

L'expression de la désaminase de cytosine de l'ADN Apobec3B est induite par les adénovirus

Auteur : Lejeune, Noémie

Promoteur(s) : Willems, Luc; Gillet, Nicolas

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3027>

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.

L'EXPRESSION DE LA DÉSAMINASE DE CYTOSINE DE L'ADN APOBEC3B EST INDUITE PAR LES ADÉNOVIRUS

NOÉMIE LEJEUNE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

**PROMOTEUR : LUC WILLEMS
CO-PROMOTEUR : NICOLAS GILLET**

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique ¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ L'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT (Luc Willems)

L'EXPRESSION DE LA DÉSAMINASE DE CYTOSINE DE L'ADN APOBEC3B EST INDUITE PAR LES ADÉNOVIRUS

NOÉMIE LEJEUNE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

**PROMOTEUR : LUC WILLEMS
CO-PROMOTEUR : NICOLAS GILLET**

Laboratoire d'accueil

Ce travail de fin d'étude a été réalisé dans le laboratoire d'Epigénétique Cellulaire et Moléculaire du GIGA-Cancer (Grappe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée, Université de Liège).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le Dr Luc Willems, pour m'avoir permise de réaliser mon travail de fin d'étude dans son laboratoire, mais également pour sa confiance, son suivi et ses conseils tout au long de ces 6 mois passionnants. Merci de m'avoir donné la chance de vivre cette fantastique aventure.

Je remercie également mon co-promoteur, le Dr Nicolas Gillet, pour m'avoir intégrée dans son projet de recherche mais également pour son encadrement tout au long de mon mémoire. Merci d'avoir eu confiance en mon travail, d'avoir pris en compte mes suggestions, pour ta contribution à ce travail, tes conseils et tes corrections.

Un tout grand merci également à l'ensemble de l'équipe de recherche, à savoir Hélène, Nathalie, Ludo, Florent, Bernard, Sathya, Pradeep et Vikas pour leurs conseils et leurs encouragements. Je tiens également à les remercier pour les belles discussions qui ont accompagné mon travail.

Je remercie également mes co-mémorants, Clothilde et Sandy, pour le soutien et les conseils mutuels.

Merci à mes parents et à ma petite sœur qui ont cru en moi, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études universitaires. Merci de m'avoir supportée, même dans les moments les plus difficiles.

Je tiens également à remercier mes amis, Florine, Nico, Virginie, Sandy et Blandine pour leur soutien, leurs encouragements et leurs conseils. Merci également pour tous ces superbes moments partagés ensemble tout au long de notre parcours universitaire.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail de fin d'études, ainsi qu'à la réussite de mes études.

Résumé

Les mutations somatiques, responsables de l'apparition et du développement des cancers, ont de multiples origines (exposition à carcinogène ou infidélité de l'ADN polymérase). On appelle signature mutationnelle l'ensemble des altérations laissées dans le génome par un processus mutationnel. Après celle attribuée à l'âge, la signature mutationnelle la plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs est associée à l'activité désaminase des protéines APOBEC3 (Apolipoprotein B Editing Catalytic subunits 3, A3). Ces enzymes, au nombre de 7 (A3A, B, C, DE, F, G and H) chez l'homme et impliquées dans l'immunité innée antivirale, convertissent la déoxycytidine de l'ADN en uridine. Dans les tumeurs du cou et de la gorge positives aux papillomavirus humains, des mutations attribuées aux A3s sont observées, alors qu'elles sont absentes des tumeurs oro-pharyngées négatives pour ce virus. Cette étude a donc établi un premier lien entre une infection virale et la signature mutationnelle caractéristique des A3s. Bien que ces signatures soient également très répandues dans les cancers du poumon non à petites cellules, aucun lien n'a encore été établi avec une possible infection virale.

Le but de ce travail a donc été d'étudier si certaines souches d'adénovirus (HAdV) fréquemment impliquées dans les infections du système respiratoire inférieur, à savoir l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3, peuvent induire l'expression des enzymes APOBEC3, et plus particulièrement du membre APOBEC3B, au sein de cellules épithéliales pulmonaires. Nous avons mis en évidence que seule l'expression des transcrits A3B est induite par les 3 souches adénovirales dans des cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses A549. Nous avons également détecté l'expression de protéines A3B suite à l'infection par les souches C2 et B3. De manière intéressante, les deux souches virales induisent l'expression de protéines A3B ayant des poids moléculaires légèrement différents. Nous émettons l'hypothèse que cette différence est due à des modifications post-traductionnelles. Bien qu'ils doivent être confirmés par des expériences supplémentaires, ces résultats sont très encourageants et pourraient être le point de départ du premier lien entre infection virale et les mutations associées aux APOBEC3s dans le cancer du poumon non à petites cellules.

Abstract

Somatic mutations, which are responsible for the emergence and development of cancers, have multiple origins, such as the exposition to carcinogenic agents or the DNA polymerase infidelity during replication. After the spontaneous mutations associated with age, the second most prevalent mutational process has been attributed to the deaminase activity of APOBEC3 proteins (Apolipoprotein B Editing Catalytic subunits 3, A3). This family of enzymes, which contains 7 members (A3A, B, C, DE, F, G and H) in humans and involved in innate immune defenses against viruses, converts cytosine bases to uracil in single stranded DNA contexts. Genomic mutations associated with APOBEC3 are observed in human papillomavirus (HPV) positive head and neck squamous cell carcinomas, whereas they are lacking in HPV negative oropharyngeal cancer. This study established the first link between viral infection and APOBEC3-associated mutations. Although these mutations are also common in non-small cell lung cancer, no link has yet been established with a possible viral infection.

The aim of this project was to test whether adenoviral strains (HAdV) frequently involved in lower respiratory tract infections (HAdV-C2, HAdV-C5 and HAdV-B3) induce the expression of APOBEC3 enzymes in pulmonary epithelial cells. We founded that A3B transcripts are the only ones that are upregulated upon adenoviral infection in A549 cancerous pulmonary epithelial cells. We also detected the expression of A3B at the protein level upon infection by the B3 and C2 strains. Very interestingly, the induced A3B proteins showed a slight different molecular weight. We hypothesize that this difference might be caused by different post-translational modifications. Although they must be confirmed by other experiments, these results are very encouraging and may be the starting point for the first link between viral infection and APOBEC3-associated mutation in non-small cell lung cancer.

Liste des abréviations

Abréviation	Nom complet
%	Pourcent
°C	Degré Celsius
μ	Micro
A	APOBEC
A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
AAV	Virus adéno-associé
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AdV	Adénovirus
AID	Désaminase à activation induite
ApoB	Apolipoprotéine B
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAK	BCL-2 antagonist/killer
BAX	BCL-2 associated X-protein
bp	Paire de bases
BSA	Bovine serum albumin
CAR	Coxsackie/Adenovirus receptor
CBNPC	Cancer bronchique à non petites cellules
CBPC	Cancer bronchique à petites cellules
CBX	Chromobox
CCD	charge coupled devices
CTSD	Cathepsin D
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothréitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
eIF	Facteur d'initiation de la traduction
ER	Estrogen receptor
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
FX	Facteur de coagulation X
G	Accélération de la pesanteur
GREB	Gene Regulated By Estrogen In Breast Cancer
h	Heure
HAdV	Adénovirus humain
HBEC3-KT	Human bronchial epithelial cells
HBV	Virus de l'hépatite B
HED	HEPES-EDTA-DTT
HEK 293T	Human embryonic kidney 293T
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His	Histidine
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HPV	Human papillomavirus
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus 1

IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
K	kDa
kb	Kilobase
LTR	Long terminal repeats
M	Milli
M	Molarité
shARN	Short hairpin RNA
MLP	Promoteur tardif majeur
MOI	Multiplicity of infection
N	Nano
NEB	New England Biolabs
NFκB	Nuclear factor kappa B
NHEJ	Jonction des régions non-homologues
nm	Nanomètre
NPC	Nuclear Pore Complex
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction en chaîne par polymérisation
Pen-Strep	Pénicilline-streptavidine
PKR	Protéine kinase R
Pmol	Picomole
pRB	Protéine du rétinoblastome
Pten	Homologue de phosphatase et tensine
RNAse	Ribonucléase
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ta	Température d'appariement
TBE	Tris, Borate, EDTA
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20
TFF1	Trefoil factor 1
Tm	Température de fusion
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UDG	Uracil DNA glycosylase
V	Volt
VA-RNA	Virus associated-RNA
VIH	Virus à immunodéficience humaine
α	Alpha
β	Béta
κ	Kappa

Liste des figures

Figure 1. Inhibition de la réplication virale du VIH par plusieurs APOBEC3s.	5
Figure 2. Régulation de l'expression de gènes ciblés par les récepteurs à œstrogène par APOBEC3B.	6
Figure 3. Désamination de la cytosine en uracile.	6
Figure 4. Conséquences de la désamination de la déoxycytosine en uracile par APOBEC3B.	7
Figure 5. Impact d'APOBEC3B (A3B) sur l'évolution des tumeurs.	9
Figure 6. Induction du cancer du poumon par les dérivés réactifs de l'oxygène.	12
Figure 7. Structure des adénovirus.	14
Figure 8. Structure du génome des adénovirus.	15
Figure 9. Cycle infectieux lytique des adénovirus.	18
Figure 10. Induction et répression de l'apoptose par les oncogènes E1A et E1B lors d'une infection par un adénovirus.	21
Figure 11. Vérification de l'identité des souches virales amplifiées.	33
Figure 12. Illustration de l'infection des cellules A549 par des adénovirus.	35
Figure 13. L'expression des transcrits A3B dans les cellules A549 est induite par des adénovirus. ...	36
Figure 14. L'expression de la protéine A3B est induite dans les cellules A549 infectées par les adénovirus C2 et B3.	37
Figure 15. Identification des variants d'épissage d'A3B exprimés dans des cellules A549.	38
Figure 16. Illustration de l'infection des cellules HBEC3-KT par des adénovirus.	39
Figure 17. L'expression des transcrits A3B dans les cellules primaires HBEC3-KT est induite par l'HAdV-C2 à 48 heures d'infection et par l'HAdV-C5 à 96 heures d'infection.	41
Figure 18. L'expression protéique d'A3B est induite dans les cellules HBEC3-KT par l'HAdV-B3 à 48 heures d'infection.	42
Figure 19. Identification des variants d'épissage d'A3B exprimés dans des cellules HBEC3-KT après infection par des adénovirus.	43
Figure 20. Cartes des plasmides codant pour les gènes précoces E1 des adénovirus.	44
Figure 21. Expression des transcrits A3B dans des cellules HBEC3-KT transfectées par des plasmides d'expression codant pour les gènes précoces E1 des adénovirus.	45
Figure 22. Hypothèse quant à la combinaison de l'induction des dommages à l'ADN et l'expression d'APOBEC3.	50

Listes des tableaux

Tableau 1. Paramètres de la qPCR utilisée pour estimer le titre des adénovirus.	23
Tableau 2. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier les régions codant pour un fragment du gène fiber et les boucles 1 et 2 des hexons des HAdV-C2, HAdV-C5 et HAdV-B3.	24
Tableau 3. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier les gènes précoces de l'HAdV-C2, l'HAdV- C5 et l'HAdV-B3.	25
Tableau 4. Paramètres de la RT-qPCR utilisée pour quantifier l'expression d'A3B au niveau de l'ARN messenger.	27
Tableau 5. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier certaines régions d'ADNc correspondant aux transcrits A3B.	27

Table des matières

Introduction.....	1
1. APOBEC3B	2
1.1. Introduction.....	2
1.2. Description de la famille APOBEC.....	2
1.3. Activité antivirale.....	4
1.4. Implication d'APOBEC3B dans la régulation des gènes.....	5
1.5. Conséquences de l'activité désaminase sur le génome cellulaire	6
1.6. Intérêt thérapeutique potentiel	8
2. Cancer du poumon non à petites cellules	10
2.1. Introduction.....	10
2.2. Epidémiologie.....	10
2.3. Causes du cancer du poumon	11
2.4. Lien entre APOBEC et le cancer du poumon à non petites cellules	12
3. Adénovirus humains.....	13
3.1. Introduction.....	13
3.2. Description générale	14
3.3. Epidémiologie.....	16
3.4. Cycle infectieux lytique.....	16
3.5. Mécanismes de défenses du système immunitaire cellulaire	19
3.6. Oncogènes.....	20
Matériel et méthodes.....	22
1. Lignée et culture cellulaire	22
2. Amplification des adénovirus.....	22
2.1. Amplification	22
2.2. Titration par qPCR	23
3. Génotypage des adénovirus.....	23
4. Clonage des gènes précoces d'adénovirus.....	24
5. Analyse de l'expression d'APOBEC3B par RT-qPCR et détermination des variants d'épissage	26
5.1. Extraction de l'ARN des cellules infectées	26
5.2. Extraction de l'ARN des cellules transfectées	26
5.3. Synthèse de l'ADN complémentaire et RT-qPCR.....	27
5.4. Amplification des variants d'épissage par PCR.....	27
6. Analyse de l'expression d'APOBEC3B par Western Blot	28
6.1. Extraction des protéines et dosage	28
6.2. Migration sur gel, transfert sur membrane et révélation	28
7. Test de l'activité de désamination	29

7.1.	Extraction des protéines totales.....	30
7.2.	Réaction de désamination et analyse	30
Résultats		32
1.	Amplification et génotypage des adénovirus.....	32
2.	Induction de l'expression d'APOBEC3B par les adénovirus dans des cellules pulmonaires cancéreuses.....	34
2.1.	Analyse de l'expression d'A3B par RT-qPCR.....	35
2.2.	Analyse de l'expression d'A3B par Western Blot	36
2.3.	Détermination des variants d'épissage d'A3B.....	38
3.	Induction de l'expression d'APOBEC3B par les adénovirus dans des cellules pulmonaires non cancéreuses.....	39
3.1.	Analyse de l'expression d'A3B par RT-qPCR.....	40
3.2.	Analyse de l'expression d'A3B par Western Blot	41
3.3.	Détermination des variants d'épissage d'A3B.....	42
4.	Oncogènes.....	43
4.1.	Clonage des plasmides codant pour les gènes précoces	44
4.2.	Niveaux d'expression des transcrits A3B dans des cellules pulmonaires exprimant des gènes précoces d'adénovirus	45
Perspectives		50
Conclusions.....		51
Références bibliographiques.....		52

Introduction

Les mutations somatiques, responsables de l'apparition et du développement des cancers, ont différentes origines : l'exposition à un carcinogène ou à des radiations telles que les ultraviolets, l'infidélité de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN, une erreur lors de la réparation de l'ADN ou une altération due à une activité enzymatique inappropriée. Afin de mieux comprendre les processus mutationnels, Alexandrov *et al.* (2013) ont analysé plusieurs millions de mutations somatiques retrouvées dans plus de 7000 tumeurs. Cette étude a révélé la présence de 21 signatures mutationnelles distinctes ; une signature étant l'empreinte ou l'ensemble des altérations laissées dans le génome par un processus mutationnel. Après celle associée à l'âge, la signature mutationnelle la plus fréquente a été attribuée à l'activité désaminase de protéines appartenant à la famille APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme subunit 3, A3). Les enzymes de cette famille comptant 7 membres (A3A, B, C, DE, F, G et H) jouent un rôle dans l'immunité innée antivirale en convertissant la déoxycytosine présente dans le génome virale en uracile. De façon intéressante, une signature APOBEC3 est présente dans les tumeurs du cou et de la gorge positives pour le virus HPV (human papillomavirus), alors que cette signature n'a pas été détectée dans les tumeurs oropharyngées négatives pour HPV (Henderson *et al.*, 2014). Cette étude établit donc pour la première fois un lien entre infection virale et la signature mutationnelle attribuée aux APOBEC3s.

La signature mutationnelle APOBEC3 étant très fréquente dans le cancer du poumon non à petites cellules (Alexandrov *et al.*, 2013), nous avons pour objectif de comprendre les événements menant à celle-ci. Dans un premier temps, nous tenterons d'identifier les facteurs induisant l'expression des gènes A3 et en particulier du membre A3B, celui-ci étant surexprimé au niveau transcriptionnel dans les tumeurs pulmonaires (Burns, Temiz, *et al.*, 2013). Comme certaines souches d'adénovirus humains sont fréquemment impliquées dans les infections des voies respiratoires inférieures, ce travail de fin d'étude a pour objectif de tester si l'infection de cellules pulmonaires par des adénovirus induit une augmentation de l'expression des gènes A3B.

1. APOBEC3B

1.1. Introduction

Au cours de l'évolution, les mammifères ont développé une immunité innée antivirale qui comporte notamment la famille des APOBECs (Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme subunit 3, A3). Ces enzymes sont des désaminases de cytosine introduisant des mutations dans les génomes de certains virus exogènes et rétro éléments endogènes. En plus de son activité antivirale, le membre APOBEC3B (A3B) est impliqué dans la régulation de certains gènes en promouvant la transcription de gènes sous le contrôle de récepteurs à œstrogène (Periyasamy *et al.*, 2015a). De récentes études ont également montré d'une part l'implication d'A3B comme source de mutations dans le cas de nombreux cancers et d'autre part l'augmentation significative de son expression dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux, A3B étant le seul membre de la sous-famille A3 à être surexprimé. Bien que ses mécanismes d'expression ne soient pas encore connus, A3B semble être une cible thérapeutique ainsi qu'un outil de pronostic (Harris *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2014).

1.2. Description de la famille APOBEC

La première protéine appartenant à la famille APOBEC a été découverte en 1993 suite à l'identification du responsable du polymorphisme de l'ARN messager (ARNm) de l'apolipoprotéine B (ApoB). Cette protéine, impliquée dans le métabolisme des lipides, cause la désamination de la cytidine en uridine à la position 6666 de l'ARNm d'ApoB et par conséquent a été nommée Apolipoprotein B Editing Enzyme subunit 1 (APOBEC1) en 1995 (Salter *et al.*, 2016).

Chez l'homme, la famille APOBEC est composée de 11 membres : APOBEC1 (A1), désaminase à activation induite (AID), APOBEC2 (A2), APOBEC3 (A-H, A3) et APOBEC4 (A4). Ces protéines ont comme ancêtres communs les gènes d'AID exprimés dans les lymphocytes des poissons primitifs il y a plus de 500 millions d'années. Elles résultent de la duplication des gènes d'AID et ensuite d'A2 chez les poissons osseux, et de la diversification de la structure et de la fonction d'AID (Salter *et al.*, 2016).

Toutes ces enzymes possèdent un ou 2 domaine(s) de désaminase dépendant du zinc et sont par conséquent capables de désaminer l'ADN simple brin. Par exemple, A3B, A3DE, A3F et A3G contiennent 2 domaines de désaminase, contrairement à A1, AID, A3C et A3H qui n'en possèdent qu'un. Bien que les protéines APOBEC partagent une origine commune et une

structure basique homologue, elles possèdent des fonctions différentes. AID, située comme A1 sur le chromosome 12, est impliquée dans la diversification des gènes codant pour les immunoglobulines au travers des processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe. En effet, AID catalyse la désamination de la déoxycytidine, menant à des mutations ponctuelles au niveau de la région du gène variable de l'immunoglobuline au sein des lymphocytes B. Une perte de fonction d'AID peut mener à une immunodéficience appelée syndrome hyper-IgM caractérisé par un taux élevé d'IgM et un manque d'autres immunoglobulines (IgA, IgE, IgG) (Smith *et al.*, 2012).

La sous-famille des A3s, qui est spécifique aux mammifères, est impliquée dans la réponse immunitaire innée antivirale. Ces enzymes sont des désaminases de cytosine introduisant des mutations dans les génomes de certains virus exogènes et rétro éléments endogènes. Les A3s sont au nombre de 1 chez les rongeurs ; 2 chez les cochons ; 3 chez les bovins ; 4 chez les chats ; 6 chez les équidés et 7 chez les primates. La diversité de la sous-famille des A3s est apparue indépendamment chez ces différentes espèces et aurait été entraînée par l'évolution des rétrovirus exogènes et des rétro-éléments endogènes. En effet, l'augmentation du nombre de gènes codant pour les A3s chez l'homme coïncide avec la diminution du nombre de rétro-éléments au sein de son génome. Chez l'homme, les gènes des A3s sont situés sur le chromosome 22 et sont organisés en tandem entre les gènes CBX6 et CBX7, formant le locus CBX6-Z1-Z2-Z3-CBX7. A3G est la première forme d'A3 découverte lors d'études menées sur le VIH-1 (virus à immunodéficience humaine-1). Cette enzyme mute l'ADN complémentaire (ADNc) du VIH, réduisant ou annulant son infectivité. A3F, A3DE et A3H coopèrent avec A3G en désaminant des cytidines au niveau de sites additionnels ou en inhibant la rétrotranscription. A3G, A3F et A3B sont capables d'inhiber le virus de l'hépatite B (HBV) suite à une stimulation par des interférons α (IFN- α). A3A est quant à elle impliquée dans l'inhibition de parvovirus et de virus adéno-associé de type 2 (AAV). De plus, A3DE, A3F, A3H et A3G, qui sont retrouvées dans le cytoplasme, inhibent les rétro-éléments à LTR et les rétro-éléments non-LTR contrairement à A3A, A3B et A3C qui sont capables de bloquer la rétrotranscription des rétro-transposons grâce leur localisation dans le noyau (Salter *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2012).

A2 et A4, respectivement situées sur le chromosome 6 et 1, ont été les dernières protéines de la famille APOBEC à avoir été étudiées car leur expression ne semble pas être liée avec des phénotypes particuliers. Une étude récente suggère que la surexpression d'A2 pourrait muter des gènes codant pour le facteur d'initiation de la traduction 4 γ 2 (eIF4 γ 2) et l'homologue de phosphatase et tensine (Pten), et par conséquent être impliquée dans certains cancers du foie

et du poumon (Okuyama *et al.*, 2012). A4 a quant à elle été découverte par une recherche d'homologie et sa fonction n'a toujours pas été définie. L'étude des cellules germinales embryonnaires suggère cependant que cette protéine est exprimée dans les testicules (LaRue *et al.*, 2009).

Comme les protéines APOBEC ont une structure homologue, peu d'anticorps monoclonaux spécifiques à un membre de la famille ont été développés. Par conséquent, la détection et la quantification individuelles de l'expression de chaque APOBEC3 est difficile au niveau protéique (Michael B. Burns, Brandon Leonard, 2015).

1.3. Activité antivirale

Les A3s interfèrent avec la réplication virale par des mécanismes dépendants ou non de leur activité désaminase. Ces mécanismes impliqués varient en fonction du virus et de son mode de réplication. Ces enzymes agissent au niveau du cycle infectieux de nombreux virus, tels que le VIH, HTLV-1 (human T-lymphotropic virus 1) ou HBV. L'activité des A3s peut conduire à l'inactivation des virus, mais peut également faciliter leur pathogénicité en contribuant à leur évolution (Willems and Gillet, 2015).

Les mécanismes les plus étudiés sont ceux impliqués dans l'inhibition du VIH-1. A3G, A3DE, A3F, A3H coopèrent et inhibent la réplication virale au niveau de plusieurs étapes du cycle infectieux. Lors de l'infection, ces enzymes sont exprimées par des lymphocytes T CD4⁺ et se concentrent pour former des corps P. Ces corps P dégradent l'ARNm simple brin du virus injecté dans la cellule après la fixation du virion sur la membrane cellulaire. A3G inhibe le VIH-1 en introduisant des mutations délétères au sein de son génome. A3F, quant à elle, exerce une inhibition indépendamment de son activité désaminase. En effet, elle bloque la rétrotranscription et interfère avec l'intégration du provirus dans le génome de la cellule. Afin de se protéger, VIH-1 possède une protéine Vif capable d'inhiber A3G, A3F et A3H. Pour ce faire, Vif recrute un complexe ubiquitine ligase cullin5-elonginB/C-Rbx2-CBF E3. Ce complexe polyubiquitine les A3s, menant à leur dégradation et par conséquent empêchant leur conditionnement au sein du virion (Willems and Gillet, 2015).

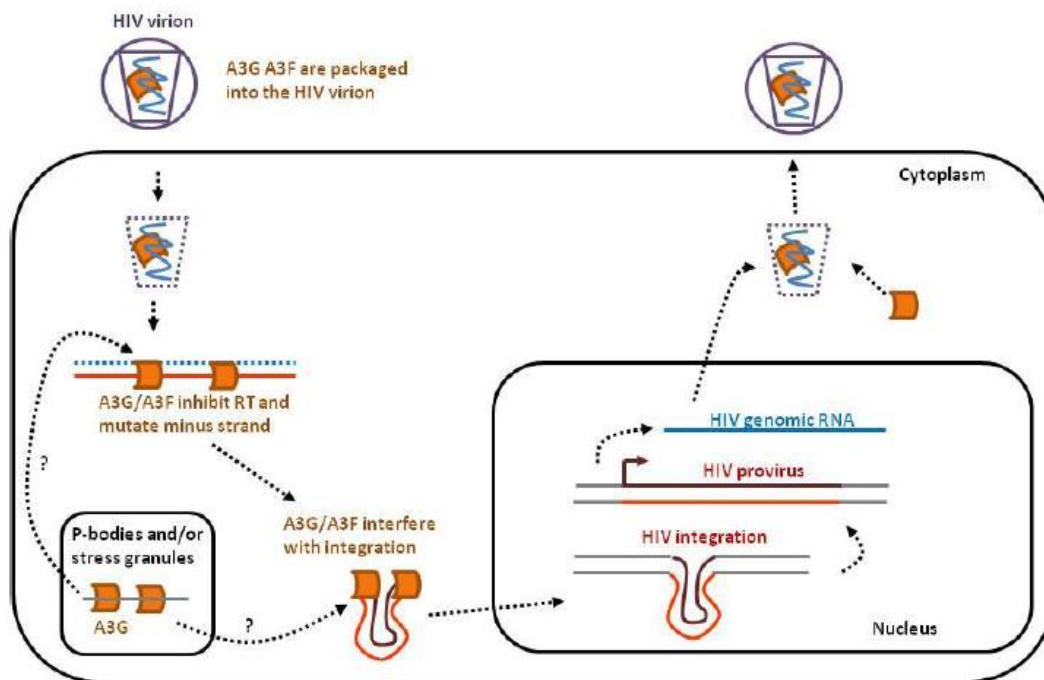


Figure 1. Inhibition de la réplication virale du VIH par plusieurs APOBEC3s. L'ARN simple brin du virus (bleu), injecté dans la cellule après la fixation du virion sur la membrane cellulaire, se trouve en contact avec les corps P contenant A3G et A3F (orange) dans le cytoplasme. A3G et A3F inhibent le VIH en introduisant des mutations, en bloquant rétrotranscription et en interférant avec l'intégration du provirus dans le génome de la cellule. En l'absence des protéines Vif, A3G et A3F sont intégrés dans les virions (Willems and Gillet, 2015).

1.4. Implication d'APOBEC3B dans la régulation des gènes

Periyasamy *et al.* (2015) ont démontré l'implication d'APOBEC3B dans la régulation de gènes ciblés par les récepteurs à œstrogène dans le cas de cancer du sein ER+. En effet, l'étude de plus de 2000 cas de cancers du sein a révélé une corrélation entre l'expression élevée d'A3B et le faible taux de survie de patients atteints du cancer du sein ER+. Le séquençage complet du génome de ces cellules tumorales a montré également la présence de la signature mutationnelle provoquée par l'activité désaminase d'A3B.

Après recrutement par les récepteurs à œstrogène, A3B se fixe au niveau de la région régulatrice des gènes ciblés tels que TFF1, GREB, FOS, CTSD. A3B provoque des mutations de la déoxycytidine vers la déoxyuridine au sein des séquences activatrices de ces gènes. Le clivage de l'uridine par le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base peut causer des cassures double brin de l'ADN. Ces cassures sont reconnues par γ H2AX qui active le mécanisme de jonction des extrémités non-homologues (NHEJ). Les facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN engendrent le remodelage de la chromatine et par conséquent favorisent l'expression des gènes ciblés par les récepteurs à œstrogène.

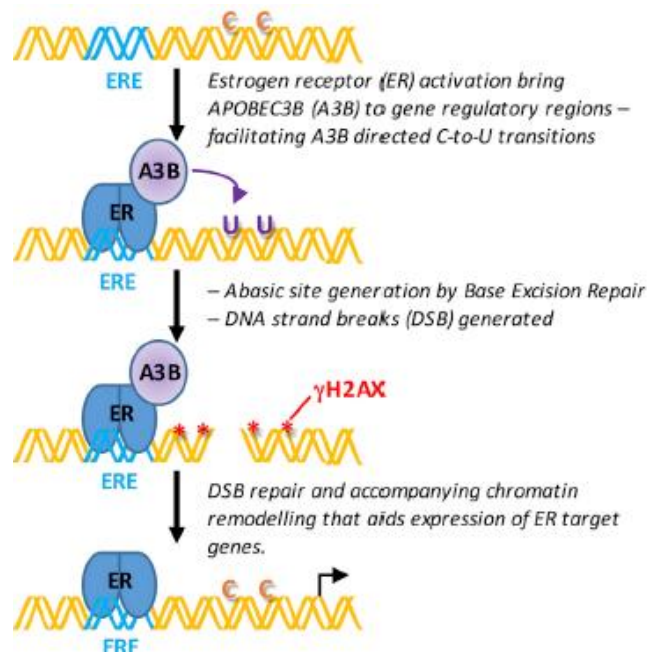


Figure 2. Régulation de l'expression de gènes ciblés par les récepteurs à œstrogène par APOBEC3B. Les récepteurs à œstrogène recrutent A3B au niveau de la région régulatrice des gènes ciblés. A3B provoque des mutations C vers U qui peuvent être clivées par excision de base, générant des cassures double brin de l'ADN. Ces cassures sont reconnues par γ H2AX qui active le mécanisme de jonction des extrémités non-homologues (NHEJ). La réparation de l'ADN engendre le remodelage de la chromatine, favorisant l'expression des gènes ciblés par les récepteurs à œstrogène (Periyasamy *et al.*, 2015b).

1.5. Conséquences de l'activité désaminase sur le génome cellulaire

APOBEC3B est la seule protéine de la famille APOBEC, avec A3A, à être localisée dans le noyau et par conséquent à être en contact avec l'ADN génomique (Michael B. Burns, Brandon Leonard, 2015). En présence d'eau, A3B désamine la déoxycytosine de l'ADN simple brin en uracile ; la désamination consistant à exciser le groupe amine exocyclique, libérant de l'ammoniac.

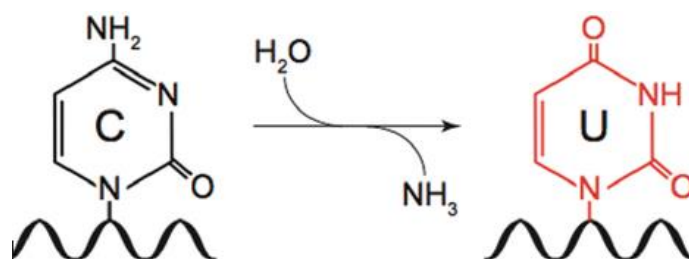


Figure 3. Désamination de la cytosine en uracile. A3 catalyse la désamination de la cytosine en uracile au niveau de l'ADN simple brin. Cette réaction nécessite la présence d'eau et libère de l'ammoniac.

L'uracile peut être excisée par le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base suivie d'une coupure de l'ADN et de la réinsertion du nucléotide correct. Dans le cas

contraire, 3 types de substitution peuvent se produire. Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase considère l'uracile comme de la thymine et insère un A sur le brin complémentaire, conduisant à une transition de C vers T au cycle suivant. Un autre scénario menant à une transition de C vers T est l'excision de l'uracile par l'UDG (uracil-DNA glycosylase) et l'insertion d'un A à l'opposé du site abasique, menant également à une transition C vers T. Le deuxième type de substitution est une transversion de C vers G ou moins fréquemment C vers A, résultant de l'incorporation d'un C ou d'un T par l'ADN polymérase translésionnelle REV à l'opposé d'un site abasique créé par l'UDG. Finalement, une accumulation de coupures au niveau d'un seul ou des deux brins d'ADN peut conduire à des cassures simple ou double brin de l'ADN. Ces cassures peuvent être réparées par recombinaison et mener à des translocations, inversions, insertions, délétions, amplifications et formation de 'kataegis', c'est-à-dire des zones de plusieurs kilobases intensément mutées (Michael B. Burns, Brandon Leonard, 2015; Harris *et al.*, 2015).

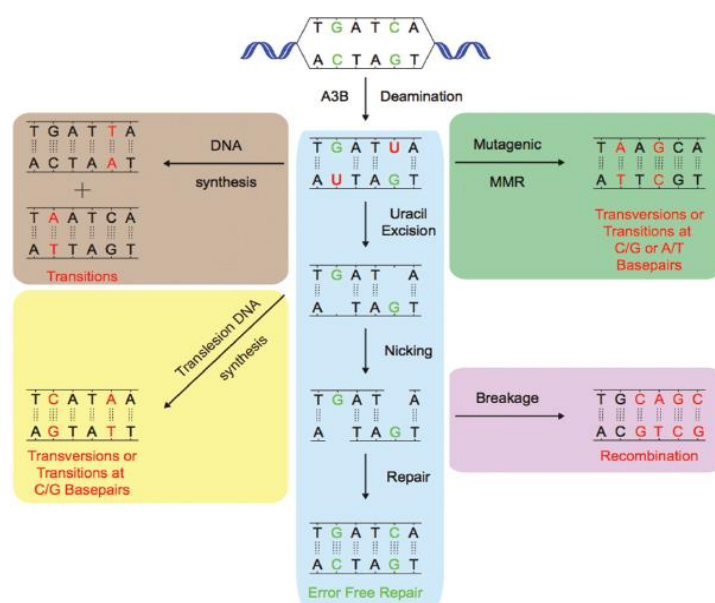


Figure 4. Conséquences de la désamination de la déoxycytosine en uracile par APOBEC3B. Après désamination de la déoxycytosine en uracile par A3B, l'uracile peut être excisé par le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base, suivie d'une coupure de l'ADN et de la réinsertion du nucléotide correct. *A contrario*, 3 types de substitution peuvent se produire. La transition de C vers T est induite par l'insertion d'un A sur le brin complémentaire par l'ADN polymérase ou au niveau d'un site abasique par l'ADN polymérase translésionnelle. La transversion de C vers G ou C vers A résulte de l'incorporation d'un C ou d'un T par l'ADN polymérase translésionnelle REV à l'opposé d'un site abasique. Finalement, l'excision de l'uracile peut conduire à des cassures simple ou double brin de l'ADN réparées par recombinaison (Michael B. Burns, Brandon Leonard, 2015).

La désamination de l'ADN par A3B n'a pas lieu à des positions aléatoires, mais au niveau de motifs spécifiques. A3B cible préférentiellement les cytosines situées au sein d'un motif 5'-TCA-3' et 5'-TCG-3', menant à des signatures mutationnelles caractéristiques. Ces mutations peuvent être regroupées et former des 'kataegis'. La formation de 'kataegis' requière A3B, d'abord pour désaminer une première cytosine pouvant mener à une lésion et ensuite à une cassure simple ou double brin de l'ADN, et ensuite pour désaminer toute une série de cytosines situées sur le brin exposé lors de la réparation de l'ADN (Harris *et al.*, 2015). De plus, Seplyarskiy *et al.* (2016) ont démontré que les mutations induites par A3B se situent préférentiellement sur le brin retardé. Cette observation est expliquée par le fait que le brin retardé reste sous forme simple brin plus longtemps que le brin meneur à cause de sa synthèse discontinue, et est donc accessible plus longtemps malgré la protection par une protéine de réplication A (RPA).

L'activité désaminase d'A3B ne dépend pas uniquement de son niveau d'expression, mais également de la disponibilité de son substrat, l'ADN simple brin. L'ADN se trouve notamment sous cette forme lors de la transcription, la recombinaison et la réplication de l'ADN. Dans ce dernier cas, la quantité d'ADN simple brin est régulée par la stabilité de la fourche de réplication, et cette stabilité peut être rompue par un stress de réplication induit par des drogues ou l'expression d'oncogènes. De plus, l'ADN est exposé sous forme simple brin par la formation de boucles R lors de la transcription ou lors du phénomène appelé la « crise des télomères ». Finalement, l'ADN se retrouve également sous forme simple brin lors des mécanismes de réparation induits par des dommages à l'ADN (Kanu *et al.*, 2016; Waters *et al.*, 2015).

1.6. Intérêt thérapeutique potentiel

Afin de préserver l'intégrité du génome de l'activité désaminase des protéines APOBEC, des mécanismes de régulation de leur expression et leur localisation ont été mis en place en fonction du membre impliqué, des dysfonctionnements pouvant influencer le développement de tumeurs. Par exemple, une surexpression d'AID, d'A1 et d'A2 est respectivement impliquée dans le développement du cancer à lymphocytes B, d'adénocarcinomes œsophagiens, du cancer du foie et du poumon (Salter *et al.*, 2016).

Afin de mieux comprendre les processus mutationnels qui affectent le génome humain, Alexandrov *et al.* (2013) ont analysé plusieurs millions de mutations somatiques retrouvées dans plus de 7000 tumeurs, révélant la présence de 21 signatures mutationnelles distinctes.

Après les mutations spontanées associées à l'âge, le processus mutationnel le plus fréquent est causé par l'activité désaminase des enzymes APOBEC3; cette signature étant retrouvée dans plus de la moitié des types de cancers et dans plus de 16% des tumeurs analysés. Comme A3B est la seule protéine APOBEC à avoir une localisation constitutive dans le noyau, elle semble être la plus encline à muter le génome cellulaire. Ces observations sont soutenues par les études menées par Burns et al. (2013) et Roberts et al., (2013). Ils ont démontré la surexpression de l'ARNm d'A3B dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux dans 6 types de cancers : cancer du cou et de la gorge, du sein, de l'utérus, du poumon et de la vessie. Bien qu'un lien entre A3B et différents cancers a été établi, les mécanismes sont encore peu connus. De récentes études ont démontré l'implication d'A3B dans l'inactivation du suppresseur de tumeur TP53 (Burns, Lackey, *et al.*, 2013b) et la surexpression de PIK3CA (Henderson *et al.*, 2014) ; l'inactivation de TP53 permettant à la cellule de continuer à se diviser malgré les dommages à l'ADN et la surexpression PIK3CA provoquant la prolifération incontrôlée des cellules.

L'activité désaminase d'A3B induit la diversification clonale, contribuant à l'hétérogénéité phénotypique au sein d'une même tumeur ou entre tumeurs de même type chez différents patients. Cette diversité génétique pourrait promouvoir le développement des métastases mais également la récurrence et la résistance des tumeurs aux traitements (Harris *et al.*, 2015). A3B semble donc accélérer l'évolution des tumeurs et définit une nouvelle classe de facilitateur de tumeur. Par conséquent, A3B pourrait constituer une cible thérapeutique d'intérêt, d'abord par sa nature non-essentielle, mais également dans le but de réduire l'évolution des tumeurs et augmenter la durabilité et l'efficacité des traitements existants. De plus, A3B pourrait être utilisé comme un nouveau marqueur de pronostic. La détection des signatures mutationnelles d'A3B et la mesure de son niveau d'expression au niveau de l'ARNm permettraient de classer les tumeurs et d'aider à prédire leur évolution.

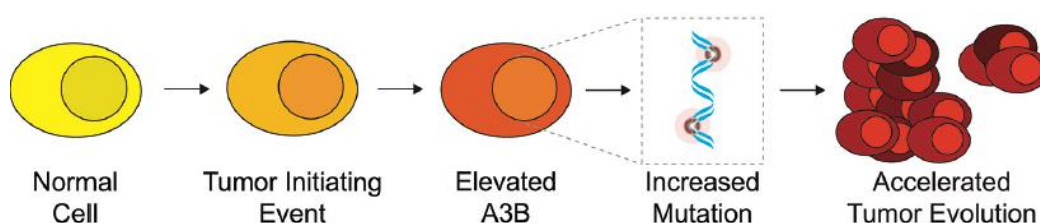


Figure 5. Impact d'APOBEC3B sur l'évolution des tumeurs. L'augmentation de l'expression d'A3B au sein de tissus tumoraux naissant induit l'augmentation du taux de mutations, conduisant à une évolution accélérée des tumeurs (Michael B. Burns, Brandon Leonard, 2015).

2. Cancer du poumon non à petites cellules

2.1. Introduction

Le terme cancer définit un groupe de maladies caractérisé par la multiplication et la prolifération anarchique de cellules anormales au sein d'un tissu normal. Les cancers ont pour origine des mutations au sein du génome. Ces mutations sont causées par des facteurs externes et/ou internes. Les facteurs externes sont liés à l'environnement (rayonnement, pollution), au mode de vie (alimentation, tabagisme, consommation d'alcool) et aux infections (virus). Les facteurs internes sont quant à eux liés au dérèglement du système immunitaire, aux hormones et mutations héréditaires. L'établissement des cellules tumorales dans le corps humain nécessite que ces dernières possèdent et développent des aptitudes précises telles que la résistance à la mort cellulaire, l'induction de l'angiogenèse, la capacité d'évasion et la formation des métastases, l'immortalité, le maintien des signaux de prolifération, le dérèglement du métabolisme cellulaire, la capacité à inhiber les suppresseurs de croissance, l'induction d'une inflammation et l'instabilité du génome (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.2. Epidémiologie

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité liée au cancer au monde. En 2012, il y a eu environ 1 590 000 décès et plus de 1 800 000 nouveaux cas, soit 13% des cancers diagnostiqués, 2/3 étant des hommes. Le nombre de nouveaux cas par an chez les hommes reste stable, tandis qu'il est en croissance chez les femmes, probablement à cause de l'augmentation du tabagisme féminin (Torre et al., 2015). Il existe 2 types principaux de cancer du poumon, à savoir le cancer du poumon non à petites cellules (cancer bronchique non à petites cellules, CBNPC) représentant entre 85% et 90% des cas et le cancer du poumon à petites cellules (CBPC) (10-15%). Le CBNPC est divisé en 3 types en fonction de la localisation de la tumeur: les adénocarcinomes représentant 40% des cas du cancer du poumon, les carcinomes épidermoïdes (25-30%) et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules (10-15%); un carcinome étant un cancer se développant à partir de cellules épithéliales. Les adénocarcinomes sont retrouvés dans les bronches périphériques au niveau des lobes supérieurs et près de la plèvre, tandis que les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules sont respectivement localisés dans les grandes bronches et à l'extérieur des poumons (Calcagno *et al.*, 2015).

2.3. Causes du cancer du poumon

La plus grande cause du cancer du poumon est le tabagisme et concerne 85% des cas, le risque de développer un cancer du poumon augmentant avec la durée du tabagisme. Les fumeurs actifs ne sont pas les seuls à voir le risque de développer un cancer du poumon croître. Le risque augmente de près de 30 % chez les fumeurs passifs régulièrement exposés à la fumée de tabac (Samet *et al.*, 2009). En effet, la combustion du tabac libère plus de 4000 composés, dont certains sont des carcinogènes, tels que les goudrons, le benzopyrène, le polonium, les nitrosamines, les dioxines, etc. Bien que le cancer du poumon soit souvent associé au tabagisme, 15% des patients sont non-fumeurs (Samet *et al.*, 2009), mettant en évidence l'implication d'autres facteurs dans le développement du cancer du poumon. Par son anatomie particulière, la surface entre un poumon humain adulte et l'air est d'environ 140 m² et est par conséquent exposée à plus de 10 000 litres d'air ambiant par jour, mettant cet organe en contact avec un grand nombre de composés et de microorganismes présents dans l'atmosphère. La seconde cause du cancer du poumon est le radon, un gaz radioactif inodore provenant de la désintégration de l'uranium. Ce gaz, libéré par les roches, est naturellement présent dans l'atmosphère et dans l'eau à très faible teneur à cause de sa désintégration rapide. Les autres facteurs à risques sont la pollution de l'air (gaz d'échappement, fumées) et l'exposition répétée à des substances telles que l'amiante ou les goudrons. Il semble également probable que l'alimentation et les infections jouent un rôle dans le développement du cancer du poumon, mais les mécanismes restent encore peu connus (Samet *et al.*, 2009).

L'inhalation d'agents biologiques, chimiques ou physiques peut conduire à la production de dérivés réactifs de l'oxygène connus sous l'acronyme anglais ROS (reactive oxygen species), menant à l'inflammation; des ROS étant des composés chimiques oxygénés et capables d'échanger des électrons libres. Les ROS produits sont capables de directement, ou par le biais de produits de la cascade de signalisation, d'induire l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN. Les radicaux libres hydroxyles oxydent les nucléotides, menant à des insertions, délétions, modifications de bases, translocations, etc. L'oxydation de l'ADN est notamment caractérisée par la présence de la 8-oxoguanine, dont la lecture par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN mène à une transition de G vers T. En plus d'altérer directement l'ADN, les ROS peuvent endommager l'ADN polymérase ou les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. Par conséquent, une inflammation chronique, engendrée par le biais d'agent biologiques, chimiques ou physiques augmente le risque de développer un cancer et peut influencer son évolution (Rosanna and Salvatore, 2012).

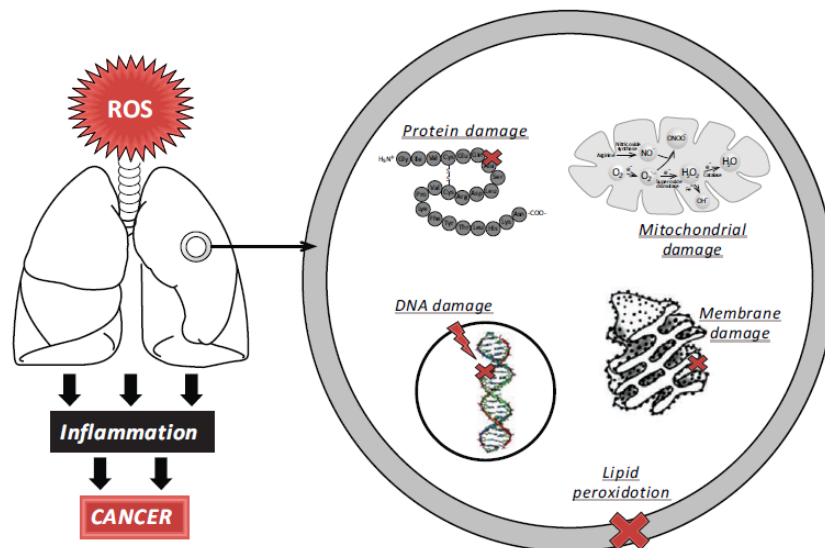


Figure 6. Induction du cancer du poumon par les dérivés réactifs de l'oxygène. Les agents chimiques, physiques et biologiques présents dans l'air sont capables d'induire la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). En plus de l'activation de la cascade de signalisation conduisant à l'inflammation, les ROS endommagent les protéines, les lipides, les mitochondries, les membranes et l'ADN. L'altération de l'ADN peut mener au développement ou l'évolution du cancer du poumon (Rosanna and Salvatore, 2012).

2.4. Lien entre APOBEC et le cancer du poumon à non petites cellules

Bien que ces 2 types de cancer touchent le même organe, le cancer du poumon à petites cellules (CBPC) et celui du cancer du poumon à non petites cellules (CBNPC) possèdent des profils mutationnels différents au sein de leur génome. Le CBPC présente principalement des signatures mutationnelles associées au tabagisme, tandis que celles du CBNPC sont liées à l'âge, au tabagisme et à l'activité désaminase des enzymes APOBEC. Les signatures mutationnelles d'A3B sont retrouvées dans environ 35% des tumeurs de carcinomes épidermoïdes et 25% des adénocarcinomes (Alexandrov *et al.*, 2013). De plus, l'étude des mutations au niveau des tumeurs du poumon chez les fumeurs et anciens fumeurs a révélé qu'au fur et à mesure du développement du CBNPC, les mutations C vers T associées aux APOBEC3s augmentent par rapport aux mutations C vers A associées au tabagisme. En effet, au début de la formation du cancer, 11% des mutations non silencieuses sont causées par les enzymes APOBEC3, alors qu'elles atteignent 31 % dans les stades plus avancés (de Bruin *et al.*, 2015). En plus des signatures mutationnelles au sein de son génome, l'analyse des adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes a révélé l'augmentation significative de l'expression des transcrits A3B au sein des tumeurs par rapport aux tissus non cancéreux (Burns, Temiz, *et al.*, 2013).

Les mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression d'A3B et de l'apparition des mutations induites au sein des tumeurs pulmonaires non à petites cellules sont encore inconnus. Un premier lien entre infection virale et signature mutationnelle associée aux A3s a été établi dans le cancer du cou et de la gorge. En effet, une signature APOBEC3 est présente dans les tumeurs du cou et de la gorge positives pour le virus HPV. Au contraire, cette signature n'a pas été détectée dans les tumeurs oro-pharyngées négatives pour HPV (Henderson *et al.*, 2014). L'implication d'autres infections virales persistantes dans la genèse de la signature mutationnelle APOBEC3 a été proposée. Par exemple le polyomavirus humain BKPyV est capable d'induire l'expression d'A3B, et un lien a été établi entre ces virus et l'occurrence des tumeurs reno-urinaires (Verhalen *et al.*, 2016). Cette surexpression est également retrouvée dans les cancers oro-pharyngés (Henderson *et al.*, 2014) et du col de l'utérus positifs à HPV (Vieira *et al.*, 2014; Mori *et al.*, 2017). Il semble donc envisageable que l'induction de l'expression d'A3B dans les tumeurs du CBNPC puisse être causée par un virus capable d'infecter les voies respiratoires inférieures. Pour la suite de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux adénovirus appartenant aux sous-groupes B et C.

3. Adénovirus humains

3.1. Introduction

Les adénovirus humains, des virus ubiquitaires de notre environnement, sont associés à toute une série de maladies, telles que des infections des voies respiratoires inférieures et supérieures, des gastroentérites, des conjonctivites et des cystites hémorragiques. Ces infections n'entraînent généralement pas de complications, sauf chez les personnes immunodéprimées. Ces virus, au cycle infectieux lytique, c'est-à-dire qu'ils entraînent la lyse de la cellule après la réplication virale, ont développé des mécanismes afin d'optimiser la réplication virale et contrecarrer les défenses immunitaires de l'hôte. Ces mécanismes sont mis en place par des protéines associées aux gènes précoces, à savoir E1, E2, E3 et E4. Une caractéristique intéressante des adénovirus est qu'ils possèdent des oncogènes; i.e. des gènes capables de transformer des cellules normales en cellules cancéreuses. Ces oncogènes jouent des rôles essentiels, notamment dans la réplication virale, la modulation du système immunitaire cellulaire et l'inhibition de l'apoptose.

3.2. Description générale

Les adénovirus appartiennent à la famille des *Adenoviridae* qui compte 5 genres (*Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* and *Ichtadenovirus*). Ces virus sont capables d'infecter les 5 classes majeurs des vertébrés, à savoir les mammifères, les oiseaux, les amphibiens, les reptiles et les poissons (Genus *et al.*, 2012). Les adénovirus seraient apparus il y a plus de 400 millions d'années lors du début de la différenciation des vertébrés (Kumar and Hedges, 1998). D'après des analyses phylogénétiques et génomiques, les adénovirus auraient une origine commune avec les phages d'entérobactéries de la famille des *Tectiviridae* et auraient ensuite co-évolué avec leurs hôtes (Harrach and Benkö, 2003).

Les adénovirus humains (HAdV) appartiennent au genre des *Mastadenoviridae* et ont été découverts en 1953 par Wallace P. Rowe. Plus de 70 génotypes d'adénovirus humains, répartis en 50 sérotypes, ont été répertoriés et classés en 7 sous-groupes (A-G) en fonction de leur lien phylogénétique, leur structure, leurs propriétés biologiques et immunochimiques, etc. Ces virus, non enveloppés et à ADN double brin linéaire, possèdent une capsidie icosaédrique composée de 252 capsomères, soit 240 hexons et 12 pentons (respectivement de structure hexa- et pentagonale), et un diamètre d'environ 90 nm. Les pentons sont prolongés par une fibre de longueur variable présentant à son extrémité un domaine globulaire. La capsidie est également composée de polypeptides impliqués dans la stabilisation de la capsidie et la liaison de l'ADN.

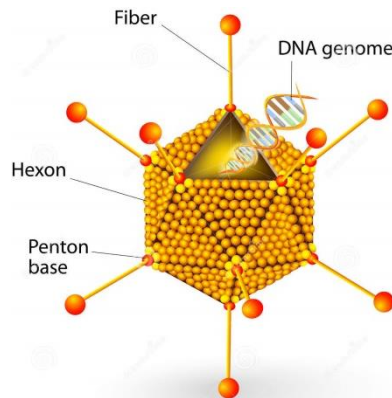


Figure 7. Structure des adénovirus. Les adénovirus sont formés d'une capsidie icosaédrique de 252 capsomères (240 hexons et 12 pentons). Ils possèdent un ADN double brin linéaire d'une longueur d'environ 36 kb.

Le génome des adénovirus humains a une longueur d'environ 36 kb et possède aux extrémités des séquences terminales inversées de 100-140 paires de bases (bp) servant d'origine de réplication. Le génome est subdivisé en unités transcriptionnelles précoces et tardives. Les gènes précoces, à savoir E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4, sont impliqués dans la

transformation des cellules, l'établissement d'une importante réplication virale et de la latence des virus dans les cellules infectées. Les régions E1A et E1B sont les premières à être transcrites et sont principalement impliqués dans la transactivation de la transcription virale et cellulaire. Elles jouent également un rôle dans la transformation des cellules et la préparation de la synthèse de l'ADN viral. Les régions E2A et E2B codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN des adénovirus, telles que l'ADN polymérase, la primase et des protéines de liaison à l'ADN. Les régions E3 et E4 jouent un rôle dans la suppression des mécanismes de défense de la cellule, la régulation de la transcription et le transport de l'ARNm viral. Les régions tardives (L1-L5) codent quant à elles pour des protéines impliquées dans la structure et l'assemblage des virions (Russell *et al.*, 2004; Philipson, 1995). Contrairement aux gènes précoces dont la synthèse commence au niveau de 6 promoteurs différents, la transcription de la majorité des gènes tardifs est initiée au niveau d'un promoteur tardif majeur (major late promoter MLP). L'épissage alternatif et la polyadénylation du long transcrit synthétisé à partir du MLP entraîne la formation de 5 familles de transcrits (L1-L5). Les ARNs associés au virus (VA RNA), qui ne codent pas pour des protéines, sont quant à eux impliqués dans l'inhibition des interférons.

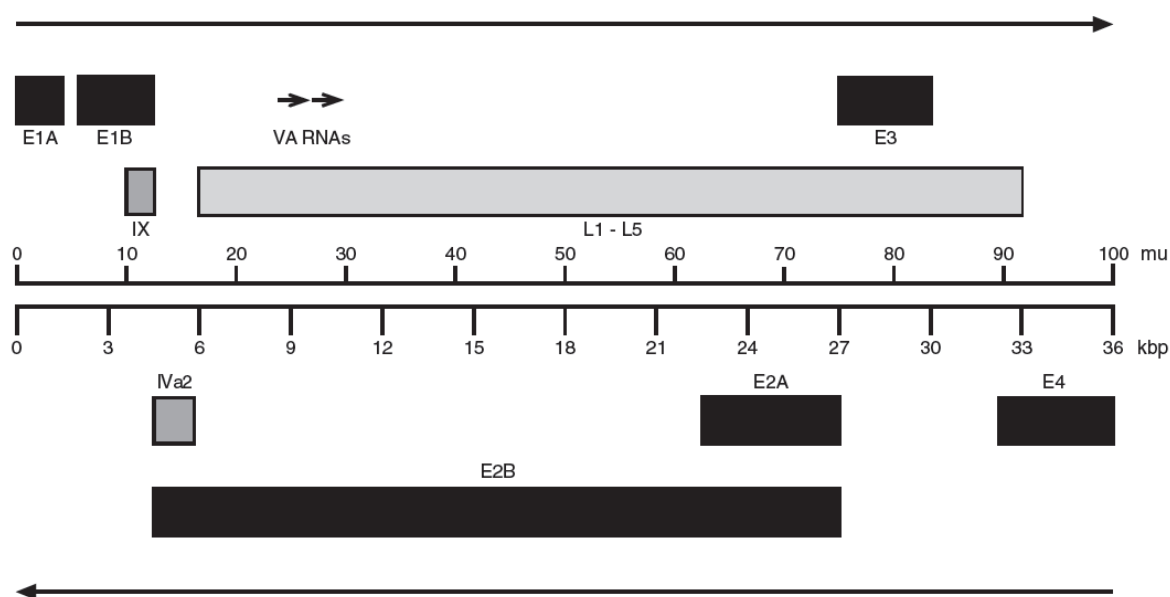


Figure 8. Structure du génome des adénovirus. Le génome des adénovirus humains est composé d'unités transcriptionnelles précoces et tardives. Les gènes précoces (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4), représentés par les cases noires, sont impliqués dans les processus liés à l'infection virale. Les gènes tardifs (L1-L5) sont quant à eux représentés par les cases gris claires et sont impliqués dans l'assemblage et la structure des virions. Les flèches représentent le sens de la transcription (Russell *et al.*, 2004).

3.3. Epidémiologie

Les infections causées par les adénovirus sont fréquentes au sein de la population humaine, particulièrement chez les enfants, et touchent toutes régions du monde. Quatre-vingt à 90% de la population sub-saharienne possèdent des anticorps anti-adénovirus, tandis que ce chiffre s'élève entre 30 et 70% en Europe et en Amérique du Nord (Grosso *et al.*, 2017). Les adénovirus sont présents toute l'année dans l'environnement, avec une hausse de leur dissémination à la fin de l'hiver et au début du printemps. Les épidémies causées par ces virus sont rares, bien qu'elles soient plus fréquentes dans les zones confinées, telles que dans les hôpitaux et les casernes militaires. La transmission se fait par voie respiratoire ou oro-fécale, suivie d'une période d'incubation de 2 à 14 jours. Malgré que les adénovirus infectent une variété d'espèces, aucune zoonose n'a encore été répertoriée.

Cinquante-cinq pourcents des infections adénovirales sont subcliniques, c'est-à-dire qu'elles ne se manifestent pas par des symptômes, malgré leurs détections sérologiques et virologiques possibles. Dans le cas contraire, les adénovirus sont à l'origine de légères maladies associées aux voies respiratoires inférieures et supérieures, telles que des trachéites et des bronchites. Les adénovirus peuvent également provoquer des conjonctivites, des gastro-entérites et des cystites hémorragiques. De plus, certains sérotypes infectent spécifiquement un tissu, tandis que d'autres sont capables d'en infecter plusieurs (Berger, 2017). Les HAdVs des sous-groupes B, C et E infectent le système respiratoire, tandis que ceux des sous-groupes F et G touchent le système gastro-intestinal (Cook and Radke, 2017). Les conjonctivites sont quant à elle causées par les HAdVs appartenant aux sous-groupes B et D. La grande majorité des infections n'entraînent pas des complications, hormis chez les enfants et les personnes immunodéprimées. Ces derniers peuvent souffrir de maladies plus sévères, telles que les pneumonies, hépatites et myocardites pouvant être fatales (Eckstein *et al.*, 2010).

3.4. Cycle infectieux lytique

La première étape de l'infection par les adénovirus consiste en l'interaction du domaine globulaire des fibres virales avec des récepteurs appartenant à la famille des immunoglobulines, les récepteurs à coxsackie et adénovirus (CAR). La majorité des sous-groupes d'adénovirus humains se fixe sur les récepteurs CAR, sauf le sous-groupe B qui interagit avec une protéine régulatrice du système du complément CD46. L'étape suivante est l'internalisation des virions et leur pénétration dans la cellule par endocytose. En effet, l'attachement des fibres virales aux récepteurs CAR entraîne un changement de conformation

du motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) situé au niveau de la base du penton des AdVs. Ce motif est dès lors capable d'interagir avec la fibronectine/vitronectine liant des intégrines alpha V-béta 3/5 au niveau de la membrane cellulaire, induisant l'entrée des adénovirus par endocytose médiée par les clathrines. Une fois à l'intérieur de l'endosome, le démantèlement séquentiel de la capside virale débute par la perte des fibres et la dissociation de la base des pentons et des hexons. Ces désagréations sont accompagnées de la dissociation des protéines IIIa, VI, VIII et IX, dont le rôle est de stabiliser la capside. L'exposition de la protéine VI à l'extérieur de la capside joue un rôle très important dans le cycle infectieux des AdVs. Cette protéine provoque la destruction de la membrane des endosomes menant à la libération des virions possédant une capside partiellement dissociée (Nemerow and Stewart, 2016). Les capsides partiellement dissociées sont transportées jusqu'au complexes poreux nucléaires (NPC) par des microtubules via un transport dépendant de protéines motrices appelées dynéines. Le contact entre la capside partiellement dissociée et le noyau est médiée par la nucléoporeine Nup214. Ensuite, la kinésin-1 est activée par Nup238 et fournit la force nécessaire pour complètement dissocier la capside et libérer l'ADN viral. Les protéines V et VII liant directement l'ADN virale, seraient quant à elles les dernières à être dissociées avant l'entrée de l'ADN dans le noyau. Cet ADN pénètre ensuite dans le noyau via des facteurs de transport cellulaire tels que des importines et transportines (Greber, 2016). La perte des protéines V et VII permet la formation de nucléosomes suite à l'interaction entre l'ADN viral et les histones (Greber, 1998). L'efficacité des mécanismes d'internalisation et de pénétration dans le noyau permet que 50% de l'ADN viral soit pénétré dans le noyau 30 minutes après l'internalisation (Philipson, 1995).

Une fois que l'ADN viral est rentré dans le noyau de la cellule infectée, la phase de transcription des gènes viraux précoces commence. Le premier gène précoce à être transcrit code pour les protéines E1A dont le rôle majeur est la transactivation d'autres gènes viraux et cellulaires. Elles sont également impliquées dans la transformation des cellules et l'induction de la synthèse de l'ADN viral. Ensuite, la synthèse des protéines E1B permet d'inhiber l'apoptose induite par la présence des protéines E1A et d'inactiver certaines réactions immunitaires antivirales. Les protéines E3 sont également capables de bloquer les réponses antivirales en inhibant l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de classe I et celle des ligands liant les récepteurs des cellules NK (Cook and Radke, 2017). Lorsque l'ADN viral est synthétisé en quantité suffisante grâce aux protéines E2, la seconde phase du cycle de l'infection virale commence. Les gènes retardés sont transcrits à partir du promoteur retardé majeur, donnant 18 variants d'épissage répartis en 5 familles (L1-L5). Ces protéines sont impliquées dans la formation de la capside virale et l'assemblage des virions.

Lorsque ces protéines ont été synthétisées en quantité suffisante, la troisième et dernière phase de l'infection virale, correspondant à l'assemblage des virions, débute. Tout d'abord, une capside vide est formée à partir des hexons, des bases des pentons, des fibres virales et des précurseurs des protéines pIIIa, pVI, pVII et pVIII. L'étape suivante de l'assemblage est le packaging et l'insertion de l'ADN viral au sein de la capside. Ensuite, les précurseurs des protéines sont clivés par les protéases de cystéine virales pour former des protéines fonctionnelles menant à la maturation des virions. Une fois leur assemblage et maturation terminés, les virions sont libérés lors de la lyse de la cellule (Greber, 1998; Philipson, 1995)

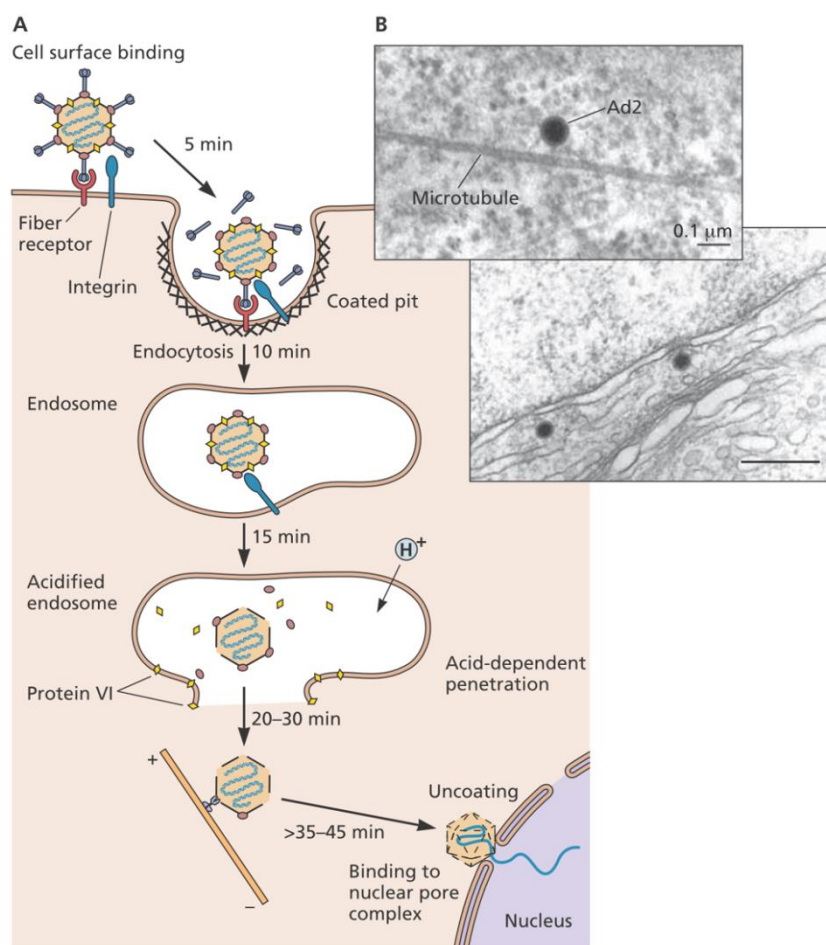


Figure 9. Cycle infectieux lytique des adénovirus. **A.** Les fibres des adénovirus (Ad) interagissent avec des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire, entraînant l'internalisation des virus dans la cellule par voie endocytaire médiée par la clathrine. Au sein de l'endosome, la capside se désassemble progressivement. Les fibres, les pentons, les hexons et les protéines de structure se dissocient de la capside. La dissociation partielle de la capside est accompagnée de la destruction de la membrane de l'endosome par l'action de la protéine VI, permettant la libération des virions dans le cytoplasme. Les virions partiellement dissociés sont ensuite transportés par des microtubules jusqu'au complexes poreux nucléaires. Une fois l'ADN viral au sein du noyau, les gènes précoces et ensuite les gènes tardifs sont transcrits et les protéines correspondantes sont synthétisées. Lorsque l'ADN viral et les protéines formant la capside ont été produits en quantité suffisante, les virions sont assemblés, maturés et finalement libérés de la cellule après sa lyse. **B.** Illustration du transport des adénovirus partiellement dissociés le long des microtubules (Flint *et al.*, 2015).

Une des conséquences de l'infection des cellules est l'arrêt de la synthèse des protéines de la cellule afin de favoriser la production de protéines virales. En effet, le transport de l'ARNm cellulaire dans le cytoplasme est bloqué via un complexe entre les protéines virales E1B-55K et E4ORF6 et la synthèse des protéines virales par les ribosomes est favorisée (Russell *et al.*, 2004).

3.5. Mécanismes de défenses du système immunitaire cellulaire

Afin de s'opposer à une infection virale, la cellule possède des mécanismes destinés à détecter une invasion et à éliminer le pathogène. L'activation du système immunitaire par les adénovirus engendre toute une série d'étapes : l'activation de l'état pro-inflammatoire, le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site d'infection et l'alerte des cellules voisines.

Les HAdVs sont détectés par le système immunitaire dès leur entrée dans le système sanguin. En effet, les HAdVs interagissent avec des facteurs sanguins, tels que le facteur de coagulation X (FX), des anticorps et les protéines du complément C3 et C4. Ces interactions activent le système immunitaire via les cascades de signalisation dépendantes de NF κ B (nuclear factor-kappa B), menant à la libération de cytokines dans le système sanguin telles que l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), caractéristiques d'un état pro-inflammatoire. De plus, les macrophages retrouvés au niveau de tous les organes constituent la première ligne de défense contre les HAdVs. La phagocytose des HAdVs par les macrophages est suivie la libération de cytokines et de chimiokines, telles que l'interleukine-1 α (IL-1 α) et l'IL-1 β . Le rôle des cytokines et chimiokines est de recruter les granulocytes, monocytes et lymphocytes au niveau du site d'infection (Atasheva and Shayakhmetov, 2016). De plus, les acides nucléiques viraux sont reconnus par des récepteurs RIG-I, MDA5, and TLR3 qui activent le système immunitaire en induisant l'expression d'interférons de type 1, eux-mêmes activant la synthèse de protéines antivirales. La protéine kinase R (PKR) possède 2 domaines liant l'ARN double brin viral. Cette kinase, une fois activée par dimérisation, phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , menant à l'arrêt de la synthèse des protéines virales (Launer-Felty *et al.*, 2015). Le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) se lie quant à lui au niveau des extrémités de l'ADN double brin viral et active les mécanismes de réparation de l'ADN, entraînant l'arrêt de la réplication virale sans interférer avec le cycle cellulaire. Les cellules voisines sont alertées de la présence d'un pathogène par les cellules infectées. Ces dernières libèrent des interférons (IFN) de type I, tels que l'IFN α et l'IFN β , dont le rôle est d'activer

l'expression de gènes antiviraux afin de préparer les cellules voisines à une tentative d'infection virale (Atasheva and Shayakhmetov, 2016).

3.6. Oncogènes

Bien que la surexpression d'APOBEC3B soit observée dans de nombreux cancers, le mécanisme d'induction reste encore inconnu. Vieira et al. (2014) ont été les premiers à faire le lien entre l'augmentation de l'expression d'A3B et une infection par HPV. Ils ont démontré que les oncogènes E6 d'HPVs à haut risque, c'est-à-dire qui sont responsables du développement de cancers, sont capables d'induire à eux seuls la surexpression d'A3B, contrairement aux oncogènes E6 d'HPVs à faible risque. D'autres études ont contribué à la compréhension de l'induction de l'expression d'A3B par E6 en démontrant l'activation du promoteur d'A3B par E6 via les facteurs de transcription TEAD (Mori *et al.*, 2017).

Comme HPV, les adénovirus possèdent plusieurs oncogènes, dont E1A et E1B. Le gène E1A est le premier à être transcrit après l'infection virale. Il code pour plusieurs protéines essentielles pour la réplication virale et la reprogrammation du fonctionnement de la cellule hôte. L'épissage du transcrit primaire d'E1A donne 5 variants: 13S, 12S, 11S, 10S et 9S; les 13S et 12S étant les plus fréquents. Comme E1A ne possède pas la capacité de directement lier l'ADN, il interagit avec des molécules cellulaires afin de moduler leur activité ou d'avoir accès aux promoteurs ou régions régulatrices. L'extrémité N-terminale d'E1A pousse le cycle cellulaire en phase S notamment en liant le suppresseur de tumeur pRb (retinoblastoma protein). Cette interaction empêche la formation du complexe E2F-pRb, stimulant l'expression des gènes en phase G₀ et G₁ (Lang and Hearing, 2003). E1A est également impliqué dans diverses fonctions, telles que la transactivation d'autres gènes viraux, la reprogrammation de la transcription de gènes cellulaires, l'immortalisation et la transformation de cellules, la répression de la transcription de gènes cellulaires (Frost *et al.*, 2017). De plus, E1A a la capacité d'inhiber le système immunitaire cellulaire en inhibant la transcription de facteurs pro-inflammatoires dépendant de NFκB et de gènes stimulés par des interférons (Cook and Radke, 2017). E1A induit également une réponse de dommages à l'ADN, menant à l'activation de l'apoptose dépendant ou indépendant du suppresseur de tumeur p53. L'activation de l'apoptose indépendant de p53 est causée par la dégradation de la protéine anti-apoptotique MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia), conduisant à la libération de la protéine pro-apoptotique BAK (BCL-2 antagonist/killer) du complexe BAK-MCL-1 (White, 2006; Tarakanova and Wold, 2010).

Le gène E1B code pour 2 variants: les variants E1B-19kDa (K)/20K/21K en fonction du sous-groupe d'adénovirus et E1B-55K. Ces 2 produits collaborent afin d'inhiber l'apoptose induite par l'expression des gènes E1A et E4, prolongeant la vie des cellules et permettant de cette manière la formation complète des virions. E1B-19K, un homologue de BCL-2, inhibe l'apoptose en liant la protéine BAK, empêchant la formation du complexe BAK-BAX (BCL-2 associated X-protein). Ce complexe se fixe au niveau de la membrane interne des mitochondries, favorisant la libération de protéines pro-apoptotiques. E1B-55K interagit quant à lui avec la protéine E4 Orf6 afin de former une ubiquitine ligase E3 capable d'inhiber l'apoptose en interagissant avec p53 (Tarakanova and Wold, 2010; McNees and Gooding, 2002). Radke et al. (2014) ont récemment montré qu'E1B-19K impliqué dans la répression de la réponse inflammatoire médiée par les macrophages, mais le mécanisme n'est pas encore connu.

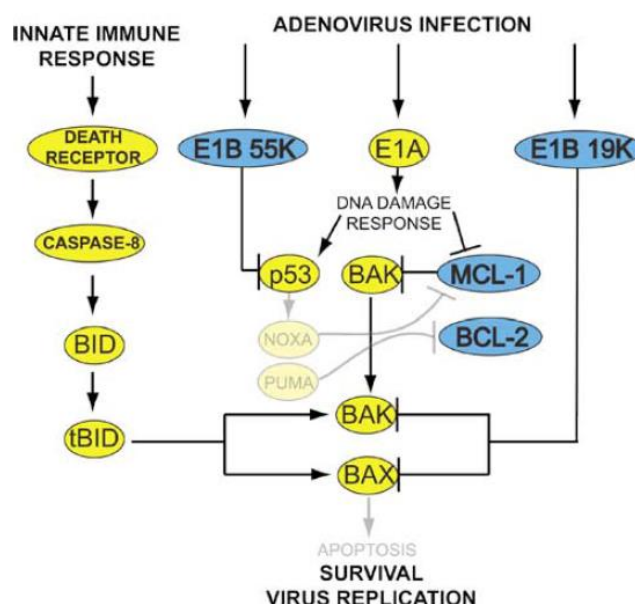


Figure 10. Induction et répression de l'apoptose par les oncogènes E1A et E1B lors d'une infection par un adénovirus. L'expression de l'oncogène E1A induit une réponse de dommages à l'ADN, menant à l'apoptose dépendant ou indépendant de p53. L'apoptose ne dépendant pas de p53 est induite par la dégradation d'une protéine anti-apoptotique MCL-1, libérant la protéine pro-apoptotique BAK du complexe MCL-1-BAK. Afin de prolonger la vie des cellules, l'apoptose induite par E1A est inhibée par les 2 variants de l'oncogène E1B, à savoir E1B-19K et E1B-55K. E1B-19K, un homologue de BCL-2, empêche la formation du complexe pro-apoptotique BAK-BAX en liant BAK. E1B55K, quant à lui, collabore avec la protéine E4 Orf6 et inhibe l'apoptose en interagissant avec p53. La couleur jaune représente une fonction pro-apoptotique, tandis que la fonction anti-apoptotique est en bleu (White, 2006).

Matériel et méthodes

1. Lignée et culture cellulaire

Les cellules HEK 293T (human embryonic kidney cells 293T), A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) avec L-glutamine supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Lonza) et 1% de mélange de pénicilline-streptomycine (Pen-Strep 10.000/10.000, Lonza). Les cellules HBEC3-KT (human bronchial epithelial cells) ont été cultivées dans du milieu kératinocyte-SFM (ThermoFisher Scientific) supplémenté par de l'extrait pituitaire bovin et le facteur de croissance épidermique 1-53. Ces 3 lignées ont été maintenues à une température de 37°C et dans une atmosphère riche en 5% de CO₂.

2. Amplification des adénovirus

2.1. Amplification

Des cellules A549 en phase exponentielle de croissance ont été cultivées dans des boîtes de 75 cm² en présence de 10 ml de milieu de culture DMEM supplémenté par 10% de FBS et 1% de Pen-Strep. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 70%, le milieu de culture a été remplacé par 10 ml de milieu de culture DMEM supplémenté par 2% de FBS et 1% de Pen-Strep afin de favoriser l'infection virale. Ensuite, les cellules ont été infectées par 20 µl de solution contenant les virions de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3. Lorsque 90% des cellules ont montré un effet cytopathique, elles ont été détachées de la boîte à l'aide de « scraper » (VWR) et soumises à 3 cycles de congélation et décongélation afin d'éclater les cellules non lysées et récupérer l'entièreté des virions. Les virions présents dans le surnageant ont été purifiés et concentrés dans environ 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) à l'aide du kit Vivapure® AdenoPACK™ 20 (Sartorius). Après concentration, les virions ont directement été conservés à -80°C.

Comme cette technique de purification n'a pas permis d'avoir un rendement d'amplification satisfaisant pour l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3, une autre méthode de semi-purification a été utilisée. Les cellules A549 ont été cultivées dans du milieu OPTI-MEM®I Reduced-Serum Medium (ThermoFisher Scientific) sans rouge de phénol pour éviter l'obstruction des filtres utilisés ultérieurement. Après infection, les cellules ont été décrochées avec des « scraper » et ont été soumises à 3 cycles de congélation et décongélation. Le surnageant contenant les

virions a ensuite été filtré avec un filtre 0,22 µm afin de retirer toutes les contaminations possibles et les débris cellulaires. Le filtrat est déposé dans un tube de concentration appelé tube Amicon® Ultra-15 100K (Merck) et soumis à une étape de centrifugation pendant 15 minutes à 3000g. Les molécules inférieures à 100 kDa sont éliminées avec le surnageant, tandis que les virions et les molécules entre 100 kDa et 0,22 µm sont conservées dans la partie supérieure du tube. Les virions ont été lavés 2 fois avec du PBS qui a ensuite été éliminé par centrifugation pendant 15 minutes à 3000g. La dernière étape de centrifugation a été interrompue lorsque les virions ont été concentrés dans environ 1 ml de PBS. Après concentration, les virions ont été directement conservés à -80°C.

2.2. Titration par qPCR

Afin d'inactiver les virions de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 et extraire leur ADN double brin, un aliquote de 50 µl de PBS contenant les virions a été placé à 75°C pendant 10 minutes et ensuite conservé à -20°C. Le titre des virions a été déterminé par qPCR (quantitative Polymerization Chain Reaction) à l'aide du kit Takyon™ qPCR (Eurogentec) et d'amorces spécifiques au gène codant pour l'hexon des HAdVs (séquences en annexe). Pour chaque virus, 3 mesures correspondant à 3 dilutions (non dilué, dilution 3 et dilution 9) ont été effectuées sur l'appareil LightCycler® 480 (Roche). En parallèle, 5 échantillons contenant entre 50 et 5*10⁵ copies d'un plasmide pGEM T-vector (Promega) codant pour l'hexon des HAdVs ont été amplifiés et quantifiés par qPCR afin d'établir une droite d'étalonnage permettant d'estimer le nombre de copies de génome des HAdVs par µl de PBS.

Tableau 1. Paramètres de la qPCR utilisée pour estimer le titre des adénovirus.

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95	300	1
Dénaturation	95	15	45
Appariement	60	20	
Elongation	72	40	

3. Génotypage des adénovirus

Afin de confirmer l'identité de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3, les régions d'ADN codant pour un fragment du gène fiber et les boucles 1 et 2 de l'hexon ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (séquences en annexe) en présence de l'ADN polymérase

phusion® Hot Start Flex (NEB) et du tampon phusion® HF (NEB). Dans ces conditions, la température d'appariement (Ta) des amorces reconnaissant la région d'ADN de la boucle 1 de l'hexon est de 56°C. La Ta des amorces reconnaissant la région d'ADN codant pour la boucle 2 de l'hexon et un fragment du gène fiber de l'HAdV-B3 est de 58°C, tandis que celle des amorces reconnaissant la région d'ADN codant pour un fragment du gène fiber de l'HAdV-C2 est de 62°C.

Tableau 2. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier les régions codant pour un fragment du gène fiber et les boucles 1 et 2 de l'hexon de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3. Les valeurs des températures d'appariement ne sont valables qu'en présence de l'ADN polymérase phusion® Hot Start Flex et du tampon phusion® HF (NEB).

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	10	35
Appariement	56-58 ou 62	10	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	300	1
Maintien final	10	∞	1

L'amplification de ces régions ou son absence a été vérifiée par migration des produits PCR sur un gel d'agarose 2% à 120 V pendant 30 minutes. Après séquençage des amplicons codant pour la boucle 1 de l'hexon de chaque virus, les séquences obtenues ont été comparées aux séquences de référence trouvées dans la base de données GenBank (NIH). Elles ont également été comparées à d'autres HAdVs appartenant aux mêmes sous-groupes et à des HAdVs d'autres sous-groupes, à savoir l'HAdV-C1 et l'HAdV-B7, l'HAdV-F40, l'HAdV-A12, l'HAdV-D9 et l'HAdV-E4. L'alignement multiple de l'ensemble de ces séquences a été généré par le programme Clustal Omega (EMBL-EBI), et sur base de cet alignement, un arbre phylogénétique a ensuite été construit en utilisant le programme Seaview version 4 configuré avec la méthode « Neighbor-Joining ».

4. Clonage des gènes précoces d'adénovirus

Les gènes précoces E1A, E1B-19K, E1B-55K de l'HAdV-C2 et de l'HAdV-C5, et les gènes précoces E1A, E1B-21K et E1B-55K de l'HAdV-B3 (séquences en annexe) ont été amplifiés à partir des génomes viraux correspondant par PCR avec des amorces spécifiques (séquences en annexe) en présence de l'ADN polymérase phusion® Hot Start Flex et du tampon phusion® HF. Dans ces conditions, la Ta des amorces est de 62°C pour les gènes précoces de l'HAdV-

C2, de l'HAdV-C5 et le gène précoce E1A de l'HAdV-B3. La Ta des amorces des gènes précoces E1B-21K et E1B-55K de l'HAdV-B3 est de 58°C.

Tableau 3. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier les gènes précoces de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3.
Les températures d'appariement ne sont valables qu'en présence de l'ADN polymérase phusion® Hot Start Flex et du tampon phusion® HF (NEB).

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	10	35
Appariement	58 ou 62	20	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	300	1
Maintien final	10	∞	1

Les produits PCR des 9 gènes précoces ont ensuite été clonés par recombinaison à l'aide du kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning (NEB) dans un plasmide pcDNA™ 3.1/His C (Invitrogen) préalablement digéré par les enzymes de restriction EcoRI-HF® et HindIII-HF® (NEB). Après la transformation de 50 µl de bactéries *Escherichia coli* (E. coli) chimiocompétentes 5-alpha (NEB) avec 2 µl (soit environ 40 ng) de plasmides, ces derniers ont d'abord été isolés avec le kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) et ensuite digérés par 2 enzymes de restriction EcoRI-HF® et Hind III-HF® pendant 1 heure à 37°C. Les fragments ont été séparés en fonction de leur poids moléculaire par migration sur un gel d'agarose 2% pendant 30 minutes à 120 V. Les plasmides donnant la bonne fragmentation ont été amplifiés dans des bactéries E. coli chimiocompétentes 5-alpha, isolés par le kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) et ensuite vérifiés par séquençage.

Cette technique de clonage n'ayant pas fonctionné pour le gène précoce E1B-55K de l'HAdV-C2 et l'HAdV-C5, les produits PCR correspondant et le plasmide pcDNA™ 3.1/His C ont été digérés par les enzymes de restriction EcoRI-HF® et SacI-HF® (NEB) pendant 1 heure à 37°C. La digestion du plasmide avec ces 2 enzymes permet de retirer le site d'amorçage T7. Les produits PCR ont ensuite été clonés par ligation à l'aide du Quick Ligation™ Kit. Comme décrit-ci-dessus, après transformation des bactéries et isolation des plasmides, ces derniers ont été digérés par 2 enzymes de restriction EcoRI-HF® et SacI-HF®. Les fragments ont ensuite été séparés sur un gel d'agarose et les plasmides donnant la bonne fragmentation ont été amplifiés dans des bactéries, isolés et vérifiés par séquençage.

5. Analyse de l'expression d'APOBEC3B par RT-qPCR et détermination des variants d'épissage

5.1. Extraction de l'ARN des cellules infectées

Des cellules A549 en phase exponentielle de croissance ont été cultivées dans des boîtes de 75 cm² en présence de 10 ml de milieu de culture DMEM supplémenté par 2% de FBS et 1% de Pen-Strep. En parallèle, des cellules HBEC3-KT en phase exponentielle de croissance ont été placées dans des boîtes de 75 cm² préalablement gélatinées en présence de 10 ml de milieu de culture kératinocyte-SFM supplémenté par de l'extrait pituitaire bovin et le facteur de croissance épidermique 1-53. Lorsque les cellules ont atteint 90% de confluence, elles ont été infectées par 10⁵, 10⁶, 10⁷ et 5*10⁸ copies de génome de l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3, et 5*10⁸ copies de génome de l'HAdV-C5. Après 48-72-96 heures d'infection, les cellules A549 ont été décrochées à l'aide de « scraper », tandis que les cellules HBEC3-KT ont été décrochées à l'aide de trypsine-EDTA. Ces 2 types cellulaires ont ensuite été récupérés dans des tubes Falcon 15 ml, lavés 2 fois à l'aide de 10 ml de PBS et centrifugés à 300g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées dans 700 µl de Qiazol (Qiagen) et l'ARN a été purifié à l'aide du kit miRNeasy[®] Mini (Qiagen). L'ARN a ensuite été conservé à -80°C.

5.2. Extraction de l'ARN des cellules transfectées

Des cellules HBEC3-KT en phase exponentielle de croissance ont été cultivées dans des plaques 6 puits préalablement gélatinées (500 000 cellules/puit) en présence de 2.5 ml de milieu de culture kératinocyte-SFM supplémenté par de l'extrait pituitaire bovin et le facteur de croissance épidermique 1-53. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 2.5 µg de plasmide d'expression codant pour les 8 gènes précoces, GFP et A3B (fourni par le Prof Wain-Hobson et décrit par Caval, Suspène, Shapira, *et al.* (2014)) à l'aide de 15 µl du réactif de transfection *TransIT*[®]-LT1 (Mirus). Après 48 heures, les cellules HBEC3-KT transfectées ont été lavées 2 fois avec du PBS et directement lysées dans les puits avec 700 µl de Qiazol. L'ARN extrait a été purifié à l'aide du kit miRNeasy[®] Mini. L'ARN a ensuite été conservé à -80°C.

5.3. Synthèse de l'ADN complémentaire et RT-qPCR

L'ADN complémentaire des cellules infectées et transfectées a été synthétisé par transcription inverse (RT) à l'aide du kit FastGene® Scriptase II cDNA Kit (NIPPON Genetics) en utilisant des amorces aléatoires. Après synthèse de l'ADNc, l'expression d'A3B a été mesurée par qPCR à l'aide du kit Takyon™ qPCR et d'amorces spécifiques à A3B (séquences en annexe). Pour chaque échantillon, 3 mesures correspondant à 3 dilutions (non dilué, dilution 3 et dilution 9) ont été effectuées sur l'appareil LightCycler® 480 (Roche). Afin de comparer directement les échantillons entre eux, l'expression du gène de ménage HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) a été mesurée en parallèle en utilisant des amorces spécifiques (séquences en annexe), et ensuite les ratios des signaux A3B/HPRT ont été calculés.

Tableau 4. Paramètres de la RT-qPCR utilisée pour quantifier l'expression d'A3B au niveau de l'ARN messager.

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	95	180	1
Dénaturation	95	3	45
Appariement	60	10	
Elongation	72	10	

5.4. Amplification des variants d'épissage par PCR

Tableau 5. Paramètres de la PCR utilisée pour amplifier certaines régions d'ADNc correspondant aux transcrits A3B.

Les températures d'appariement ne sont valables qu'en présence de l'ADN polymérase Q5® Hot Start High Fidelity (NEB) et de tampon Q5® (NEB).

Etape	Température (°C)	Durée (s)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	10	45
Appariement	63 ou 66	20	
Elongation	72	20	
Elongation finale	72	60	1
Maintien final	10	∞	1

Certaines régions de l'ADNc correspondant aux transcrits A3B (séquences en annexe) ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (séquences en annexe) en présence de l'ADN polymérase Q5® Hot Start High Fidelity (NEB) et de tampon Q5® (NEB). 2 couples

d'amorces ont été utilisés avec respectivement, dans ces conditions, des Tas de 63 et 66°C. Les produits PCR ont ensuite migrés sur un gel d'agarose 2% pendant 30 minutes à 120 V afin de déterminer leur taille. Avec le premier couple d'amorces, les produits PCR des variants d'épissage 1 et 3 ont une taille de 327 bp, celui du variant d'épissage 4 252 bp et celui du variant d'épissage 2 173 bp. Avec le second couple d'amorces, le produit PCR du variant d'épissage 3 a une taille de 515 bp, ceux des variants d'épissage 1,2 et 4 234 bp.

6. Analyse de l'expression d'APOBEC3B par Western Blot

6.1. Extraction des protéines et dosage

Des cellules A549 en phase exponentielle de croissance ont été cultivées dans des boîtes de 75 cm² en présence de 10 ml de milieu de culture DMEM supplémenté par 2% de FBS et 1% de Pen-Strep. En parallèle, des cellules HBEC3-KT en phase exponentielle de croissance ont été placées dans des boîtes de 75 cm² préalablement gélatinées en présence de 10 ml de milieu de culture kératinocyte-SFM supplémenté par de l'extrait pituitaire bovin et le facteur de croissance épidermique 1-53. Lorsque les cellules ont atteint 90% de confluence, elles ont été infectées par 10⁷ et 5*10⁸ copies de génome de l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3, et 5*10⁸ copies de génome de l'HAdV-C5. Après 48-72-96 heures d'infection, les cellules A549 ont été décrochées à l'aide de « scraper », tandis que les cellules HBEC3-KT ont été décrochées avec à l'aide de trypsine-EDTA. Ces 2 types cellulaires ont été récupérés dans des tubes Falcon 15 ml, lavés 2 fois à l'aide de 10 ml de PBS et centrifugés à 300g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées dans 100 µl de tampon RIPA supplémenté un cocktail d'inhibiteurs de protéases Halt™ (Thermo Fisher Scientific) et 1% de Triton™ X-100 (Merck). Les protéines ont ensuite été conservées à -80°C.

Les extraits protéiques ont été dosés avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). La droite de calibration externe a été réalisée sur des concentrations de solution BSA (bovine serum albumine, Merck) allant de 0 à 2000 µg/ml. Les mesures colorimétriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (VICTOR™ X3, PerkinElmer) à une longueur d'onde de 562 nm.

6.2. Migration sur gel, transfert sur membrane et révélation

10 µl de bleu de Coomassie 4X ont été ajoutés à 30 µl de tampon RIPA contenant 50 µg de protéines. Les échantillons ont été placés à 95°C pendant 5 minutes puis centrifugés pendant 1

minute à vitesse maximale. Les protéines ont ensuite été séparées en fonction de leur poids moléculaire par migration sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 10% pendant 2h45 à 100 V.

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Whatman Protran BA85, GE Healthcare Life Sciences) à 4°C pendant 1 heure à 100 V. La qualité du transfert a été vérifiée en colorant la membrane avec du rouge Ponceau (0.1% rouge Ponceau, 5% acide acétique, Merck). La membrane a ensuite été rincée à l'eau distillée et bloquée dans du TBST-BSA 5% (Tris-Buffered Saline avec 0.1% de Tween-20) pendant 1 heure. Les anticorps primaires anti-A3B (National Institutes of Health, dilution 1/20, lapin), anti-hsp90 (Merck, 1/1000, lapin) ou anti-tubuline (Merck, 1/1000, souris) ont été dilués dans du TBST-BSA 5% et ensuite été appliqués sur la membrane. Après incubation overnight à 4°C, la membrane a été lavée à 3 reprises avec du TBST pendant 10 minutes. L'anticorps secondaire IgG anti-lapin (Polyclonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP, Dako) ou l'anticorps secondaire anti-souris (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse immunoglobulins/HRP, Dako), dilué à 1/2000 dans du TBST-BSA 5%, a été appliqué sur la membrane pendant 1 heure. Après incubation, la membrane a été lavée à 3 reprises avec du TBST pendant 10 minutes et incubée quelques minutes en présence d'un substrat chimioluminescent pour HRP (Pierce ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher Scientific). Les protéines ont ensuite été détectées à l'aide d'un appareil ImageQuant LAS4000 mini (Ge Healthcare Life Sciences) équipé d'une caméra CCD (charge coupled devices) refroidie.

7. Test de l'activité de désamination

Des cellules HEK 293T en phase exponentielle de croissance ont été cultivées dans des boîtes de 10 cm de diamètre (10^6 cellules/boîte) en présence de 10 ml milieu DMEM sans Pen-Strep. Les cellules ont ensuite été transfectées avec un plasmide codant pour le gène A3B humain (fourni par le Prof Wain-Hobson et décrit par Caval, Suspène, Shapira, *et al.* (2014)) ou un plasmide vide. La transfection a été réalisée à l'aide de phosphate de calcium suivant la méthode Profection® Mammalian Transfection (Promega). Les protéines ont été extraites 48h post-transfection comme décrit ci-après.

7.1. Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites par 5 méthodes différentes. Les 3 premiers extraits ont été obtenus en resuspendant les cellules respectivement dans 100 µl de tampon NP-40 froid (150 mM NaCl ; 1.0% NP-40 ; 50 mM Tris-HCl ; pH 8.0) supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmpleteTM Protease Inhibitor cocktail, Roche), 100 µl tampon de lyse froid (25mM HEPES pH7.4 ; 10% glycérol ; 150mM NaCl ; 0.5% triton X-100 ; 1mM EDTA ; 1mM MgCl₂ ; 1mM ZnCl₂) supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmpleteTM Protease Inhibitor cocktail, Roche) (Caval, Suspène, Vartanian, *et al.*, 2014) et 100 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 50 mM Tris ; pH 8.0 ; 1 % NP-40 ; 0.5% sodium deoxycholate ; 0.1% SDS) supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases HaltTM (Thermo Fisher Scientific) et 1% de TritonTM X-100 (Merck). Après 30 minutes d'incubation sur glace, les lysats protéiques ont été séparés des débris cellulaires par centrifugation. Pour le quatrième et cinquième extraits, le kit PARISTM (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé afin d'isoler les protéines nucléaires et les protéines cytoplasmiques. Le sixième lysat protéique a été obtenu en resuspendant les cellules dans 100 µl de tampon HED (20mM HEPES pH7.4 ; 5mM EDTA ; 100µg/ml de RNaseA ; 1 mM DTT ; 10% glycérol) supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmpleteTM Protease Inhibitor cocktail, Roche). La suspension de cellules a été congelée dans de la carboglace puis décongelée, soumise à une rotation pendant une heure à température ambiante et placée dans un bain de sonication (cycle de 30 secondes ON, 30 secondes OFF) pendant 20 minutes. Le lysat protéique a été séparé des débris cellulaires par centrifugation. Les protéines ont ensuite été conservées à -80°C.

7.2. Réaction de désamination et analyse

Les différents extraits protéiques ont d'abord été incubés à 37°C pendant 3 heures en présence de 1 pmol de sonde simple brin marquée à la fluorescéine et contenant le motif 5'-TCA-3' reconnu par A3B (séquence en annexe), d'UDG (uracil DNA glycosylase, NEB) et de tampon UDG (NEB) et ensuite pendant 10 minutes à 95°C après ajout de NaOH à une concentration finale de 100 mM. Les produits de la réaction ont été séparés en fonction de leur poids moléculaire par migration sur un gel de polyacrylamide 15% dénaturant dans du tampon TBE pendant 1h30 à 200 V et ensuite analysés à l'aide du Typhoon FLA 9400 (GE) après excitation à 488 nm et acquisition à 526 nm.

Objectifs

La seconde signature mutationnelle la plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs est associée à l'activité désaminase des protéines APOBEC3. Ces enzymes, qui possèdent une activité antivirale, convertissent la déoxycytosine en uracile lorsque l'ADN est sous forme simple brin. Un premier lien a été établi entre infection virale et signature mutationnelle induite par les APOBEC3s. En effet, des mutations génomiques associées aux APOBEC3s sont clairement observées dans les tumeurs de la gorge et du cou positives pour HPV mais absentes des tumeurs oropharyngées négatives pour ce même virus. Bien que des mutations associées aux APOBEC3s soient très répandues dans les cancers du poumon non à petites cellules, aucun lien n'a encore été établi avec une possible infection virale. Comme certaines souches d'adénovirus humains sont fréquemment impliquées dans les infections des voies respiratoires inférieures, ce travail de fin d'étude a pour objectif d'étudier si des adénovirus peuvent induire l'expression d'un membre de la famille APOBEC3, plus particulièrement APOBEC3B, au sein de cellules épithéliales pulmonaires.

Pour ce faire, des cellules A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) et des cellules primaires HBEC3-KT (human bronchial epithelial cells) ont été infectées par 3 souches d'adénovirus capables d'infecter les voies respiratoires inférieures (HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3). Après vérification de l'identité des adénovirus par génotypage, l'étude de l'induction de l'expression d'A3B consiste à :

- Analyser l'expression des transcrits A3B par RT-qPCR
- Analyser l'expression protéique d'A3B par Western Blot
- Déterminer les variants d'épissage exprimés

Comme les oncogènes E6 des HPVs à haut risque et le large antigène T des polyomavirus humains BKPyV sont à eux seuls capables d'induire l'expression d'A3B, nous étudierons si les oncogènes de la famille E1 des adénovirus possèdent également cette aptitude. Cet aspect du projet consiste à :

- Construire les plasmides codant pour les gènes précoces E1A, E1B-19K/21K et E1B-55K de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3
- Transfecter des cellules HBEC3-KT avec ces plasmides d'expression et doser les transcrits A3B par RT-qPCR

Résultats

1. Amplification et géotypage des adénovirus

La première étape de ce projet a consisté à amplifier, purifier et concentrer les trois souches d'adénovirus communes : les souches C2, C5 et B3. Pour ce faire, des cellules A549 ont été infectées avec des virions des adénovirus HAdV-C2, HAdV-C5 et HAdV-B3 et lorsque 90% des cellules ont présentés des signes d'infection, les virions ont été récoltés. Les virions de l'HAdV-C5 ont été purifiés et concentrés à l'aide du kit Vivapure® AdenoPACK™ 20 (Sartorius). Cette méthode de purification est basée sur une colonne chromatographique échangeuse d'ions. Les propriétés de la membrane sont telles que seules les particules virales sont adsorbées via leur capsid, permettant l'élimination des autres molécules présentes dans le surnageant cellulaire lors des étapes de lavage. Bien que ce kit ait été efficace pour purifier et concentrer l'HAdV-C5, le rendement obtenu pour l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 était insuffisant pour infecter des cellules avec un nombre de copies de génome viral élevé. Par conséquent, une autre méthode de purification, qualifiée de semi-purification plus exactement, a été développée. Elle consiste en une première filtration avec un filtre de 0,22 µm, suivie d'une seconde purification et concentration sur un tube Amicon® Ultra-15 100K (Merck). Ces 2 étapes successives de purification permettent d'éliminer les particules supérieures à 0,22 µm et les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 100 kDa. Pour ces 2 méthodes de purification des virus, le titre viral a été estimé par qPCR et est exprimé en nombre de copies de génome viral par µl. Le terme MOI (Multiplicity Of Infection) ne peut pas être employé dans ce cas-ci, car le nombre de copies de génome ne correspond pas nécessairement au nombre de virions infectieux.

Après amplification, l'identité des virus a été vérifiée par géotypage. L'ADN viral a été extrait par dénaturation thermique des virions et analysé par PCR en utilisant d'amorces reconnaissant différentes séquences adénovirales (la boucle 1 ou 2 du gène de l'hexon et un fragment du gène fiber). Les produits PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 2% (figure 11A). Les amorces utilisées pour amplifier la région d'ADN codant pour boucle 1 de l'hexon ne sont pas spécifiques à un HAdV en particulier. A contrario, les amorces utilisées pour amplifier la région d'ADN de la boucle 2 de l'hexon sont spécifiques au sous-groupe B. Finalement, nous avons également utilisé 2 couples d'amorces reconnaissant un fragment du gène fiber respectivement spécifiques au sous-groupe B et à l'HAdV-C2. Sur la figure 11A, l'observation d'un produit PCR dans les deux premiers puits du gel supérieur et le premier puit du gel inférieur démontre la présence d'ADN adénoviral dans nos isolats. Lorsque nous

utilisons des amorces spécifiques au sous-groupe B ou à l'HAdV-C2, nous n'observons qu'un produit PCR respectivement qu'à partir de l'isolat de l'HAdV-B3 ou de celui de l'HAdV-C2.

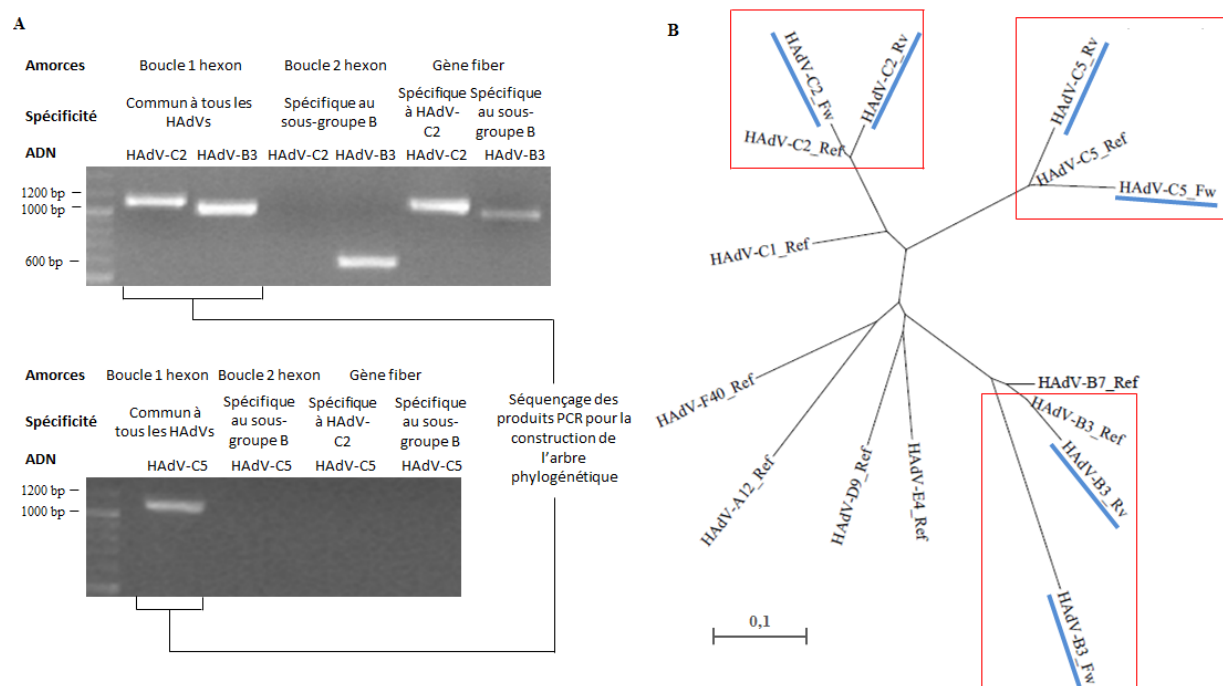


Figure 11. Vérification de l'identité des souches virales amplifiées. Trois souches d'adénovirus HAdV-C2, -B3 et -C5 ont été amplifiées dans des cellules épithéliales pulmonaires A549. Après purification des virions, les ADN viraux des trois souches ont été isolés et amplifiés par PCR. **A.** Des amorces permettant l'amplification de séquences communes à tous les adénovirus (boucle 1 du gène de l'hexon) ou bien spécifiques à certains sous-groupes (boucle 2 du gène de l'hexon ou fragment du gène fiber) ont été utilisées. **B.** Les produits de PCR correspondant à la boucle 1 du gène de l'hexon ont été séquencés. Ces séquences ont été comparées aux séquences de référence disponibles dans la base de données GenBank (NIH) et un arbre phylogénétique a été construit.

Afin d'affiner l'identité des virus au niveau de la souche et non seulement du sous-groupe, les produits PCR correspondant à la boucle 1 de l'hexon ont été séquencés, la boucle 1 de l'hexon étant amplifiée pour tous les HAdVs. Leurs séquences ont été comparées aux séquences de référence de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3, et à celles d'autres HAdVs (HAdV-C1, HAdV-B7, HAdV-F40, HAdV-A12, HAdV-D9 et HAdV-E4). L'HAdV-C1 et l'HAdV-B7 ont été choisis car les séquences de leur hexon sont respectivement proches de celles de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5, et l'HAdV-B3, comme illustré dans l'arbre phylogénétique construit à partir de l'entière de la séquence nucléotidique de l'hexon des adénovirus humains par Madisch *et al.* (2005). Les autres HAdVs ont été sélectionnés pour représenter chaque sous-groupe d'HAdV capables d'infecter l'homme. Le choix des séquences de référence a été restreint par leur disponibilité dans la base de données

GenBank (NIH). Afin de construire l'arbre phylogénétique, les séquences nucléotidiques de référence et celles obtenues par séquençage ont été alignées en utilisant le programme d'alignement multiple Clustal Omega (EMBL-EBI). Sur base de cet alignement, l'arbre phylogénétique circulaire a été construit via le programme Seaview version 4 et par la méthode appelée « Neighbor joining » (figure 11B). La longueur des branches de l'arbre ont été calculée par la méthode « maximum-likelihood » et l'échelle représente le degré de divergence entre les séquences nucléotidiques. L'arbre phylogénétique présente notamment 3 groupes distincts, chacun comprenant les séquences de nos virus et la séquence de référence correspondant. Ces résultats signifient que ces séquences sont très similaires, et par conséquent que l'identité des virus est correcte.

2. Induction de l'expression d'APOBEC3B par les adénovirus dans des cellules pulmonaires cancéreuses

Afin d'étudier si l'expression d'A3B peut être induite par des adénovirus dans le contexte du cancer du poumon non à petites cellules, des cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses d'adénocarcinome appartenant à la lignée cellulaire A549 ont été infectées par 3 souches d'adénovirus capables d'infecter les voies respiratoires inférieures, à savoir l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3. Dans un premier temps, des cellules A549 cultivées dans des boîtes de 75 cm² ont été infectées par 0.01-0.1-1-50 copie(s) de génome d'HAdV-C2 et d'HAdV-B3 par cellule et 50 copies de génome de l'HAdV-C5 par cellule.

Les signes d'infection par un adénovirus se caractérisent par un changement de morphologie des cellules qui deviennent rondes, leur regroupement et ensuite leur détachement du matériel de culture. Les cellules infectées par 1 copie de génome par cellule commencent à présenter ces signes d'une infection à 48 heures pour la souche C2 et à 72 heures pour la souche B3. Comme espéré, augmenter le nombre de copies de génome viral par cellule nous a permis d'avoir une infection synchrone, c'est-à-dire que toutes les cellules semblent être au même stade d'infection au même moment. A 48 heures, la majorité des cellules A549 infectées par 50 copies de génome des souches C2, C5 et B3 par cellule sont devenues rondes et se sont regroupées (figure 12). De manière intéressante, les cellules infectées par l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 semblent prendre une certaine organisation. A 72 heures, la totalité des cellules sont décrochées de la boîte. En ce qui concerne les cellules non infectées, le nombre de cellules dans les boîtes croît avec le temps, augmentant la confluence des cellules.

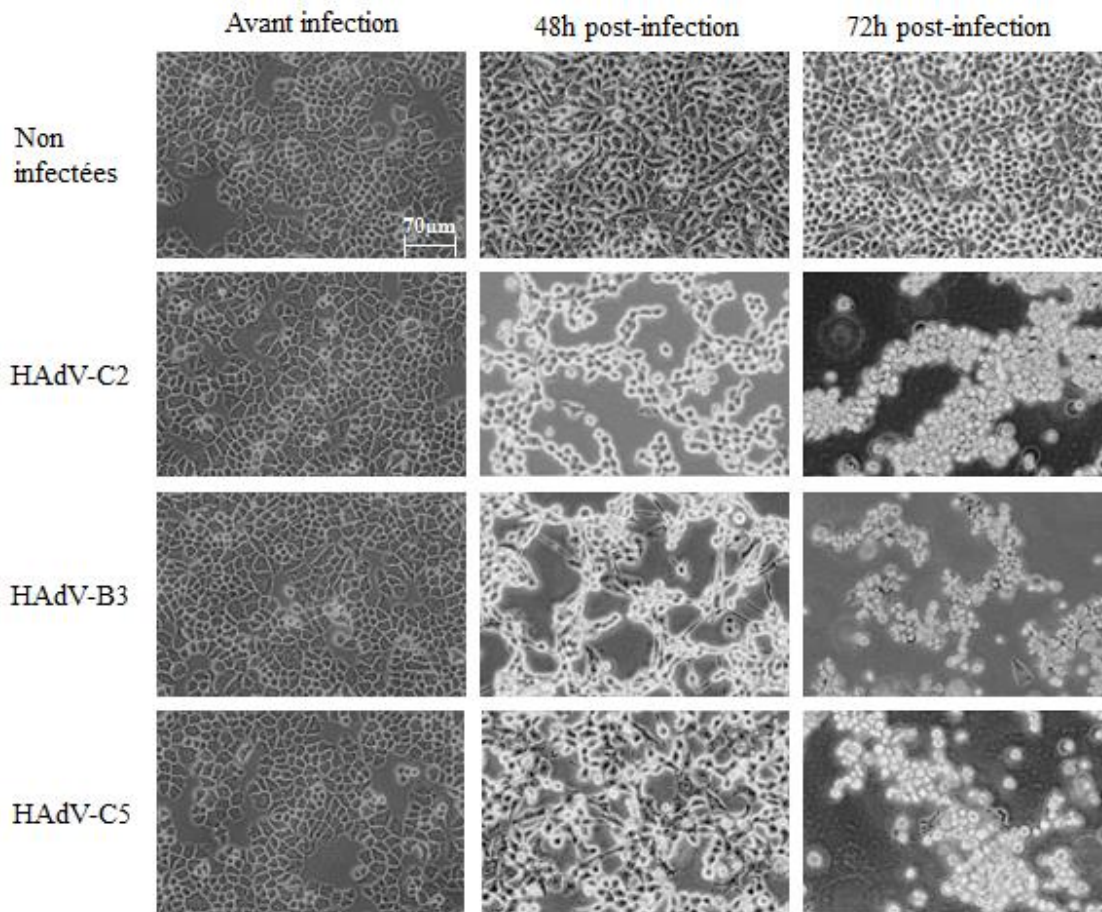


Figure 12. Illustration de l'infection des cellules A549 par des adénovirus. Les signes caractéristiques d'infection des cellules A549 par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-B3 et l'HAdV-C5 par cellule ont été observés à 48 et 72 heures d'infection par microscope.

Pour toutes ces conditions (4 doses infectieuses, 3 types d'adénovirus et 2 durées d'infection), l'ARN et les protéines ont été extraits afin de respectivement analyser l'expression d'A3B par RT-qPCR et par Western Blot. L'ARN et les protéines de cellules non infectées ont également été extraits et utilisés comme contrôle négatif.

2.1. Analyse de l'expression d'A3B par RT-qPCR

Différentes méthodes permettent d'étudier le niveau d'expression d'un gène. L'une des techniques le plus couramment utilisée pour sa spécificité et sa sensibilité est la « reverse transcription polymérase chain reaction » (RT-qPCR). Cette méthode a été utilisée pour quantifier l'expression des transcrits A3B à partir de l'ADN complémentaire. Le niveau d'expression relative des transcrits A3B a été normalisé par rapport à celui du gène de ménage HPRT et fixé à 1 dans le cas des cellules non infectées.

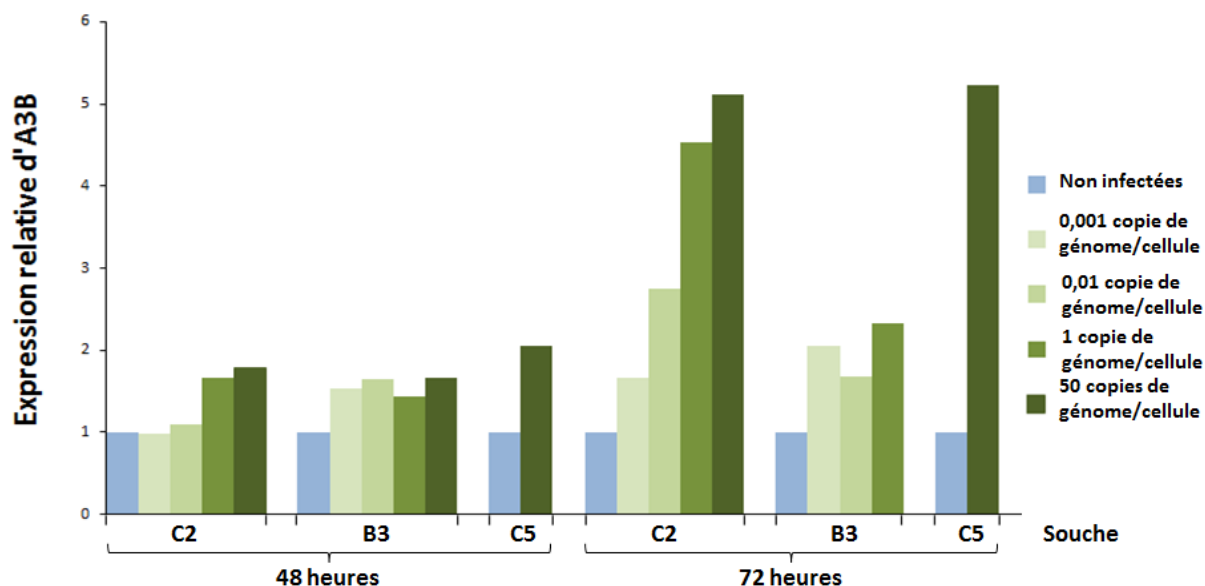


Figure 13. L'expression des transcrits A3B dans les cellules A549 est induite par des adénovirus. Des cellules A549 ont été infectées par 0.01-0.1-1-50 copies de génome de l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 par cellule et 50 copies de génome de l'HAdV-C5 par cellule. 48 et 72 heures après infection, l'ARN a été extrait afin d'étudier l'expression des transcrits A3B par RT-qPCR. L'ARN de cellules non infectées a été utilisé comme contrôle négatif. Afin de normaliser les échantillons, l'expression du gène de ménage HPRT a été mesurée et l'expression d'A3B est exposée relativement aux niveaux mesurés dans les cellules non infectées.

L'analyse de l'expression des transcrits A3B par RT-qPCR (figure 13) révèle une induction de l'expression par les 3 souches. Cette induction de l'expression est observée dès 48 heures post infection mais semble être plus nette après 72 heures. L'effet est proportionnel à la dose infectieuse dans le cas de l'HAdV-C2.

2.2. Analyse de l'expression d'A3B par Western Blot

L'augmentation de l'expression des transcrits A3B dans les cellules A549 par l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 étant observée, nous avons vérifié si cette induction se traduit également au niveau protéique. L'expression des protéines A3B a donc été analysée pour les conditions montrant l'induction la plus élevée de l'expression d'A3B au niveau des transcrits, à savoir les cellules A549 infectées par 1 et 50 copie(s) de génome d'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 par cellule, et par 50 copies de génome de l'HAdV-C5 par cellule à 72 heures d'infection. Les protéines A3B peuvent être produites sous la forme de 4 isoformes qui sont notamment distinguées en fonction de leur poids moléculaire : l'isoforme 1 a une taille prédite de 45.9 kDa, l'isoforme 2 29 kDa, l'isoforme 3 57.2 kDa et l'isoforme 4 43.1 kDa. Les niveaux d'expression de la tubuline ont également été révélés afin de s'assurer que la même quantité

de protéines a été chargée dans tous les puits. Des protéines de cellules non infectées et de cellules HEK 293T transfectées par un plasmide codant pour A3B ont été analysées, servant respectivement de contrôles négatif et positif.

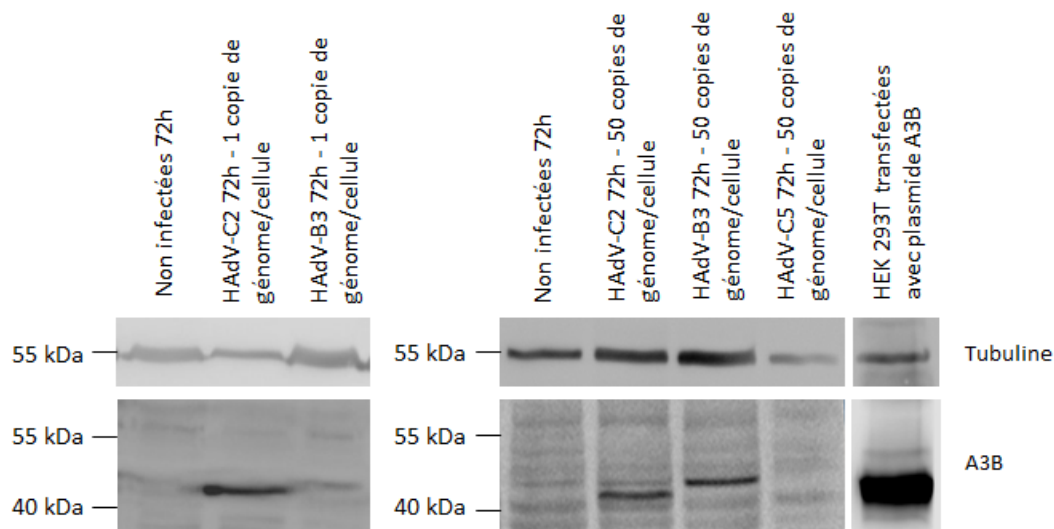


Figure 14. L'expression de la protéine A3B est induite dans les cellules A549 infectées par les adénovirus C2 et B3. Des cellules A549 ont été infectées par 1 et 50 copie(s) de génome de l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 par cellule, et 50 copies de génome d'HAdV-C5 par cellule. 72 heures après infection, les protéines ont été extraites afin d'étudier l'expression protéique d'A3B par Western Blot. Les protéines de cellules non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Le contrôle de charge a quant à lui été réalisé en révélant la tubuline.

Une nette augmentation de l'expression protéique d'A3B (figure 14) est observée pour les cellules A549 infectées par 1 copie de génome de l'HAdV-C2 par cellule à 72 heures d'infection par rapport aux cellules non infectées et celles infectées par l'HAdV-B3. La taille de cette bande, entre 40 et 55 kDa, suggère que les protéines A3B sont sous la forme de l'isoforme 1 ou 4. L'expression protéique d'A3B est également induite dans les cellules infectées par 50 copies de génome de l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 par cellule à 72 heures d'infection par rapport aux cellules non infectées. De manière intéressante, ces 2 bandes observées présentent un décalage, suggérant que l'HAdV-C2 induirait l'expression des protéines A3 sous la forme de l'isoforme 4 tandis que l'HAdV-B3 induirait l'isoforme 1.

Afin de déterminer si l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 induisent respectivement l'expression des protéines A3B sous la forme de 2 isoformes distinctes, l'expression des variants d'épissage au niveau des transcrits a été étudiée.

2.3. Détermination des variants d'épissage d'A3B

La RT-qPCR réalisée pour étudier l'induction de l'expression d'A3B au niveau transcriptionnel par des adénovirus a dosé la totalité des transcrits A3B exprimés, mais ne permet pas, telles que les amorces ont été construites, de distinguer les différents variants d'épissage. Par conséquent, nous avons amplifié par RT-PCR des régions spécifiques de l'ADN complémentaire d'A3B représentant l'ARN après épissage à l'aide de 2 couples d'amorces. Le premier couple permet de distinguer en fonction de la taille des produits PCR les variants d'épissage 1 et 3 (327 bp) du variant d'épissage 4 (252 bp) et du variant d'épissage 2 (173 bp). Le second couple d'amorces permet quant à lui de différencier le variant d'épissage 3 (515 bp) des variants d'épissage 1,2 et 4 (234 bp) (figure15 A). Après amplification, les produits PCR ont migrés sur un gel d'agarose 2% afin de visualiser leur taille et déterminer les variants d'épissage exprimés.

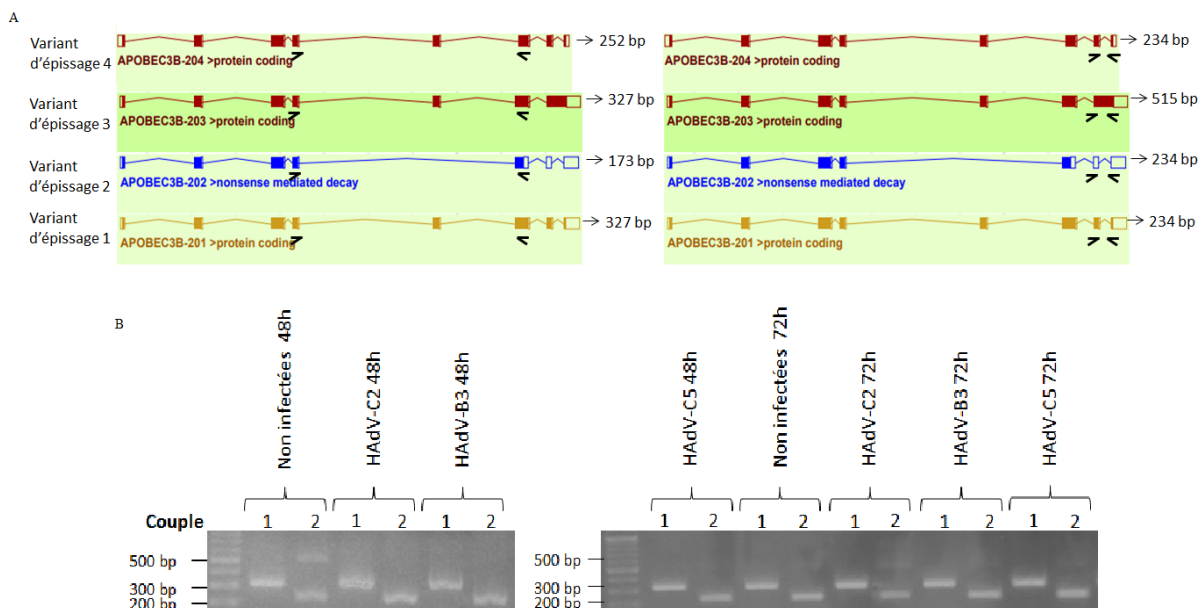


Figure 15. Identification des variants d'épissage d'A3B exprimés dans des cellules A549 après infection par des adénovirus. **A.** Amorces utilisées pour amplifier des régions des variants d'épissage d'A3B. Le premier couple d'amorces permet de distinguer en fonction de la taille des produits PCR les variants d'épissage 1 et 3 (327 bp) du variant d'épissage 2 (173 bp) et du variant d'épissage 4 (252 bp). Le second couple d'amorces, en amplifiant une région différente, permet de distinguer les variants d'épissage 1, 2 et 4 (234 bp) du variant d'épissage 3 (515 bp). **B.** Des PCRs utilisant ces 2 couples d'amorces ont été réalisées et la taille des produits PCR a ensuite été déterminée par migration sur un gel d'agarose 2%.

L'amplification d'une région des isoformes par le premier couple d'amorces montre que, pour les cellules A549 infectées par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 par cellule et pour des cellules non infectées, les produits PCR ont une taille légèrement

supérieure à 300 bp, correspondant au(x) variant(s) d'épissage 1 et/ou 3. L'amplification par le second couple d'amorces donne un amplicon entre 200 et 300 bp pour toutes les conditions, correspondant au(x) variant(s) d'épissage 1, 2 et/ou 4. Certaines conditions montrent également la présence d'une bande d'intensité beaucoup plus faible au-dessus de 500 bp, signifiant l'expression du variant d'épissage 3 pour les cellules A549 non infectées, et celles cellules infectées par les 3 souches à 72 heures d'infection (figure 15B). Le variant d'épissage 1 est donc exprimé dans les cellules A549 non infectées et infectées par les 3 souches adénovirales. Le variant 3 est parfois observé mais sa présence ne semble pas liée à l'infection.

3. Induction de l'expression d'APOBEC3B par les adénovirus dans des cellules pulmonaires non cancéreuses

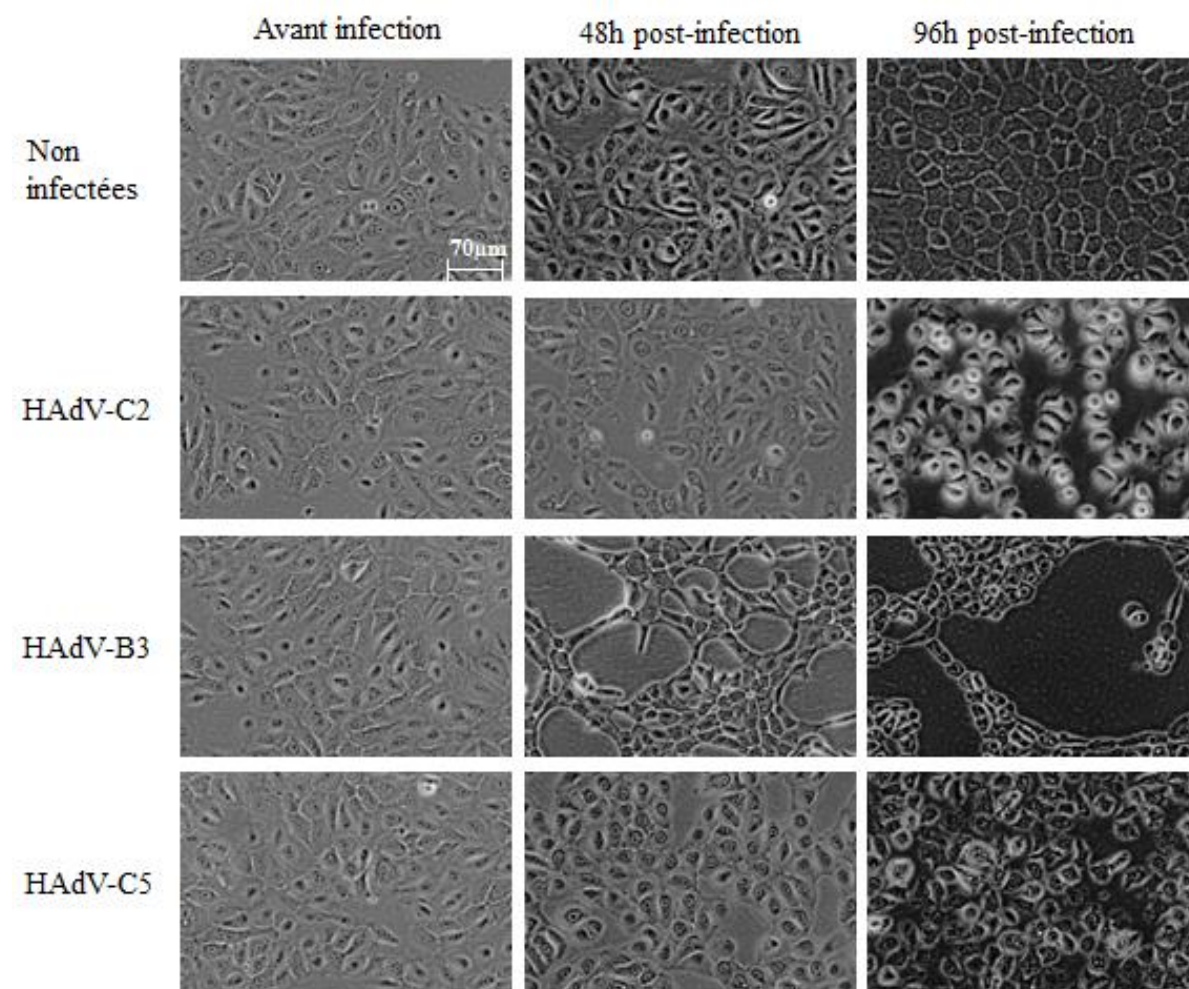


Figure 16. Illustration de l'infection des cellules HBEC3-KT par des adénovirus. Les signes caractéristiques d'infection des cellules HBEC3-KT par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-B3 et l'HAdV-C5 par cellule ont été observés à 48 et 96 heures d'infection par microscope.

L'expression d'A3B étant induite par les adénovirus dans une lignée cellulaires pulmonaire cancéreuse, nous avons infecté des cellules primaires afin d'étudier si l'augmentation de l'expression d'A3B est également retrouvée dans une lignée cellulaire épithéliale pulmonaire non cancéreuse. Des cellules primaires immortalisées HBEC3-KT ont été infectées par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 par cellule. Contrairement aux cellules A549, les cellules HBEC3-KT infectées par l'HAdV-C2 et l'HAdV-C5 ne présentent pas les signes caractéristiques d'une infection par un adénovirus à 48 heures d'infection (figure 16). Seules les cellules infectées par l'HAdV-B3 change d'organisation, et cette tendance est accentuée à 96 heures. Les cellules infectées par l'HAdV-C2 et l'HAdV-C5 commencent à devenir rondes à 96 heures.

L'ARN et les protéines des cellules HBEC3-KT ont été extraits à 48 et 96 heures d'infection. L'expression d'A3B a ensuite été analysée par RT-qPCR et Western Blot. En parallèle, des cellules non infectées ont été cultivées et utilisées comme contrôle négatif.

3.1. Analyse de l'expression d'A3B par RT-qPCR

Comme précédemment, l'expression des transcrits A3B suite à une infection par l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 a été quantifiée par RT-qPCR. L'expression des transcrits du gène de ménage HPRT a été mesurée en parallèle et les niveaux d'expressions d'A3B ont été rapportés relativement au niveau dans les cellules non infectées.

Le profil de l'induction de l'expression des transcrits A3B (figure 17) est différent dans les cellules HBEC3-KT par rapport aux cellules A549. L'expression des transcrits A3B montre une augmentation marquée à 48 heures d'infection par 50 copies de génome de l'HAdV-C2 par cellule et qui diminue après 96 heures mais qui reste cependant supérieure par rapport aux cellules non infectées. En ce qui concerne l'infection par 50 copies de génome de l'HAdV-C5 par cellule, les observations sont opposées par rapport à celles de l'HAdV-C2. L'expression des transcrits A3B augmente fortement à 96 heures d'infection. Le niveau d'expression des transcrits A3B au sein des cellules infectées par l'HAdV-B3 ne semble quant à lui pas différent de celui des cellules non infectées.

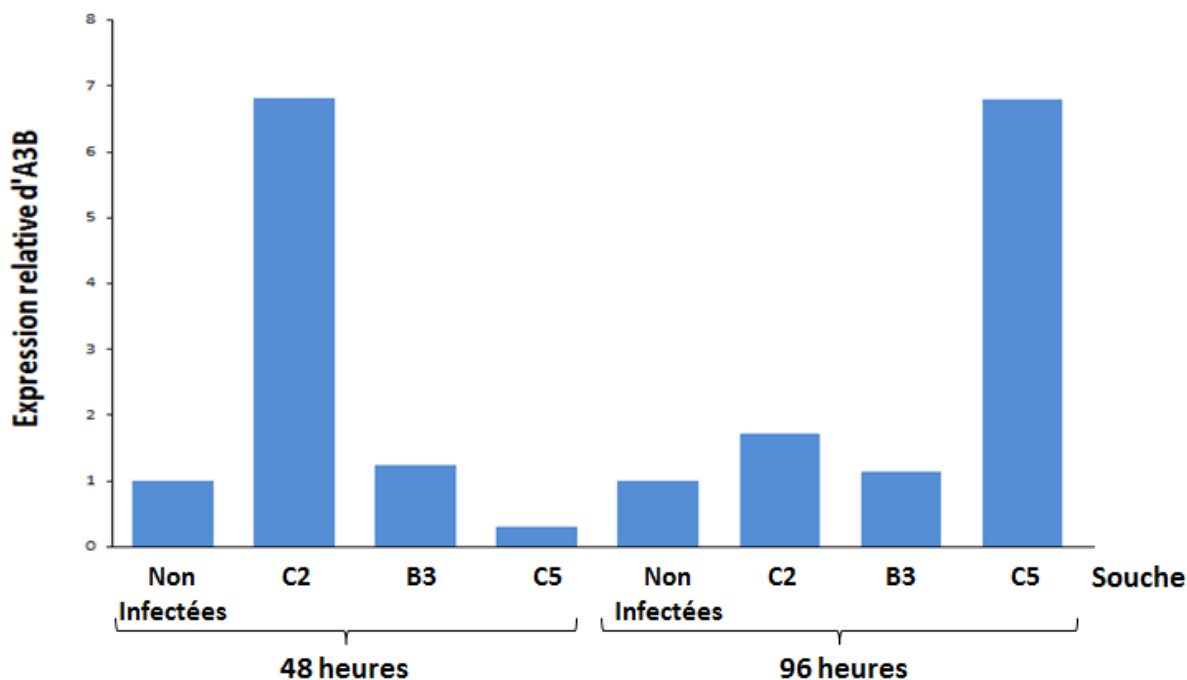


Figure 17. L'expression des transcrits A3B dans les cellules primaires HBEC3-KT est induite par l'HAdV-C2 à 48 heures d'infection et par l'HAdV-C5 à 96 heures d'infection. Des cellules HBEC3-KT ont été infectées par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 par cellule. 48 et 72 heures après infection, l'ARN a été extrait afin d'étudier l'expression des transcrits A3B par RT-qPCR. L'ARN de cellules non infectées a été utilisé comme contrôle négatif. L'expression du gène de ménage HPRT a été mesurée et l'expression d'A3B est exposée relativement aux niveaux mesurés dans les cellules non infectées.

3.2. Analyse de l'expression d'A3B par Western Blot

L'induction de l'expression des transcrits A3B dans les cellules HBEC3-KT infectées par l'HAdV-C2 et l'HAdV-C5 étant observée pour certaines durées d'infection, nous avons vérifié si elle est également retrouvée au niveau protéique. Pour rappel, les protéines A3B peuvent être produites sous la forme de 4 isoformes distinguables en fonction de leur poids moléculaire. L'isoforme 1 a une taille de 45.9 kDa, l'isoforme 2 29 kDa, l'isoforme 3 57.2 kDa et l'isoforme 4 43.1 kDa. L'expression de tubuline a également été recherchée afin de s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée dans tous les puits. Des protéines de cellules non infectées et celles de cellules HEK 293T transfectées avec un plasmide codant pour A3B ont été analysées, servant respectivement de contrôles négatif et positif.

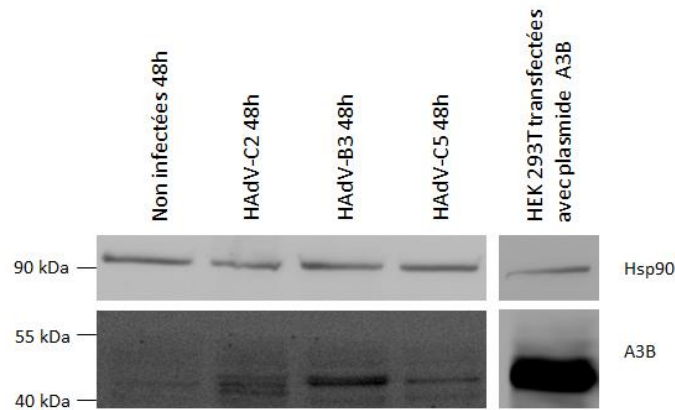


Figure 18. L'expression protéique d'A3B est induite dans les cellules HBEC3-KT par l'HAdV-B3 à 48 heures d'infection. Des cellules HBEC3-KT ont été infectées par 50 copies de génome de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3. 48 heures après infection, les protéines ont été extraites afin d'étudier l'expression protéique d'A3B par Western Blot. Les protéines de cellules non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Le contrôle de charge a quant à lui été réalisé en révélant la tubuline.

Comme pour les résultats RT-qPCR, le profil d'expression protéique A3B (figure 18) par les adénovirus dans des cellules HBEC3-KT est différent de celui observé dans les cellules A549. Une bande nette est présente pour l'échantillon correspondant aux protéines extraites après 48 heures d'infection par 50 copies de génome de l'HAdV-B3 par cellule. Il semble également possible qu'une bande au même poids moléculaire et d'une intensité plus faible, mais tout de même supérieure au contrôle négatif à 48 heures, soit présente pour les cellules infectées par l'HAdV-C5. Ces bandes observées ont un poids moléculaire compris entre 40 kDa et 55 kDa, correspondant à l'isoforme 1 et/ou l'isoforme 4. Par conséquent, les variants d'épissage exprimés ont été déterminés par RT-PCR.

3.3. Détermination des variants d'épissage d'A3B

Comme pour les cellules A549, les régions spécifiques de l'ADN complémentaire d'A3B des cellules HBEC3-KT infectées et non infectées ont été amplifiées à l'aide de 2 couples d'amorces. Pour rappel, le premier couple permet de distinguer les variants d'épissage 1 et 3 (327 bp) du variant 4 (252 bp) et du variant (173 bp), tandis que le second couple d'amorces permet quand à lui de différencier le variant d'épissage 3 (515 bp) des variants 1,2 et 4 (234 bp). Après amplification, la taille des variants d'épissage a été déterminée par migration sur un gel d'agarose 2%.

Comme pour les cellules A549, l'amplification d'une région des variants d'épissage par le premier couple d'amorces montre que, pour les cellules infectées et non infectées, les produits

PCR ont une taille légèrement supérieure à 300 bp, correspondant au(x) variant(s) d'épissage 1 et/ou 3. L'amplification par le second couple d'amorces donne un amplicon entre 200 et 300 bp pour toutes les conditions, correspondant au(x) variant(s) d'épissage 1, 2 et/ou 4. Certaines conditions montrent également la présence d'une bande au-dessus de 500 bp, signifiant l'expression du variant d'épissage 3 pour les cellules HBEC3-KT infectées par l'HAdV-B3 à 48 heures d'infection, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 à 96 heures, et pour les cellules non infectées à 96 heures (figure 19B). Le variant d'épissage 1 est donc exprimé par les cellules HBEC3-KT non infectées et infectées par les 3 adénovirus. Le variant 3 est parfois observé mais sa présence ne semble pas liée à l'infection.

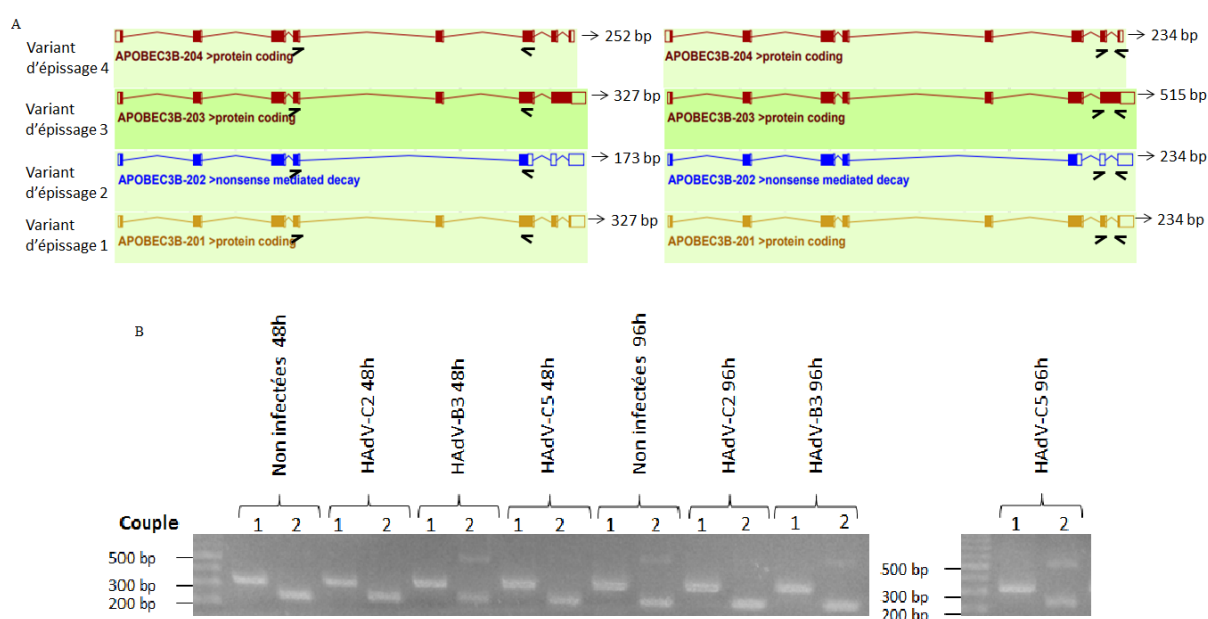


Figure 19. Identification des variants d'épissage d'A3B exprimés dans des cellules HBEC3-KT après infection par des adénovirus. **A.** Amorces utilisées pour amplifier des régions des variants d'épissage d'A3B. Le premier couple d'amorces permet de distinguer en fonction de la taille des produits PCR les variants d'épissage 1 et 3 (327 bp) du variant d'épissage 2 (173 bp) et du variant d'épissage 4 (252 bp). Le second couple d'amorces, en amplifiant une région différente, permet de distinguer les variants d'épissage 1, 2 et 4 (234 bp) du variant d'épissage 3 (515 bp). **B.** Des PCRs utilisant ces 2 couples d'amorces ont été réalisées et la taille des produits PCR a ensuite été déterminée par migration sur un gel d'agarose 2%.

4. Oncogènes

Les gènes précoces des adénovirus (gènes E1, E2, E3 et E4) sont exprimés directement après l'entrée du génome des adénovirus dans le noyau cellulaire afin d'établir une infection et une réplication virales efficaces. Certains de ces gènes, à savoir les gènes E1 et E4, possèdent une activité oncogénique, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'immortaliser des cellules. De plus, comme certains gènes précoces E1 (E1B-19/21K et E1B-55K) ont une fonction anti-

apoptotique, qu'il semble que l'oncogène E6 d'HPV à haut risque est capable à lui seul d'augmentation l'expression d'A3B et que cette induction soit liée à l'inhibition de la protéine pro-apoptotique p53, nous avons testé si les gènes précoces E1 des adénovirus peuvent induire à eux seuls l'expression d'A3B.

4.1. Clonage des plasmides codant pour les gènes précoces

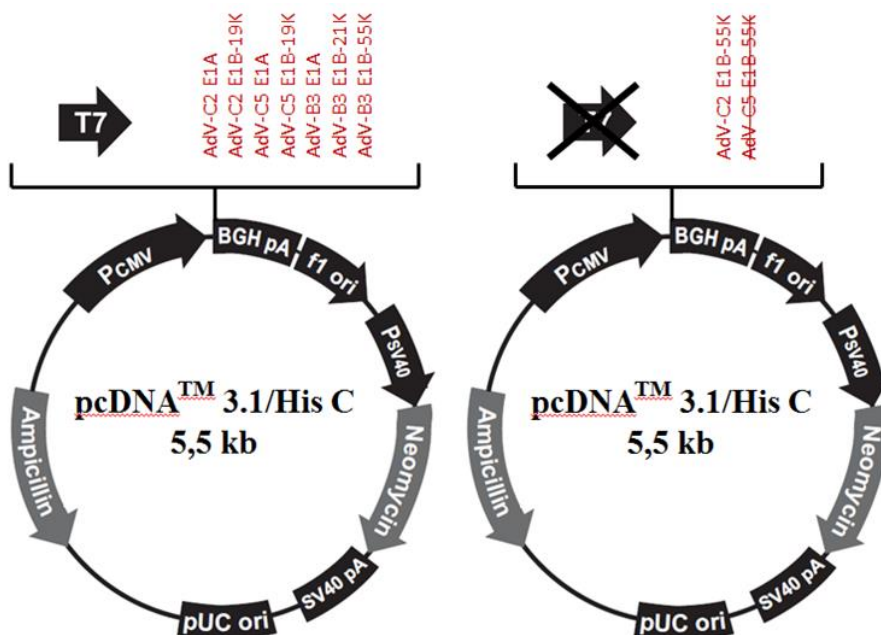


Figure 20. Cartes des plasmides codant pour les gènes précoces E1 des adénovirus. Les gènes précoces E1A et E1B-19K de l'HAAdV-C2 et de l'HAAdV-C5, et E1A, E1B-21K et E1B-55K de l'HAAdV-B3 ont été clonés par recombinaison dans un plasmide pcDNA™ 3.1/His C de 5.5kb. L'oncogène E1B-55K de l'HAAdV-C2 et de l'HAAdV-C5 a quant à lui été inséré par ligation dans un plasmide pcDNA™ 3.1/His C pour lequel le site d'amorçage T7 a été retiré. Ces 2 techniques de clonage n'ont pas permis de cloner l'oncogène E1B-55K de l'HAAdV-C5.

La première étape a consisté à construire les plasmides codant pour les gènes précoces E1A, E1B-19K, E1B-55K de l'HAAdV-C2 et de l'HAAdV-C5, et les oncogènes E1A, E1B-21K et E1B-55K de l'HAAdV-B3. Ces gènes précoces ont été amplifiés par PCR à partir du génome des HAAdVs correspondant et insérés par recombinaison dans un plasmide pcDNA™ 3.1/His C (Invitrogen). Cette technique n'ayant pas fonctionné pour les gènes précoces E1B-55K de l'HAAdV-C2 et de l'HAAdV-C5, ceux-ci ont été clonés par ligation dans un plasmide pcDNA™ 3.1/His C pour lequel le site d'amorçage T7 a été retiré (figure 20). Bien que cette seconde méthode de clonage ait permis de construire le plasmide contenant l'oncogène E1B-55K de l'HAAdV-C2, la construction de l'équivalent HAAdV-C5 a échoué.

4.2. Niveaux d'expression des transcrits A3B dans des cellules pulmonaires exprimant des gènes précoces d'adénovirus

Afin d'étudier si les gènes précoces E1 des adénovirus ont la capacité à eux seuls d'induire l'expression d'A3B, des cellules HBEC3-KT ont été transfectées avec les 8 plasmides codant pour les gènes précoces E1, un plasmide codant pour une protéine GFP et un plasmide codant pour A3B. La transfection du plasmide GFP a permis l'estimation de l'efficacité de la transfection, et la transfection du plasmide A3B a servi de contrôle positif. A 48 heures post-transfection, environ 20% des cellules transfectées par le plasmide codant pour GFP étaient fluorescentes (observation sous microscope à fluorescence). L'ARN des cellules a été extrait et l'expression d'A3B au niveau de l'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR. Afin de comparer directement l'expression d'A3B dans les différentes conditions, les niveaux d'expression d'A3B ont été rapportés sous forme de ratio par rapport au gène de ménage HPRT.

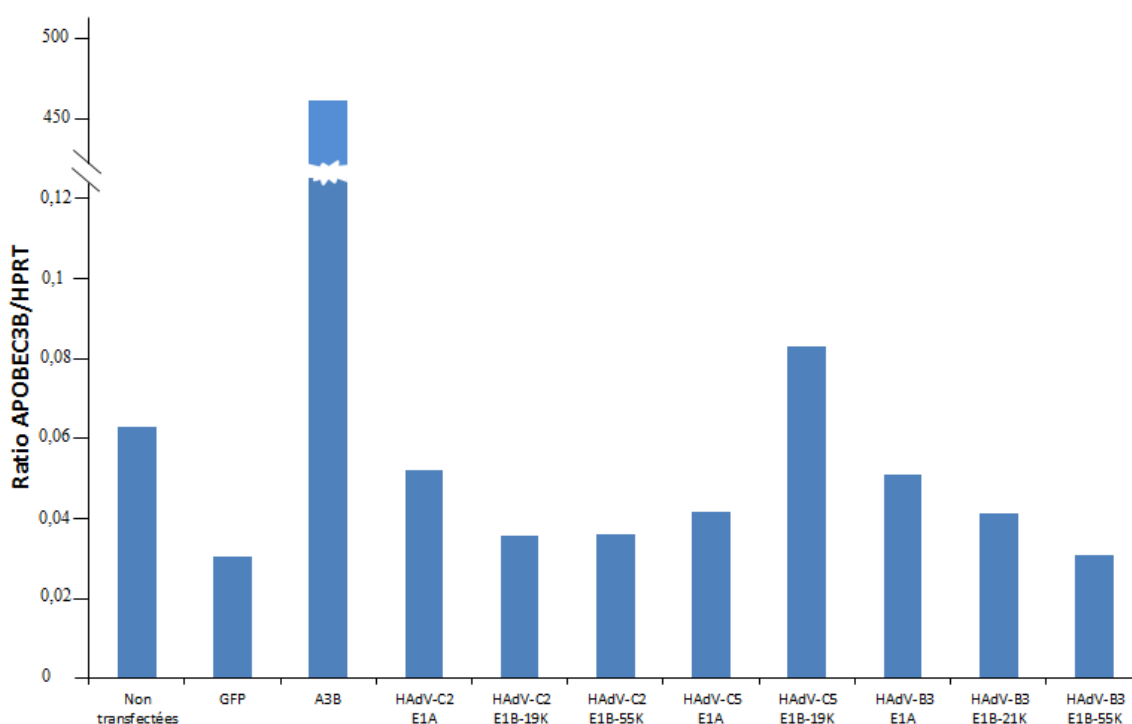


Figure 21. Expression des transcrits A3B dans des cellules HBEC3-KT transfectées par des plasmides d'expression codant pour les gènes précoces E1 des adénovirus. 48 heures après la transfection de cellules HBEC3-KT par des plasmides codant pour les gènes précoces E1A, E1B-19K/21K et E1B-55K de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3, les transcrits A3B ont été quantifiés par RT-qPCR. Les niveaux d'expression d'A3B sont exprimés sous forme de ratio par rapport aux transcrits du gène de ménage HPRT. D'autres cellules HBEC3-KT ont également été transfectées par des plasmides codant pour GFP et A3B afin de servir de contrôle de transfection et de contrôle positif d'expression des transcrits A3B.

Comme attendu, les cellules transfectées avec le plasmide d'expression codant pour A3B expriment une très grande quantité de transcrits A3B. Les cellules transfectées avec les plasmides d'expression codant pour les différents gènes précoces ne montrent pas de modifications marquées des niveaux du transcrit A3B (figure 21).

Discussion

Près de 30 % des tumeurs du cancer du poumon non à petites cellules présentent des signatures mutationnelles associées à l'activité désaminase des protéines de la famille APOBEC3, mais les mécanismes d'induction de leur expression restent encore inconnus pour ce type de cancer. Le but de ce travail était donc de tester si l'infection de cellules pulmonaires par des souches communes d'adénovirus pouvait induire l'expression des protéines APOBEC3, et plus particulièrement du membre APOBEC3B.

Après amplification des souches adénovirales B3, C2 et C5 et vérification de leurs identités par génotypage, nous avons pu montrer que l'infection de cellules pulmonaires **cancéreuses A549** par ces adénovirus provoquait une augmentation marquée des transcrits A3B, et que parmi les sept membres que compte la famille des A3s, seul le membre A3B était induit par l'infection au niveau transcriptionnel (données non exposées). Nous avons aussi observé une induction de l'expression protéique d'A3B dans le cas des cellules cancéreuses infectées par les souches B3 et C2 et ce à plusieurs reprises lors d'expériences indépendantes. L'amplification des virus HAdV-C5 ayant été faite plus tard dans l'avancement de ce travail, l'infection des cellules pulmonaires cancéreuses par l'HAdV-C5 n'a pu être faite qu'une seule fois. Il est donc nécessaire de répéter cette infection pour déterminer l'impact de ce virus sur l'expression de la protéine A3B.

Les résultats obtenus par Western Blot à la figure 14 montrent que l'infection de cellules pulmonaires cancéreuses par la souche C2 induit l'expression d'une protéine A3B dont le poids moléculaire est légèrement inférieur à celui des protéines A3B observées dans le cas d'une infection par l'HAdV-B3. Nous avons donc tenté d'expliquer cette différence. Notre première hypothèse était que, comme l'anticorps anti-A3B reconnaît également les protéines de 2 autres membres de la famille A3, à savoir A3A et A3G, la différence entre les poids moléculaires est due à l'induction de 2 membres A3 différents par les souches C2 et B3. Les protéines A3A ayant un poids moléculaire largement inférieur à celui observé (23 kDa) et les transcrits correspondant n'étant pas été détectés par RT-qPCR (données non exposées), l'induction de l'expression d'A3A a rapidement été rejetée. Par contre, comme les protéines A3G ont un poids moléculaire prédit de 46 kDa, nous avons considéré la possibilité que la bande observée lors de l'infection par l'HAdV-B3 soit due à une augmentation de l'expression d'A3G. Nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité des transcrits A3G, celui-ci étant détecté à un niveau au moins 100 fois inférieur à ceux d'A3B (données

non exposées). Ce résultat n'est cependant pas suffisant pour exclure définitivement cette hypothèse.

Sachant que la protéine A3B présente 4 isoformes dont 2 ayant des poids moléculaires pouvant correspondre aux bandes observées, à savoir l'isoforme 1 (45.9 kDa) et l'isoforme 4 (43.1 kDa), nous avons également envisagé que la différence entre les poids moléculaires est due à l'induction de l'expression de 2 isoformes d'A3B différents par les souches C2 et B3. Nous avons donc recherché la présence de différents variants d'épissage exprimés au niveau transcriptionnel. L'analyse RT-PCR a montré la présence constante du variant 1 correspondant l'isoforme 1. Nous avons pu aussi observé dans certains cas la présence du variant 3 correspondant à l'isoforme 3 (57.2 kDa), mais exprimé à un niveau beaucoup plus faible. Néanmoins, le variant 4, correspondant à une protéine de 43.1 kDa, n'a jamais été détecté. Par conséquent, il ne semble pas que la différence de poids moléculaire des protéines A3B puisse être expliquée par l'expression d'isoformes différents selon la souche adénovirale.

Nous émettons donc l'hypothèse que l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 induisent l'expression de l'isoforme 1 d'A3B (45.9 kDa) dans les cellules pulmonaires cancéreuses A549 et que la différence de taille observée entre les protéines A3B induites par ces 2 souches lors de l'infection puisse être liée à une modification post-traductionnelle de la protéine. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour valider ou non cette hypothèse.

A ce stade de notre travail, il nous paraît essentiel de valider (ou invalider) deux points critiques :

1. Vérifier que l'attribution à A3B des bandes observées par Western blot (figure 14) soit légitime
2. Si A3B est bien exprimée, est-elle active ? : i.e. exerce-t-elle une activité désaminase ?

Pour tester le premier point, nous prévoyons d'établir une lignée de cellules A549 exprimant constitutivement des shRNAs ciblant spécifiquement les transcrits A3B. De cette manière, l'infection de ces cellules par les souches B3 et C2 ne devrait pas mener à l'induction de la protéine A3B, et si les bandes précédemment observées ont été correctement attribuées, elles disparaîtront. Pour tester le second point, nous envisageons d'utiliser un test de désamination *in vitro* afin de vérifier l'activité fonctionnelle des protéines A3B exprimées par l'infection. Ce test consiste à mettre en contact les extraits protéiques avec une sonde contenant le motif 5'TCA-3' spécifiquement reconnu par A3B et des enzymes UDG (uracil-DNA-glycosylase). Si l'extrait protéique contient A3B, la cytosine sera convertie en uracile et la sonde d'ADN

sera clivée en 2 fragments au niveau de l'uracile par les enzymes UDG. Afin de mettre au point ce test, des cellules HEK 293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour A3B et les protéines ont ensuite été extraites dans 6 tampons différents, à savoir le tampon RIPA, NP-40, HED, un tampon de lyse froid et les 2 tampons fournis dans le kit PARISTM. Les résultats (données non exposées) ont montré que le tampon HED et sa méthode physique d'extraction associée préserve au mieux l'activité désaminase d'A3B. Comme les échantillons protéiques des cellules A549 après infection ont été extraits dans du tampon RIPA et que ce dernier inhibe l'activité d'A3B, nous devons recommencer les infections des cellules A549 et ensuite extraire les protéines à l'aide du tampon HED et sa méthode physique d'extraction associée avant de pouvoir réaliser ce test.

La compréhension des mécanismes menant à l'expression des protéines A3B dans les cellules cancéreuses est importante, car elle pourrait aider à prédire l'évolution des tumeurs. En effet, le nombre de signatures mutationnelles associées à l'activité désaminase d'A3B augmente au cours du développement du cancer et pourrait de cette manière augmenter la diversité clonale menant au développement de métastases et l'apparition de la résistance aux traitements (de Bruin *et al.*, 2015). Nous avons également initié l'étude de l'expression d'A3B par les 3 souches adénovirales dans des cellules pulmonaires primaires car le profil de l'expression d'A3B dans des cellules non cancéreuses pourrait être différent par rapport aux cellules cancéreuses. En effet, les cellules primaires pourraient être moins permissives aux virions ou possèderaient une réponse immune innée différente et plus forte. Comme l'infection des cellules pulmonaires primaires immortalisées HBEC3-KT par l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 n'a pu être faite qu'une seule fois, il est donc nécessaire de répéter cette infection pour déterminer l'impact de ces virus sur l'expression de la protéine A3B.

Nous avons également commencé à étudier si les gènes précoces E1 de l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 sont capables à eux seuls d'induire l'expression des transcrits A3B. Le rationnel de cette expérience tient en 2 points. Tout d'abord, des oncogènes viraux comme E6 chez HPV ou le large antigène T des polyomavirus humains BKPyV sont capables à eux seuls d'induire A3B *in vitro*. Ensuite, les gènes précoces d'adénovirus ont une action pro-proliférative sur la cellule hôte et peuvent transformer des cellules primaires *in vitro*. Les premiers résultats obtenus ne montrent pas une expression significative d'A3B, mais le faible taux de transfection et l'absence de vérification de l'expression des protéines de ces gènes pourraient avoir biaisé l'analyse. Il est également possible que ces protéines collaborent avec d'autres protéines virales pour induire l'expression d'A3B. Par conséquent, cette partie du travail mérite d'être approfondie.

Perspectives

Bien que l'induction de l'expression d'A3B au niveau protéique doit encore être confirmée par interférence par ARN et le test de l'activité de désamination, l'augmentation marquée de l'expression des transcrits A3B par certaines souches d'adénovirus dans les cellules pulmonaires épithéliales cancéreuses et la révélation de l'expression protéines A3B par Western Blot après infection sont très encourageants et ouvrent également des perspectives supplémentaires.

Il est peu probable que seule l'augmentation de l'expression d'A3B induite par une infection virale mène à la présence de signatures mutationnelles caractéristiques d'A3B dans les tumeurs. En effet, comme les poumons sont constamment exposés à des agents physiques, chimiques ou biologiques qui sont des carcinogènes ou qui peuvent induire la production de ROS capables d'altérer l'ADN, les mécanismes de réparation de l'ADN sont souvent activés, exposant l'ADN simple brin, le substrat d'A3B. Par conséquent, notre hypothèse consiste à combiner l'augmentation de l'expression d'A3B par certaines souches d'adénovirus et l'induction des dommages à l'ADN par des polluants de l'air ou la fumée de cigarette (figure 22). Après établissement d'une infection persistante par l'HAdV-C2, l'HAdV-B3 et l'HAdV-C5 dans les cellules primaire HBEC3-KT comme décrit par Zheng *et al.* (2016), ces lignées cellulaires seront exposées de manière chronique à des carcinogènes tels que les condensats de la fumée de cigarette, un carcinogène retrouvé dans la fumée de cigarette appelé le benzo[a]pyrènediol époxydé (BPDE) ou au 3-nitrobenzanthrone (3-NBA) un puissant carcinogène présent dans les gaz d'échappement. Nous pourrions étudier l'expression d'A3B, l'activité désaminase des extraits cellulaires, la présence de la base uracile et de mutations associées à A3 dans l'exome cellulaire.

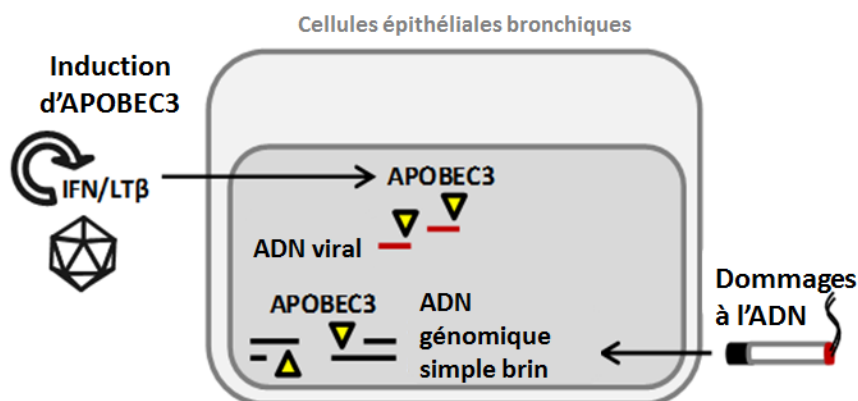


Figure 22. Hypothèse quant à la combinaison de l'induction des dommages à l'ADN et l'expression d'APOBEC3. L'expression d'A3B est induite par une infection virale dans des cellules épithéliales bronchiques. En parallèle, ces cellules sont exposées de manière chronique à des agents carcinogènes tels que ceux retrouvés dans la fumée de cigarette, activant les mécanismes de réparation de l'ADN et exposant l'ADN simple brin qui constitue le substrat d'A3B.

Conclusions

Au final, ce travail a permis de mettre en évidence l'induction de l'expression des transcrits A3B par l'HAdV-C2, l'HAdV-C5 et l'HAdV-B3 dans des cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses et l'expression de protéines reconnues par l'anticorps anti-A3B-A3G-A3A qui présentent un poids moléculaire différent en fonction du virus dans des cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses. Comme la différence entre les poids moléculaires des protéines révélées ne semblant pas être expliquée par l'induction de l'expression d'autres transcrits d'épissage d'A3B ou l'augmentation de l'expression des transcrits A3G, nous émettons donc l'hypothèse que l'HAdV-C2 et l'HAdV-B3 induisent l'expression de l'isoforme 1 d'A3B (45.9 kDa) et que la variation du poids moléculaire est liée à une modification post-traductionnelle de la protéine. Il nous semble d'abord critique de valider (ou invalider) l'attribution à A3B des bandes observées par Western blot par interférence par ARN et vérifier si l'activité désaminase des protéines A3B est fonctionnelle par un test de désamination.

Bien que l'infection par l'HAdV-C5 des cellules A549 et l'infection des cellules HBEC3-KT par les 3 souches adénovirales doivent être répétées, et que l'induction de l'expression d'A3B au niveau protéique doit encore être confirmée, la nette augmentation de l'expression des transcrits A3B dans des cellules pulmonaires cancéreuses est très encourageante et pourrait être le point de départ du premier lien entre une infection virale et le cancer du poumon non à petites cellules.

Références bibliographiques

- Alexandrov, L.B. *et al.* (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, **500**, 415–421.
- Atasheva, S. and Shayakhmetov, D.M. (2016) Adenovirus sensing by the immune system. *Curr. Opin. Virol.*, **21**, 109–113.
- Berger, S. (2017) Adenovirus infection 2017 edition. 2017th ed. GIDEON Informatics Inc, Los Angeles.
- de Bruin, E.C. *et al.* (2015) Analysis of intratumor heterogeneity unravels lung cancer evolution. *Mol. Cell. Oncol.*, **2**, 1–3.
- Burns, M.B., Lackey, L., *et al.* (2013a) APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, **494**, 366–371.
- Burns, M.B., Lackey, L., *et al.* (2013b) APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, **494**, 366–370.
- Burns, M.B., Temiz, N. a, *et al.* (2013) Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat. Genet.*, **45**, 977–983.
- Calcagno, C. *et al.* (2015) Lung cancer: biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*, **1865**, 189–210.
- Caval, V., Suspène, R., Shapira, M., *et al.* (2014) A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. *Nat. Commun.*, 1–7.
- Caval, V., Suspène, R., Vartanian, J.P., *et al.* (2014) Orthologous mammalian APOBEC3A cytidine deaminases hypermutate nuclear DNA. *Mol. Biol. Evol.*, **31**, 330–340.
- Cook, J. and Radke, J. (2017) Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, **6**, 1–10.
- Eckstein, A. *et al.* (2010) Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res.*, **88**, 86–94.
- Flint, J. *et al.* (2015) Principles of Virology, Volume I: Molecular Biology, Fourth Edition American Society of Microbiology.
- Frost, J.R. *et al.* (2017) The interaction of adenovirus E1A with the mammalian protein Ku70/XRCC6. *Virology*, **500**, 11–21.
- Genus, F. *et al.* (2012) Adenoviridae. In, King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., L.E.J.S.D. (ed), *Virus Taxonomy*. Elsevier, pp. 125–141.
- Greber, U. (2016) Virus and host mechanics support membrane penetration and cell entry. *J. Virol.*, **90**, 3082–3085.
- Greber, U.F. (1998) Virus assembly and disassembly: the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Rev. Med. Virol.*, **8**, 213–222.
- Grosso, F. *et al.* (2017) Suppression of Adenovirus Replication by Cardiotonic Steroids. *J. Virol.*, **91**, 1–16.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. a. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, **144**, 646–674.
- Harrach, B. and Benkö, M. (2003) Adenoviruses : model and vectors in virus-host interactions :

- virion-structure, viral replication, host-cell interactions Doerfler,W. and Böhm,P. (eds) Springer.
- Harris,R.S. *et al.* (2015) Molecular mechanism and clinical impact of APOBEC3B catalyzed mutagenesis in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **17**, 1–10.
- Henderson,S. *et al.* (2014) APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development. *Cell Rep.*, **7**, 1833–1841.
- Kanu,N. *et al.* (2016) DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Genome Biol.*, **17**, 2–15.
- Kumar,S. and Hedges,S.B. (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, **392**, 917–920.
- Lang,S.E. and Hearing,P. (2003) The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene*, **22**, 2836–2841.
- LaRue,R.S. *et al.* (2009) Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J. Virol.*, **83**, 494–497.
- Launer-Felty,K. *et al.* (2015) Structural analysis of adenovirus VAI RNA defines the mechanism of inhibition of PKR. *Biophys. J.*, **108**, 748–757.
- Madisch,I. *et al.* (2005) Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants o. **79**, 15265–15276.
- McNees,A.L. and Gooding,L.R. (2002) Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death. *Virus Res.*, **88**, 87–101.
- Michael B. Burns, Brandon Leonard,R.S.H. (2015) APOBEC3B : Pathological Consequences of an Innate Immune. *Biomed J.*, **38**, 102–110.
- Mori,S. *et al.* (2017) Human Papillomavirus 16 E6 Up-regulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J. Virol.*, 1–44.
- Nemerow,G.R. and Stewart,P.L. (2016) Insights into Adenovirus Uncoating from Interactions with Integrins and Mediators of Host Immunity. *Viruses*, **8**, 1–15.
- Okuyama,S. *et al.* (2012) Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int. J. Cancer*, **130**, 1294–1301.
- Periyasamy,M. *et al.* (2015a) APOBEC3B-Mediated Cytidine Deamination Is Required for Estrogen Receptor Action in Breast Cancer. *Cell Rep.*, **13**, 108–121.
- Periyasamy,M. *et al.* (2015b) APOBEC3B-Mediated Cytidine Deamination Is Required for Estrogen Receptor Action in Breast Cancer. *Cell Rep.*, **13**, 108–121.
- Philipson,L. (1995) The Molecular Repertoire of Adenoviruses I : Virion Structure and Infection 1995th ed. Doerfler,W. and Böhm,P. (Petra) (eds) Springer Berlin Heidelberg.
- Radke,J.R. *et al.* (2014) Adenovirus E1B 19-Kilodalton Protein Modulates Innate Immunity through Apoptotic Mimicry. *J. Virol.*, **88**, 2658–2669.
- Roberts,S. a *et al.* (2013) An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat. Genet.*, **45**, 970–976.
- Rosanna,D.P. and Salvatore,C. (2012) Reactive Oxygen Species , Inflammation , and Lung

- Diseases. *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 3889–3900.
- Russell, I.A. *et al.* (2004) Exploitation of cell cycle and cell death controls by adenoviruses: the road to a productive infection Springer. Alonso, C. (ed).
- Salter, J.D. *et al.* (2016) The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 578–594.
- Samet, J. *et al.* (2009) Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. *Clin. Cancer ...*, **15**, 5626–5645.
- Septyarskiy, V.B. *et al.* (2016) APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication. *Genome Res.*, **26**, 174–182.
- Smith, H.C. *et al.* (2012) Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **23**, 258–268.
- Tarakanova, V.L. and Wold, W.S.M. (2010) Adenovirus E1A and E1B-19K proteins protect human hepatoma cells from transforming growth factor β 1-induced apoptosis. *Virus Res.*, **147**, 67–76.
- Torre, L. a. *et al.* (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.*, **65**, 87–108.
- Verhalen, B. *et al.* (2016) Functional Upregulation of the DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B by Polyomaviruses. *J. Virol.*, **90**, 6379–6386.
- Vieira, V.C. *et al.* (2014) Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *MBio*, **5**, 1–8.
- Waters, C.E. *et al.* (2015) FHIT loss-induced DNA damage creates optimal APOBEC substrates: Insights into APOBEC-mediated mutagenesis. *Oncotarget*, **6**, 3409–3419.
- White, E. (2006) Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ.*, **13**, 1371–1377.
- Willems, L. and Gillet, N.A. (2015) APOBEC3 interference during replication of viral genomes. *Viruses*, **7**, 2999–3018.
- Zheng, Y. *et al.* (2016) E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. *PLoS Pathog.*, **12**, 1–24.