E-BP1, entraînant une accélération de la progression du cycle cellulaire. Cette action est très importante pour le rôle oncogène de l'antigène ST^{23,49,51}. Toujours via son domaine LSD, l'antigène ST inhibe les ligases E3 du complexe SCF (Skp1, Cullin, F-box). Cette inhibition favorise la réplication du MCPyV et la prolifération cellulaire⁵².

Parmi les composants du complexe SCF, on retrouve l'ubiquitine ligase FBW7 (F-box/WD repeat-containing protein 7), un gène suppresseur de tumeur favorisant la dégradation de plusieurs proto-oncogènes, celles-ci sont ainsi stabilisées à la suite de l'inhibition de FBW7^{51,53}. Cette inhibition favorise également la formation de métastases et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) via l'augmentation de l'expression des métalloprotéases matricielles MMP-2, MMP-9 et MMP-13, des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, l'antigène ST contribue à la suppression de gènes codant pour des molécules d'adhésion cellulaire, renforçant son rôle potentiel dans la TEM⁵².

L'antigène ST a également la capacité d'activer la signalisation de NF-κB non canonique menant à une promotion de la prolifération et survie cellulaire⁵³.

Parallèlement, via son **domaine phosphatase 4C (PP4C)**, ST interagit avec la protéine NEMO (modulateur essentiel de NF-κB) perturbant la signalisation inflammatoire médiée par NF-κB dans la cellule hôte⁵¹. Ce domaine contribue également à la déstabilisation des microtubules, favorisant ainsi la motilité et la migration cellulaire⁵¹.

Un rôle supplémentaire à l'antigène ST est le recrutement de la protéine MYCL, un homologue de Myc, dans le complexe de transcription EP400, permettant l'activation de nombreux gènes impliqués dans la transformation cellulaire. Au niveau de ce complexe, MYCL va interagir avec MAX^{23,49}. Cette interaction est importante pour la fonction de transformation de l'antigène ST. En effet, une expérience de déplétion du complexe MYCL/EP400 via CRISPR-Cas9 a montré une réduction significative de la viabilité cellulaire dans une lignée de CCM positive au virus (MKL-1), suggérant que ce complexe est essentiel à la survie des cellules du CCM⁵⁴. Le complexe ST-MYCL-EP400 augmente les niveaux de MDM2 et CK1, un activateur de MDM4, entraînant une diminution de l'expression de p53. Ce système contrecarre l'augmentation de p53 par l'antigène LT²⁶.

L'antigène ST a la capacité de moduler le métabolisme en augmentant l'expression de la glycolyse aérobie par induction de MCT-1, un transporteur majeur de monocarboxylates⁵⁵.

1.4.3 L'antigène 57 kT

L'antigène 57 kT est issu de la même région codante que les antigènes LT et ST. Cette région qui est transcrite puis qui subit un épissage alternatif donne lieu aux trois protéines LT, ST et 57 kT, partageant de nombreux motifs (Figure 4). Au niveau de la protéine 57 kT, on retrouve le même domaine amino-terminal que LT et ST comprenant les domaines DnaJ, la région MUR, le motif de liaison à pRb, LXCXE. Cette protéine possède aussi les 100 acides aminés les plus carboxy-terminaux de la protéine LT⁴⁵. Cependant, que ce soit au niveau du MCPyV ou dans la carcinogénèse du CCM, la fonction de l'antigène 57 kT n'a pas encore été élucidée⁴⁹.

Une hypothèse serait qu'il soit un analogue de l'antigène 17 kT du virus SV40 qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire⁴⁵.

1.5 Origine du CCM

Parmi les nombreuses questions entourant le CCM, son origine reste une question non résolue. Au vu de leurs similitudes phénotypiques, les cellules de Merkel ont longtemps été considérées comme les cellules d'origine. Or, cette hypothèse a été réfutée, car ces cellules sont post-mitotiques et le virus a besoin d'un cycle cellulaire actif pour pouvoir s'intégrer et induire une transformation tumorale. Cette incompatibilité a également été démontrée dans des modèles murins, où la surexpression des oncoprotéines virales n'a pas permis aux cellules de Merkel matures de réintégrer le cycle cellulaire⁷. De plus, les cellules de Merkel et les cellules de CCM se situent à des endroits anatomiquement distincts⁸.

Il existe une controverse autour de cette origine et plusieurs hypothèses existent. L'une d'elles suggère les **kératinocytes** comme origine pour le CCM négatif pour le virus. Deux arguments sont en faveur de cette hypothèse. Premièrement, l'exposition des kératinocytes aux UV entraînerait une accumulation de mutations, caractéristique des CCM négatifs. Deuxièmement, le carcinome épidermoïde et le CCM partagent un profil mutationnel similaire, ce qui suggère qu'ils pourraient dériver de la même cellule et qu'ensuite le CCM présenterait une différenciation neuroendocrine^{1,9}. Une autre hypothèse propose que le CCM négatif pour le virus pourrait également venir de **cellules souches tumorales**, capables de se différencier en cellules neuroendocrines¹.

Pour les CCM positifs pour le virus, une hypothèse suggère une origine cellulaire lymphocytaire **pré-/pro-B**, car le CCM exprime des marqueurs des cellules B (Tdt et PAX5). Le CCM pourrait également dériver de cellules mésenchymateuses dermiques, plus précisément des **fibroblastes dermiques**. Cette hypothèse repose sur leur localisation, leur faible charge mutationnelle, du fait qu'ils sont des hôtes permissifs de l'infection par le polyomavirus et de l'absence de mutations associées aux UV. Selon certaines théories, les oncoprotéines du virus permettraient au CCM positif pour le virus d'acquérir un phénotype neuroendocrinien. L'antigène LT, en séquestrant pRb, entraîne une accumulation d'Atonal homolog 1 (ATOH1) et de SRY-box 2 (SOX2), deux facteurs de transcription régulant la différenciation des cellules de Merkel et donc permettant d'acquérir un phénotype neuroendocrinien. Cependant, des modèles murins ont montré que l'expression des oncoprotéines virales, seule, ne suffit pas à induire ce phénotype neuroendocrinien⁷.

Une autre hypothèse suggère une origine épithéliale car il existe un chevauchement mutationnel entre le CCM et le **trichoblastome**, une tumeur épithéliale bénigne. Ce lien suggère que le CCM pourrait dériver de cette tumeur, qui ressemble phénotypiquement aux cellules progénitrices au niveau des follicules pileux qui peuvent se différencier en cellules de Merkel¹⁰.

1.6 Mode d'infection du polyomavirus de Merkel (MCPyV)

Le MCPyV infecte la majorité des individus dès l'enfance, menant à une infection asymptomatique à vie^{3,16,23}. La preuve de cette infection persistante est la présence d'anticorps dans le sérum dirigés contre la protéine de capsid VP1^{22,27}. L'infection devient ensuite active chez les personnes âgées et/ou immunodéprimées suite à une modification du système immunitaire bien que le mécanisme d'activation de l'infection persistante, passant de l'état latent à actif, reste encore mal compris³. A l'état latent, le virus persiste sous forme épisomale, probablement dans un réservoir cutané, chez les individus immunocompétents. Lorsque le système immunitaire s'affaiblit, il y a une réactivation des réservoirs où sont stockés les épisomes ce qui favorise les mutations et l'intégration de l'ADN viral au niveau du génome de l'hôte²⁴. Le MCPyV est ainsi le premier polyomavirus directement impliqué dans le développement d'un cancer humain agressif⁵⁶.

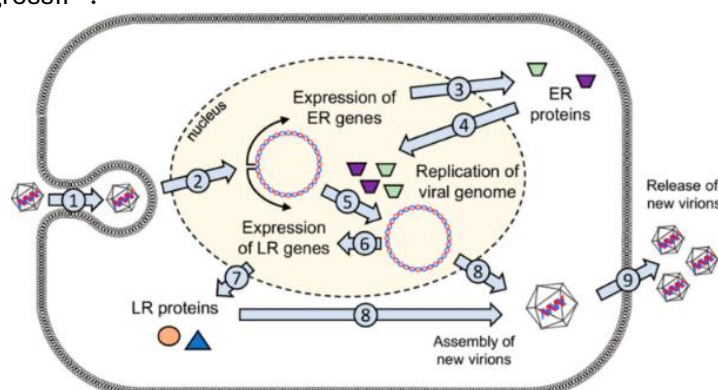


Figure 6 : **Le cycle de vie du MCPyV dans son hôte.** (1) Entrée du virus par endocytose. (2) Translocation nucléaire. (3) Transcription et puis traduction des gènes de la région précoce. (4-5) Réplication du génome viral. (6-7) Transcription et puis traduction des gènes de la région tardive. (8) Assemblage des virions. (9) Libération des virions de la cellule⁵⁷.

L'entrée du virus dans la cellule s'effectue par endocytose médiée par des cavéoles. Son attachement repose sur l'interaction entre VP1, la protéine de capsid du MCPyV, et les glycosaminoglycanes, des glucides sulfatés, présents à la surface des cellules hôtes, tandis que son internalisation nécessite la présence d'acides sialiques^{16,56}. Plus spécifiquement, le virus reconnaît et se lie au niveau du site de liaison à l'acide N-acétylneuraminique¹⁶. À la suite de l'internalisation dans des vésicules, le virus transite par les endosomes avant d'être transporté vers le réticulum endoplasmique, puis vers le noyau⁵⁶.

Avant de commencer à se répliquer, MCPyV, en exploitant des protéines de la cellule hôte, va transcrire et, ensuite, traduire sa région précoce codant pour les antigènes T qui permettent la réplication du génome viral. Ensuite, sur le brin opposé du génome, il y a transcription et traduction de la région tardive codant pour les protéines de structures permettant la production des virions (Figure 6)^{44,57}. Les génomes viraux sont intégrés de manière monoclonale dans les cellules tumorales et présentent des mutations spécifiques à la tumeur que l'on ne retrouve pas chez les individus sains²⁴. Le cycle de vie des polyomavirus ne comprend normalement pas l'intégration de leur génome dans le génome de l'hôte. Cette intégration se produit de manière accidentelle, probablement à la suite d'erreurs lors de la réplication du virus.

Ce virus au génome circulaire va acquérir un génome linéaire défectueux pouvant être présent sous forme de concatémère. Il va s'intégrer au niveau du génome de l'hôte à la suite de cassures doubles brins dans celui-ci²⁴. L'intégration se fait de manière aléatoire, sans site préférentiel au niveau du génome de l'hôte⁵⁸. Deux mécanismes potentiels d'intégration ont été proposés (Figure 7)⁵⁹:

- 1) La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), qui donne lieu à une intégration linéaire²⁴.
- 2) La jonction médiée par microhomologie (MMEJ), c'est un processus plus complexe qui entraîne une amplification des régions de l'hôte adjacentes au site d'insertion, conduisant à une intégration en Z²⁴.

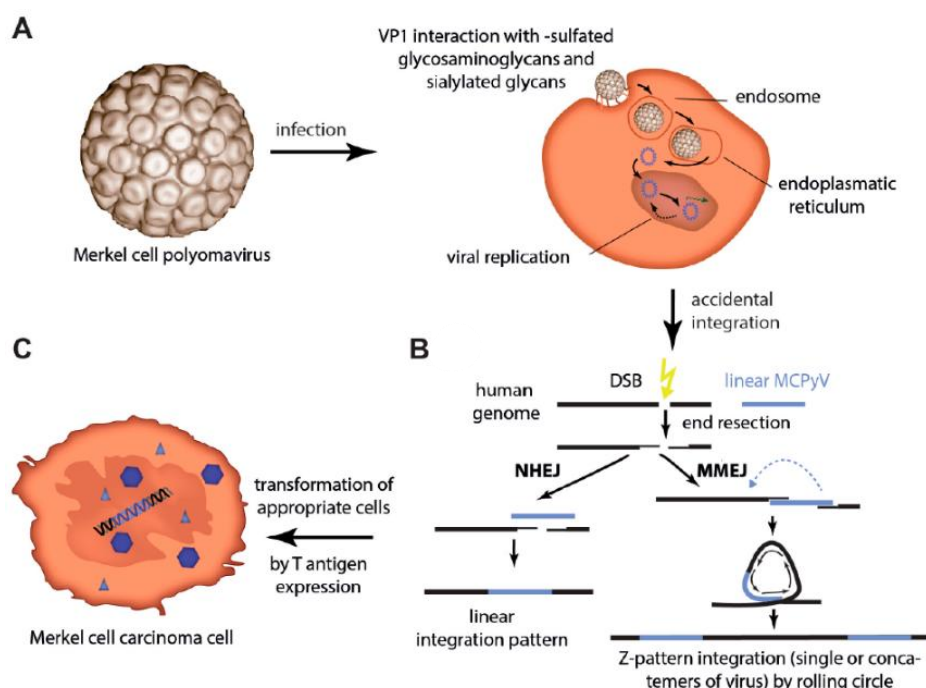


Figure 7 : **Mécanisme d'intégration du MCPyV dans le génome de l'hôte.** (A) Infection de la cellule hôte par le virus. (B) Intégration accidentelle du génome virale dans le génome de l'hôte à la suite de sa réplication. (C) Expression constitutive des oncoprotéines virales donnant lieu à la cancérisation⁵⁹.

Une fois intégré dans le génome de l'hôte, les antigènes T sont exprimés de manière persistante²⁵. En effet, lors d'une infection active, l'intégration du virus donne lieu à une délétion de l'antigène LT, conduisant à l'expression d'un antigène Large T tronqué (LTtrunc) (Figure 4). Cette délétion affecte systématiquement le domaine C-terminal, entraînant la perte de sa capacité à lier l'ADN, de son activité hélicase et des domaines inhibiteurs de la croissance cellulaire, et donc à la perte des domaines responsables de la réplication virale^{23,25}. Cependant, au niveau de son extrémité N-terminale, *via* le motif LxCxE, LTtrunc séquestre de manière constitutive pRb, libérant ainsi le facteur de transcription E2F, stimulant la prolifération cellulaire^{21,51}. pRb est une protéine faisant partie de la famille des protéines de poche qui sont des suppresseurs tumoraux composés de pRb, p107 et p130. L'antigène LT du polyomavirus de Merkel se lie de manière préférentielle à pRb^{23,60}. E2F fait partie d'une famille de facteurs de transcription qui transcrit des gènes essentiels à l'entrée en phase S. En phase G1, pRb recrute des histones désacétylases pour réprimer la transcription de ses gènes. Ensuite, lors de l'entrée en phase S, pRb est phosphorylée par un complexe cycline/CDK, ce qui libère E2F et active la prolifération cellulaire. Au niveau du CCM, la séquestration de pRb par LTtrunc induit donc une prolifération cellulaire incontrôlée, favorisant ainsi la transformation tumorale. Ce mode d'action a également été observé chez d'autres virus, notamment l'antigène grand T de SV40, un autre polyomavirus mais aussi avec l'oncoprotéine E7 de HPV ou encore avec E1A, l'oncoprotéine des adénovirus⁶⁰. L'antigène LT possède donc un rôle critique dans le CCM car la prolifération des cellules cancéreuses est dépendante de son expression et de sa fonction²³. Les sites d'intégration de l'antigène LT varient d'une tumeur à l'autre et l'ouverture de LTtrunc n'est pas systématiquement la même, le nombre de paires de bases perdues diffère également^{14,24}.

1.7 Facteurs de risque

L'immunodépression multiplie par 15 le risque de développer la maladie¹¹. Le virus peut se réactiver suite à la prise d'un traitement immunosuppresseur avant une transplantation d'organe, d'une maladie inflammatoire chronique ou d'une infection par le VIH^{16,27,61,62}. Cette immunodépression entraîne une augmentation du risque d'incidence, de récurrence et de mauvais pronostic pour la maladie¹⁵. Les autres facteurs de risque incluent l'âge, l'exposition aux UV, être de sexe masculin et le fait d'être caucasien⁶³⁻⁶⁶.

1.8 Diagnostic

Le CCM présente quatre stades, allant d'une tumeur localisée à une forme métastatique (Tableau 2).

Tableau 2 : Présentation des différents stades du CCM selon la classification TNM (tumeur-ganglion-métastases)⁶⁷.

	T	N	M
Stade I	Tumeur primaire ≤ 2 cm	Absence de métastases ganglionnaires régionales	Absence de métastases à distance
Stade IIa	Tumeur primaire >2 cm, voire > 5 cm	Absence de métastases ganglionnaires régionales	Absence de métastases à distance
Stade IIb	Tumeur primaire envahissant le fascia, les muscles, le cartilage ou l'os	Absence de métastases ganglionnaires régionales	Absence de métastases à distance
Stade IIIa	Soit absence de tumeur primaire, soit présence de tumeur primaire ≤2 cm ou >2 cm, voire > 5 cm ou présence de tumeur primaire envahissant le fascia, les muscles, le cartilage ou les os	C* : Soit présence de métastases ganglionnaires régionales cliniquement détectées, soit présence de métastases en transit sans ou avec atteintes ganglionnaires P* : Présence de métastases ganglionnaires occultes identifiées soit uniquement par biopsie du ganglion sentinelle, soit après une dissection ganglionnaire, soit détectées cliniquement ou radiologiquement et confirmées pathologiquement.	Absence de métastases à distance

Stade IIIb	Soit absence de tumeur primaire, soit présence de tumeur primaire ≤ 2 cm ou > 2 cm, voire > 5 cm ou présence de tumeur primaire envahissant le fascia, les muscles, le cartilage ou les os	P : Présence de métastases ganglionnaires régionales détectées cliniquement ou radiologiquement et confirmées pathologiquement, soit métastases en transit avec ou sans métastases ganglionnaires	Absence de métastases à distance
Stade IV	Soit absence de tumeur primaire, soit présence de tumeur primaire ≤ 2 cm ou > 2 cm, voir > 5 cm ou présence de tumeur primaire envahissant le fascia, les muscles, le cartilage ou les os	/	Présence de métastases à distance

*c stadification clinique : il y a eu une évaluation clinique et/ou radiologique des métastases. P stadification pathologique : il y a une évaluation pathologique des ganglions lymphatiques régionaux, soit par biopsie du ganglion sentinelle, par lymphadénectomie complète ou par confirmation pathologique de métastases à distance.

La survie à cinq ans est d'environ 60 % pour les tumeurs au stade I, 45 % pour les tumeurs au stade II, 36 % pour les tumeurs au stade III et seulement 14 % pour les tumeurs au stade IV lors du diagnostic^{14,15}. Lors de la première année suivant le diagnostic, il y a un risque de récurrence qui est de 11 % pour le stade I, 33 % pour le stade II, 30 % pour le stade IIIa, 45 % pour le stade IIIb et 58% pour le stade IV⁶⁵. Les tumeurs du CCM présentent un développement rapide et un risque élevé de faire des métastases que ce soit au niveau du bassin ganglionnaire de drainage, ainsi qu'au niveau de sites plus distants chez près d'un tiers des patients¹⁵. C'est une proportion relativement élevée qui dépend du stade du patient mais également de facteurs qui sont indépendants de celui-ci tels que le sexe, l'âge ou encore le statut immunitaire. Le risque de récurrence peut être jusqu'à quatre fois plus élevé en raison de ces facteurs indépendants du stade⁶⁴. De plus, il a été démontré que les patients souffrant de CCM négatif pour le virus présentent un pronostic plus défavorable que ceux atteints de CCM positif pour le virus (Figure 8)⁶¹.

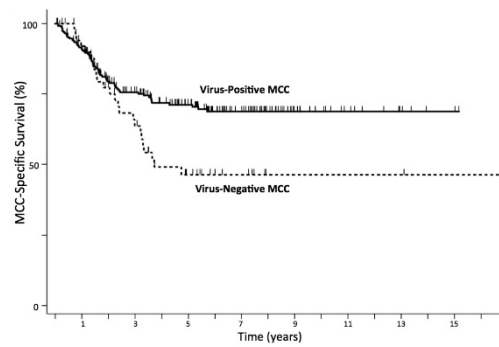


Figure 8 : Courbes de survie de Kaplan-Meier chez des patients atteints de CCM. La survie spécifique au CCM est significativement diminuée ($p=0,015$) pour les patients atteints de tumeurs négatives pour le virus (figure adaptée de Ata S. Moshiri *et al.*, (2017))⁶¹.

Les données cliniques et les caractéristiques microscopiques sont utilisées dans le but de diagnostiquer ce cancer⁶⁹. Un patient atteint de CCM présente généralement au moins trois des critères définis par l'acronyme *AEIOU* : Asymptomatique, Expansion rapide, Immunosuppression, Âge supérieur à 50 ans et Exposition aux rayons ultraviolets¹¹.

Lors de l'examen clinique, la lésion cutanée est inspectée. D'un point de vue morphologique, celle-ci est indolore, ferme et à croissance rapide, avec une teinte allant du rose ou rouge violacé. Elle peut apparaître sous la forme d'un nodule en dôme ou d'une plaque rouge, mesurant le plus souvent entre 1 et 2 cm (Figure 9). De plus, les ganglions lymphatiques lororégionaux sont examinés. Finalement, les comorbidités et l'espérance de vie du patient sont évaluées¹².

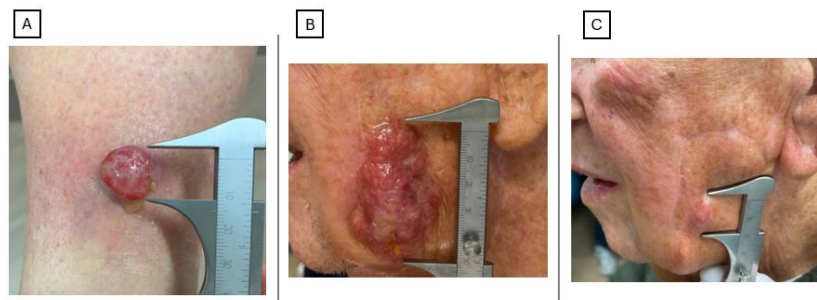


Figure 9 : Aspect du CCM. (A) CCM au niveau d'un membre inférieur. (B-C) CCM au niveau de la joue¹¹.

Les lésions se localisent principalement sur la tête et le cou, mais on les retrouve aussi sur les membres supérieurs, les membres inférieurs, le tronc ou d'autres sites. Dans environ 10 % des cas, le site primaire cutané n'est pas identifiable. La tumeur peut s'étendre à la peau avoisinante et aux ganglions lymphatiques de drainage. Elle peut également migrer vers des sites distants tels que les os, le foie ou encore le cerveau (Figure 10)¹².

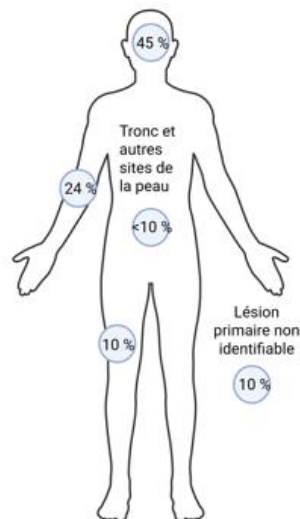


Figure 10 : Les sites de la peau touchés par le CCM. La majorité des lésions sont localisées au niveau de la tête et le cou. Les autres localisations sont les membres supérieurs, les membres inférieurs, le tronc, ... Dans 10 % des cas, le site primaire de la lésion n'est pas identifiable. Figure créée avec Biorender.

Une biopsie est ensuite réalisée afin de déterminer si d'autres structures sont touchées (le fascia, les muscles, le cartilage ou les os), les marges chirurgicales à réaliser, la profondeur de la tumeur, une potentielle invasion lymphovasculaire ou une infiltration lymphocytaire intratumorale. Suite à la biopsie, le profil immunohistochimique doit être évalué, ainsi que la présence du virus MCPyV¹².

D'un point de vue histologique, le CCM présente les caractéristiques d'un carcinome neuroendocrinien à petites cellules (Figure 11)^{1,8}. Il est composé de petites cellules rondes, avec un cytoplasme peu abondant et un noyau vésiculaire, bien que des variants puissent exister. Son taux mitotique est élevé. La tumeur siège généralement dans le derme réticulaire et l'hypoderme, bien qu'elle puisse être retrouvée dans l'épiderme dans 10 % des cas.

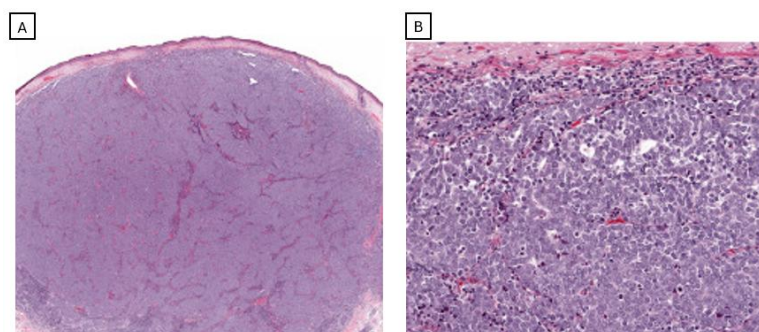


Figure 11 : Morphologie neuroendocrine du CCM en coloration H&E. (A) Grossissement x50. (B) Grossissement x200 (figure adaptée de DeCoste et al., (2022))¹.

Les cellules du CCM expriment plusieurs cytokératines (CK), ainsi que des marqueurs neuroendocriniens tels que la chromogranine A, NSE, la synaptophysine, la protéine 1 d'interaction avec la huntingtine et le cluster de différenciation CD56¹².

Pour différencier le CCM des autres carcinomes neuroendocriniens, et en particulier du cancer du poumon à petites cellules, un marquage ciblant la cytokératine 20 (CK20) ainsi que le facteur de transcription thyroïdien-1 (TTF-1) sont utilisés. Le CCM est généralement positif pour CK20 et négatif pour TTF-1, inversement au cancer du poumon à petites cellules⁷⁰. Cependant, des variants du CCM peuvent se révéler négatifs pour le CK20 ou exprimer TTF-1. En effet, certains CCM sont associés à d'autres cancers, tels que le carcinome épidermoïde, la maladie de Bowen ou le carcinome basocellulaire. Ces CCM combinés présentent des immunophénotypes qui peuvent différer en comparaison avec les CCM purs. De plus, comme mentionné précédemment, dans 10 % des cas, le site primaire cutané peut ne pas être identifié. On peut également retrouver une tumeur isolée au niveau des ganglions lymphatiques. Tous les éléments cités ci-dessus rendent le diagnostic compliqué^{28,69,71}. Des recherches sont en cours pour identifier de nouveaux marqueurs. Une étude menée par Thibault Kervarrec *et al.* (2019) a évalué plusieurs biomarqueurs : CK20, TTF-1, ATOH1, neurofilament (NF), SATB2, PAX5, terminal désoxynucléotidyl transférase, CD99 et la mucine 1. Parmi eux, NF et SATB2 se sont révélés les plus discriminants. NF est un marqueur des cellules neuronales exprimé notamment par les cellules de Merkel. Sa sensibilité est de 75 % et sa spécificité de 98 % pour diagnostiquer le CCM. SATB2 est une protéine associée à la matrice nucléaire, elle joue un rôle dans la différenciation des cellules neuronales et coliques au niveau des tissus extra cutanés et régule l'expression de CK20. Sa spécificité est de 98% pour le diagnostic du CCM, sa sensibilité n'a pas été mentionnée. Un autre outil potentiel de diagnostic est une real-time PCR ciblant l'ADN du MCPyV²⁸. Malheureusement, ces marqueurs sont pertinents pour le CCM positif pour le virus mais pas pour le CCM négatif au virus⁷². En effet plusieurs différences ont été mises en évidence concernant l'immunophénotype de ces deux entités. Le CCM négatif pour le virus exprime souvent TTF-1 et il est généralement négatif pour des marqueurs utilisés pour le CCM tel que le marqueur NF⁷³. Dernièrement, un nouveau marqueur a été mis en évidence, le facteur de transcription 3 de classe 4 qui possède un domaine POU (POU4F3) jouant un rôle dans le développement des cellules de Merkel. Ce marqueur a une sensibilité de 98% et une spécificité de 98,3% pour le diagnostic du CCM. Ce biomarqueur permet également la détection de métastases au niveau des biopsies des ganglions sentinelles⁷². Actuellement, pour détecter la présence de métastases, une biopsie du ganglion sentinelle (SLNB) est réalisée lors de la chirurgie d'une tumeur primaire locale. Dans les localisations difficiles d'accès, une tomographie par émission de positons couplée à la tomodensitométrie est recommandée à la place^{11,12}.

1.9 Traitements

Le traitement du CCM dépend du stade de la maladie et est indépendant de l'étiologie (Figure 12)¹⁵.

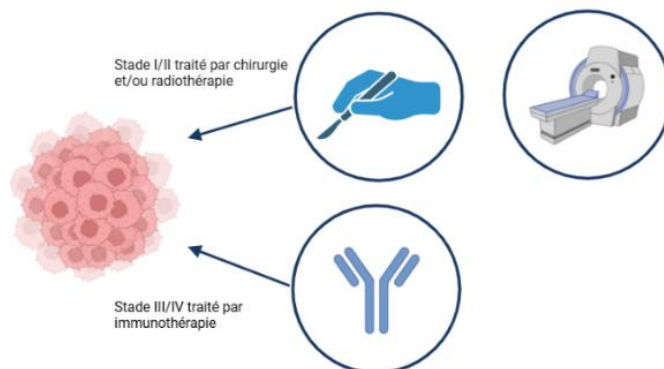


Figure 12 : **Schéma thérapeutique du CCM.** Le CCM présente quatre stades, allant d'une tumeur localisée à une tumeur métastatique. Le traitement de première intention consiste à réaliser une chirurgie. En cas de marges microscopiques positives ou étroites, d'atteinte extracapsulaire et/ou de multiples ganglions lymphatiques régionaux, ainsi qu'en présence d'une invasion lymphovasculaire, la radiothérapie est privilégiée. Enfin, lorsqu'on est en présence d'une tumeur métastatique, le CCM est traité par immunothérapie. Figure créée à l'aide de BioRender.

1.9.1 Chirurgie

Le traitement de première intention, lorsque la tumeur primaire est jugée résécable, est la chirurgie. Celle-ci est suffisante pour l'exérèse d'un petit CCM avec une marge de 1 à 2 cm, à condition d'obtenir des marges saines et en l'absence de facteurs de risque. Avant l'ablation de la tumeur primaire, il est important de réaliser une SLNB afin de détecter l'éventuelle présence de métastases ganglionnaires et d'éviter toute perturbation chirurgicale des voies lymphatiques autour de la tumeur primaire¹⁵.

1.9.2 Radiothérapie

La radiothérapie adjuvante est préconisée lorsque la taille tumorale dépasse 1 cm, que le patient est immunodéprimé, que la tumeur est localisée au niveau de la tête ou du cou, ou encore lors d'une invasion lymphovasculaire. Si obtenir une marge de 1 à 2 cm par chirurgie n'est pas possible, elle peut être réduite à 0,5-1 cm, suivie d'une radiothérapie adjuvante. Il a été démontré que la radiothérapie adjuvante permet de réduire le risque de récurrence locale¹⁵. La dose recommandée est généralement de 50 à 60 Gy, administrée en fractions de 1,8-2 Gy par jour, pendant 4 à 6 semaines^{12,74}. Lorsque la tumeur n'est pas résécable ou que la chirurgie est contre-indiquée, la radiothérapie peut être utilisée dans un but curatif. Le consensus concernant la dose optimale n'est pas encore clairement défini, mais les directives du "National Comprehensive Cancer Network" (NCCN) et les recommandations interdisciplinaires européennes recommandent des doses de 60 à 66 Gy¹².

1.9.3 Immunothérapie

Lorsque le patient présente des comorbidités médicales graves ou une maladie localement avancée, la chirurgie et radiothérapie curatives ne sont pas envisageables. Précédemment la chimiothérapie était proposée comme traitement de première intention pour les CCM avancés, le plus souvent à base de carboplatine et d'étoposide⁷⁵. Les bénéfices de la chimiothérapie étant limités, des recherches se sont récemment portées sur l'immunothérapie qui a montré une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale que la chimiothérapie. L'immunothérapie est donc devenue le traitement de première intention pour les CCM avancés⁷⁶.

Premièrement, **l'avelumab**, un anticorps dirigé contre PD-L1, commercialisé sous le nom de Bavencio, a été le premier médicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 2017 pour les enfants (âgés de 12 ans et plus) et les adultes, suite à l'essai clinique *JAVELIN Merkel 200* (NCT02155647)^{77,78}. Après son approbation, un suivi de patients traités pendant quatre ans a été réalisé pour confirmer les bénéfices du traitement, et il a montré que l'avelumab menait à une amélioration significative de la survie globale à long terme⁷⁵.

Deuxièmement, **le pembrolizumab**, un anticorps se liant à PD-1, a été approuvé par la FDA en décembre 2019 pour les patients adultes et pédiatriques atteints de CCM récidivant localement avancé ou métastatique^{76,79}. Cette décision a été prise suite à l'essai clinique multicentrique, non randomisé, *KEYNOTE-017* (NCT02267603)^{80,81}.

Troisièmement, **le retifanlimab-dlwr**, un anticorps ciblant PD-1 vendu sous la marque Zynyc, a été approuvé par la FDA en mars 2023 pour les patients atteints de CCM localement avancé récidivant ou métastatique⁸². Ce médicament a été approuvé suite à l'essai clinique *POD1UM-201* (NCT03599713), qui a évalué son efficacité et sa sécurité chez des patients atteints de CCM avancés/métastatiques, réfractaires ou naïfs à la chimiothérapie⁸³.

Finalement, il existe **le nivolumab**, un anticorps ciblant PD-1. Il n'a pas encore été approuvé par la FDA, mais son efficacité a été démontrée dans l'essai clinique *CheckMate 358* (NCT02488759). Le nivolumab a été administré pendant 4 semaines avant de pratiquer une chirurgie, cela a permis d'induire une réponse pathologique complète et des régressions tumorales radiographiques ($\geq 30\%$) chez environ la moitié des patients⁸⁴.

Le carcinome de Merkel présente un taux de réponse élevé à l'immunothérapie²⁷. En effet, il a été démontré qu'il possède le deuxième taux de réponse objectif le plus élevé parmi 27 types de cancers traités par des inhibiteurs de PD-1 ou de PD-L1⁸⁵.

2. But du projet

Le carcinome à cellules de Merkel est un cancer neuroendocrinien rare et agressif, dont le traitement varie en fonction du stade de la maladie. L'étiologie n'est actuellement pas prise en compte dans le choix du traitement, alors que le pronostic varie selon le statut viral du carcinome à cellules de Merkel (positif ou négatif pour le polyomavirus).

L'objectif de ce projet est de déterminer s'il existe une différence de sensibilité à la radiothérapie en fonction de l'étiologie du cancer. Si cela s'avère exact, il pourrait être intéressant d'adapter le traitement en fonction du statut viral des patients.

Afin de répondre à cette question, les marqueurs de radiosensibilité γ -H₂AX et Rad51 ont été analysés par immunohistochimie (IHC) sur des échantillons de carcinome de Merkel, stratifiés en fonction de leur statut viral.

Ensuite, afin d'évaluer une éventuelle différence de radiosensibilité entre les deux étiologies, des lignées cellulaires de CCM positives et négatives pour le polyomavirus ont été irradiées et leur degré de réponse à ce traitement a été déterminé par tests clonogéniques.

Finalement, afin de créer des modèles cellulaires isogéniques, des cellules HaCaT, une lignée de kératinocytes immortalisés, ont été transduites avec les oncoprotéines virales (Large T, Large T tronqué, Small T ou 57 kT). Ceci fut réalisé dans le but de déterminer si une ou plusieurs oncoprotéines joue un rôle dans la différence de radiosensibilité que peuvent présenter les patients.

3. Matériel et méthodes

3.1 Immunohistochimie

3.1.1 Immunohistochimie sur coupes tissulaires

Les analyses ont été réalisées sur 29 échantillons humains de carcinome de Merkel, anonymisés, inclus en paraffine obtenus *via* la biobanque de tissus du CHU de Liège. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Liège (2018/295). Tous les échantillons étaient des biopsies obtenues avant traitement.

Des immunohistochimies ont été réalisées afin de mettre en évidence les protéines d'intérêt sur des coupes tissulaires (Figure 13). Les lames ont été préalablement incubées, overnight (O.N.), dans une étuve à 60°C afin de faciliter le déparaffinage.

Elles ont ensuite été déparaffinées dans 2 bains de xylène 100 % de 5 minutes chacun, puis progressivement réhydratées dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (100 %, 95 % et 70 %) pendant respectivement 2 fois 2 minutes, 1 fois 2 minutes et 1 fois 1 minute puis dans 2 bains contenant de l'eau distillée. L'activité des peroxydases endogènes a été bloquée dans une solution de H₂O₂ (Sigma-Aldrich, #216763) diluée à 4,5 % dans un bain de méthanol durant 5 minutes. Cette étape est nécessaire car l'anticorps secondaire utilisé est couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase).

Une étape de démasquage des sites antigéniques par la chaleur a été menée. Selon l'anticorps primaire utilisé, cette étape a été réalisée soit dans un four à micro-ondes, soit dans une marmite à pression en incubant les lames dans une solution de citrate pH6, d'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) pH9 ou d'une solution de citrate à laquelle a été ajouté un surfactant (Tableau 3). Ensuite, les lames ont été laissées à refroidir durant 20 minutes.

Afin de limiter les signaux non spécifiques, une solution bloquante (Cell Signaling Technology, Animal-Free Blocking Solution, #15019L) a été appliquée durant 20 minutes.

En fonction de l'anticorps primaire utilisé, la coupe est incubée durant 1h à température ambiante (RT) ou O.N. à 4° (Tableau 3). La dilution de l'anticorps a été réalisée dans du Real Antibody Diluent (Dako, #s2022). Les anticorps secondaires utilisés (anti-souris ou anti-lapin) sont couplés à un polymère de dextran qui est lié à de nombreuses HRP, une enzyme qui catalyse l'oxydation du DAB (3',3'-diaminobenzidine) (Cell Signaling Technology, #8059S) en présence de H₂O₂. En raison des multiples HRP, le signal est amplifié, augmentant ainsi la sensibilité de la détection. Après 30 min d'incubation, la révélation à la DAB prend environ 10 minutes et forme un précipité brun. Enfin, les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline (Sigma-Aldrich, #GHS132-1L).

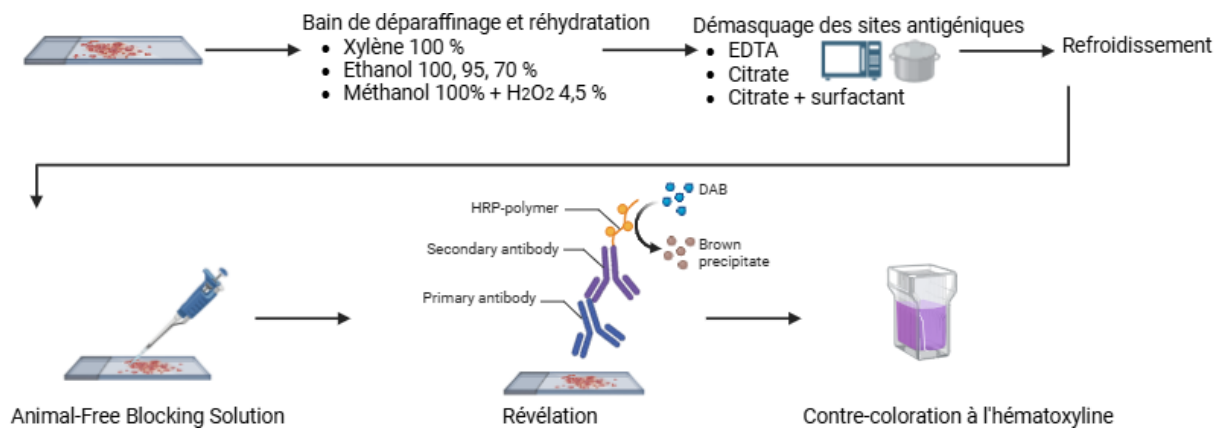


Figure 13 : Représentation schématique d'une immunohistochimie. Figure réalisée avec Biorender.

Tableau 3 : Mode de démasquage et de détection des protéines d'intérêt analysées au cours de ce mémoire

	Démasquage		Détection	
	Appareil	Tampon	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Rb	Micro-onde 23 minutes 500 Watt	Citrate pH6 (VWR, #21G274109)	Rb (4H1) Mouse mAb, #9309 Cell signaling Technology 1/500 - 1h	Dako, EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti- mouse, #K4001
Antigène Large T (CM2B4)			MCPyV large T- antigen (CM2B4) sc-136172 Santa Cruz Biotechnology 1/100 - O.N.	
y-H ₂ AX		Target Retrieval Solution 10x Concentrate (citrate + surfactant), pH6 (Dako, #S1699)	Phospho-Histone H₂A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb, #9718 Cell signaling Technology 1/75 - 1h	Dako, EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti- rabbit, #K4003
Rad51	Marmite à pression 11 minutes 120°	EDTA, pH9 (Invitrogen, #00- 4956-58)	Rad51 Rabbit Monoclonat Ab - ab133534 Abcam 1/2000 - 1h	
Antigène Large T (Ab3)			Anti-MCPyV_gp3 large T antigen antibody (Ab3) - ab202866 Abcam 1/200 - O.N.	Dako, EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti- mouse, #K4001

3.1.2 Quantification

Avant d'être quantifiées, les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner Pannoramic 250 (SYSMEX, 3Dhistech). Les quantifications ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel QuPath-0.5.1 qui a permis de déterminer le nombre de cellules cancéreuses positives par millimètre carré dans la zone tumorale pour les cas positifs et négatifs pour le virus. Cette quantification a été réalisée pour les marquages γ -H₂AX et Rad51. Le seuil de positivité a été déterminé en fonction de la densité optique de la DAB, celle de γ -H₂AX étant de 0,12 et celle de Rad51 étant de 0,24 (Figure 14).

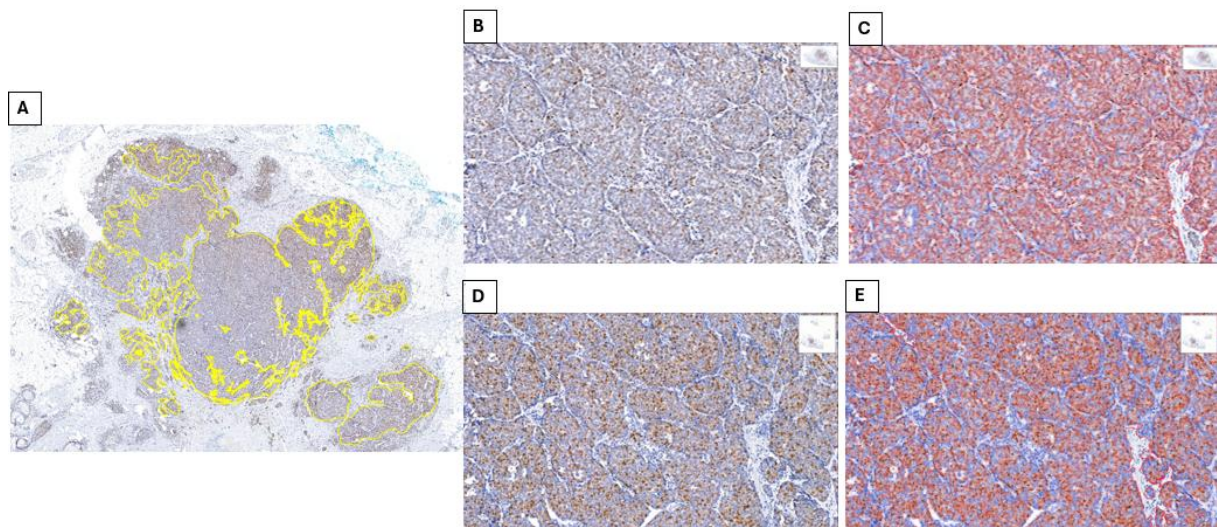


Figure 14 : **Représentation du seuil de positivité détecté par QuPath.** (A) Zone tumorale délimitée sur QuPath pour la quantification. (B) Immunoréactivité ciblant la protéine γ -H₂AX. (C) Masque de détection appliqué avec le seuil de positivité à la DAB de 0,12. (D) Immunoréactivité ciblant la protéine Rad51. (E) Masque de détection appliqué avec le seuil de positivité à la DAB de 0,24.

3.1.3 Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.3.0 pour les marquages γ -H₂AX et Rad51. Les tests de normalité choisis sont les tests d'Anderson-Darling, d'Agonisto-Pearson, de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov. À la suite du résultat, un test non-paramétrique, le test Mann-Whitney, a été utilisé pour comparer les cas positifs et négatifs pour le virus pour ces deux marquages.

3.2 Culture cellulaire

3.2.1 Lignées cellulaires

Six lignées cellulaires de carcinome de Merkel ont été utilisées pour ce mémoire : cinq lignées positives pour le polyomavirus de Merkel (PETA, WAGA, MS-1, MKL-1 et MKL-2) et une lignée négative (MCC13). Ces lignées cellulaires proviennent de l'Université de Tours (Professeur Antoine Touzé).

Ces lignées de CCM ont été cultivées dans un milieu RPMI medium 1640 1x (GIBCO, #21875-034) supplémenté avec 10 % de Fetal Bovine Serum (LONZA, #DE14-801F), 1 % de Sodium Pyruvate 100x (100mM) (GIBCO, #11360-070), 1 % d'acides aminés non essentiels 100x (MEM NEAA, GIBCO, #11140-035), 1 % de pénicilline streptomycine (GIBCO, #15140-122) et 1 % d'amphotéricine B (250 µg/ml) (GIBCO, #15290-026).

Des modèles cellulaires isogéniques provenant de kératinocytes immortalisés (HaCaT) ont également été utilisés, chacun ayant été transduit avec un lentivirus afin d'exprimer un antigène du polyomavirus du Merkel (MCPyV) soit Large T (LT), soit Large T tronqué (LTtrunc), soit Small T (ST) ou 57 kT. Deux lignées contrôle ont également été utilisées, une lignée HaCaT contenant un lentivirus exprimant la luciférase (Luc) et une lignée HaCaT wild-type (WT).

Ces lignées HaCaT ont été cultivées dans du milieu DMEM 1x (GIBCO, #41965-039) supplémenté avec 10 % de Fetal Bovine Serum, 1% de Sodium Pyruvate 100x (100mM), 1 % d'acides aminés non essentiels 100x, 1 % de pénicilline streptomycine et 1 % d'amphotéricine B (250 µg/ml).

3.2.2 Vérification de la transduction

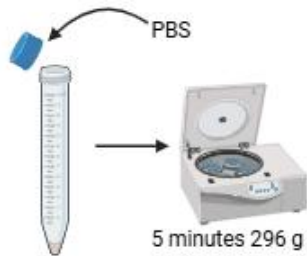
3.2.2.1 Extraction d'ARN

L'extraction a été réalisée à l'aide du kit « Nucleospin® RNA » (Macherey-Nagel, Allemagne) (Figure 15) sur un culot cellulaire sec. Pour obtenir ce culot, les cellules sont détachées de leur boîte de culture par 3 ml de trypsine-EDTA (Gibco, #25200-056). Ensuite la trypsine est « inhibée » par l'ajout de 7 ml de milieu contenant du sérum, le tout est centrifugé 5 minutes à 289 g. Le surnageant est ensuite aspiré et le culot résultant de la centrifugation est conservé à – 20 °C.

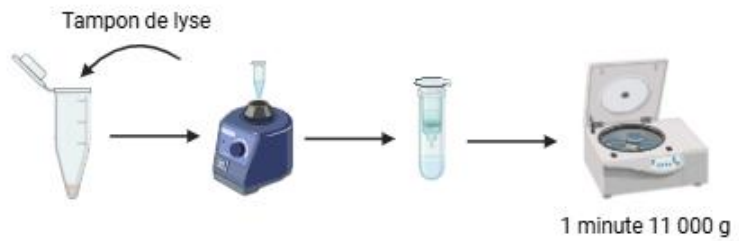
Avant de démarrer l'extraction, le culot cellulaire est lavé. Pour cela, il est resuspendu dans 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) constitué de NaCl (7 g/L), Na₂HPO₄ (1,48 g/L) et NaH₂PO₄ (0,43 g/L), ensuite, il est centrifugé pendant 5 minutes à 289 g avant de retirer le surnageant.

La lyse a été réalisée en ajoutant 350 µl du tampon de lyse par échantillon, ce tampon contenant principalement du thiocyanate de guanidinium, un agent chaotrope, et 1% de β - mercaptoéthanol, un agent réducteur. Ensuite les échantillons sont agités vigoureusement au vortex avant d'être transférés sur des colonnes purificatrices afin d'éliminer les débris cellulaires et réduire la viscosité *via* une centrifugation d'une minute à 11 000 g. L'éluat récupéré est additionné de 350 µl d'éthanol à 70 % et cette solution est transférée sur une colonne avant d'être centrifugée 30 secondes à 11 000 g.

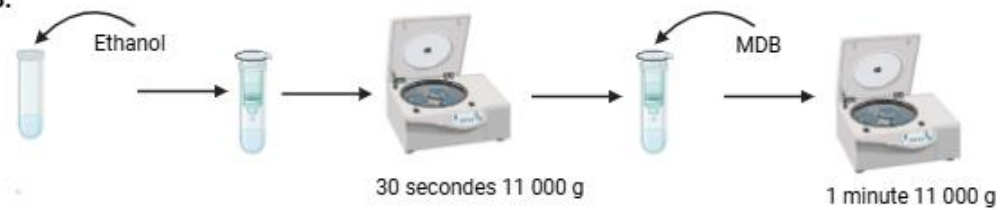
1. Lavage



2. Lyse



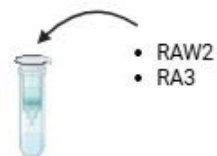
3.



4. Digestion de l'ADN



5. Lavage



6. Elution



Figure 15 : Représentation schématique de l'extraction d'ARN à l'aide du kit « Nucleospin® RNA » (Macherey-Nagel, Allemagne). Figure créée à l'aide de Biorender.

Une fois la centrifugation terminée, 350 µl de MDB (Membrane Desalting Buffer) est ajouté pour éliminer le sel et rendre l'étape suivante, la digestion de l'ADN, plus efficace. Ensuite, une autre centrifugation d'une minute à 11 000 g est lancée. L'étape suivante est une étape de digestion où les échantillons sont incubés, pendant 15 minutes à RT dans une solution de DNase.

Les échantillons subissent ensuite plusieurs étapes de lavage. Dans un premier temps, dans un tampon RAW2 qui contient du thiocyanate de guanidine et de l'éthanol et dans un deuxième temps dans du tampon RA3 contenant de l'éthanol. Finalement, l'ARN est élué dans 40 µl d'eau RNase free.

3.2.2.2 Dosage

La concentration d'ARN, en ng/µl, est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre (Isogen Lifescience, NanoDrop®).

Cet appareil permet également de fournir le rapport d'absorbance à 260/280 qui indique la présence de contaminants protéiques (si le rapport n'est pas supérieur à 2).

Il indique également le rapport d'absorbance à 260/230 nous indiquant la présence de contaminants résiduels issus du protocole d'extraction, si le rapport n'est pas compris entre 2 et 2,2.

3.2.2.3 Rétro-transcription

Afin de convertir l'ARN en ADNc pour réaliser une PCR, une rétrotranscription a été réalisée. Suite au dosage, la quantité d'ARN requise a été calculée pour obtenir 1 µg dilué dans de l'eau RNase free pour un volume final de 16 µl. Ensuite, 4 µl de l'enzyme FastGene Scriptase II (Nippon Genetics Europe) a été ajoutée à la solution. Le tout est incubé dans un bloc chauffant pendant :

- Hybridation des amorces : 10 minutes à 25 °C
- Synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN : 60 minutes à 42 °C.
- Inactivation de l'enzyme : 5 minutes à 85 °C.

3.2.2.4 PCR

La PCR est réalisée à partir du 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne) qui est une solution prête à l'emploi contenant tous les réactifs requis pour une PCR, excepté les amorces et l'eau.

Ce mix est composé de : une *ADN polymérase - 5x Reaction Buffer B* qui est un tampon contenant du 0,4 M Tris-HCl, 0,1 M (NH₄)₂SO₄ et 0,1 % w/v Tween-20 - 12,5 mM de MgCl₂ - 1 mM de chaque dNTPs - du *colorant bleu* qui a un front de migration équivalent à un fragment d'ADN de 3,5-4,5 Kb - un *colorant jaune* qui a un front de migration équivalent à un fragment d'ADN de 35-45 pb et de *composants qui augmentent la densité de l'échantillon* pour pouvoir le charger directement sur gel.

La PCR est réalisée dans des tubes à PCR (VWR #20170-010) auxquels sont ajoutés 4 µl de 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load, 1,2 µl d'amorces diluées 10x (Tableau 4), de l'eau et l'ADN à amplifier afin d'avoir une solution finale de 20 µl.

Ensuite, l'ADN est amplifié dans un thermocycleur (Westburg) où se déroule 35 cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation :

- Activation de l'enzyme Taq polymérase : 15 minutes à 95 °C.
- Dénaturation : 30 secondes à 95 °C.
- Hybridation : 30 secondes entre 58 et 62 °C en fonction du couple d'amorces.
- Elongation : 45 secondes à 72 °C.

Tableau 4 : Séquences des couples d'amorces utilisés en PCR

Amorces	Séquences (5' à 3')	
GADPH	Sens	ACC AGG TGG TCT CCT CTG AC
	Anti-sens	TGC TGT AGC CAA ATT CGT TG
Large T/Large T tronqué/57 kT/Small T	Sens	GCA ACA TCC CTC TGA TGA AAG C
	Anti-sens	TTG CTC CAA AGG GTG TTC AAT
Large T/57kT	Sens	TAG AAA ATG TAG AAG CTG GTC AGG A
	Anti-sens	AGT ACC AGA ATC TTG GGT TTC TTC A
Small T	Sens	ATT TTG CAG AGG TCC TGG GTG
	Anti-sens	TTA GAC TAC AAT GCT GGC GAG AC

En raison des séquences chevauchantes, il est trop compliqué, voire impossible de réaliser des amorces spécifiques pour les antigènes LT, LTtrunc, 57 kT et ST. Ci-dessous, voici les séquences de nucléotides représentées :

- En mauve : la séquence commune à tous les antigènes.
- En vert : la séquence commune uniquement aux antigènes LT, LTtrunc et 57 kT.
- En orange : la séquence commune uniquement aux antigènes LT et 57 kT.

Large T (complet)

ATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAGAAAGAGAGGCTCTCTGCAAGCTTTTAGAGATTGCTCCTAATTGTTATGGCAACATCC
CTCTGATGAAAGCTGCTTTCAAAGAAGCTGCTTAAAGCATCACCTGATAAAGGGGGAAATCCTGTTATAATGATGGAATT
GAACACCCCTTTGGAGCAAATTCAGCAAATATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCTCTATGTTTGATGAGGTTGACGAGGC
CCCTATATATGGGACCACTAAATCAAGAATGGTGGAGATCAGGAGGATTGAGCTTCGGAAGGCATACGAATATGGGC
CCAATCCACACGGGACCAACTCAAGATCCAGAAAGCCTTCTCCAATGCATCCAGGGGAGCCCCAGTGGAAGCTCA
CCACCCACAGCCAGAGCTTCTCTGGGTATGGTCCTTCTCAGCGTCCCAGGCTTCAGACTCCAGTCCAGAGGA
CCCGATATACCTCCCGAACACCATGAGGAACCCACCTCATCTCTGGATCCAGTAGCAGAGAGGAGACCACCAATTCA
GGAAGAGAATCCAGCACACCCAATGGAACCAAGTGATACCTAGAAATTCTTCCAGAACTGATGGCACCTGGGAGGATCTCT
TCTGCGATGAATCACTTTCTCCCTGAGCCTCCCTCGTCTCTGAGGAGCCTGAGGAGCCCCCTCTCAAGAAGCT
CGCCCCGGCAGCCCCGCTTCTCTGCGGAGGAGGCCTCGTCATCTCAGTTTACAGATGAGGAATACAGATCCTCCT
CCTTACCACCCCCGAAGACCCCTCTCCATTCTCAAGAAAGCGAAAATTTGGGGGGTCCCGAAGCTCTGCAAGCTCTG
CTAGTTCAGCAAGTTTTACAAGCACTCCACCAAAGCCAAAAAGAACAGAGAAACTCCTGTTCTACTGATTTTCTATTGA
TCTTTCTGATTATCTAGCCATGCTGTATATAGTAATAAACAGTAAGTTGTTTGGCATTATACTACTTCTGATAAAGCTATAGA
GTTATATGATAAGATTGAGAAATTTAAAGTTGATTTTAAAGCAGGCATGCCTGTGAATTAGGATGATTTTATTGTTTATACTTT
ATCAAAGCATAGAGTATCTGCTATTAAGAATTTTGTCTACCTTCTGCACTATAAGCTTTTAAATTTGTAAGGAGTGAATAAG
ATGCCTGAAATGTATAATAATTTATGCAAGCCCCCTTACAAATTACTGCAAGAGAATAAGCCACTGCTCAATTATGAATTTCA
AGAAAAAGAAAAAGAGGCCAGCTGTAATTGGAATTTAGTTGCTGAATTTGCTTGTGAATATGAGCTAGACGACCCTTTATTA
TCTAGCCCATATCTAGACTTTGCAAAACATTTCTTGGCCAAAAGTGTAAGAACAGATCTCGCCTCAAACCTCACAAAGG
CTCATGAGGCTCATCATTCTAATGCTAAGCTATTTTATGAATCTAAATCTCAGAAAACCATTTGCCAACAGCCGCAGACAC
TGTTCTAGCCAAAAGGAGGTTAGAGATGCTGGAATGACCAGGACAGAAATGCTATGTAAGAAGTTAAGAAGCACCTAGA
GAGATTAAGAGATTAGATACAATAGATCTACTGTATTATATGGTGGTGTGGCCTGGTACTGCTGCTTATTGAAGAGTTTGA
AAGAAGCTGCAGAAAATTTCAATTATTAACAGAGAATATACCTAAGTATAGAAACATTTGTTTAAAGGGCCTATTAAACAG
TGGAAAAACAAGCTTTGCTGCAGCCTTAATAGATTTGCTAGAAGGGAAGGCCTTGAATATAAACTGTCCATCTGATAAACTA
CCTTTTGAAGTATGATGTCTTTGGATAAATTTATGGTTGTTTTGAGGATGTGAAGGGGCAAAATAGCCTAAATAAAGATCTG
CAACCAGGGCAAGGAATAATAACCTTGATAACTTAAGAGATCATCTAGATGGTGTGTAGCTGTAACTTAGAGAAGAAG
CATGTGAATAAAAAGCATCAGATTTTCTCCTTGATTGTTACTGCTAATGATTATTTATCCCAAACATTAATAGCAAGATT
TAGTTACTTTACACTTTTCCCAAAGGCAATCTAAGAGATTCCCTGGATCAGAACATGGAATAAGAAAAAGAAAGAAATTC
TTCAAAGTGGAAACCACTTTATTGCTTTGTCTTATTGCTGCTTGCCTGATACAACCTTTAAGCCTTGCTTACAAGAAGAAATTA
AAAAGTGGAAAGCAAATTTTACAGAGTGAAATATCATATGTTAAATTTGTCAAATGATAGAAAATGTAGAAGCTGGTCAGGAC
CCTCTGCTCAATATTCTTATTGAGGAAGAGGGCCCTGAGGAACTGAAGAAACCCAAGATTCTGGTACTTTTTCTCAATAA

Large T (tronqué 292aa)

ATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAGAAAGAGAGGCTCTCTGCAAGCTTTTAGAGATTGCTCCTAATTGTTATGGCAACATCC
CTCTGATGAAAGCTGCTTTCAAAGAAGCTGCTTAAAGCATCACCTGATAAAGGGGGAAATCCTGTTATAATGATGGAATT
GAACACCCCTTTGGAGCAAATTCAGCAAATATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCTCTATGTTTGATGAGGTTGACGAGGC
CCCTATATATGGGACCACTAAATCAAGAATGGTGGAGATCAGGAGGATTGAGCTTCGGAAGGCATACGAATATGGGC
CCAATCCACACGGGACCAACTCAAGATCCAGAAAGCCTTCTCCAATGCATCCAGGGGAGCCCCAGTGGAAGCTCA
CCACCCACAGCCAGAGCTTCTCTGGGTATGGTCTTCTCAGCGTCCCAGGCTTCAGACTCCAGTCCAGAGGA
CCCGATATACCTCCCGAACCATGAGGAACCCACCTCATCTCTGGATCCAGTAGCAGAGAGGAGACCACCAATTCA
GGAAGAGAATCCAGCACACCCAATGGAACCAAGTGATACCTAGAAATTCTTCCAGAACTGATGGCACCTGGGAGGATCTCT
TCTGCGATGAATCACTTTCTCCCTGAGCCTCCCTCGTCTCTGAGGAGCCTGAGGAGCCCCCTCTCAAGAAGCT
CGCCCCGGCAGCCCCGCTTCTCTGCGGAGGAGGCCTCGTCATCTCAGTTTACAGATGAGGAATACAGATCCTCCT
CCTTACCACCCCCGAAGACCCCTCTCCATTCTCAAGAAAGCGAAAATTTGGGGGGTCCCGAAGCTCTGCAAGCTCTG
CTAGTTGA

Small T

ATGGATTTAGTCCTAAATAGGAAAGAAAGAGAGGCTCTCTGCAAGCTTTTAGAGATTGCTCCTAATTGTTATGGCAACATCC
CTCTGATGAAAGCTGCTTTCAAAGAAGCTGCTTAAAGCATCACCTGATAAAGGGGGAAATCCTGTTATAATGATGGAATT
GAACACCCCTTTGGAGCAAATTCAGCAAATATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCTCTATGTTTGATGAGGTCAGTACAAA
ATTTCTTGGGAAGAATATGGAACCTTAAAGGATTATATGCAAAGTGGATATAATGCTAGATTTTGCAGAGGTCCTGGGTGCA
TGCTTAAGCAACTTAGAGATTCTAAGTGCGCTTGATTAGCTGTAAGTTGTCTCGCCAGCATTGTAGTCTAAAACTTTAAAG
CAAAAAAAGTGTCTGACGTGGGGAGAGTGTTTTGCTATCAGTGCTTTATTCTTTGGTTTGGATTCTCTCTACTTGGGAAAG
TTTTGACTGGTGGCAAAAACTTTAGAAGAACTGACTACTGCTTACTGCATCTGCACCTTTTCTAG

57kT

ATGGATTAGTCTAAATAGGAAAGAAAGAGAGGCTCTCTGCAAGCTTTAGAGATTGCTCTAATTGTTATGGCAACATCC
 CTCTGATGAAAGCTGCTTTCAAAGAAGCTGCTTAAAGCATCACCTGATAAAGGGGAAATCCTGTTATAATGATGGAATT
 GAACACCCCTTTGGAGCAAATCCAGCAAAATATCCACAAGCTCAGAAGTGACTTCTCTATGTTTGATGAGGTTGACGAGGC
 CCCTATATATGGGACCACTAAATCAAAGAATGGTGGAGATCAGGAGGATTGAGCTTCGGGAAGGCATACGAATATGGGC
 CCAATCCACACGGGACCAACTCAAGATCCAGAAAGCCTTCCTCCAATGCATCCAGGGGAGCCCCCAGTGGAAGCTCA
 CCACCCACAGCCAGAGCTCTTCTCTGGGTATGGGTCTTCTCAGCGTCCCAGGCTTCAGACTCCAGTCCAGAGGA
 CCCGATATACCTCCCGAACACCATGAGGAACCCACCTCATCTCTGGATCCAGTAGCAGAGAGGAGACCACCAATTCA
 GGAAGAGAATCCAGCACACCCAATGGAACCAAGTGTACCTAGAAATTCCTCCAGAACTGATGGCACCTGGGAGGATCTCT
 TCTGCGATGAATCACTTTCCTCCCCTGAGCCTCCCTCGTCTCTGAGGAGCCTGAGGAGCCCCCTCCTCAAGAAGCT
 CGCCCCGGCAGCCCCCGTCTTCTCTGCGGAGGAGGCTCGTCATCTCAGTTTACAGATGAGGAATACAGATCCTCCT
 CCTTCAACACCCCGAAGACCCCTCCTCCATTCTCAAGAAAGCGAAAATTGGGGGGTCCCGAAGCTCTGCAAGCTCTG
 CTAGTTGAGCAAGTTTACAAGCACTCCACCAAGCCAAAAAAGAACAGAGAACTCCTGTTCTACTGATTTTCTATTGA
 TCTTTCTGATTATCTTAGCCATGCTGTATATAGTAATAAAACAAATCTAAGAGATTCCCTGGATCAGAACATGGAATAAGAAA
 AAGAAGAATTCTCAAAGTGGAACCACTTATTGCTTTGTCTTATTGGTGCTTGCTGATACAACCTTTAAGCCTTGCTTACA
 AGAAGAAATTAATAAACTGGAAGCAAATTTACAGAGTGAAATATCATATGGTAAATTTGTCAAATGATAGAAAATGTAGAAGC
 TGGTCAGGACCCCTCTGCTCAATATTCTTATTGAGGAAGAGGGCCCTGAGGAACTGAAGAAACCAAGATTCTGGTACTTT
 TTCTCAATAA

Tableau 5 : Tableau résumant les séquences positives aux différents couples d'amorces utilisés dans ce mémoire

Couple d'amorce ciblant	LT	LTtrunc	ST	57 kT
LT, LTtrunc, ST, 57 kT	+	+	+	+
LT et 57 kT	+	-	-	+
ST	-	-	+	-

Les couples d'amorces permettent de confirmer la présence de l'antigène d'intérêt dans les lignées HaCaT transduites par un lentivirus contenant un antigène du MCPyV (Tableau 5).

Les résultats sont présentés sous la forme d'un gel d'agarose à 2% (Roche, #11388991001), dissous dans du Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 1x (Sigma-Aldrich). Une fois l'agarose dissous et refroidi, du bromure d'éthidium est rajouté. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific, #SM0371). La révélation se fait *via* l'appareil Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.2.3.5 Extraction protéique

L'extraction protéique se fait sur des culots secs. Avant de démarrer l'extraction, le culot cellulaire est lavé. Pour cela, il est resuspendu dans 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) constitué de NaCl (7 g/L), Na₂HPO₄ (1,48 g/L) et NaH₂PO₄ (0,43 g/L), ensuite, il est centrifugé pendant 5 minutes à 289 g avant de retirer le surnageant.

Ensuite, en fonction de la taille du culot, 100 ou 200 µl de tampon de « RadiolImmunoPrecipitation Assay » (RIPA), un tampon de lyse a été ajouté. Ce tampon est composé de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4-8), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, 1 mM), NP-40 ou Triton X-100 (1 %), l'acide désoxycholique de sodium (1 %) et SDS (0,1 %). De plus, un inhibiteur de protéase (Roche, #11836153001) est ajouté à ce tampon. L'échantillon est, ensuite, placé sur glace pendant 30 minutes tout en agitant au vortex toutes les 5 minutes.

Enfin, une centrifugation est réalisée à 4 °C pendant 15 minutes à 13 000 g avant de collecter le surnageant contenant les protéines (Figure 16).

3.2.3.6 Dosage

Afin de doser les protéines, le kit utilisé est le « microBCA™ protein assay kit » (Thermo Scientific, #23235). Il permet de réaliser une courbe standard en réalisant une dilution sériée d'une solution d'albumine (BSA) de 2 mg/ml. Le diluant utilisé est du PBS 1x (Tableau 6).

Tableau 6 : Dilution de la courbe standard pour le dosage protéique

	Concentration en µg/mg de BSA	Volume de solution à prélever en µl	Volume de PBS 1x
A	200	50 µl de BSA standard	450 µl
B	100	250 µl de solution A	250 µl
C	50	250 µl de solution B	250 µl
D	25	250 µl de solution C	250 µl
E	12,5	250 µl de solution D	250 µl
F	6,25	250 µl de solution E	250 µl
G	3,125	250 µl de solution F	250 µl
H	1,5625	250 µl de solution G	250 µl

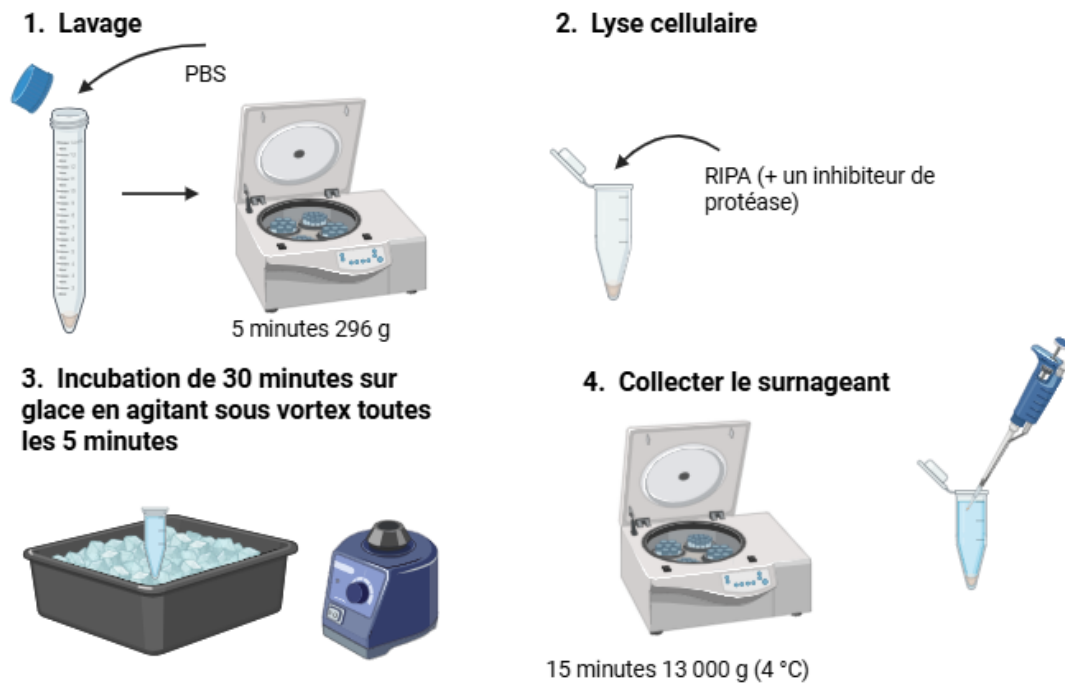


Figure 16 : Représentation schématique de l'extraction protéique. Figure réalisée à l'aide de Biorender.

Cette courbe permet d'extrapoler la concentration protéique à doser. Les protéines sont diluées 50x avec du PBS 1x. Ensuite, 100 µl de protéines sont déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits (les analyses sont réalisées en duplicat). Puis, à partir du kit « microBCA™ protein assay kit », 100 µl d'une solution ABC sont ajoutés dans chaque puits (50 % de la solution A, 48 % de la solution B et 2 % de la solution C). Enfin, la plaque est incubée pendant 1 heure à 37 °C, puis l'absorbance est mesurée à l'aide du spectrophotomètre « Multiskan™ FC Microplate Photometer » (ThermoFisher Scientific, #51119000) à une longueur d'onde de 562 nm. Ce kit permet un dosage colorimétrique des protéines et repose sur deux réactions chimiques. Dans un premier temps, il y a la réduction des ions Cu²⁺ en ion monovalent Cu⁺ des liaisons peptidiques des protéines en milieu alcalin. Ensuite, les ions Cu⁺ réagissent avec deux molécules de BCA (acide bicinchoninique) pour former un complexe coloré bleu clair à violet. L'intensité de la couleur est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques impliquées dans la réaction. La couleur peut être mesurée à n'importe quelle longueur d'onde entre 550 et 570 nm mais possède une absorbance maximale à 562 nm.

3.2.3.7 Western blot

Afin de détecter les protéines d'intérêt, des expériences de Western blot ont été réalisées.

- 1) **Dénaturation des protéines** : une solution contenant 30 µg de protéines, 3,75 µl de « LDS Sample Buffer (4X) NuPAGE » (Invitrogen #NP0007), 1,5 µl de « Sample Reducing Agent (10X) NuPAGE » (Invitrogen, #NP0009) et de l'eau est préparée. Le LDS sert de front de migration pour pouvoir arrêter la migration avant que les petites protéines ne sortent du gel. L'agent réducteur permet de couper les ponts disulfures des protéines afin de les dénaturer. De plus, afin d'aider à la dénaturation, les protéines sont incubées à 70 °C pendant 10 minutes.
- 2) **Migration** : les gels utilisés pour la migration sont des gels déjà prêts à l'emploi « NuPAGE 4/12% Bis-Tris gels » (Invitrogen, #NP0335BOX). La cuve de migration est remplie d'un tampon de migration 1X « MOPS SDS Running Buffer 20x NuPAGE » (Invitrogen, #NP0001) où 500 µl « Anti-oxydant NuPAGE » (Invitrogen, #NP0005) sont ajoutés. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le « Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder » (Thermo Scientific, #26634). La migration dure environ 50 minutes à 200 volts.

- 3) Transfert :** l'objectif de cette étape est de transférer les protéines du gel sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF). La membrane doit être préalablement activée dans des bains de méthanol, d'eau distillée puis de tampon de transfert 1x « Transfer Buffer (20x) NuPAGE » (Invitrogen #NP0006). Ensuite, un sandwich (Figure 17) est formé et installé dans la cuve de transfert. Au niveau de la cuve interne, du tampon de transfert 1x amélioré (contenant 10 % de méthanol) est ajouté dans lequel 50 µl de « Sample Reducing Agent (10x) NuPAGE » (Invitrogen #NP0009) est additionné. La cuve externe est remplie d'eau distillée. Le transfert dure 1 heure à 30 volts.
- 4) Blocage :** les membranes sont lavées 3x5 minutes dans du TBS-T (composé de 5 % de Tris 1 M pH 8, 3 % de NaCl 5 M, 0,1% de Tween et d'eau distillée) avant d'être bloquées dans une solution de 5% de lait « Nonfat dried milk powder » (PanReac AppliChem #A0830) diluée dans du TBS-T.
- 5) Anticorps :** ensuite les membranes sont incubées O.N. avec l'anticorps primaire (Tableau 7). Elles sont relavées dans du TBS-T 3x5 minutes avant d'être incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire.
- 6) Révélation :** la révélation est réalisée à l'aide de la machine Amersham ImageQuant 800 (Cytiva). La membrane est préalablement incubée pendant 1 minute dans le noir dans une solution d'ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, #32106).

Tableau 7 : Anticorps primaires et secondaires utilisés lors des Western blot

Anticorps primaires	Anticorps secondaire
MCPyV large T-antigen (CM2B4) sc-136172, Santa Cruz Biotechnology 1/1000 O.N. 4°C	Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0260, Dako 1/5000 1h RT
Anti-MCPyV_gp3 large T antigen antibody (Ab3) ab202866, Abcam 1/2000 O.N. 4°C	Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0260, Dako 1/5000 1h RT
HSC-70 (B-6) sc-7298, Santa Cruz Biotechnology 1/1000 1h RT	Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0260, Dako 1/5000 30min RT

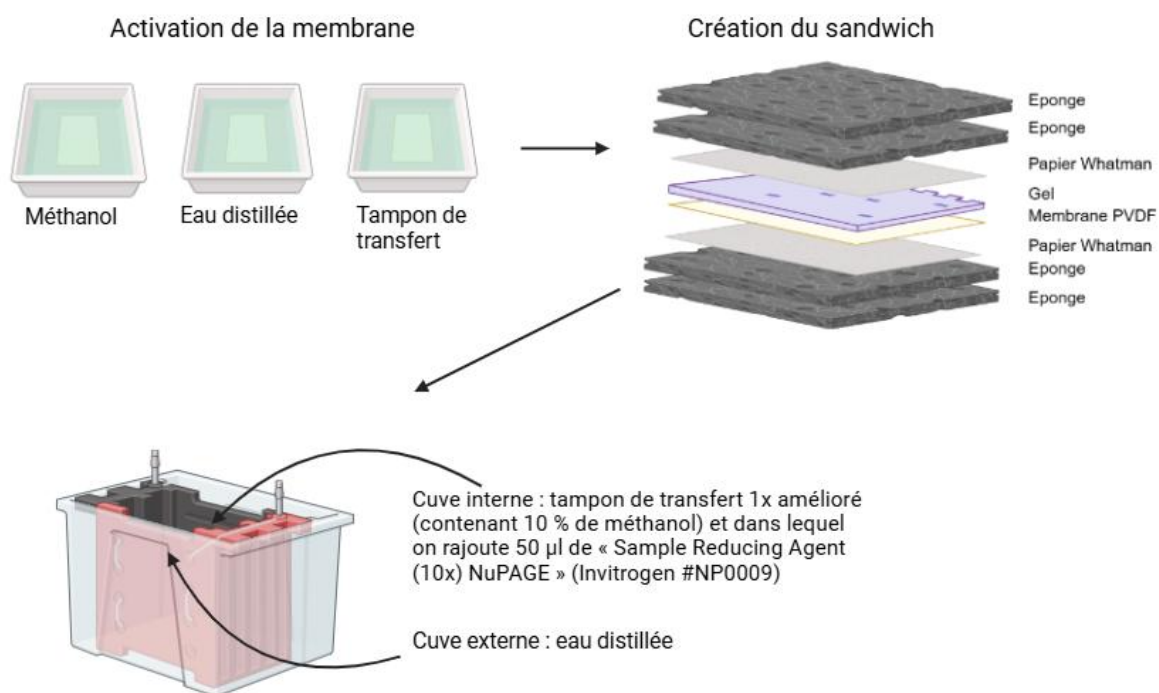


Figure 17 : Représentation de l'étape de transfert des protéines du gel vers la membrane. Figure créée sur Biorender.

3.2.3.8 Imagerie par bioluminescence

Afin de vérifier indirectement que les cellules HaCaT ont été transduites, de l'imagerie par bioluminescence a été réalisée.

Au niveau des plasmides qui ont servi à la transduction, la séquence insérée contient l'ORF cible et également la luciférase précédée d'une IRES (Figure 18). Les cellules ont été mises en contact avec de la luciférine (Promega, #E1605) car la luciférase a la capacité d'oxyder la luciférine entraînant une émission de luminescence qui a pu être lue au luminomètre (Molecular Devices, FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) en utilisant le logiciel Softmax Pro 6.3. Cette émission n'est détectable que si la séquence présente dans le lentivirus a bien été intégrée dans le matériel génétique des cellules HaCaT. L'expérience a été réalisée en triplicat dans une plaque 96 puits où 20 000 cellules ont étéensemencés dans 100 µl de milieu. Un contrôle négatif avec seulement du milieu a été ajouté également. Après adhésion, 1 µL de luciférine à 30 mg/mL a été dispensé et une lecture de luminescence a été effectuée dans la foulée.

3.3 Radiosensibilité des lignées de carcinome de Merkel

3.3.1 Soft agar assay + irradiation

Etant donné que les lignées de carcinome de Merkel positives au virus sont en suspension, réaliser des tests clonogéniques « classiques » se révèle impossible. Une des alternatives au test classiques est le soft agar assay (Figure 19).

Afin de réaliser cette expérience, au sein d'une plaque 6 puits, une 1^{ère} couche est créée composée de milieu RPMI et d'agar dissoute dans de l'eau distillée (Sigma-Aldrich, #A9414-10G). La concentration d'agar préparée pour réaliser la première couche est à 0,01 g/ml. Le ratio entre le milieu et l'agar est de 1 :1. Pour une plaque 6 puits, 1,5 ml de solution par puits est préparé. Cette première couche polymérise durant 30 minutes à RT. Ensuite, une 2^e couche de milieu et d'agar est ajoutée. Le ratio entre le milieu et l'agar est toujours de 1 :1 mais l'agar utilisée est à une concentration de 0,006 g/ml. Au niveau de la 2^e couche, les cellules sont ensemencées, entre 10 000 et 30 000 en fonction des lignées cellulaires. Le volume par puits est toujours de 1,5 ml. Cette 2^e couche polymérise à RT. Une fois ceci réalisé, la plaque subit des irradiations allant de 0 à 8 Gray (Gammacell® 40 Exactor dont la source radioactive est du Césium-137). La plaque est ensuite laissée environ 3 semaines (le temps de voir se former des colonies). Pour la coloration, une solution composée de 0,05 g de cristal violet (Sigma, #61135-25G) dans 450 ml d'eau distillée et 50 ml d'éthanol 100 % est utilisée. Cette solution incube durant 10 minutes à RT. Trois lavages à l'eau Mili-Q stérile sont réalisés. Les deux premiers lavages durent 30 minutes et le dernier quelques heures à RT. Les colonies peuvent finalement être comptées en utilisant le logiciel ImageJ.

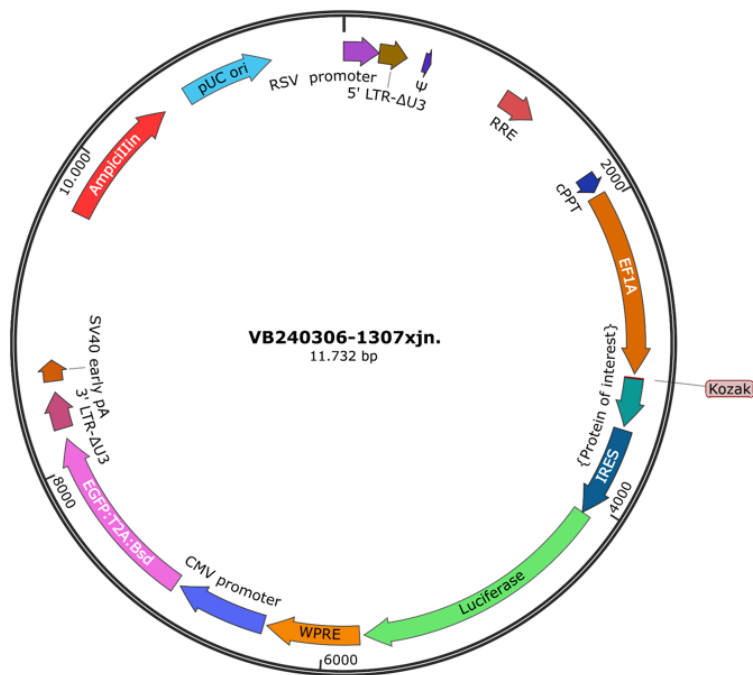


Figure 18 : **Carte du plasmide.** EF1A est le promoteur qui transcrit la séquence d'intérêt et la luciférase. Le plasmide contient une séquence IRES qui permet la traduction des 2 protéines simultanément via le recrutement direct du ribosome indépendamment de la présence de la coiffe.

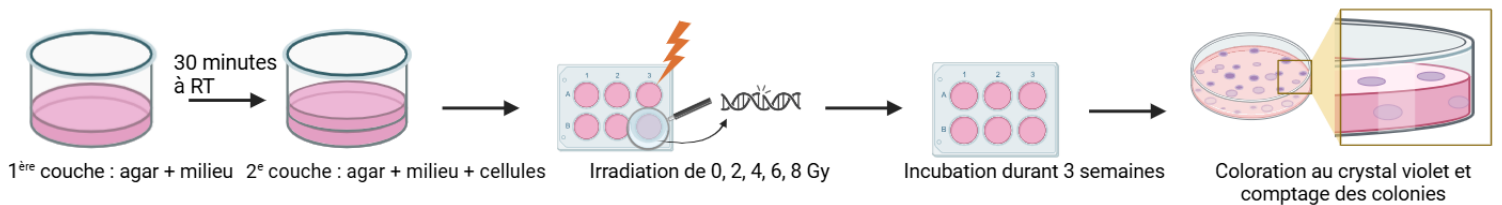


Figure 19 : **Représentation schématique du soft agar assay.** Figure réalisée avec Biorender.

3.3.2 Test clonogénique + irradiation

Une autre alternative est de coater les puits avec la Poly-L-Lysine (PLL) (ScienCell Research Laboratories, #0413).

La PLL est une chaîne d'acides aminés synthétiques possédant une charge positive. Elle modifie les charges de surface des cellules afin d'améliorer leur adhésion. La PLL est diluée 1000x dans de l'eau Milli-Q stérile. 1,5 ml de cette solution par puits est distribué dans une plaque 6 puits et incubé durant 1 heure à 37 °C. Ensuite, 2 lavages à l'eau Milli-Q stérile sont réalisés avant d'ensemencer 10 000 cellules par puits dans 1,5 ml de milieu. Celles-ci ont été irradiées avec des doses allant de 0 à 8 Gray (Gammacell® 40 Exactor). La plaque est laissée dans un incubateur durant 10 à 20 jours afin que des colonies se forment. Ensuite, les puits sont colorés avec une solution de coloration au crystal violet (la même qu'au point 3.2.1) et les colonies sont comptées en utilisant le logiciel ImageJ.

4. Résultats

4.1 Immunohistochimie

Afin de savoir si les patients atteints d'un CCM positif pour le virus sont prédisposés à être plus radiosensibles que leurs homologues atteints d'un CCM viro-négatif, des immunohistochimies (IHC) ont été réalisées sur 29 échantillons tissulaires. Dans un premier temps, afin de discriminer les cancers infectés par le virus de ceux qui ne le sont pas, deux IHC, ciblant respectivement LT et la protéine Rb, ont été réalisées. En théorie, les lésions positives pour le virus devraient être positives pour les deux marquages car la protéine LT est une oncoprotéine virale et pRb est délétée chez les patients atteints de CCM négatifs pour le virus. Pour détecter LT, un anticorps ciblant l'épitope CM2B4 a été utilisé. Il présente une sensibilité de 88,2 % et une spécificité de 94,3 %. Cet anticorps est le plus communément utilisé dans la littérature^{14,61,73}. Il existe également un deuxième anticorps pour marquer LT, cet anticorps cible l'épitope Ab3 qui possède une sensibilité de 98,3 % et une spécificité de 45,3 %. L'anticorps ciblant CM2B4 présente un plus grand risque de faire de faux négatifs par rapport à l'anticorps ciblant Ab3 qui a un risque de faire de faux positifs. Entre les deux, l'anticorps CM2B4 a été, tout d'abord, privilégié car nous avons préféré sous-estimer que surestimer des cas induits par le polyomavirus. A la suite de cette IHC, 19 cas étaient doubles positifs pour LT et pRb, 8 cas doubles négatifs et 2 cas positifs pour pRb mais négatifs pour LT. Pour ces 2 cas, un nouveau marquage LT a été réalisé en utilisant l'anticorps Ab3 et le marquage s'est révélé positif pour LT (Figure 20).

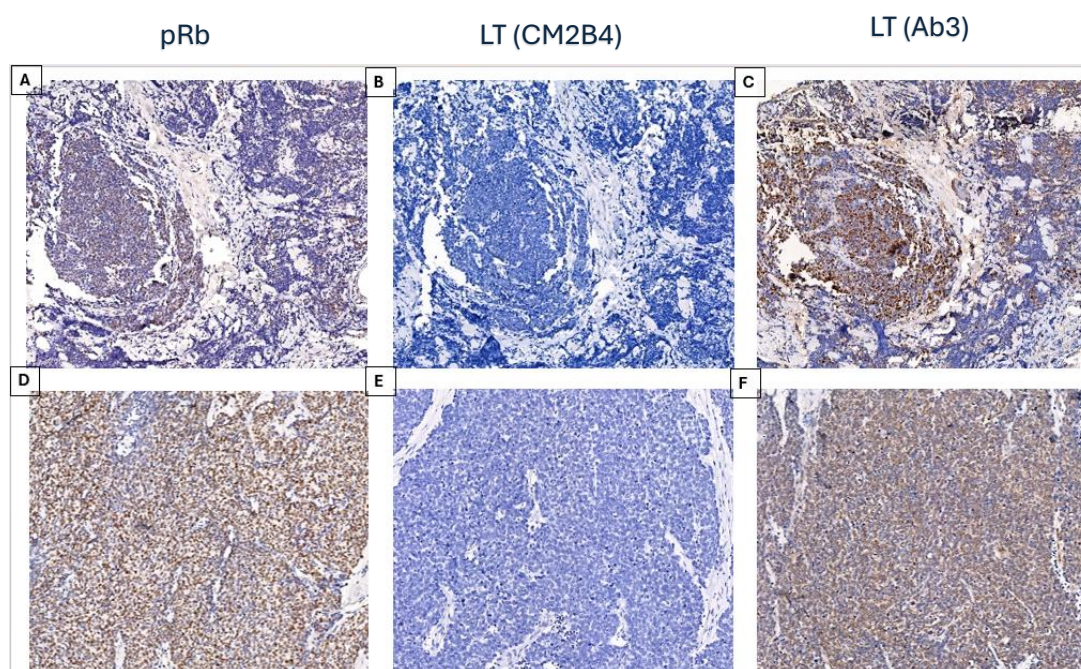


Figure 20 : **Marquages pRb et LT.** (A et D) Marquage de pRb. (B et E) Marquage de LT avec l'anticorps ciblant l'épitope CM2B4. (C et F) Marquage de LT avec l'anticorps ciblant l'épitope Ab3. Grossissement x20.

À la suite des IHC ciblant les protéines Rb et LT, sur les 29 cas, la conclusion a été que 21 cas de CCM étaient positifs pour le virus et 8 cas négatifs. Ensuite, deux autres IHC ciblant Rad51 et y-H2AX, deux marqueurs d'instabilité génomique, ont été réalisées (Figure 21).

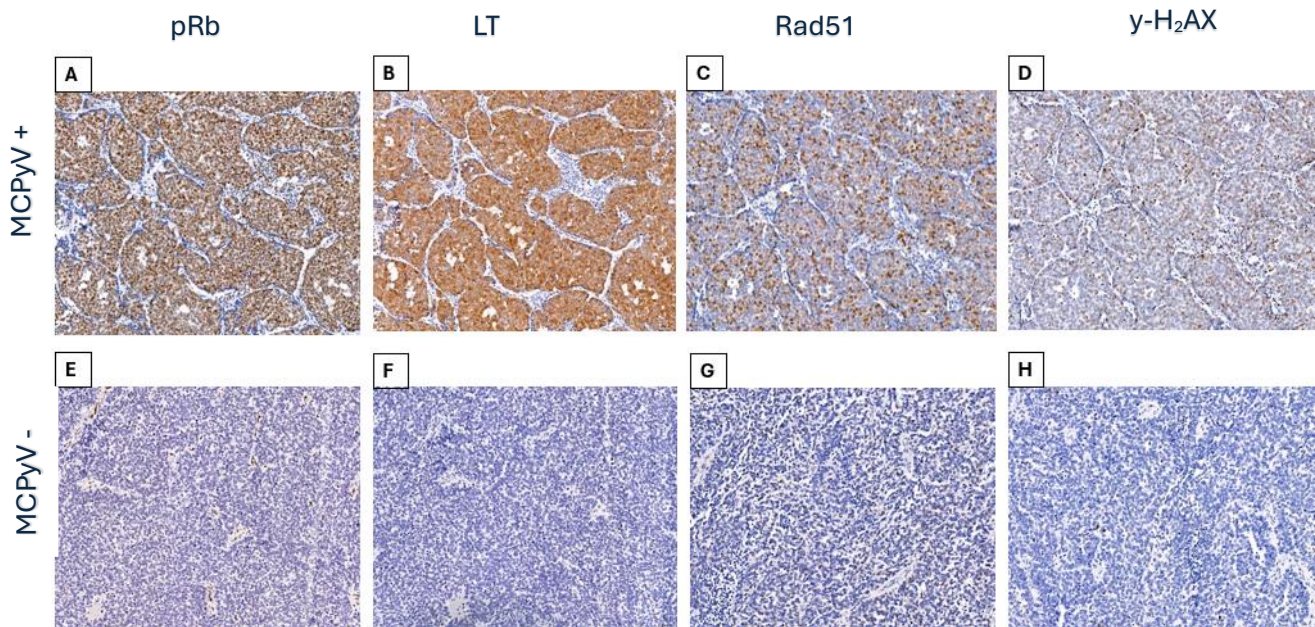


Figure 21 : Exemples représentatifs d'IHC réalisés sur des cas de patients atteints de CCM positifs et négatifs pour le virus. (A et E) Marquage de pRb. (B et F) Marquage de LT. (C et G) Marquage de Rad51. (D et H) Marquage de y-H2AX. Toutes les protéines affichaient une immunoréactivité nucléaire. Grossissement x20.

Ces IHC montrent une tendance pour l'expression de Rad51 et de y-H2AX plus marquée au niveau des patients souffrant de CCM viro-induits, bien que les résultats des tests statistiques soient non significatifs (Figure 22). Au niveau des zones tumorales de CCM, pour le marquage y-H2AX, il y a une moyenne de 5969 cellules positives par mm^2 pour les cas positifs pour le virus contre 1158 cellules positives par mm^2 pour les cas négatifs. Pour le marquage Rad51, il y a en moyenne 2191 cellules positives par mm^2 pour les cas positifs contre le virus et 1712 cellules positives par mm^2 pour les cas négatifs.

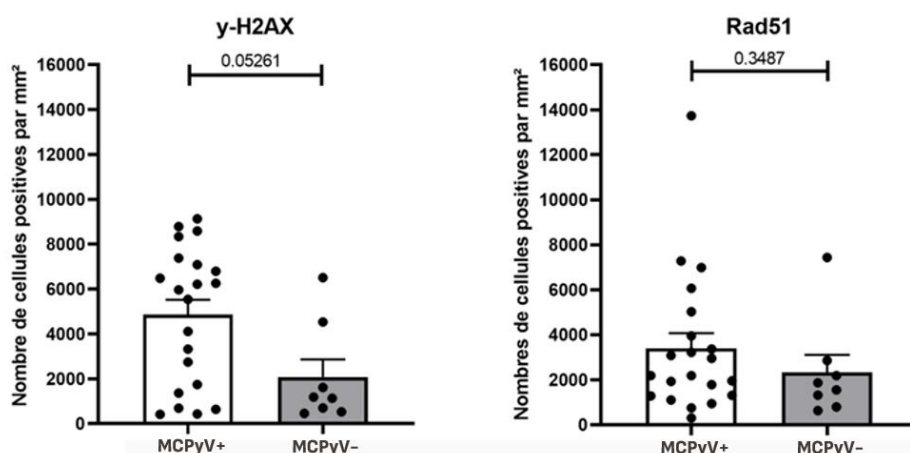


Figure 22 : **Nombre de cellules positives pour les marquages y-H₂AX et Rad51 par mm² dans les zones tumorales de CCM.** Un test non-paramétrique de Mann-Whitney a été effectué à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Sur l'axe y est représenté le nombre de cellules positives par mm². La moyenne ± SEM (erreur standard de la moyenne) est également représentée.

4.2 Transduction de la lignée HaCaT (création de modèles isogéniques)

4.2.1 Vérification au niveau génomique de la transduction des lignées

En amont de ce travail, des lignées de kératinocytes ont été transduites à l'aide de lentivirus codant pour les oncoprotéines du polyomavirus (Figure 18). Afin de vérifier si la transduction a fonctionné, plusieurs expériences ont été réalisées. Dans un premier temps, l'expression des gènes a été vérifiée par une reverse transcriptase PCR. Avant de pouvoir réaliser la PCR, des amorces ont été désignées puis la température d'hybridation optimale pour chaque couple a été investiguée par une PCR à gradient de température. La PCR a été réalisée quatre fois mais en modifiant la température d'hybridation des amorces (56, 58, 60 et 62°C). Le premier couple d'amorces testé ciblait la séquence consensus de LT, LTtrunc, 57 kT et ST. La PCR a été réalisée sur toutes les cellules HaCaT transduites mais également sur trois contrôles positifs qui sont des lignées de CCM. Suite à ça, la température d'hybridation choisie a été 60°C (Figure 23).

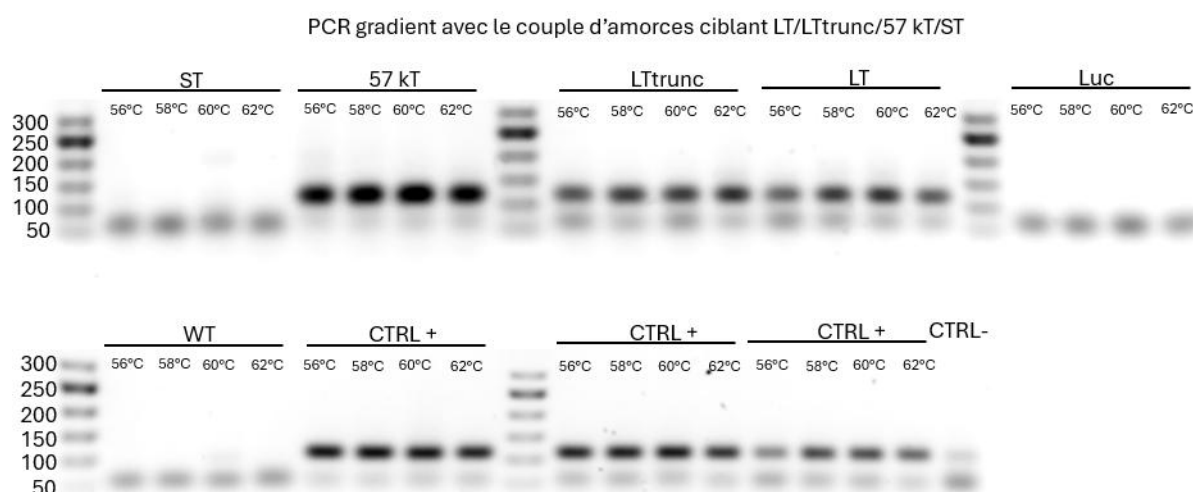


Figure 23 : Détermination de la température d'hybridation optimale pour le couple d'amorces consensus ciblant LT, LT tronqué, 57 kT et ST. L'ARN des lignées cellulaires HaCaT transduites mais également de lignées de CCM (WAGA, PETA et MKL-1) a été extrait et rétro-transcrit pour être utilisé pour la PCR. Ces lignées de CCM servent de contrôles positifs. Luc et WT sont des contrôles négatifs car ces lignées sont respectivement transduites avec la luciférase at avec aucune séquence. Le contrôle négatif (CTRL-) représente un échantillon contenant le mix où l'ADNc a été remplacé par de l'eau. La taille attendue de la bande spécifique est 109 pb.

Pour le couple d'amorces ciblant les séquences 57 kT et LT, la température d'hybridation validée a été 62°C. Etant donné qu'aucun signal ne fut observé pour ST au niveau de la PCR ciblant les antigènes LT, LT tronqué, 57 kT et ST, un contrôle positif a été utilisé pour déterminer la température d'hybridation de son couple d'amorce spécifique. La température d'hybridation validée est, ici aussi, 62°C (Figure 24).

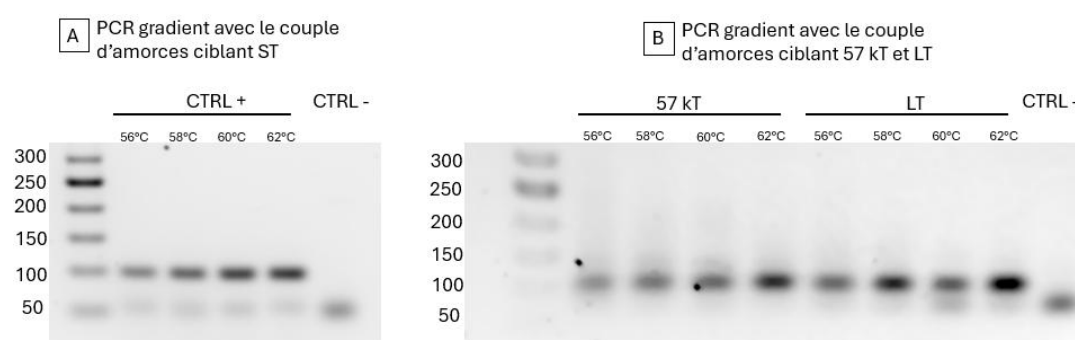


Figure 24 : Détermination de la température d'hybridation optimale pour le couple d'amorces ciblant ST et le couple d'amorces ciblant 57 kT et LT. (A) L'ARN d'une lignée de CCM (MKL-1) a été extrait et rétro-transcrit pour être utilisé pour la PCR. Le contrôle négatif représente un échantillon contenant le mix où l'ADNc a été remplacé par de l'eau. La taille attendue des bandes est 95 pb. (B) L'ARN des lignées HaCaT transduites par 57 kT et LT a été extrait et rétro-transcrit pour être utilisé pour la PCR. Le contrôle négatif représente un échantillon contenant le mix où l'ADNc a été remplacé par de l'eau. La taille attendue des bandes est 95 pb.

Suite à ces mises au point, des RT-PCR ont été réalisées sur les kératinocytes HaCaT transduits et ont permis de confirmer l'intégration de la séquence cible de LT, LT tronqué et 57 kT, mais pas ST. En effet, aucun ARNm relatif à cette séquence n'a été détecté dans le modèle HaCaT ST (Figure 25).

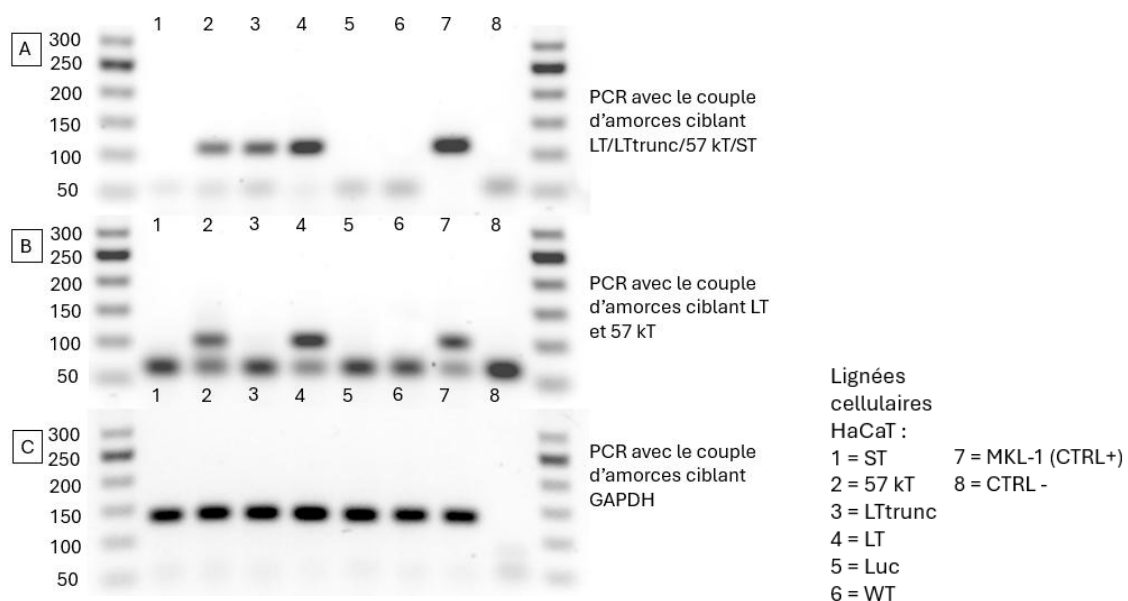


Figure 25 : Vérification des transductions de la lignée HaCaT par rétro-transcriptase PCR. L'ARN des lignées cellulaires HaCaT transduites mais également d'une lignée de CCM (MKL-1) a été extrait et rétro-transcrit pour être utilisé pour la PCR. MKL-1 sert de contrôle positif (CTRL+). Luc et WT sont des contrôles négatifs car ces lignées sont respectivement transduites avec la luciférase et avec aucune séquence. Le contrôle négatif (CTRL-) représente un échantillon contenant le mix où l'ADNc a été remplacé par de l'eau. (A) La PCR cible spécifiquement LT/LTtrunc/57 kT/ST, la taille de la bande spécifique attendue est 109 pb. (B) La PCR cible spécifiquement 57 kT et LT, La taille de la bande spécifique attendue est 95 pb. (C) Un housekeeping gene, la GAPDH, a été utilisé afin de s'assurer qu'il y avait bien de l'ARN dans chaque échantillon. La taille de la bande spécifique attendue est 129 pb.

4.2.2 Expression protéique des gènes transduits

La transduction au niveau protéique a été vérifiée par un Western blot. Il a été réalisé sur les cellules HaCaT transduites mais également sur une lignée de CCM, MKL-1, qui a servi de contrôle positif. Après plusieurs tentatives et l'utilisation de deux anticorps différents (CM2B4 et Ab3), aucune bande d'intérêt n'a été visible sur les cellules HaCaT transduites. Au niveau de MKL-1 (CTRL +), une bande d'intérêt est visible, elle correspond à LTtrunc et se situe aux alentours de 40 KDa (Figure 26).

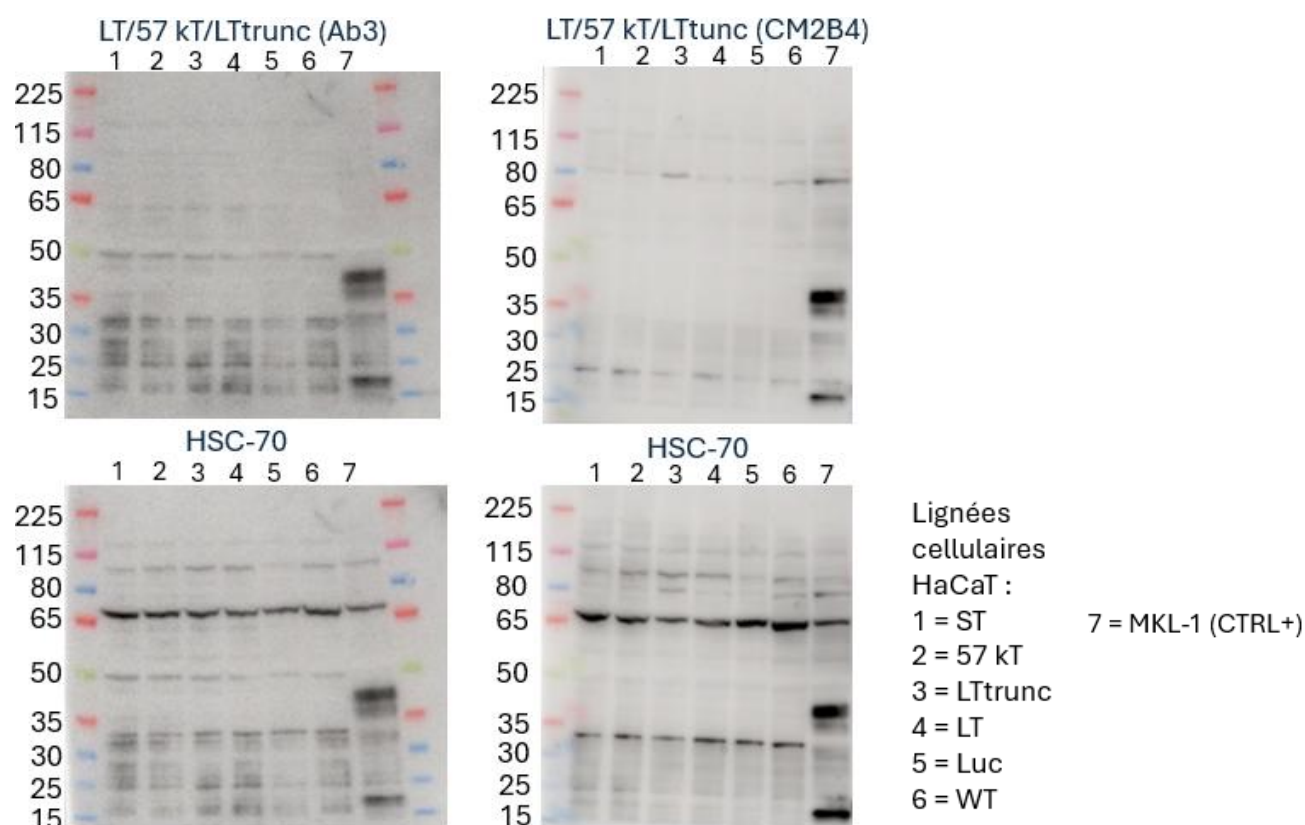


Figure 26 : **Vérification de la transduction au niveau protéique des cellules HaCaT.** Les anticorps ne ciblent pas l'antigène ST. Les bandes attendues étaient à 57 KDa pour 57 kT, aux alentours de 35 KDa pour LTtrunc et 100 KDa pour LT. Aucune bande n'était attendue pour Luc et WT. MKL-1 a été utilisé comme contrôle positif pour 57 kT et LTtrunc. HSC-70 a été utilisé comme contrôle de charge, il possède un poids moléculaire de 70 KDa.

4.2.3 Imagerie par bioluminescence

Le logiciel Softmax Pro 6.3 nous a rapporté l'émission de luminescence obtenue à la suite de la réaction entre la luciférine et la luciférase présente au niveau des cellules HaCaT transduites mais aussi au niveau du contrôle négatif qui correspond à du milieu et de la luciférine (Tableau 8).

Tableau 8 : **Tableau reprenant la moyenne d'émission de luminescence émise à la suite de l'oxydation de la luciférine par la luciférase retrouvée au niveau des lignées HaCaT à suite de leur transduction.**

	ST	57 kT	LTtrunc	LT	Luc	WT	CTRL -
Emission de luminescence	0	10 667	21 000	42 000	1 050 667	1 333	3 000

Le contrôle négatif a une émission de luminescence de 3000. Nous pouvons supposer que tout ce qui est égal/inférieur à 3000 correspond à du bruit de fond. Le contrôle avec les kératinocytes transduits avec la luciférase a une émission de luminescence de 1 050 667, évidemment les autres lignées cellulaires possèdent une émission moindre.

Etant donné que l'émission n'est détectable que si la séquence présente dans le lentivirus a bien été intégrée dans le matériel génétique des cellules HaCaT, cette expérience confirme l'hypothèse de la PCR qui indiquait que la transduction des cellules HaCaT pour 57 kT, LT tronqué et LT a fonctionné alors que la transduction des cellules HaCaT pour ST n'a pas fonctionné.

5. Discussion

Le carcinome à cellules de Merkel est un cancer neuroendocrinien de la peau, rare et particulièrement agressif. Dans environ 80 % des cas, sa carcinogénèse est attribuée à une infection par le polyomavirus de Merkel, tandis que les 20 % restants sont associés à une exposition excessive aux rayons ultraviolets induisant notamment une inactivation du gène Rb1²³⁻²⁵. À ce jour, le traitement du CCM est déterminé en fonction du stade de la maladie, indépendamment de son étiologie¹⁵.

Comme tout virus, le MCPyV cherche à se répliquer. En raison de sa petite taille, il est dépendant des machineries cellulaires de son hôte, il est donc probable qu'il détourne les machineries de réplication et de réparation de l'ADN de la cellule hôte. Cependant, ce mécanisme peut mener à une intégration accidentelle du génome viral dans celui de l'hôte provoquant une troncature de son oncoprotéine LT, sa surexpression et la séquestration constitutive de pRb, un gène suppresseur de tumeur contrôlant la prolifération cellulaire. En conséquence, une prolifération cellulaire incontrôlée qui conduit à une transformation tumorale est observée²¹.

D'un point de vue clinique, les patients porteurs de CCM positifs pour le virus présentent un pronostic plus favorable que ceux atteints d'un CCM viro-négatif⁶¹. Dans ce contexte, notre hypothèse est que le détournement des voies de réparation des dommages à l'ADN (DDR) par les oncoprotéines virales, LT, ST et 57kT, pourrait expliquer en partie cette différence de sensibilité aux traitements, et donc de pronostic, entre les deux formes du CCM.

Ce mémoire s'est focalisé sur les potentielles variations de sensibilité à la radiothérapie que peuvent présenter les cellules tumorales à la suite du détournement potentiel des voies DDR par les oncoprotéines du virus. En effet, ces voies permettent de maintenir une intégrité du génome. Dans de nombreux cancers, les gènes qui y sont associés sont altérés, conduisant à une instabilité génomique. Cette instabilité est une propriété fondamentale des tumeurs, favorisant leur développement, leur dissémination, ainsi que leur sensibilité à certains traitements ciblant l'ADN comme la radiothérapie ou certaines chimiothérapies⁸⁶.

Par la suite, l'étude plus approfondie de l'interaction entre les oncoprotéines du polyomavirus et les composants de la DDR présenteraient un intérêt pour démontrer qu'il existe bien un détournement des voies DDR par les oncoprotéines du virus. Cela permettrait de mieux comprendre les mécanismes de sensibilité à des traitements existants (radiothérapie, chimiothérapie ou immunothérapie) afin de mieux traiter le patient, et permettraient également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques au sein des voies DDR^{86,87}.

Ces axes ont d'ailleurs déjà été explorés pour le papillomavirus humain (HPV), dont certains génotypes (ex : HPV16) sont également cancérogènes.

Des précédents travaux (notamment au sein du laboratoire d'accueil) ont mis en évidence que les oncoprotéines d'HPV détournent des protéines des voies DDR, modifiant la radiosensibilité des cancers HPV-positifs par rapport à leurs homologues HPV négatifs⁸⁸. Etant donné les similarités entre les papillomavirus et polyomavirus humains, il est probable d'y retrouver les mêmes conclusions⁸⁹.

Dans un premier temps, notre travail s'est concentré sur l'évaluation de la prédisposition à la radiosensibilité chez des patients atteints de CCM positifs et négatifs pour MCPyV. Dans ce but, l'expression de deux biomarqueurs de la DDR a été évaluée : γ -H2AX, un indicateur de cassures double brin et Rad51, impliqué dans la recombinaison homologue^{89,90}. Les résultats obtenus par IHC ont révélé une tendance à la surexpression de ces deux protéines chez les patients infectés par le virus. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse d'une activation par le virus puis d'un détournement des voies de réparation, dont la conséquence est une accumulation de lésions non réparées. Cependant, les résultats ne se sont pas montrés statistiquement significatifs en raison de la taille restreinte de la cohorte. En effet, l'analyse n'a été réalisée que sur 29 patients au total dont seulement 8 négatifs pour le virus. Dans le futur, il serait pertinent d'élargir la cohorte en sollicitant d'autres biobanques.

Un autre aspect de ce mémoire était de comparer la radiosensibilité entre les lignées de CCM positives et négatives pour le virus. Pour cela, il a été envisagé de réaliser des tests clonogéniques afin d'évaluer la formation de colonies après l'irradiation des cellules. Si une lignée est plus radiosensible, sa capacité à réparer les lésions induites par l'irradiation sera réduite et moins de colonies seront formées.

La première limitation expérimentale a été que les tests clonogéniques sont réalisables seulement pour des cellules qui adhèrent, or les lignées positives pour le virus sont en suspension. Une alternative a été de mettre en place des tests en soft agar. Malgré plusieurs tentatives et l'utilisation de plusieurs protocoles, les résultats obtenus se sont avérés inexploitable.

A la suite de ces échecs, nous avons tenté de faire adhérer les cellules en coatant les puits des plaques à la poly-L-lysine, permettant ainsi de réaliser des tests clonogéniques classiques. Pour le moment, l'essai n'a été réalisé que sur une seule lignée cellulaire. Néanmoins, à la suite du coating, les cellules n'ont pas formé de colonies rendant la réalisation du test clonogénique impossible.

Dans la littérature, Ahmed *et al.* ont également voulu comparer la sensibilité à la radiothérapie entre les lignées de CCM positives et négatives pour le virus en s'intéressant directement à la viabilité des cellules.

Dans ce but, ils ont utilisé le CellTiter-Glo qui détermine le nombre de cellules viables en culture basé sur la détection de l'ATP intracellulaire. L'expérience a été réalisée sur quatre lignées cellulaires, deux lignées positives pour le virus, WAGA et MKL-1 mais aussi sur deux lignées négatives pour le virus MCC13 et MCC26⁹¹. Le test CellTiter-Glo a été réalisé après que les cellules aient été traitées avec des doses croissantes d'irradiations. Leur étude a montré que la viabilité cellulaire était significativement plus faible pour les lignées positives pour le virus, cela va donc dans la direction de notre hypothèse de travail.

Afin de mieux comprendre comment le mécanisme de sensibilisation à la radiothérapie fonctionne, nous avons voulu étudier l'effet individuel de chaque oncoprotéine virale. Dans ce but, des modèles isogéniques à partir de kératinocytes immortalisés (HaCaT) ont été réalisés en transduisant la séquence d'une oncoprotéine du virus à la fois. Avant de réaliser des expériences de radiosensibilité sur les cellules transduites, nous avons voulu contrôler la transduction en détectant les protéines virales transduites aux niveaux ARNm et protéique.

Une première validation a été réalisée par une PCR sur de l'ARN. Elle a permis de conclure que, en ARN, il y a une expression de transcrits pour LT, LT tronqué et 57 kt mais pas pour ST.

Afin de contrôler la traduction efficace des éléments transduits, un Western blot a ensuite été effectué à l'aide d'anticorps ciblant une région commune à LT, LT tronqué et 57 kT (mais pas à ST). Malheureusement, aucune bande d'intérêt n'a été détectée dans les lignées transduites. Au niveau du contrôle positif, MKL-1 une lignée de CCM, l'unique bande retrouvée a été celle de LT tronqué.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence de signal. L'une d'elles est que la traduction ne se soit pas produite, malgré une transcription réussie.

Une autre hypothèse est la possibilité qu'à la suite de la traduction, la protéine est produite dans une conformation qui masque l'épitope reconnu par l'anticorps. En effet, aussi bien l'anticorps CM2B4 que l'anticorps Ab3 sont des anticorps monoclonaux, il suffit que leur unique épitope soit masqué pour qu'on ne puisse pas mettre en évidence nos protéines d'intérêt.

Afin de départager ces deux hypothèses, une analyse en spectrométrie de masse pourrait être envisagée. Cette technique pourrait identifier la présence des fragments peptidiques et confirmer si l'on retrouve notre protéine d'intérêt.

Cette expérience serait d'autant plus intéressante qu'elle nous permettrait de nous affranchir de l'utilisation d'un anticorps.

A la suite du Western blot, nous avons également pu constater que la protéine 57 kT n'a pas pu être mise en évidence au niveau du contrôle positif, MKL-1.

La probabilité que l'antigène 57 kT soit traduit en protéine dans les lignées de CCM reste très controversé. L'hypothèse la plus répandue concernant l'antigène 57 kT est le fait qu'il puisse être un analogue de 17 kT retrouvé dans le virus SV40. Mais aucune expérience n'a encore réussi à montrer sa fonction cellulaire, s'il est réellement traduit dans la cellule ou s'il reste sous forme d'ARN non codant.

Afin d'investiguer la raison pour laquelle aucun signal pour la protéine ST n'a été détecté dans les extraits protéiques des HaCaT transduites avec le lentivirus ST, nous avons procédé à un séquençage du plasmide lentiviral. Bien qu'aucun signal GFP n'ait été détecté lors du contrôle de production du lentivirus consistant en une transduction de cellules HEK293, le séquençage a démontré un plasmide contenant bien la séquence cible. Notre hypothèse serait que la protéine ST serait trop toxique pour les cellules et celles l'ayant intégré ne survivraient pas. Les cellules récoltées seraient alors des cellules non transduites mais étant devenues résistantes à la sélection par antibiotique. Cela reste étrange car le mode de cancérisation de ST dans le CCM est de bloquer la répression Rb-dépendante de la transcription dépendante de E2F²¹. Or l'immortalisation des cellules HEK293 est réalisée par une transfection avec des fragments de l'ADN d'adénovirus qui contiennent les régions précoces 1 : E1A et E1B⁹². L'adénovirus est un virus oncogène dont le mode d'action est similaire au CCM, c'est-à-dire que le produit du gène E1A de l'adénovirus séquestre également la protéine pRb^{93,94}.

Si la transduction des HaCaT pour ST ne se révèle pas possible, un changement de modèle cellulaire pourrait être envisagé. Dans un article de Emil Chtenberget *al*, le modèle utilisé est MCC13, une des lignées cellulaires négatives pour le virus⁹⁵. L'avantage de ce modèle est qu'il est intéressant si l'on veut se rapprocher le plus possible de la réalité « physiologique ». En effet, bien que viro-négatives, les cellules MCC13 sont issues d'un CCM et en présentent, dès lors, toutes les caractéristiques classiques (ex : taux de prolifération élevé, différenciation neuroendocrine).

Si la transduction avait fonctionné, le rôle de chaque oncoprotéine dans la sensibilité à la radiothérapie aurait été investigué par la mise en place de tests clonogéniques sur des cellules irradiées, ces tests auraient été précédés par des analyses sur la prolifération cellulaire, le taux d'apoptose et la proportion de cellules en phase G2/M.

Ces paramètres sont essentiels afin de s'assurer que l'effet observé sera spécifique à la réponse aux dommages à l'ADN, et non à une perturbation globale du cycle cellulaire.

D'une manière intéressante, une récente étude de Kamel Bachiri *et al.* s'est intéressée aux perturbations des voies DDR induites par le MCPyV. Grâce à des approches protéomiques et interactomiques, une dérégulation des voies DDR liée à LTtrunc a été mise en évidence. Leur étude met, ensuite, en lumière l'interaction entre LTtrunc et EHMT2, une méthyltransférase des histones, localisée à proximité de facteurs DDR. D'autres études sont nécessaires pour démontrer que EHMT2 pourrait être une potentielle cible thérapeutique et/ou pour trouver d'autres cibles thérapeutiques⁸⁷.

Comme perspective, une expérience complémentaire permettant de démontrer qu'on a bien une perturbation de l'ADN, pourrait consister à traiter des cellules CCM positives et négatives pour le virus par chimiothérapie. La première condition correspondrait à une molécule chimique ciblant les microtubules qui servirait de contrôle. Les cellules, sans leurs microtubules, entreraient en apoptose. La deuxième condition consisterait en l'utilisation d'une molécule chimiothérapique ciblant l'ADN. Si les cellules positives et négatives pour le virus ont la même réponse à la première chimiothérapie et une réponse différente à la deuxième, ça confirmerait qu'on a bien une perturbation des voies de réparation à l'ADN pour les cellules positives pour le virus.

Finalement, dans ce mémoire, nous avons décidé de nous intéresser spécifiquement à la radiothérapie mais il est tout à fait possible que la présence du virus influence la réponse à l'immunothérapie également. Les CCM positifs pour le MCPyV sont immunogènes par leur expression d'antigènes viraux. Mais les CCM négatifs pour le virus sont également immunogènes car ils présentent un haut taux de mutations⁹⁶. Actuellement, il n'a pas encore été démontré que les tumeurs positives pour le virus présentent une immunogénicité plus élevée en comparaison aux tumeurs négatives²⁵.

En conclusion, des ajustements et des expériences restent nécessaires pour confirmer l'existence d'une différence de sensibilité à la radiothérapie entre les CCM positifs et négatifs pour le MCPyV. Les perspectives de ce projet seraient, par la suite, de démontrer que les oncoprotéines du virus détournent une ou plusieurs voies de réparation de l'ADN de l'hôte durant la répllication virale. Il faudra, ensuite, identifier plus précisément quelle(s) oncoprotéine(s) jou(en)t un rôle et avec quelles protéines cellulaires elle(s) interagiss(en)t. Par la suite, si on arrive à démontrer qu'une ou plusieurs voies sont détournées par le virus, cela ouvrirait la porte à l'utilisation de nouveaux médicaments ciblant cette vulnérabilité induite par la présence du virus.

6. Références bibliographiques

1. DeCoste, R. C. *et al.* RB1-deficient squamous cell carcinoma: the proposed source of combined Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* **35**, 1829–1836 (2022).
2. Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* **319**, 1096–1100 (2008).
3. Zou, W. & Imperiale, M. J. Biology of Polyomavirus miRNA. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
4. Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus. *Modern Pathology* **28**, 498–504 (2015).
5. De Wolff-Peeters, C., Marien, K., Mebis, J. & Desmet, V. A cutaneous APUDoma or Merkel cell tumor? A morphologically recognizable tumor with a biological and histological malignant aspect in contrast with its clinical behavior. *Cancer* **46**, 1810–1816 (1980).
6. Myers, E. & Uhde, M. Hiding in Plain Sight: An Atypical Presentation of the Uncommon Merkel Cell Carcinoma. *Cureus* **16**, e55613.
7. Thibault, K. Evidence of an epithelial origin of Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* **35**, 446–448 (2022).
8. Harms, P. W. *et al.* Genomic evidence suggests that cutaneous neuroendocrine carcinomas can arise from squamous dysplastic precursors. *Modern Pathology* **35**, 506–514 (2022).
9. Kervarrec, T. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus–Negative Merkel Cell Carcinoma Originating from In Situ Squamous Cell Carcinoma: A Keratinocytic Tumor with Neuroendocrine Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* **142**, 516–527 (2022).
10. Kervarrec, T. *et al.* Polyomavirus-Positive Merkel Cell Carcinoma Derived from a Trichoblastoma Suggests an Epithelial Origin of this Merkel Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* **140**, 976–985 (2020).
11. Thakker, S. *et al.* Merkel cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **91**, 598–605 (2024).
12. Lugowska, I. *et al.* Merkel-cell carcinoma: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *ESMO Open* **9**, 102977 (2024).
13. Silling, S. *et al.* Epidemiology of Merkel Cell Polyomavirus Infection and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers* **14**, 6176 (2022).
14. Schrama, D. *et al.* Characterization of six Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cell lines: Integration pattern suggest that large T antigen truncating events occur before or during integration. *International Journal of Cancer* **145**, 1020–1032 (2019).
15. Schmuts, C. D. *et al.* NCCN Guidelines® Insights: Merkel Cell Carcinoma, Version 1.2024: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **22**, (2024).
16. Prezioso, C. *et al.* Structural Analysis of Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) Viral Capsid Protein 1 (VP1) in HIV-1 Infected Individuals. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7998 (2020).
17. Nguyen, A. T. *et al.* Quantitative metastatic lymph node burden and survival in Merkel cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **84**, 312–320 (2021).

18. De Pinto, G. *et al.* Global trends in cutaneous malignant melanoma incidence and mortality. *Melanoma Research* **34**, 265 (2024).
19. Stang, A., Becker, J. C., Nghiem, P. & Ferlay, J. The association between geographic location and incidence of Merkel cell carcinoma in comparison to melanoma: An international assessment. *European Journal of Cancer* **94**, 47–60 (2018).
20. Hernandez, L. E. *et al.* Merkel cell carcinoma: An updated review of pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Dermatologic Therapy* **35**, e15292 (2022).
21. Bahar, F. & DeCaprio, J. A. Why do we distinguish between virus-positive and virus-negative Merkel cell carcinoma? *British Journal of Dermatology* **190**, 785–786 (2024).
22. DeCaprio, J. A. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**, 20160276 (2017).
23. Spurgeon, M. E. *et al.* Merkel cell polyomavirus large T antigen binding to pRb promotes skin hyperplasia and tumor development. *PLOS Pathogens* **18**, e1010551 (2022).
24. Czech-Sioli, M. *et al.* High-resolution analysis of Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma reveals distinct integration patterns and suggests NHEJ and MMBIR as underlying mechanisms. *PLOS Pathogens* **16**, e1008562 (2020).
25. Samimi, M. *et al.* Viral and tumor antigen-specific CD8 T-cell responses in Merkel cell carcinoma. *Cellular Immunology* **344**, 103961 (2019).
26. Park, D. E. *et al.* Dual inhibition of MDM2 and MDM4 in virus-positive Merkel cell carcinoma enhances the p53 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 1027–1032 (2019).
27. Starrett, G. J. *et al.* Clinical and molecular characterization of virus-positive and virus-negative Merkel cell carcinoma. *Genome Med* **12**, 30 (2020).
28. Kervarrec, T. *et al.* Diagnostic accuracy of a panel of immunohistochemical and molecular markers to distinguish Merkel cell carcinoma from other neuroendocrine carcinomas. *Modern Pathology* **32**, 499–510 (2019).
29. Spurgeon, M. E. *et al.* The Merkel Cell Polyomavirus T Antigens Function as Tumor Promoters in Murine Skin. *Cancers* **13**, 222 (2021).
30. Gardner, Sylvia D., Field, Anne M., Coleman, Dulcie V. & Hulme, B. NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *The Lancet* **297**, 1253–1257 (1971).
31. Padgett, Billie L., Zurhein, Gabriele M., Walker, Duard L., Eckroade, Robert J. & Dessel, Bert H. CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY. *The Lancet* **297**, 1257–1260 (1971).
32. Allander, T. *et al.* Identification of a Third Human Polyomavirus. *J Virol* **81**, 4130–4136 (2007).
33. Gaynor, A. M. *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* **3**, e64 (2007).
34. Mishra, N. *et al.* Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy. *The Journal of Infectious Diseases* **210**, 1595–1599 (2014).
35. Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host & Microbe* **7**, 509–515 (2010).

36. Meijden, E. van der *et al.* Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. *PLOS Pathogens* **6**, e1001024 (2010).
37. Scuda, N. *et al.* A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *Journal of Virology* **85**, 4586–4590 (2011).
38. Buck, C. B. *et al.* Complete Genome Sequence of a Tenth Human Polyomavirus. *Journal of Virology* **86**, 10887–10887 (2012).
39. Lim, E. S. *et al.* Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* **436**, 295–303 (2013).
40. Korup, S. *et al.* Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLOS ONE* **8**, e58021 (2013).
41. Gheit, T. *et al.* Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology* **506**, 45–54 (2017).
42. Ondov, B. D. *et al.* Mash Screen: high-throughput sequence containment estimation for genome discovery. *Genome Biol* **20**, 232 (2019).
43. Houben, R. *et al.* Inhibition of T-antigen expression promoting glycogen synthase kinase 3 impairs merkel cell carcinoma cell growth. *Cancer Letters* **524**, 259–267 (2022).
44. Nomburg, J. *et al.* Long-read sequencing reveals complex patterns of wraparound transcription in polyomaviruses. *PLOS Pathogens* **18**, e1010401 (2022).
45. Spurgeon, M. E. & Lambert, P. F. Merkel cell polyomavirus: A newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology* **435**, 118–130 (2013).
46. Rapchak, K., Yagobian, S. D., Moore, J., Khattri, M. & Shuda, M. Merkel cell polyomavirus small T antigen is a viral transcription activator that is essential for viral genome maintenance. *PLOS Pathogens* **18**, e1011039 (2022).
47. Ögüt, B., Bayram, E. K., İnan, M. A., Kestel, S. & Erdem, Ö. Association of Merkel Cell Polyomavirus Status With p53, RB1, and PD-L1 Expression and Patient Prognosis in Merkel Cell Carcinomas: Clinical, Morphologic, and Immunohistochemical Evaluation of 17 Cases. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **31**, 371 (2023).
48. Pietropaolo, V., Prezioso, C. & Moens, U. Merkel Cell Polyomavirus and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers* **12**, 1774 (2020).
49. Czech-Sioli, M. *et al.* The Ubiquitin-Specific Protease Usp7, a Novel Merkel Cell Polyomavirus Large T-Antigen Interaction Partner, Modulates Viral DNA Replication. *Journal of Virology* **94**, 10.1128/jvi.01638-19 (2020).
50. Houben, R. *et al.* Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T antigen. *International Journal of Cancer* **136**, E290–E300 (2015).
51. Kumar, S. *et al.* Merkel cell polyomavirus oncoproteins induce microRNAs that suppress multiple autophagy genes. *International Journal of Cancer* **146**, 1652–1666 (2020).
52. Nwogu, N., Ortiz, L. E., Whitehouse, A. & Kwun, H. J. Merkel Cell Polyomavirus Small Tumor Antigen Activates Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression for Cell Migration and Invasion. *Journal of Virology* **94**, 10.1128/jvi.00786-20 (2020).

53. Zhao, J. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Activates Noncanonical NF- κ B Signaling to Promote Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research* **18**, 1623–1637 (2020).
54. Cheng, J. *et al.* Merkel cell polyomavirus recruits MYCL to the EP400 complex to promote oncogenesis. *PLOS Pathogens* **13**, e1006668 (2017).
55. Berrios, C. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Promotes Pro-Glycolytic Metabolic Perturbations Required for Transformation. *PLoS Pathog* **12**, e1006020 (2016).
56. Becker, M. *et al.* Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology* **93**, 10.1128/jvi.02004-18 (2019).
57. Myrda, J., Bremm, F., Schaft, N. & Dörrie, J. The Role of the Large T Antigen in the Molecular Pathogenesis of Merkel Cell Carcinoma. *Genes* **15**, 1127 (2024).
58. Wong, M. K. & Yee, C. Polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma: the beginning of the beginning. *J Clin Invest* **134**, (2024).
59. Houben, R., Celikdemir, B., Kervarrec, T. & Schrama, D. Merkel Cell Polyomavirus: Infection, Genome, Transcripts and Its Role in Development of Merkel Cell Carcinoma. *Cancers* **15**, 444 (2023).
60. Hesbacher, S. *et al.* RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget* **7**, 32956–32968 (2016).
61. Moshiri, A. S. *et al.* Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol* **137**, 819–827 (2017).
62. Rotondo, J. C. *et al.* Merkel Cell Carcinomas Arising in Autoimmune Disease Affected Patients Treated with Biologic Drugs, Including Anti-TNF. *Clinical Cancer Research* **23**, 3929–3934 (2017).
63. Jacobs, D. *et al.* Assessment of Age, Period, and Birth Cohort Effects and Trends in Merkel Cell Carcinoma Incidence in the United States. *JAMA Dermatology* **157**, 59–65 (2021).
64. McEvoy, A. M. *et al.* Merkel cell carcinoma recurrence risk estimation is improved by integrating factors beyond cancer stage: A multivariable model and web-based calculator. *Journal of the American Academy of Dermatology* **90**, 569–576 (2024).
65. McEvoy, A. M. *et al.* Recurrence and Mortality Risk of Merkel Cell Carcinoma by Cancer Stage and Time From Diagnosis. *JAMA Dermatol* **158**, 382–389 (2022).
66. Lewis, C. W. *et al.* Patterns of distant metastases in 215 Merkel cell carcinoma patients: Implications for prognosis and surveillance. *Cancer Medicine* **9**, 1374–1382 (2020).
67. Harms, K. L. *et al.* Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System. *Ann Surg Oncol* **23**, 3564–3571 (2016).
68. Yaghi, M. *et al.* Merkel cell carcinoma: Epidemiology, disease presentation, and current clinical practice outcomes. *JAAD International* **9**, 128–136 (2022).
69. Brohl, A. S. & Sondak, V. K. Neoadjuvant Checkpoint Inhibitor Therapy for Merkel Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* **38**, 2471–2475 (2020).
70. Vilasi, S. M. *et al.* ATOH1, TFAP2B, and CEACAM6 as Immunohistochemical Markers to Distinguish Merkel Cell Carcinoma and Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **16**, 788 (2024).

71. Hobbs, M. M., Geers, T. E., Brown, T. S. & Malone, J. C. Triple collision tumor comprising Merkel cell carcinoma with an unusual immunophenotype, squamous cell carcinoma in situ, and basal cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology* **47**, 764–767 (2020).
72. Karpinski, P. et al. POU4F3 Is a Sensitive and Specific Marker of Merkel Cell Carcinoma. *Modern Pathology* **38**, 100627 (2025).
73. Kervarrec, T. et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* **32**, 1605–1616 (2019).
74. Gonzalez, L., Rubens, M., Yarlagadda, S., Rabinowits, G. & Kalman, N. S. Hypofractionated versus standard fractionation radiotherapy for merkel cell carcinoma. *Radiation Oncology* **19**, 142 (2024).
75. D'Angelo, S. P. et al. First-line avelumab treatment in patients with metastatic Merkel cell carcinoma: 4-year follow-up from part B of the JAVELIN Merkel 200 study. *ESMO Open* **9**, (2024).
76. Nghiem, P. et al. Durable Tumor Regression and Overall Survival in Patients With Advanced Merkel Cell Carcinoma Receiving Pembrolizumab as First-Line Therapy. *JCO* **37**, 693–702 (2019).
77. Commissioner, O. of the. FDA approves first treatment for rare form of skin cancer. (2020).
78. Kaufman, H. L. et al. Updated efficacy of avelumab in patients with previously treated metastatic Merkel cell carcinoma after ≥ 1 year of follow-up: JAVELIN Merkel 200, a phase 2 clinical trial. *J Immunother Cancer* **6**, 7 (2018).
79. Research, C. for D. E. and. FDA approves pembrolizumab for Merkel cell carcinoma. *FDA* (2019).
80. Nghiem, P. et al. Three-year survival, correlates and salvage therapies in patients receiving first-line pembrolizumab for advanced Merkel cell carcinoma. *J Immunother Cancer* **9**, e002478 (2021).
81. Bradford, D. et al. FDA Accelerated Approval of Pembrolizumab for Recurrent Locally Advanced or Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *The Oncologist* **25**, e1077–e1082 (2020).
82. Research, C. for D. E. and. FDA grants accelerated approval to retifanlimab-dlwr for metastatic or recurrent locally advanced Merkel cell carcinoma. *FDA* (2024).
83. Grignani, G. et al. 545 A phase 2 study of retifanlimab in patients with advanced or metastatic merkel cell carcinoma (MCC) (POD1UM-201). *J Immunother Cancer* **9**, (2021).
84. Topalian, S. L. et al. Neoadjuvant Nivolumab for Patients With Resectable Merkel Cell Carcinoma in the CheckMate 358 Trial. *JCO* **38**, 2476–2487 (2020).
85. Yarchoan, M., Hopkins, A. & Jaffee, E. M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* **377**, 2500–2501 (2017).
86. Groelly, F. J., Fawkes, M., Dagg, R. A., Blackford, A. N. & Tarsounas, M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* **23**, 78–94 (2023).
87. Bachiri, K. et al. DNA Damage Stress Control Is a Truncated Large T Antigen and Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2–Dependent Central Feature of Merkel Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* **145**, 400–410.e4 (2025).

88. Bruyere, D. *et al.* Human papillomavirus E6/E7 oncoproteins promote radiotherapy-mediated tumor suppression by globally hijacking host DNA damage repair. *Theranostics* **13**, 1130–1149 (2023).
89. Wu, J. H. *et al.* Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Induces DNA Damage Response. *Intervirology* **62**, 96–100 (2019).
90. Laurini, E. *et al.* Role of Rad51 and DNA repair in cancer: A molecular perspective. *Pharmacology & Therapeutics* **208**, 107492 (2020).
91. Ahmed, M. M., Rivas, H. G., Frost, T. C. & DeCaprio, J. A. Distinct Radiation Responses in Virus-Positive and Virus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* **143**, 166-169.e5 (2023).
92. Louis, N., Eveleigh, C. & Graham, F. L. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**, 423–429 (1997).
93. Arroyo, M. & Raychaudhuri, P. Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Res* **20**, 5947–5954 (1992).
94. Zamanian, M. & La Thangue, N. B. Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from repressing the activity of a cellular transcription factor. *EMBO J*
95. Chteinberg, E. *et al.* The significance of PAX5 in Merkel cell carcinoma. *The Journal of Pathology* **n/a**,.
96. Goh, G. *et al.* Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget* **7**, 3403–3415 (2015).