



**HAL**  
open science

# Etude de la séparation de phase liquide-liquide et du chaperon d'histone fact dans l'organisation du compartiment de réplication de l'adénovirus de type 5

Guillaume Beucher

► **To cite this version:**

Guillaume Beucher. Etude de la séparation de phase liquide-liquide et du chaperon d'histone fact dans l'organisation du compartiment de réplication de l'adénovirus de type 5. Immunologie. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0192 . tel-04246168

**HAL Id: tel-04246168**

**<https://theses.hal.science/tel-04246168v1>**

Submitted on 17 Oct 2023

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Microbiologie et Immunologie

Par Guillaume BEUCHER

**Etude de la séparation de phase liquide-liquide et du chaperon  
d'histone FACT dans l'organisation du compartiment de réplication  
de l'Adénovirus de type 5**

Sous la direction de : Fabienne RAYNE

Soutenue le 11 Juillet 2023

Membres du jury :

Dr. Fabienne Rayne  
Pr. Dr. Nicolas Larmonier  
Pr. Dr. Cécile Malnou  
Dr. Patrick Lomonte  
Dr. Caroline Goujon  
Dr. Thierry Michon

Université de Bordeaux  
Université de Bordeaux  
Université de Toulouse  
Université de Lyon  
Université de Montpellier  
Université de Bordeaux

Directrice de thèse  
Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

Membre invité :

Dr. Harald Wodrich

Université de Bordeaux

Invité







**Titre :** Etude de la séparation de phase liquide-liquide et du chaperon d'histone FACT dans l'organisation du compartiment de réplication de l'Adénovirus de type 5.

**Résumé :** L'Adénovirus est un virus à ADN double brin qui est utilisé comme vecteur vaccinal. Son génome est très compacté à l'intérieur de la particule virale et il est organisé en chromatine grâce à son association avec la protéine virale VII. La libération du génome viral dans le noyau d'une cellule cible est suivie par sa décompaction, par l'éviction partielle de protéines VII et le dépôt d'histones cellulaires afin d'initier la transcription des gènes viraux puis la réplication de l'ADN viral. A un stade plus tardif, ce processus est inversé et les génomes viraux sont condensés et compactés en chromatine associée à la protéine VII et dépourvue d'histones cellulaires. A l'heure actuelle, peu de facteurs impliqués dans cette chromatinisation réversible du génome adénoviral sont connus. Ces facteurs sont probablement les chaperons d'histones cellulaires, classés en trois groupes différents agissant de manière dépendante ou non de la réplication, ou durant la réparation de l'ADN. La réplication de l'ADN viral s'effectue à l'intérieur d'organelles sans membranes induites par le virus et nommées compartiments de réplication viraux (CR). Les CR sont formés par des facteurs de l'hôte et par des protéines virales comme la protéine de réplication virale DBP (DNA Binding Protein). Les CR sont morphologiquement dynamiques et deux types de CR distincts peuvent être distingués. Les CR précoces sont supposés répliquer les génomes pour l'expression des gènes viraux tandis que les CR tardifs entourent des corps appelés corps viraux induits après la réplication (ViPR bodies en anglais) qui sont le site d'accumulation de génomes susceptibles d'être encapsidés dans les nouvelles particules virales. Nous avons essayé d'élucider le mécanisme à l'origine de la formation des CR et des ViPR et ce qui permet le recrutement ou l'exclusion des protéines de l'hôte et des protéines virales, qui pourrait être nécessaire à la chromatinisation réversible des génomes viraux. Les mécanismes impliqués sont probablement la séparation de phase liquide-liquide (LLPS). La LLPS est un processus physique réversible permettant l'enrichissement et l'appauvrissement en facteurs au sein de deux phases fonctionnelles distinctes formées par de faibles interactions entre des protéines et des acides nucléiques. Elle pourrait expliquer la formation des CR de l'Adénovirus. Dans ce travail, nous avons montré que les CR sont dépourvus d'histones cellulaires, qu'ils excluent la chromatine de l'hôte et que des chaperons d'histones incluant FACT (Facilitates Chromatin Transcription) y sont spécifiquement associés. FACT s'accumule dans les CR et sa sous-unité SSRP1 induit de la séparation de phase suggérant un rôle dans la formation des CR de l'Adénovirus et la réplication et/ou la transcription du génome viral probablement par la chromatinisation réversible du génome viral. Ce travail permettra de mieux comprendre le devenir du génome adénoviral dans la cellule infectée et potentiellement d'améliorer encore les vecteurs basés sur les Adénovirus.

Ce travail de thèse s'est également concentré sur l'étude du SRAS-CoV-2 pouvant provoquer un syndrome de détresse respiratoire aiguë avec un degré élevé de mortalité chez les patients âgés. Nous avons établi des épithéliums bronchiques primaires (EB) reconstitués fonctionnels dérivés de donneurs (adultes et enfants) pour étudier l'infection par le SRAS-CoV-2 dans un modèle physiologiquement pertinent. Nous avons identifié les cellules multi-ciliées comme principales cellules cibles du SRAS-CoV-2. Nous avons observé une propagation virale rapide dans tout l'EB en 24 à 48 heures. En 3-4 jours, nous avons observé la formation de syncytiums entre les cellules ciliées et les cellules basales qui s'accumulent du côté apical des EB. Nous observons que les cellules infectées, notamment les syncytiums, sont libérés au niveau apical et contribuent à la dose virale transmissible. Il est intéressant de noter que certains EB, principalement reconstitués à partir de jeunes donneurs, ont montré une résistance intrinsèque à l'infection et à la propagation du virus. Ce phénotype d'infection restreint était corrélé à une libération plus rapide de la sécrétion d'interféron de type III. De plus, le traitement par interféron exogène de type III des épithéliums permissifs a installé une restriction de l'infection, tandis que l'inactivation du gène de l'interféron a favorisé l'infection. Prises ensemble, nos données révèlent la formation de syncytiums comme contribution possible à la dissémination tissulaire ou environnementale du SRAS-CoV-2 et la réponse IFN de type III en tant que contributeur central à la résistance au SRAS-CoV-2 dans les BE, ce qui peut expliquer les observations épidémiologiques selon lesquelles la mortalité par le SRAS-CoV-2 dépend de l'âge.

**Mots clés :** Adénovirus, Chromatinisation, Chaperon d'histone, Séparation de phase liquide-liquide, Interactions hôte-pathogène, SRAS-CoV-2.

**Title :** Study of liquid-liquid phase separation and the FACT histone chaperone in the adenovirus type 5 replication compartment organization.

**Abstract :** Adenovirus is a double stranded DNA virus which is used as a viral vector vaccine. Its genome is highly compacted inside the viral particle and organized into chromatin by virtue of the protein VII. Nuclear genome delivery in a target cell is followed by decompaction and partial eviction of protein VII and the deposition of cellular histones to initiate viral genes transcription and then the viral DNA replication. At late stages the process is reversed and viral genomes are condensed and packaged into a chromatin associated with proteins VII and without cellular histones. Few factors involved in driving this reversible chromatinization of the adenoviral genome are known. Potential candidates involve cellular histone chaperons, which are classed into three different groups acting replication dependent, replication independent or following DNA repair. Viral genome replication occurs in virus induced membraneless organelles called viral replication compartment (RC) formed with host factors and viral proteins like the viral DBP (DNA Binding Protein) protein. RCs are morphologically dynamic and two distinct RCs can be distinguished. Early RCs are presumed to replicate genomes for gene expression while late RCs surround bodies called viral induced post replication bodies (ViPR bodies) which are the site of viral genome accumulation likely for their encapsidation into new viral particles. We tried to elucidate the mechanism driving RC and ViPR bodies formation and what allows the recruitment or exclusion of both host and viral proteins which can be necessary for the reversible viral genome chromatinization. Mechanisms involved are likely liquid-liquid phase separation (LLPS). LLPS is a reversible physical process permitting the enrichment and depletion of factors within two functional separate phases formed by weak interactions between proteins and nucleic acids. It can explain the adenoviral RC formation. In this work, we have shown that RCs are histone free, exclude host chromatin and that histone chaperones including FACT (FACilitates Chromatin Transcription) are specifically associated with RCs. FACT accumulates in RC and its SSRP1 subunit drives phase separation suggesting a role in Adenovirus RC formation and genome replication and/or transcription possibly by reversible genome chromatinization. This work will allow to better understand the fate of the adenoviral genome in the infected cell and to improve potentially adenoviral based vectors.

This thesis work also focused on the study of SARS-CoV-2 which can cause acute respiratory distress syndrome with a high degree of mortality in elderly patients. We established functional reconstituted primary bronchial epithelia (BE) derived from donors (adults and children) to study SARS-CoV-2 infection in a physiologically relevant model. We identified multi-ciliated cells as the primary target cells for SARS-CoV-2. We further observed rapid viral spread throughout the entire BE within 24-48 hours. Within 3-4 days, we observed syncytia formation between ciliated cells and basal cells which accumulate at the apical side of the BE. We show that infected cells including syncytia are released into the apical lumen and contribute to the transmittable virus dose. Interestingly, some BE mainly reconstituted from young donor, showed an intrinsic resistance to infection and virus spread. This restricted infection phenotype correlated with a faster release of type-III interferon secretion. Moreover, exogenous type-III interferon treatment to permissive epithelia installed infection restriction while interferon gene knockout promoted infection. Taken together our data uncover syncytia formation as possible contribution to tissue or environmental SARS-CoV-2 dissemination and the type-III IFN response as a central contributor to SARS-CoV-2 resistance in BE, which may explain epidemiological observations that SARS-CoV-2 fatality is age dependent.

**Keywords :** Adenovirus, Chromatinization, Histone chaperone, Liquid-liquid phase separation, Host-Pathogen interactions, SARS-CoV-2.

---

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>18</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>23</b>
I. La chromatine cellulaire : structure et régulation.....	24
I.1 Organisation de la chromatine cellulaire. ....	24
I.1.1 Structure et formation des nucléosomes avec les histones cellulaires. ....	24
I.1.2 Modifications épigénétiques, régulation de la compaction de la chromatine cellulaire et de l'expression des gènes.....	28
I.1.2.1 Gestion des histones et de la chromatine cellulaire par les chaperons d'histones. ....	30
I.1.2.1.1 Principes généraux sur les chaperons d'histones .....	30
I.1.2.1.2 Chaperons d'histones indépendants de la réplication.....	33
I.1.2.1.3 Chaperons d'histones dépendants de la réplication.....	33
I.1.2.1.4 Chaperons d'histones impliqués dans l'import nucléaire des histones.....	34
I.1.2.1.5 Chaperons d'histones impliqués dans le stockage des histones.....	35
I.1.2.2 Le chaperon d'histone FACT est impliqué dans le dépôt de dimères H2A-H2B durant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. ....	37
I.1.2.2.1 FACT : un complexe hétérodimérique formé par SSRP1 et Spt16. ....	37
I.1.2.2.2 Structure de la sous-unité SSRP1. ....	38
I.1.2.2.3 Structure de la sous-unité Spt16. ....	38
I.1.2.2.4 Rôle de FACT durant la transcription. ....	39
I.1.2.2.5 Rôle de FACT durant la réplication de l'ADN.....	41
I.1.2.2.6 Rôle de FACT durant la réponse et la réparation aux dommages de l'ADN. ....	41
I.1.2.2.7 Régulation des niveaux protéiques de FACT, de son activité et inhibition par ARN interférence ou pharmacologique.....	42
II. Les Adénovirus. ....	44
II.1 Introduction générale.....	44
II.1.1 Histoire et découverte.....	44
II.1.2 Classification.....	44
II.1.3 Pathogénicité.....	45
II.1.4 Traitements. ....	46
II.1.5 Utilisation thérapeutique. ....	46
II.1.5.1 Vaccination. ....	46

II.1.5.2	Vecteurs de thérapie génique.....	47
II.1.5.3	Vecteurs oncolytiques.....	47
II.2	Structure de la particule virale.....	48
II.2.1	Protéines majeures.....	49
II.2.2	Protéines mineures.....	49
II.2.3	Protéines core.....	49
II.2.4	Structure du génome viral.....	50
II.3	Cycle de réplication de l'adénovirus.....	52
II.3.1	Reconnaissance et entrée de l'Ad5 dans la cellule hôte.....	52
II.3.2	Rupture et échappement endosomal.....	53
II.3.3	Transport de la particule virale vers le MTOC.....	53
II.3.4	Libération du génome viral dans le noyau.....	54
II.3.5	Expression des gènes viraux.....	54
II.3.6	La réplication du génome viral.....	55
II.3.7	Assemblage et sortie virale.....	55
II.4	Le devenir du génome viral dans le noyau : structure, transcription et réplication.....	57
II.4.1	Chromatinisation réversible du génome adénoviral.....	57
II.4.2	Régulation de la chromatine adénovirale par les chaperons d'histones.....	59
II.4.3	Formation et composition des compartiments de réplication adénoviraux (CR).....	60
II.4.4	Chromatinisation réversible connue pour d'autres virus.....	64
II.4.5	L'infection par de nombreux virus induit la formation de compartiments de réplication viraux.....	66
II.5	Les organelles sans membranes et la séparation de phase liquide-liquide (LLPS).....	67
II.5.1	Introduction générale.....	67
II.5.1.1	Définition, principes physiques généraux et fonctions cellulaires associées aux organelles sans membranes.....	67
II.5.1.2	Méthodes d'étude de la séparation de phase liquide-liquide.....	70
II.5.2	Des compartiments cytoplasmiques sans membranes se forment par LLPS.....	71
II.5.3	De nombreux organites sans membranes se forment par LLPS dans le noyau... ..	72
II.5.4	Les CR de nombreux virus dont ceux des Ad sont des MLO qui se forment par LLPS.....	74
<b>Objectifs de la thèse.....</b>		<b>77</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>		<b>79</b>
I.	Matériel.....	80
I.1	Equipements techniques.....	80
I.2	Consommables.....	80
I.3	Kits.....	80

I.4	Logiciels. ....	81
I.5	Produits chimiques et réactifs. ....	81
I.6	Solutions stocks. ....	81
I.7	Tampons et médiums. ....	81
I.8	Lignées cellulaires. ....	82
I.9	Anticorps. ....	82
I.9.1	Anticorps primaires. ....	82
I.9.2	Anticorps secondaires. ....	84
II.	Culture cellulaire. ....	84
II.1	Lignées cellulaires. ....	84
II.2	Maintenance des cellules. ....	85
II.3	Transfection d'ADN. ....	85
II.4	Traitements pharmacologiques. ....	86
III.	Culture d'épithéliums bronchiques (EB) reconstitués de patients. ....	87
III.1	Génération des épithéliums. ....	87
III.2	Maintenance des épithéliums. ....	87
IV.	Infection par l'Ad5. ....	87
IV.1.1	Infection synchronisée des lignées cellulaires. ....	87
IV.1.2	Infection pour les expériences d'imagerie en temps réel. ....	88
IV.1.3	Infection des épithéliums bronchiques. ....	88
V.	Immunofluorescence et Microscopie. ....	89
V.1	Fixation. ....	89
V.1.1	Fixation des lignées cellulaires. ....	89
V.1.2	Fixation des épithéliums bronchiques. ....	89
V.1.3	Congélation et décongélation des épithéliums bronchiques. ....	89
V.2	Immunofluorescence. ....	90
V.2.1	Marquage des lignées cellulaires. ....	90
V.2.2	Marquage des épithéliums bronchiques. ....	90
V.3	Acquisitions par microscopie et analyses. ....	91
V.3.1	Acquisition à partir de cellules fixées. ....	91
V.3.2	Acquisition à partir de cellules vivantes. ....	91
V.3.3	Acquisition des épithéliums bronchiques fixés. ....	92
V.4	Analyses et quantification des images. ....	92
V.4.1	Traitements. ....	92
V.4.2	Quantification. ....	92
V.4.3	Elaboration des profils d'intensité ....	92

VI.	Microscopie électronique.....	93
VI.1	Fixation et traitement des épithéliums bronchiques.....	93
VI.2	Acquisition des images.....	93
VII.	Biochimie.....	93
VII.1	Lyse cellulaire.....	93
VII.2	Dosage protéique par méthode Bradford.....	94
VII.3	Electrophorèse des protéines en gel dénaturant et réducteur (SDS-PAGE).....	94
VII.4	Coloration par technologie « Stain Free ».....	94
VII.5	Western Blot.....	95
VII.6	Révélation et quantification.....	95
<b>RESULTATS.....</b>		<b>96</b>
I.	Les compartiments de réplication de l'Ad5 sont dépourvus d'histones.....	97
I.1	Mise en évidence et caractérisation des CR de l'Ad dans les cellules U2OS.....	97
I.2	Les CR de l'Ad5 sont dépourvus d'histones cellulaires dans les cellules U2OS.....	100
I.3	Au cours de l'infection, les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments dépourvus d'histones et d'ADN cellulaire. ....	102
I.4	Conclusion générale du chapitre.....	105
II.	Les chaperons d'histones CAF1 et FACT sont associés aux compartiments de réplication de l'Ad5.....	106
II.1	Localisation des chaperons d'histones dans les cellules U2OS infectées par l'Ad5. ....	106
II.1.1	HIRA et DAXX : chaperons d'histone H3.3.....	106
II.1.2	CAF1 : chaperon d'histone H3.1. ....	108
II.1.3	NPM2, ASF1 et NASP : chaperons d'histones cargo et de stockage d'histones..	110
II.1.4	NAP1L4 et FACT : chaperons de dimères d'histones H2A-H2B. ....	112
II.2	Localisation des chaperons d'histones dans les cellules MRC5 et HFF-CAR infectées par l'Ad5.....	115
II.2.1	CAF1 : chaperon d'histone H3.1. ....	115
II.2.2	ASF1 et NASP : chaperons cargo et de stockage de dimères d'histones H3-H4.	117
II.2.3	FACT et NAP1L4 : chaperons de dimères d'histones H2A-H2B. ....	119
II.2.4	Localisation de la sous-unité Spt16 de FACT dans des cellules infectées d'un épithélium bronchique reconstitué.....	121
II.3	CAF1 et SSRP1 sont relocalisés dans les cellules infectées par l'Ad5.....	124
II.3.1	SSRP1 est recrutée dans les zones dépourvues d'histones au cours de l'infection. .	124
II.3.2	SSRP1 et p60 sont relocalisées dans les mêmes structures au cours de l'infection. ....	126
II.3.3	SSRP1 et p150 sont relocalisées au niveau de l'ADN viral au cours de sa réplication dans les cellules infectées. ....	130

II.4	Conclusion générale du chapitre.....	132
III.	Etude du chaperon d'histone FACT et son rôle au cours de l'infection par l'Ad5.....	134
III.1	Inhibition pharmacologique du chaperon d'histone FACT par la curaxine.....	134
III.2	Conclusion générale du chapitre.....	144
IV.	SSRP1 et DBP sont capables de former des structures semblables à des compartiments sans membranes dépendants de la séparation de phase liquide-liquide (LLPS). .....	146
IV.1	La surexpression de DBP et de SSRP1 induit la formation de structures intranucléaires dépourvues d'histones. ....	146
IV.2	Les structures formées par SSRP1 sont partiellement accessibles aux anticorps.....	148
IV.3	Les structures formées par DBP ou par SSRP1 fusionnent entre elles.....	149
IV.3.1	Structures formées par la protéine virale DBP.....	149
IV.3.2	Structures formées par la protéine SSRP1. ....	151
IV.3.3	Les structures SSRP1 et DBP colocalisent dans des structures intranucléaires dépourvues d'histones similaires aux CR viraux.....	153
IV.4	Conclusion générale du chapitre.....	155
	<b>RESULTATS (Partie SARS-CoV-2, Ad5 et EB) .....</b>	<b>156</b>
V.	Etude entre adultes et enfants de l'infection par le SARS-CoV-2 avec des épithéliums bronchiques reconstitués de patient : l'infection par le SARS-CoV-2 est restreinte par l'interféron de type III et induit la formation de syncytiums. ....	158
V.1	Introduction générale.....	158
V.1.1	Transmission et pathogénicité. ....	158
V.1.2	Structure de la particule du SARS-CoV-2.....	159
V.1.3	Organisation génomique du SARS-CoV-2.....	161
V.1.4	Emergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2. ....	162
V.1.5	Les syncytiums se forment durant l'infection de nombreux virus par fusion de cellule à cellule. ....	163
V.1.6	Infection virale et contrôle de la réponse interféron.....	164
V.1.7	Morphologie et composition cellulaire du tractus respiratoire humain et des EB reconstitués. ....	167
V.2	Résultats publiés.....	171
V.3	Résultats supplémentaires .....	183
V.3.1	L'IFN de type III restreint l'infection du SARS-CoV-2.....	183
V.4	Conclusion générale du chapitre.....	185
VI.	Etude de l'infection d'épithéliums bronchiques reconstitués par l'Ad5.....	187
VI.1	Introduction générale.....	187
VI.2	Résultats préliminaires.....	187
VI.2.1	Etude de la cinétique d'infection d'EB d'adultes par une souche standard répliquative d'Ad5.....	187

VI.2.2	Etude de l'infection des EB d'adultes par différentes quantités de particules d'Ad5.....	191
VI.2.3	Caractérisation morphologique des foyers d'infection par l'Ad5. ....	192
VI.3	Conclusion générale du chapitre.....	196
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>198</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>211</b>



## **Remerciements**

Je voudrais premièrement remercier Cécile Malnou et Patrick Lomonte pour avoir bien voulu accepter d'être mes rapporteurs et pour avoir évalué mes recherches. Merci à Nicolas Larmonier pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Merci également à Caroline Goujon et à Thierry Michon pour avoir bien voulu être mes examinateurs lors de ma soutenance. Je tiens à remercier Harald Wodrich pour m'avoir donné la chance d'intégrer son laboratoire, de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre le projet ANACONDA et d'avoir pu travailler sur le SRAS-CoV-2 en plus de mon projet de thèse initial. Malgré l'épreuve de la pandémie et de ce contexte si particulier, j'aurais eu la chance de pouvoir contribuer à ces recherches si captivantes. Merci également à Thierry Noël pour m'avoir permis d'intégrer le Master MIMU. Je voudrais adresser de grands remerciements à Fabienne, ma directrice de thèse, pour tout ton soutien, toute ton aide durant ces années intenses et particulièrement difficiles sur la fin. Ce manuscrit n'aurait jamais été aussi étoffé sans tous tes conseils et tes très nombreuses corrections. Un grand merci à toute l'équipe « SpacVir » pour ces années. Merci beaucoup Noémie pour m'avoir montré les immunofluorescences et mes premières images de cellules infectées au BIC. Merci également pour tous tes bons plans de sorties. Merci Jean-Baptiste, pour toutes nos discussions et toutes celles à venir. Toi qui étais derrière moi dans notre bureau. Merci Coralie pour m'avoir enseigné avec Noémie les Western Blot et également pour tous tes autres bons plans. Je voudrais bien sûr te remercier Muriel pour ton aide et pour toutes ces fois où nous nous rendions à notre adresse culinaire préférée. Merci à vous Benoit, Eugenia, Jessica, Marie-Edith, Nicolas et Alexia pour tous les bons moments passés ensemble. Un grand merci également à Tetsuro Komatsu que je n'aurais pas eu la chance de rencontrer en personne mais, qui en générant un travail incroyable, m'a permis de le continuer. Merci à vous d'avoir cru en moi dans les moments les plus difficiles. Je voudrais remercier tous les membres du projet ANACONDA. Un grand merci à Thomas Trian, à Alexis Celle et à Pauline Esteves de nous avoir fourni tous les précieux épithéliums bronchiques et pour leur expertise sur ce modèle. Je me rappelle de notre première rencontre en plein confinement avec Harald dans le laboratoire de Thomas. Je voudrais également remercier Marie-Line Andreola, Marie-Lise Blondot, Patricia Recordon-Pinson et Mathieu Métifiot pour notre magnifique projet et pour toutes les infections réalisées au BSL-3. Un grand merci à Denis Dacheux pour avoir produit notre anticorps anti-SRAS-CoV-2-N. Merci à Marc Landry et à Sabrina Lacomme pour leur expertise en microscopie électronique. Et bien sûr, merci à nouveau à Harald Wodrich, à Muriel Faure, à Noémie Pied, à Jessica Ragues et à Marie-Edith Lafon. Je remercie les membres du Bordeaux Imaging Center pour toute l'aide que vous m'avez apportée sur mes différents projets. Un grand merci à Christel pour mes premiers pas avec un système SP8-STED. Un grand merci également à Magali, Sébastien et Fabrice pour toutes les réponses à mes questions.

Je voudrais écrire cette phase pour la reconnaissance que j'ai envers mon pays de m'avoir permis de réaliser mon cursus universitaire ainsi que cette thèse de virologie au moyen de plusieurs financements. J'ai eu la chance de réaliser mon rêve de d'enfin pouvoir étudier les virus plus en détails. Je souhaite remercier tout particulièrement toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer durant ma scolarité et qui m'ont tellement apportées humainement et intellectuellement. Un grand merci notamment à monsieur Plassan, madame Vergez, monsieur Bord, madame Collet, madame Bossis, madame Domerque, monsieur Lebarbier, madame Dubreuil, madame Lourde-Rocheblave, madame Vagner, madame Garin et bien tant d'autres.

Je voudrais également au travers de quelques lignes bien trop courtes, adresser des remerciements à ma famille dont ma mère et ma sœur pour m'avoir soutenu durant ces trois années et qui me supportent depuis maintenant plus de 28 ans. Une pensée toute particulière à ma maman qui a toujours cru en moi et mes nombreuses passions. Merci à toi de m'avoir offert à mes 10 ans mon tout premier microscope. Le chemin a été long de Nouméa jusqu'à Bordeaux ! Une autre pensée à ma grand-mère et à parrain qui ne pourront malheureusement pas être présents le jour de ma soutenance. Je voudrais aussi adresser une pensée à ma seconde grand-mère et à mon père.

Je désire remercier vivement et chaleureusement tous mes amis que j'ai la chance d'avoir (Nathan, Manon, Lucie, Mélanie, Julien, Mélissa, Méline, Richard, Diane, Paul, Louise et également Carla, Gautier, Laure et Jean-Baptiste), avec qui j'ai partagé tant de moments précieux depuis le début et avec qui j'ai en plus eu l'occasion de m'évader durant la pandémie et l'épreuve difficile de l'écriture de ce manuscrit de thèse. Pour toutes ces attentions, ces instants, ces nombreux voyages, ces challenges dont, la réussite de notre premier semi-marathon le 31 décembre 2022 et pour le marathon de Paris du 7 avril prochain. Merci pour tous ces projets fous que nous partageons ensemble mais, aussi pour tous ceux que nous aurons dans le futur. J'ai également une pensée amicale pour Hugo Lallement et pour sa famille.

Je voudrais terminer par vous remercier pour l'intérêt et la curiosité que vous porterez à ces travaux.

## Liste des figures

**Figure 1.** Schéma de l'organisation et des différents niveaux de compaction de la chromatine.

**Figure 2.** Structure d'un nucléosome constitué d'un octamère d'histones et structures des dimères d'histones H3-H4 et H2A-H2B.

**Figure 3.** Schéma des étapes d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes par les chaperons d'histones.

**Figure 4.** Modèle de l'assemblage de la chromatine par les chaperons d'histones.

**Figure 5.** Structure du chaperon d'histone FACT.

**Figure 6.** Fonctions attribuées au chaperon d'histone FACT.

**Figure 7.** Mécanisme de l'inhibition de FACT par la curaxine (CBL0100 et CBL0137).

**Figure 8.** Vues schématiques de la structure d'une particule d'Ad5.

**Figure 9.** Schéma simplifié de la structure du génome de l'Ad5.

**Figure 10.** Cycle simplifié de réplication de l'Ad5.

**Figure 11.** Modèle de la chromatinisation réversible du génome viral au cours du cycle de l'Ad5.

**Figure 12.** Schéma de la réplication du génome de l'Ad5.

**Figure 13.** Schéma de l'organisation des compartiments de réplication (CR) de l'Ad5.

**Figure 14.** Schéma des différents types de compartiments de réplication membranaires (cytoplasme) et sans membranes (noyau) induits au cours de l'infection par de nombreux virus.

**Figure 15.** Principe physique de la séparation de phase liquide-liquide (LLPS) et fonctions associées.

**Figure 16.** MLO intranucléaires et cytoplasmiques se forment par LLPS.

**Figure 17.** Des MLO intranucléaires et cytoplasmiques se forment par LLPS au cours de l'infection par de nombreux virus et servent de sites de réplication.

**Figure 18.** Visualisation des CR de l'Ad5 par le marquage des protéines DBP/USP7 et des ViPR marqués par la protéine Mybbp1a.

**Figure 19.** Les CR précoces, les CR tardifs et les ViPR sont dépourvus d'histones cellulaires.

**Figure 20.** Les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments intranucléaires dépourvus en histones et en ADN cellulaire.

**Figure 21.** Les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments intranucléaires qui grossissent et qui excluent la chromatine cellulaire au cours de l'infection.

**Figure 22.** Les chaperons d'histones HIRA et DAXX sont relocalisés au niveau des CR tardifs dans des cellules U2OS infectées.

**Figure 23.** Le chaperon d'histones CAF1 est relocalisé au niveau des CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.

**Figure 24.** Les chaperons d'histones NPM2, ASF1 et NASP sont associés aux CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.

**Figure 25.** Les chaperons d'histones NAP1L4 et FACT sont relocalisés au niveau des CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.

**Figure 26.** Le chaperon d'histones CAF1 est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.

**Figure 27.** Le chaperon d'histones ASF1 est présent et faiblement enrichi dans les CR précoces et dans des cellules MRC5 infectées.

**Figure 28.** Le chaperon d'histones NASP est associé aux CR dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.

**Figure 29.** La sous-unité SSRP1 du chaperon d'histones FACT est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR.

**Figure 30.** Le chaperon d'histones NAP1L4 est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.

**Figure 31.** Spt16 est observé au niveau des CR dans un contexte physiologique au sein d'un épithélium d'adulte bronchique reconstitué 5 j pi.

**Figure 32.** SSRP1 est recrutée dans les zones dépourvues d'histones au cours de l'infection par l'Ad5.

**Figure 33.** SSRP1 et p60 sont relocalisées dans les mêmes structures dans des U2OS infectées.

**Figure 34.** La surexpression d'EGFP-SSRP1 perturbe la morphologie des CR viraux formés dans des noyaux de cellules U2OS infectées.

**Figure 35.** SSRP1 et p150 sont relocalisées au niveau de l'ADN viral au cours de sa réplication dans des cellules U2OS infectées.

**Figure 36.** Tests de cytotoxicité de la curaxine (CBL0100 et CBL0137) avec des cellules U2OS.

**Figure 37.** Effet inhibiteur de CBL0100 et non de CBL0137 sur la formation des CR dans les cellules U2OS infectées.

**Figure 38.** Effet inhibiteur de CBL0100 sur la formation des CR dans les cellules U2OS infectées (16 h et 24 h pi).

**Figure 39.** DBP s'accumule au sein de noyaux malgré l'effet inhibiteur de CBL0100 sur la formation des CR avec des cellules U2OS infectées (24 h pi). CBL0100 induit un délai d'accumulation pour DBP et les protéines structurales, inhibant la formation des CR avec des cellules U2OS infectées (29 h pi et 52 h pi).

**Figure 40.** La production de DBP est atténuée à mesure d'un traitement tardif par CBL0100 et non effectif après 10 h pi avec des cellules U2OS.

**Figure 41.** L'inhibiteur de FACT CBL0100 induit une diminution de la quantité de la protéine DBP dans les cellules U2OS infectées.

**Figure 42.** L'inhibiteur de FACT CBL0100 induit une diminution de la quantité des protéines de structure du virus dans les cellules U2OS infectées (30 h pi et 52 h pi).

**Figure 43.** DBP et SSRP1 sont capables de former des organelles sans membranes dépourvues en histones et en ADN cellulaire.

**Figure 44.** Les structures formées par SSRP1 sont partiellement accessibles aux anticorps dans les cellules U2OS.

**Figure 45.** Les structures formées par DBP fusionnent entre elles dans les cellules U2OS.

**Figure 46.** Les structures formées par SSRP1 fusionnent entre elles dans les cellules U2OS.

**Figure 47.** Les structures SSRP1 et DBP colocalisent dans des structures intranucléaires dépourvues d'histones similaires aux CR viraux.

**Figure 48.** Vues schématiques d'une particule virale de SARS-CoV-2.

**Figure 49.** Cycle viral simplifié du SARS-CoV-2.

**Figure 50.** Schéma simplifié de l'organisation du génome ARN simple brin du SARS-CoV-2.

**Figure 51.** Formation et fonctions des syncytiums durant l'infection par le SARS-CoV-2.

**Figure 52.** Voies de signalisation de l'IFN de type I et de type III.

**Figure 53.** Composition du tractus respiratoire humain et des épithéliums bronchiques reconstitués de patients.

**Figure 54.** Voies simplifiées de différenciation des cellules épithéliales respiratoires.

**Figure 55.** L'interféron de type III protège les EB de l'infection par le SARS-CoV-2.

**Figure 56.** Modèle de la progression de l'infection du SARS-CoV-2 avec des EB reconstitués de patients.

**Figure 57.** Etude de la cinétique d'infection d'EB d'adultes par une souche standard répliquative d'Ad5.

**Figure 58.** Etude de l'infection des EB d'adultes par différentes quantités de particules adénovirales.

**Figure 59.** Caractérisation morphologique des foyers d'infection viraux.

**Figure 60.** Etude des foyers d'infection par microscopie électronique.

**Figure 61.** Modèle de la chromatinisation réversible du génome viral par les chaperons d'histones au cours de l'infection par l'Ad5.

**Liste des tableaux**

**Tableau 1.** Liste des chaperons d'histones et leurs fonctions.

**Tableau 2.** Classification des adénovirus humains.

**Tableau 3.** Equipements et techniques.

**Tableau 4.** Consommables.

**Tableau 5.** Kits.

**Tableau 6.** Logiciels.

**Tableau 7.** Produits chimiques et réactifs.

**Tableau 8.** Solutions stocks utilisées pour ces travaux.

**Tableau 9.** Tampons et médiums.

**Tableau 10.** Lignées cellulaires.

**Tableau 11.** Liste des anticorps primaires.

**Tableau 12.** Liste des anticorps secondaires.

**Tableau 13.** Conditions d'ensemencement cellulaire.

**Tableau 14.** Conditions de transfection des cellules U2OS avec de la Lipofectamine 2000.

**Tableau 15.** Liste des plasmides.

**Tableau 16.** Tableau bilan de l'étude de la localisation des chaperons d'histones.

**Liste des abréviations**

**A**

ACE2 : Angiotensin-Converting Enzyme 2  
 Ad : Adénovirus  
 AD : Adenoid Degenerating agent  
 Ad5 : Adénovirus de type 5  
 ADN : Acide désoxyribonucléique  
 ADP : Adenovirus Death Protein  
 ARDS : Acute Respiratory Distress Syndrome  
 ARN : Acide ribonucléique  
 ASF1 : Anti-silencing function protein 1  
 ATRX :  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome protein  
 AVP : Adenoviral Protease

**B**

BKV : BK virus  
 BrdU : Bromodeoxyuridine

**C**

CAR : Coxsackievirus and Adenovirus Receptor  
 CABIN1 : Calcineurin Binding Protein 1  
 Csat : Concentration de saturation  
 CENP-A : CENTromere Protein A  
 CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator  
 cGAMP : 2'3'-cyclic GMP-AMP  
 cGAS : Cyclic GMP-AMP Synthase  
 CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1  
 CH25H : Cholesterol-25-Hydroxylase  
 CK2 : Casein Kinase 2

CLEM : Correlated Light and Electron Microscopy

CoV : Coronavirus

COVID19 : Coronavirus disease 2019

CPSF6 : Cleavage and Polyadenylation Specific Factor subunit 6

CR : Compartiment de Réplication

CRM1 : Chromosomal Maintenance 1

CTD : C-Terminal Domain

CytK5 ou (KRT5) : Cytokératine 5

**D**

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
 DAXX : Death domain-associated protein 6  
 DBP : DNA Binding Protein  
 DD : Domaine de dimérisation  
 DFC : Dense Fibrillar Center  
 DMSO : Dimethyl sulfoxide  
 DNA-PK : DNA-dependent protein kinase  
 DPI : Days Post Infection

**E**

E : Enveloppe  
 EB : Epithélium Bronchique  
 EBV : Epstein-Barr Virus  
 EM : Electron Microscopy

**F**

FACT : FAcilitates Chromatin Transcription

Fab : Fragment antigen-binding

FC : Fibrillar Center

FOXJ1 : Forkhead box protein J1

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

FUS : Fused in sarcoma

**G**

GC : Granular Component

GON : Group of Nine

GOS : Group of Six

GS : Granule de stress

G3BP1 : GTPase-activating protein-(SH3 domain)-binding protein 1

**H**

HCoV : Human Coronavirus

HCMV : Human Cytomegalovirus

HDAC : Histone deacetylase

HeLa : Henrietta Lacks

HIRA: Histone Cell Cycle Regulator/ Histone regulator A

HFF: Human Foreskin Fibroblast

HMG : High Mobility Group

HMGB : High Mobility Group Box

HOX : Homeobox

HPI: Hours Post Infection

Hsp70 : Heat shock protein 90

Hsp90 : Heat shock protein 90

HSV : Herpes simplex virus

**I**

ICP0 : Infected Cell Protein 0

ICP4 : Infected cell polypeptide 4

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IDR : Intrinsic Disorder Region

IFN : Interféron

IL-6 : Interleukine 6

IRF : Interferon Regulatory Factor

IRF3 : Interferon Regulatory Factor 3

ISG : Interferon-Stimulated Gene

ISGF3 : Interferon-Stimulated Gene Factor 3

ISRE : Interferon-Sensitive Response Element

ITR : Inverted Terminal Repeat

**J**

JAK1 : Janus kinase 1

**K**

KRT5 ou (CytK5) : Cytokératine 5

KRT14 : Cytokératine 14

KSHV : Kaposi's sarcoma associated herpesvirus

**L**

LLPS : Liquid-Liquid Phase Separation

LLSM : Lattice Light Sheet Microscopy



**M**

M : Membranaire

MCF7 : Michigan Cancer Foundation-7

MCM : Minichromosome maintenance

MCM4 : Minichromosome maintenance complex component 4

MD : Domaine Médian

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated Protein 5

MLO : Membraneless Organelle

MLP : Major Late Promoter

MTOC: Microtubule Organizing Center

MRC5 : Medical Research Council cell strain-5: Normal Human Foetal Lung Fibroblast Cells

MUC5AC : Mucine 5AC

Mybbp1a : MYB Binding Protein 1a

**N**

N : Nucléoprotéine

NAP family : Nucleosome assembly protein family

NAP-1 : Nucleosome assembly protein 1

NAP1L1 : Nucleosome assembly protein 1 like 1

NAP1L4 : Nucleosome assembly protein 1 like 4

NASP : Somatic Nuclear Autoantigenic Sperm Protein

NFI : Nuclear factor I

NF-κB : Nuclear factor-Kappa B

NI : Non-Infected

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localization Signal

NONO : Non-Pou domain-containing octamer-binding protein

NPC : Nuclear Pore Complex

NS : Nuclear Speckles

NSP : Non structural protein

NPM1 : Nucleophosmin 1 (B23.1)

NPM2 : Nucleophosmin 2

NTD : N-Terminal Domain

**O**

OAS1 : 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1

OCT-1 : Octamer-binding transcription factor 1

ORF : Open Reading Frame

**P**

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PES1 : Pescadillo ribosomal biogenesis factor 1

PFU : Plaque Forming Unit

PH : Pleckstrin Homology domain

PML-NB : Promyelocytic leukemia-Nuclear bodies

Pol : Polymerase

pi : post infection

PP : Particule Physique

PRR : Pattern-Recognition Receptors

PRZ : Peripheral Replicative Zone

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**R**

RBD : Receptor Binding Domain

RBM : Receptor Binding Motif

RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene I

RPA : Replication protein A

RPA1 : Replication protein A1

RSV : Respiratory Syncytial Virus

**S**

S : Spicule (Spike)

SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome

SARS-CoV-2 : Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus 2

SCGB1A1 : Secretoglobin family 1A Member 1

SFPQ : Splicing factor proline/glutamine-rich

SIM : Structures Illumination Microscopy

siRNA : small interfering RNA

SMN : Survival of Motor Neurons

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

ssDAS : single-stranded DNA accumulation  
sites

SSRP1 : Structure Specific Protein 1

Spt16 : SuPpressor of Ty 16

STAT2 : Signal Transducer and Activator of  
Transcription 2

STING : Stimulator of Interferon Genes

STORM : Stochastic Optical Reconstruction  
Microscopy

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

**T**

TAF-1 : Template activating Factor-1

TLR3 : Toll-Like Receptor 3

TLR4 : Toll-Like Receptor 4

TMPRSS2 : Transmembrane serine protease 2

TP : Terminal Protein

TP63 : Transformation-related protein 63

TSS : Transcription Start Site

TRIM21 : Tripartite motif-containing protein  
21

TuMV : Turnip Mosaic Virus

TYK2 : Tyrosine kinase 2

**U**

UBN1 : Uninuclein-1

USP7 : Ubiquitin Specific peptidase 7

U2OS : Human Bone Osteosarcoma Epithelial  
Cells

UTR : Untranslated region

**V**

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

ViPR : Viral induced Post Replication bodies

VRC : Viral Replication Complex

**X**XRCC1 : X-ray repair cross-complementing  
protein 1

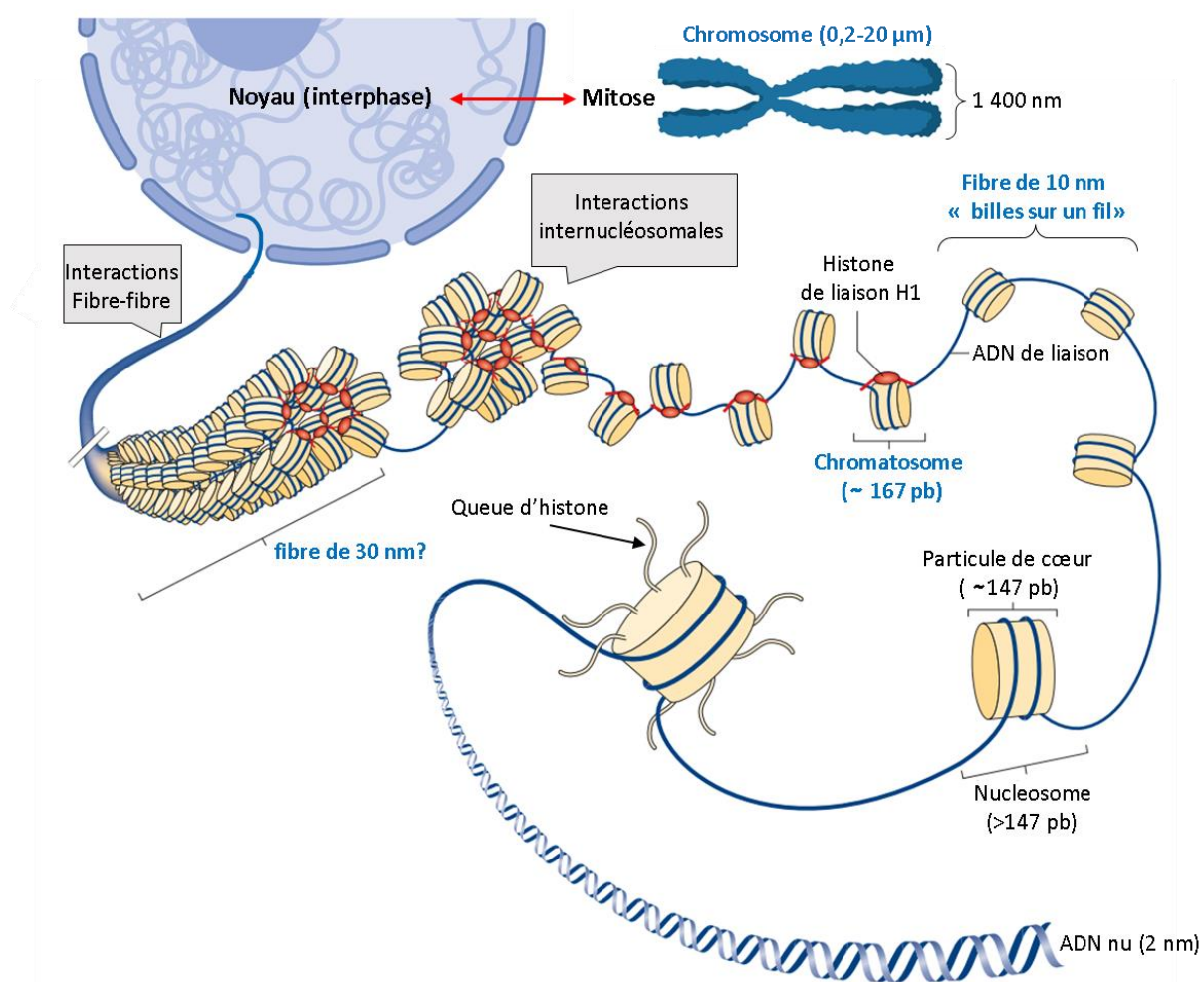
# INTRODUCTION

## Chapitre 1

### I. La chromatine cellulaire : structure et régulation.

#### I.1 Organisation de la chromatine cellulaire.

##### I.1.1 Structure et formation des nucléosomes avec les histones cellulaires.

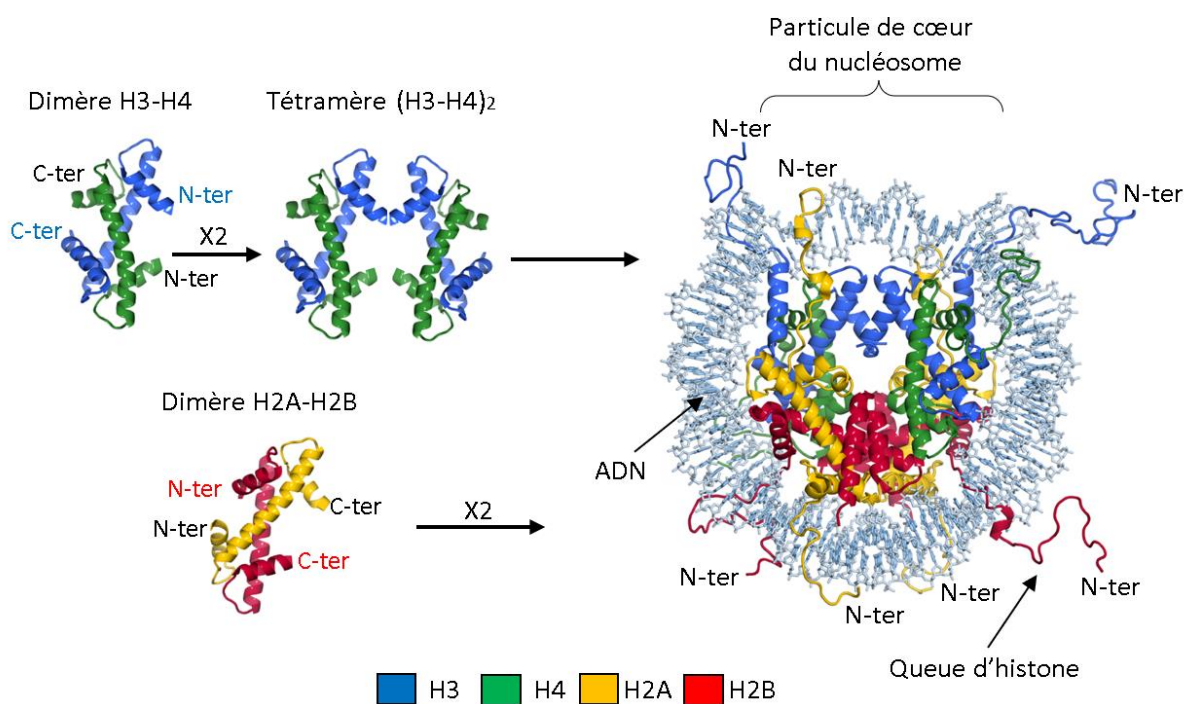


**Figure 1. Schéma de l'organisation et des différents niveaux de compaction de la chromatine.** La chromatine adopte une structure de billes sur un fil (fibre de 10 nm) par enroulement de l'ADN autour d'une particule de cœur d'histones (nucléosomes). L'association de l'histone H1 aux nucléosomes permet la formation de chromatosomes qui peuvent s'associer entre eux (fibres de 30 nm). La formation d'une fibre de 30 nm reste toutefois débattue *in vivo*. Des interactions entre les fibres induisent un niveau plus élevé de compaction de la chromatine notamment sous la forme de chromosomes compacts au cours de la mitose. (Adaptation de (1)). (Schéma généré avec Biorender.com).

L'ADN génomique, localisé et protégé à l'intérieur du noyau des cellules eucaryotes, n'est pas présent sous la forme d'une molécule nue. Il est en effet associé à des protéines et plus ou moins compacté grâce à de petites protéines chargées positivement, les histones. Ces histones sont réparties entre les histones de « cœur » (H2A, H2B, H3 et H4) et l'histone de liaison H1. L'ADN associé aux histones, forme la chromatine cellulaire. Elle est structurée par des unités répétées (Figure 1) que sont les

nucléosomes. Un octamère d'histones de cœur sur lequel 145 à 147 paires de bases d'ADN sont enroulées en hélice gauche. Les histones interagissent toutes les 10 paires de bases environ en 14 positions ((2) ; (3)). Un octamère d'histones est composé de 2 copies de chacune des histones, H2A, H2B, H3 et H4 (Figure 2). Les nucléosomes sont connectés les uns avec les autres par de courtes séquences d'ADN génomique nommées « ADN de liaison » qui varient en taille en fonction des espèces et les types cellulaires considérés.

La formation de nouveaux nucléosomes s'effectue séquentiellement. Dans un premier temps, deux dimères d'histones H3-H4 s'associent à l'ADN pour former le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> ((4) ; (5)). Deux dimères d'histones H2A-H2B sont ensuite incorporés pour former le nucléosome. Les nucléosomes sont des structures très dynamiques, qui peuvent changer de conformation sur une durée de temps très courte (6). Le détachement temporaire de 10 ms à 50 ms d'une partie de l'ADN de l'octamère d'histones permet l'accès à des sites internes des nucléosomes. L'ADN est ensuite enroulé à nouveau durant 250 ms.



**Figure 2. Structure d'un nucléosome constitué d'un octamère d'histones et structures des dimères d'histones H3-H4 et H2A-H2B.** Un nucléosome est formé par l'enroulement de 147 pb d'ADN autour d'un octamère d'histones (2 hétérodimères d'histones H3-H4 (tétrasome) et 2 hétérodimères d'histones H2A-H2B) (structures issues de (7)). (Adaptation de (7), (8), (3) et (9)).

Comme toutes les protéines, les histones sont synthétisées dans le cytoplasme et elles sont ensuite prises en charge sous la forme de monomères et de dimères dans le cytoplasme pour être acheminées dans le noyau (10). De la même façon, le remodelage des nucléosomes de la chromatine nécessite l'intervention de facteurs cellulaires spécifiques que l'on appelle chaperons d'histones.

Bien que la formation des nucléosomes semble possible sur presque toutes les séquences d'ADN, celle-ci est plus souvent rencontrée sur des séquences comportant les dinucléotides AA, TT ou TA et espacés de 10 paires de bases. Ces séquences présentent une meilleure affinité pour les octamères d'histones ((11) ; (12) ; (3)). Le positionnement des nucléosomes peut être plus ou moins dense sur l'ADN génomique. Par exemple, des régions pauvres ou dépourvues en nucléosomes ont pu être mises en évidence (13). Ces régions sont le plus souvent des promoteurs de gènes, des « enhanceurs » ou encore des origines de réplication ((14) ; (15) ; (16) ; (17) ; (18)). Cette densité des nucléosomes peut également varier en réponse à des signaux spécifiques et des stress environnementaux. Dans ce cas, une reprogrammation de la transcription de gènes peut avoir lieu par la disparition de nucléosomes résultant de l'éviction des histones ((19) ; (20)). L'ajout de nouveaux nucléosomes est souvent corrélé à une diminution de l'expression des gènes ((21) ; (22) ; (23) ; (24) ; (20) ; (19) ; (25)).

La chromatine peut adopter plusieurs niveaux de repliements (Figure 1) (1). La structure primaire de la chromatine est caractérisée par la disposition des nucléosomes le long de l'ADN génomique sous la forme d'une fibre de 10 nm semblable à des billes sur un fil permettant d'assurer le premier niveau de compaction de l'ADN (26). L'histone de liaison H1 peut s'associer aux nucléosomes proches des points d'entrée et de sortie de l'ADN et former un chromatosome (27). Cette association assure de multiples fonctions dont la stabilisation des nucléosomes et la formation d'une structure tertiaire plus compacte sous la forme d'une fibre de 30 nm (1). Malgré des études ayant observé la formation de cette fibre *in vitro*, son existence reste cependant controversée *in vivo* ((28) ; (29) ; (30)). Un niveau de compaction supérieur de la chromatine est observé au cours de la mitose. Dans ce cas, l'ADN nouvellement répliqué est condensé en chromosomes compacts. Cette condensation de la chromatine est un processus clé de la division cellulaire qui permet de partager de manière égale les deux jeux de chromatides sœurs (31). La présence de chromosomes condensés durant la métaphase résulte de nombreuses interactions fibre-fibre (32). Malgré une implication de complexes nommés condensines I et II ((33) ; (34)), les mécanismes régissant la compaction de la chromatine en chromosomes compacts restent très largement méconnus. Un modèle est cependant proposé où la chromatine est distribuée de manière homogène durant l'interphase et commence à être formée sous la forme de fibres filiformes au cours de la phase précoce de la prophase. La formation de segments de chromatine, d'une taille de 80 kb à 120 kb et sous la forme de boucles, serait induite par les condensines et d'autres facteurs cellulaires. Cette étape constituerait l'événement initial dans le processus de compaction de l'ADN (35). Plus tardivement durant la phase M, la compression axiale des bras des chromosomes nécessiterait une activité supplémentaire des condensines en combinaison avec la topoisomérase II $\alpha$  ((36) ; (37)). Le diamètre des chromosomes est ensuite réduit par une compression latérale.

Il est admis que la structure et le degré de compaction de la chromatine influencent directement l'accessibilité du génome notamment à la machinerie transcriptionnelle. Le degré de compaction de la chromatine régulerait ainsi l'expression des gènes. Des travaux récents ont par exemple montré que la chromatine compacte comporte très rarement des sites actifs d'initiation de la transcription (TSS) (38) et qu'elle inhibe l'expression des gènes (39). D'autres études ont toutefois révélé l'existence possible de gènes transcriptionnellement actifs *in vivo* au sein d'une chromatine en interface, 25 fois plus compacte que la fibre de 30 nm (40). Cet arrangement tertiaire de la chromatine pourrait probablement permettre une plus grande accessibilité de l'ADN.

Les histones dites canoniques sont synthétisées et incorporées durant la réplication de l'ADN. Pour cette raison, elles sont qualifiées d'histones « dépendantes de la réplication » (41). A la différence des histones canoniques, les variants d'histones sont synthétisés tout au long du cycle cellulaire et sont qualifiés d'histones « indépendantes de la réplication » (42). Des travaux ont permis d'identifier 83 variants d'histones en incluant des isoformes épissées chez la souris et 85 variants d'histones chez l'homme pour les histones H2A, H2B et H3 (43). Le plus grand nombre de variants d'histones a été caractérisé pour les histones H2A et H3.

A ce jour, seul un unique variant a été découvert pour l'histone H4 chez l'homme. Ce variant est nommé H4G et il possède 85 % d'identité avec l'histone H4 canonique. Des travaux ont montré que l'expression de ce variant est plus élevée dans certaines lignées cancéreuses comme celle issue d'un cancer du sein humain MCF7 (44) ainsi que chez des patients. Malgré une faible connaissance de son rôle, ce variant d'histone est localisé uniquement dans le nucléole où il permettrait d'augmenter l'expression des ARNr.

L'histone H2A est celle qui présente le plus de variants dont H2A.X, H2A.Z, MacroH2A et H2A.B. H2A.X est impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN (45). En effet, en réponse à des dommages de l'ADN, la phosphorylation de la sérine 139 ou de la tyrosine 142 dans sa partie C-terminale permet le recrutement de facteurs cellulaires impliqués dans les voies de signalisation et de réparation de l'ADN (46). H2A.Z est enrichie dans les nucléosomes en position + 1 et -1 dans les régions libres en nucléosomes entourant les sites d'initiation de transcription chez la levure (24). MacroH2A semble associée à une fonction de répression de l'expression des gènes en raison de son enrichissement dans l'hétérochromatine comme celle du chromosome X inactivé chez les femelles de mammifères (47). Le variant H2A.B est enrichi au niveau des sites de réparation de l'ADN, des sites de réplication de l'ADN et dans les régions actives pour la transcription (48). Des travaux ont montré qu'il peut ensuite être rapidement échangé par l'histone canonique H2A sans l'assistance d'autres facteurs cellulaires

supplémentaires *in vitro* (48). D'autres travaux suggèrent au contraire, l'implication du chaperon d'histones NAP-1 (49).

Dans les cellules somatiques, les régions transcriptionnellement actives sont enrichies avec le variant d'histone H3.3 (50). Le variant H3.3 diffère de H3.1 et H3.2 par seulement 4 acides aminés pour H3.2 et 5 acides aminés pour H3.1. Son incorporation dans la chromatine se fait de manière indépendante de la réplication ((51) ; (52) ; (53) ; (54)). Des travaux ont en effet montré que l'histone H3.1 est remplacée par le variant H3.3 au niveau de gènes transcriptionnellement actifs (55). D'autres études ont révélé une incorporation du variant H3.3 au niveau de dommages de l'ADN induits par les UV (56). D'autres variants de l'histone H3 peuvent également être incorporés en dehors de la phase S comme le variant CENP-A (Centromere protein A) chez les mammifères, qui est spécifiquement retrouvé au niveau des centromères (57).

D'autres variants d'histones ayant un rôle durant la spermatogenèse (58) ont également été décrits comme le variant TH2A pour l'histone H2A ((59) ; (60)), le variant TH2B pour l'histone H2B (61) et les variants H1t et H1LS1 pour l'histone de liaison H1 ((62) ; (63) ; (64)).

Comme pour les histones canoniques, l'incorporation des variants d'histones au sein de la chromatine est assurée par des chaperons d'histones spécialisés. Ceci sera détaillé dans un autre paragraphe (voir paragraphe : I.1.2.1).

Les histones peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM) au niveau de leur long segment N-terminal (voir paragraphe : I.1.2). Ces modifications ainsi que l'incorporation de variants d'histones jouent de multiples rôles dans la régulation de la structure de la chromatine, son niveau de compaction mais également dans la régulation directe de la transcription et de l'expression des gènes.

### **I.1.2 Modifications épigénétiques, régulation de la compaction de la chromatine cellulaire et de l'expression des gènes.**

L'étude de la structure des nucléosomes (2) a montré que les extrémités N- et C-terminales des histones constituent des extensions désordonnées exposées à l'extérieur des nucléosomes et forment l'ensemble des « queues d'histones ». L'intégrité des nucléosomes est maintenue par des interactions entre les histones de cœur ainsi que certaines de leurs extrémités. Ces queues d'histones peuvent également interagir avec les nucléosomes voisins et permettre ainsi une régulation de la compaction de la chromatine. Les queues d'histones subissent des modifications post-traductionnelles par l'ajout de groupements acétyles au niveau de lysines (acétylation), méthyles au niveau de lysines et arginines (méthylation), phosphates au niveau de sérines et thréonines (phosphorylation) et ubiquitines au niveau de lysines (ubiquitinylation) ((65) ; (66) ; (1)). On a longtemps parlé du « code d'histone » en

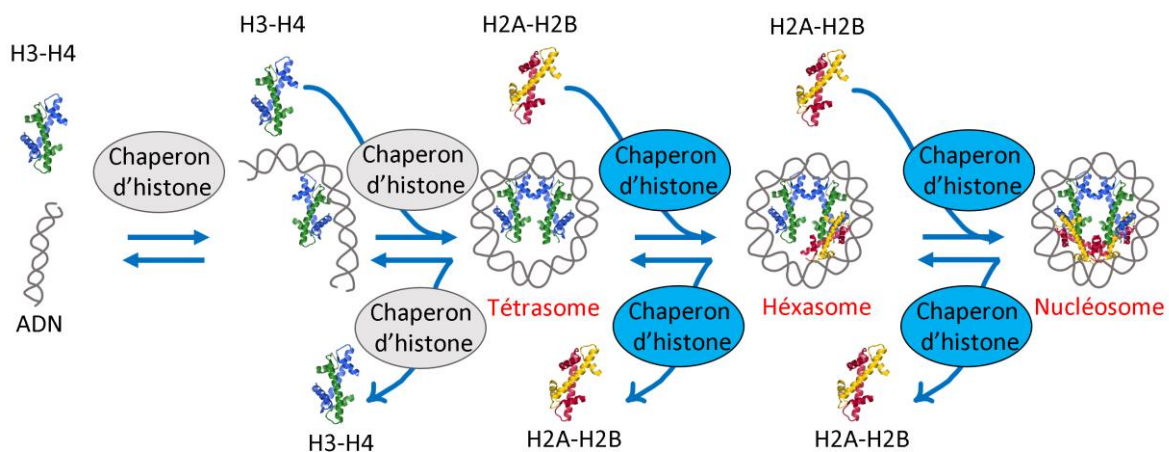


relation avec ces modifications post-traductionnelles où de nombreuses revues en parlent encore par exemple en 2022 (67). Le rôle de ces modifications post-traductionnelles sera très brièvement abordé dans le paragraphe suivant.

Des travaux ont révélé que les modifications post-traductionnelles des histones contribuent à la modification de la structure de la chromatine et au recrutement spécifique de facteurs de liaison à la chromatine impliqués dans l'expression des gènes (68). L'acétylation des lysines est réversible et régulée par deux familles d'enzymes, les histones acétyltransférases (HAT) qui ajoutent des groupements acétyles et neutralisent des charges positives et les histones déacétylases (HDAC) qui enlèvent des groupements acétyles et restaurent ainsi des charges positives. En diminuant les interactions entre les histones et l'ADN par la neutralisation de charges positives, l'acétylation favorise la décondensation de la chromatine. Elle est par conséquent majoritairement associée à une transcription active des gènes. L'acétylation des lysines K9 et/ou K14 de l'histone H3 est par exemple utilisée comme marqueur de chromatine active pour la transcription. La méthylation peut jouer à la fois un rôle dans l'activation et la répression des gènes (69). Des travaux ont par exemple montré que la triple méthylation de la lysine K36 de H3 s'accumule à l'extrémité 3' de certains gènes actifs (70). D'autres études ont mis en évidence que la méthylation de la lysine K27 de l'histone H3 joue un rôle dans la répression de l'expression du gène *HOX* (71). La phosphorylation des queues d'histones joue aussi de multiples rôles dont la régulation de la compaction de la chromatine durant la mitose et la méiose (72) mais également dans la régulation de l'expression des gènes (73) et la réparation des dommages de l'ADN (46). Finalement, des études sur l'ubiquitinylation des histones ont montré des rôles dans l'inhibition de la compaction de la chromatine (74) et dans la régulation de l'expression des gènes (75).

Des modifications épigénétiques ont également été observées au sein de la chromatine adénovirale (76) et elles auraient notamment un rôle dans l'établissement et la maintenance de l'infection ((77) ; (78)). Nos travaux de recherches se sont focalisés sur l'implication des chaperons d'histones et leurs rôles dans le remodelage de la chromatine du virus.

### I.1.2.1 Gestion des histones et de la chromatine cellulaire par les chaperons d'histone.

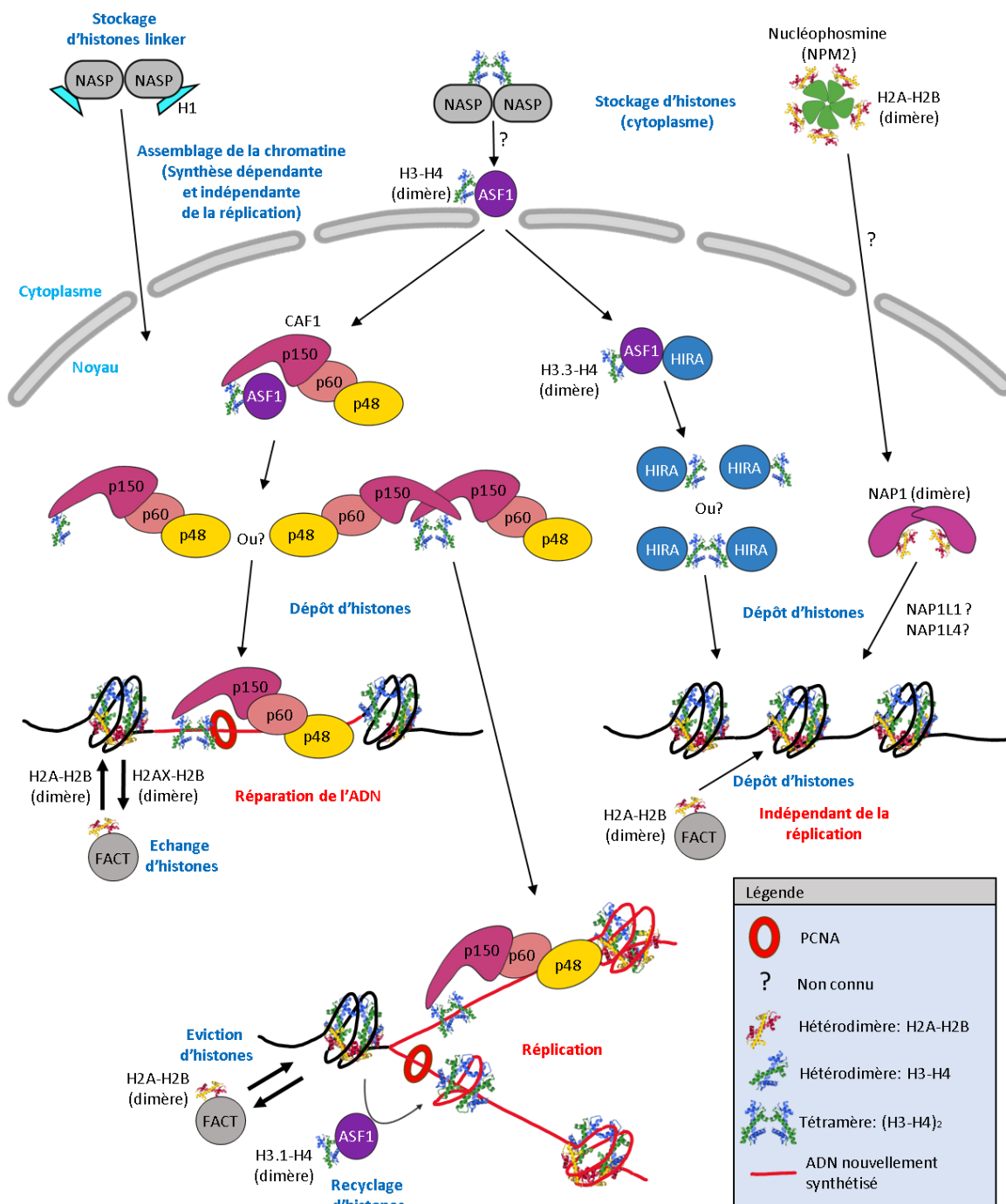


**Figure 3. Schéma des étapes d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes par les chaperons d'histones.** Deux dimères d'histones H3-H4 sont premièrement fixés à l'ADN pour former un tétrasome. Un premier dimère d'histones H2A-H2B est ensuite ajouté pour former un hexasome. L'ajout d'un second dimère d'histones H2A-H2B permet de former un nucléosome. Chaque étape de l'assemblage des nucléosomes est réalisée par différents chaperons d'histone spécialisés dans la gestion soit de dimères d'histones H3-H4, soit de dimères d'histones H2A-H2B. (Adaptation de (79)).

#### I.1.2.1.1 Principes généraux sur les chaperons d'histones.

Les nucléosomes et la chromatine peuvent se former spontanément lorsque des histones et de l'ADN sont incubés seuls *in vitro* (80). Des travaux en ajoutant des extraits cellulaires d'œufs de *Xenopus laevis* (81) ont permis d'identifier d'autres facteurs cellulaires qui facilitent cet assemblage. Ils ont été nommés chaperons d'histones. Ce sont des protéines acides pouvant être identifiées par leur capacité à promouvoir l'assemblage des particules de cœur des nucléosomes en liant les histones (82) (Figure 3). A la différence d'autres remodeleurs de la chromatine comme le complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) ((83); (84)), les chaperons d'histones fonctionnent de manière indépendante de l'ATP. Les chaperons d'histones n'interviennent pas seulement au niveau de l'ADN. Ils sont en effet impliqués dans la gestion des histones depuis leur site de synthèse dans le cytoplasme, dans leur import dans le noyau, dans leur stockage, dans leur dépôt/ dissociation de la chromatine et dans leur dégradation. Des études ont montré que les dimères d'histones H3-H4 sont importés dans le noyau par ASF1 (Anti-silencing function protein 1) et par un mécanisme dépendant de la protéine d'import Imp4 ((85); (86)). D'autres travaux plus récents proposent une autre voie d'import et suggèrent que des monomères d'histones H3 et H4 sont importés directement dans le noyau par un mécanisme dépendant de Imp5. Les monomères d'histones H3 et H4 sont ensuite assemblés en dimères et pris en charge par des chaperons d'histones (86). Les dimères d'histones H3-H4, H2A-H2B et les variants d'histones ne sont pas manipulés par les mêmes chaperons d'histones. Certains chaperons d'histones sont en effet spécialisés soit dans la gestion des dimères H3-H4, soit dans la

gestion des dimères H2A-H2B. Les chaperons d'histones peuvent également être divisés en 2 classes suivant leur intervention dans le dépôt d'histones de manière non couplée à la réplication de l'ADN (chaperons d'histones indépendants de la réplication) ou de manière couplée à la réplication (chaperons d'histones dépendants de la réplication) (82) (Figure 4). De manière non exhaustive, HIRA (Histone cell cycle regulation defective homolog A) et DAXX (Death domain-associated protein) appartiennent à la première classe de chaperons d'histones alors que ASF1, CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) et NASP (Somatic Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) appartiennent à la seconde (82) (Tableau 1). Certains chaperons d'histones peuvent toutefois être des exceptions en intervenant à la fois durant la réplication ou de manière indépendante. Ceci est le cas par exemple des chaperons d'histones NAP1 (Nucleosome assembly 1), NAP1L4 (Nucleosome assembly protein 1 like 4) et FACT (FAcilitates Chromatin Transcription). Le chaperon d'histone FACT intervient en effet à la fois durant la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (voir I.1.2.2).



**Figure 4. Modèle de l'assemblage de la chromatine par les chaperons d'histones.** A la suite de leur synthèse dans le cytoplasme et jusqu'à leur destination finale (chromatine), les histones H3, H4, H2A et H2B sont pris en charge sous la forme de dimères par différents chaperons d'histones. D'autres chaperons d'histones dont NASP et NPM2 permettent le stockage de dimères d'histones dans le cytoplasme. ASF1 joue un rôle de navette entre les chaperons d'histones CAF1 et HIRA en leur transmettant respectivement soit des dimères d'histones H3.1-H4/H3.2-H4, soit H3.3. ASF1 permet également le recyclage d'histones durant la réplication. CAF1 est impliqué dans le dépôt d'histones de manière couplée à la réplication et durant la réparation de l'ADN. HIRA a un rôle dans le dépôt de dimères d'histones H3.3-H4 de manière indépendante de la réplication comme DAXX. FACT et NAP1 sont des pourvoyeurs de dimères d'histones H2A-H2B. FACT joue un rôle dans le dépôt d'histones de

manière couplée ou non à la réplication. Il est également engagé dans l'échange d'histones durant la réparation de l'ADN. Adaptation de (5), (9) et de (82)). (Schéma généré avec Biorender.com).

#### **I.1.2.1.2 Chaperons d'histones indépendants de la réplication.**

Le chaperon d'histone HIRA est un complexe de 6 protéines. Il a été renommé ainsi en raison de sa principale sous-unité HIRA (3 copies), impliquée dans la formation des nucléosomes par le dépôt de dimères d'histones H3.3-H4 de manière indépendante de la réplication ((87) ; (88)) (Figure 4). Les 2 autres sous-unités sont CABIN1 (Calcineurin Binding Protein 1) (2 copies) et UBN1 (Uninuclein-1) (1 copie). Ce chaperon est impliqué dans de multiples fonctions comme la détection d'ADN nu par le dépôt du variant d'histone H3.3 (89). Des études ont montré qu'HIRA peut interagir avec l'ARN polymérase de type II, permettant l'incorporation d'H3.3 au niveau de gènes actifs pour la transcription (89). HIRA permet également de promouvoir la transcription des gènes en étant recruté spécifiquement par un mécanisme dépendant de la protéine de liaison à l'ADN RPA (Replication protein A) au niveau de promoteurs ou d'enhanceurs (90). D'autres travaux ont montré une implication d'HIRA dans la réparation de l'ADN via le dépôt du variant H3.3 au niveau de sites d'ADN endommagés (56). Le chaperon d'histone ASF1 sert de donneur de dimères d'histones H3.3-H4. La liaison spécifique du complexe HIRA avec le variant d'histone H3.3 est conférée par sa liaison avec UBN1 (glycine en position 90 d'H3.3). UBN1 se lie ainsi directement avec le complexe ASF1-H3.3-H4 (91).

Le chaperon d'histone DAXX est également spécialisé dans le dépôt de dimères d'histones H3.3-H4 de manière indépendante de la réplication de l'ADN (92) (Tableau 1). La spécificité de DAXX pour H3.3 est due à son interaction avec la glycine 90 de H3.3, comme pour HIRA (93). Ce chaperon d'histones peut former un complexe en s'associant au remodelleur de la chromatine ATRX ( $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome protein). Le complexe DAXX/ATRX est impliqué dans le dépôt spécifique du variant d'histone H3.3 au niveau des télomères (94), de l'ADN péricentrique (95), d'éléments d'ADN répétés (96) mais également au niveau de séquences rétrovirales endogènes (97).

#### **I.1.2.1.3 Chaperons d'histones dépendants de la réplication.**

Le chaperon d'histone CAF1 est impliqué dans le dépôt de dimères d'histones *de novo* des dimères d'histones H3.1-H4 et H3.2-H4 de manière dépendante de la réplication ((98) ; (82)) (Figure 4). Ce chaperon d'histone est un complexe formé de 3 sous-unités ; une petite sous-unité p48 (RbAp48), une moyenne sous-unité p60 (CHAF1b) et une grande sous-unité p150 (CHAF1a) (99). La sous-unité p150 permet au complexe CAF1 de s'associer avec la machinerie de réplication en se liant directement à PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Cette interaction avec PCNA permet également un

recrutement de CAF1 et le dépôt du variant d'histone H3.1 au niveau de sites de réparation de l'ADN endommagé ((100) ; (101)). Des études proposent un modèle pour lequel 2 complexes CAF1-H3-H4 permettent le dépôt de 2 dimères d'histones H3-H4 et la formation d'un tétrasome (H3-H4)<sub>2</sub> durant la réplication au niveau de la fourche de réplication (102). La reconnaissance du tétrasome par les chaperons d'histone FACT ou NAP1 permet ensuite le dépôt de dimères d'histones H2A-H2B et la formation de nucléosomes ((9) ; (99)). Le chaperon d'histone ASF1 sert de donneur de dimères d'histones H3.1-H4 au chaperon d'histone CAF1 dans le noyau (82). Des travaux ont toutefois montré que CAF1 peut se lier à des dimères d'histones H3.3-H4 (95).

Le chaperon d'histone NAP1 est spécialisé dans la gestion des dimères H2A-H2B comme pour le complexe FACT (Figure 4). Des travaux chez la levure ont montré que la déplétion de NAP1 induit une augmentation d'hexasomes (103). Ces résultats suggèrent que NAP1 est impliqué préférentiellement dans le dépôt du dernier dimère d'histones H2A-H2B.

Les chaperons d'histones NAP1L1 (Nucleosome assembly protein 1 like 1) et NAP1L4 appartiennent à la famille des NAP1L (Nucleosome assembly protein-like). Cette famille de chaperons d'histones comporte 5 membres (NAP1L1 à NAP1L5), caractérisés chez l'homme et chez la souris. Ils sont cependant moins connus par rapport à NAP1. Des travaux ont toutefois montré qu'ils ont tous les deux la capacité à s'associer aux dimères d'histones H2A-H2B et à former des nucléosomes (104). Ces travaux ont également trouvé une activité de désassemblage des nucléosomes plus élevée pour NAP1L1 que pour NAP1L4, suggérant une implication possible de ces chaperons d'histones dans la chromatinisation réversible des nucléosomes. Cette activité d'éviction pour les histones canoniques et pour des variants d'histones a également été documentée par d'autres travaux (105).

NPM2 (Nucleoplasmin-2) est un autre chaperon d'histone spécialisé dans la gestion des dimères H2A-H2B (106) (Figure 4). Il forme un complexe protéique pentamérique (ou décamerique) (107) pouvant reconstituer des nucléosomes *in vitro* (108). Les fonctions associées à ce chaperon d'histone sont peu connues. Des travaux ont cependant révélé un rôle de NPM2 dans le remodelage et la décondensation de la chromatine spermatique après la fécondation ((109) ; (104)).

#### **I.1.2.1.4 Chaperons d'histones impliqués dans l'import nucléaire des histones.**

Le chaperon d'histone ASF1 est impliqué dans la gestion des dimères H3-H4 ainsi que des différents variants de l'histone H3 (110) de leur site de synthèse jusqu'à leur import dans le noyau (82) (Figure 4). ASF1 comporte une seule protéine chez la levure et les deux paralogues (ASF1a et ASF1b) chez les mammifères et la plupart des vertébrés. Il se trouve au centre de nombreuses voies en servant de donneur d'histones à la fois aux chaperons d'histones CAF1 (dépendant de la réplication) (79), au

complexe HIRA (indépendant de la réplication) (82). Il peut également interagir et former un complexe avec d'autres chaperons d'histones dont NASP (stockage d'histones) et DAXX (indépendant de la réplication) (93). Des études ont montré que ASF1a interagit avec HIRA à la fois *in vitro* et *in vivo* ((111) ; (112) ; (113)) alors que ASF1b interagit préférentiellement avec la sous unité p60 de CAF1 (112).

#### **I.1.2.1.5 Chaperons d'histones impliqués dans le stockage des histones.**

Le chaperon d'histone NASP peut s'associer à la fois à des dimères H3-H4 et à des monomères d'H3 ((114) ; (115)) (Figure 4). Des travaux *in vitro* ont révélé que NASP est capable de former des dimères d'histones H3-H4 en présence d'histones monomériques en concertation avec ASF1 (114). Ces résultats suggèrent ainsi une implication possible de NASP dans le repliement et la formation des dimères H3-H4, dans leur protection *in vivo* (116). Les travaux de Cook et al, proposent un rôle de NASP dans le stockage des dimères d'histones H3-H4 à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (117) (Figure 4). NASP serait impliqué dans la protection de ces dimères en cas de stress cellulaire contre la dégradation induite par les protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp90. D'autres études suggèrent une implication directe du complexe HSP90-NASP dans le repliement des dimères H3-H4 (117). Comme décrit précédemment, NASP est également impliqué avec ASF1 dans le stockage des dimères H3-H4 (79).

Des études ont montré que NPM2 est le chaperon d'histone majeur impliqué dans le stockage des dimères d'histones H2A-H2B dans des oocytes et des embryons de vertébrés à un stade précoce du développement (118).

Chaperon d'histone	Cargo d'histone	Fonctions	Références
Histone cell cycle regulation defective homolog A (HIRA)	H3.3-H4	Dépôt: H3.3-H4	-(87)
Death domain-associated protein (DAXX)	H3.3-H4	Dépôt: H3.3-H4	-(93) -(94)
Anti-silencing factor 1 (Asf1)	H3-H4	-Import nucléaire: H3-H4 -Transfert à CAF1 et HIRA	-(119)
Chromatin assembly factor 1 (CAF1)	H3.1-H4	-Dépôt: H3.1-H4 -Formation: (H3-H4) <sub>2</sub>	-(86) -(120) -(121)
Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	H3-H4	Approvisionnement et renouvellement: H3-H4	-(115) -(122)
<b>Facilitates chromatin transcription (FACT)</b>	H2A-H2B H2A.X-H2B	-Dépôt et échange: H2A-H2B  H2A.X-H2B	-(123) -(124) -(125) -(81) -(126)
Nucleoplasmin-2 (NPM2)	H3-H4 H2A-H2B	-Cargo, stockage et donneur: H2A-H2B. -Dépôt: H2A-H2B?	-(122) -107)
Nucleosome assembly 1 (Nap1)	H3-H4 H2A-H2B	-Import nucléaire: H2A-H2B -Dépôt: H2A-H2B	-(127) -(128)
Nucleosome assembly protein 1 like 1 (NAP1L1)	H2A-H2B	-Dépôt: H2A-H2B -Eviction: H2A-H2B	-(129) -(104)
Nucleosome assembly protein 1 like 4 (NAP1L4)	H2A-H2B	-Dépôt: H2A-H2B -Eviction: H2A-H2B	-(129) -(104)

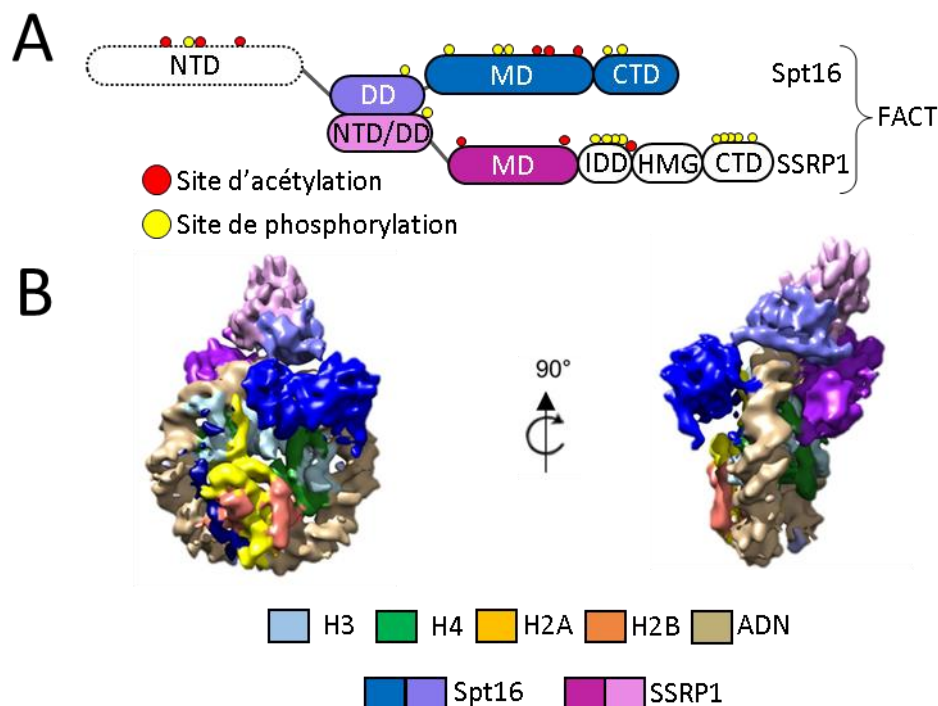
**Tableau 1. Liste des chaperons d'histones et leurs fonctions.** Le chaperon d'histone FACT de notre étude est montré en rouge. (Adaptation de (119)).



### I.1.2.2 Le chaperon d'histone FACT est impliqué dans le dépôt de dimères H2A-H2B durant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN.

Nous nous focaliserons plus en détails dans les prochains paragraphes sur les caractéristiques du complexe FACT dont sa constitution, ses fonctions biologiques ainsi que les mécanismes moléculaires connus car ce facteur s'est révélé important au cours de nos travaux.

#### I.1.2.2.1 FACT : un complexe hétérodimérique formé par SSRP1 et Spt16.



**Figure 5. Structure du chaperon d'histone FACT.** (A) Schéma de l'organisation des 2 sous-unités SSRP1 et Spt16 du complexe FACT, de leurs différents domaines et de leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acétylation). NTD : Domaine N-terminal ; DD : Domaine de dimérisation ; MD : Domaine médian ; IDD : domaine intrinsèquement désordonné ; HMG : boîte de groupe à forte mobilité et CTD : Domaine C-terminal. (Adaptation de (131)). (B) Reconstruction de la structure 3D du complexe FACT et son association à l'ADN et à la particule de cœur d'un nucléosome à partir de cartes de densités électroniques (image prise de (132)).

Le chaperon d'histone FACT est un complexe hétérodimérique constitué par 2 sous-unités protéiques, Spt16 (Suppressor of Ty 16) et Pob3 (Polymerase One Binding protein 3) ((133) ; (134)) chez *Saccharomyces cerevisiae* et Spt16 (codé par le gène *Supt16*) et SSRP1 (Structure Specific Recognition Protein 1 codé par le gène *Ssrp1*) chez l'Homme ((132) ; (131)). De multiples fonctions sont attribuées au chaperon d'histone FACT dont un rôle durant la transcription (124), la réplication (135) et la réparation de l'ADN (127). D'autres fonctions lui sont également associées dont sa nécessité dans la

formation artificielle de cellules souches pluripotentes (136) et son implication dans la progression de différents cancers ((137) ; (138) ; (139) ; (140) ; (141)).

La structure du complexe FACT est conservée chez tous les eucaryotes (142). Les structures complètes de ses 2 sous-unités associées aux nucléosomes n'ont pas encore été résolues à ce jour. L'association individuelle des domaines de FACT avec les nucléosomes a cependant été obtenue ((143) ; (144) ; (145) ; (146)). Ces études ont permis de proposer un modèle d'interaction de FACT avec l'ADN et les nucléosomes (132) (Figure 5).

#### **I.1.2.2.2 Structure de la sous-unité SSRP1.**

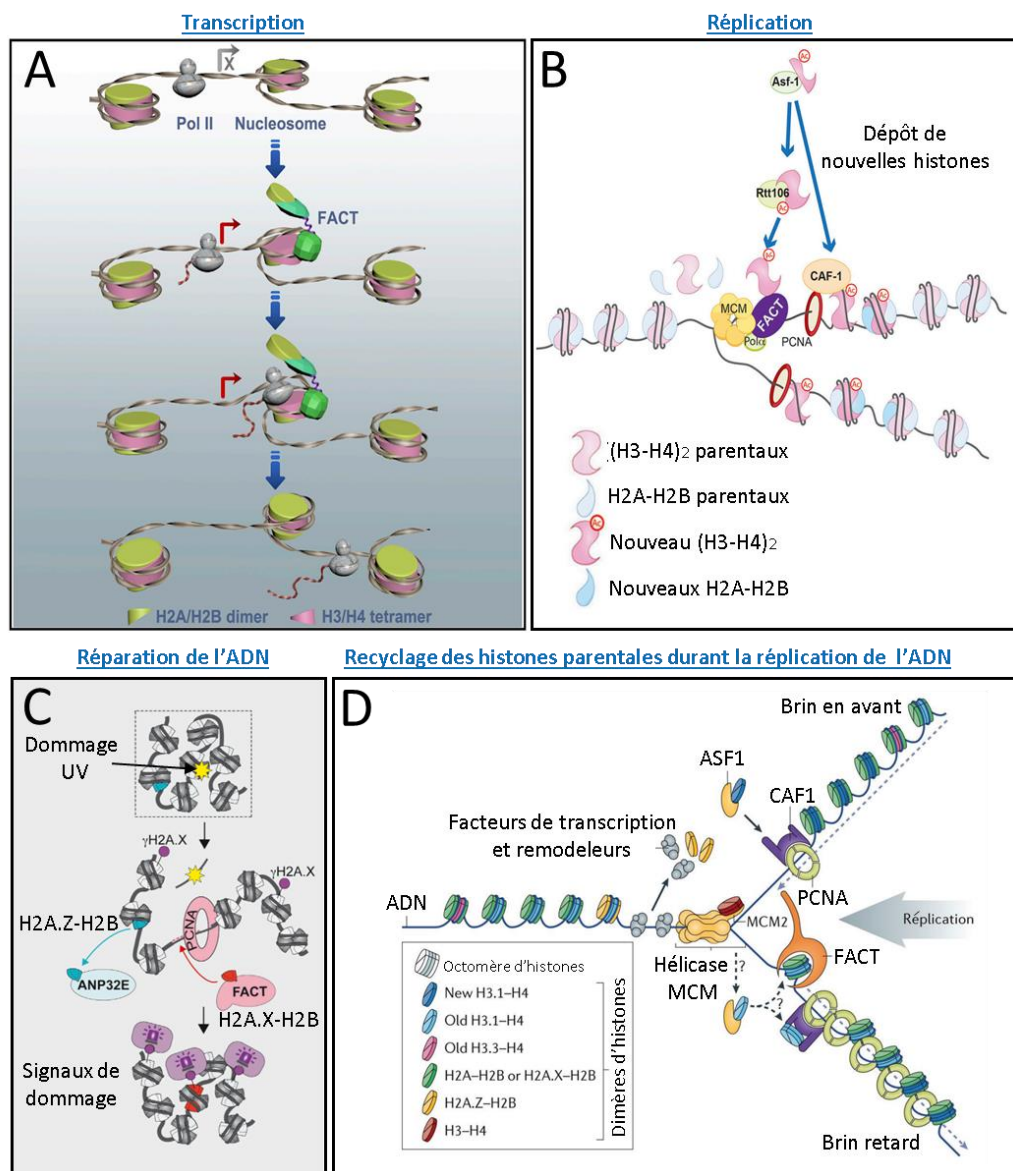
La sous-unité SSRP1 est formée de 5 domaines : un domaine N-terminal (NTD), un domaine médian (MD), un domaine intrinsèquement désordonné (IDD), une boîte de groupe à forte mobilité (HMG) et un domaine C-terminal intrinsèquement désordonné (CID) (Figure 5). Le domaine NTD contient un motif PH (Pleckstrin Homology domain) et il est responsable de la dimérisation de SSRP1 avec Spt16. Le domaine MD contient 2 domaines PH et il serait impliqué dans la liaison du complexe FACT avec l'ADN et les histones H3 et H4 de la particule de cœur des nucléosomes (147). Le domaine HMG est un domaine de liaison à l'ADN présentant une homologie avec les protéines de la famille des HMGB (148). Ces protéines se lient à l'ADN de manière dépendante de la structure de l'ADN mais indépendamment de sa séquence. Ce domaine est entouré par les 2 domaines intrinsèquement désordonnés IDD et CID. Le domaine CID peut également se lier à l'ADN (149).

#### **I.1.2.2.3 Structure de la sous-unité Spt16.**

La taille de la structure de la sous-unité Spt16 est fortement conservée entre la levure et les mammifères. Spt16 est constituée de 4 domaines, à savoir un domaine N-terminal (NTD), un domaine de dimérisation (DD), un domaine médian (MD) et un domaine C-terminal (CTD). Le domaine NTD est impliqué dans la liaison de Spt16 aux queues d'histones H3 et H4 (143). Ce domaine permet ainsi une interaction stable du complexe FACT avec le tétramère d'histones H3 et H4. Le domaine DD comporte un motif PH permettant la dimérisation des deux sous-unités Spt16 et SSRP1 (144). Ces mêmes travaux suggèrent une liaison entre le domaine MD et les dimères H2A-H2B. D'autres études ont mis en évidence sa liaison avec le tétramère H3/H4 (134). Pour terminer, le domaine CTD qui est négativement chargé et intrinsèquement désordonné présente un signal de localisation nucléaire (144). Des travaux ont montré que la délétion de ce domaine et d'une partie du domaine MD empêche son interaction avec les nucléosomes et inhibe la transcription dépendante de FACT (150). Les deux sous-unités Spt16 et SSRP1 peuvent subir des modifications post-traductionnelles pouvant affecter

l'activité de FACT et sa liaison à l'ADN. La sous-unité Spt16 peut être poly-ribosylée par la protéine PARP-1 en réponse à des dommages de l'ADN et ceci inhibe l'association de FACT avec la chromatine ((151); (127)). SSRP1 comporte notamment plusieurs sites de phosphorylation pouvant être phosphorylés par la protéine kinase nucléaire CK2 ((152); (153)). Des études ont montré que la phosphorylation des domaines entourant le domaine HMG, inhibe sa liaison avec l'ADN des nucléosomes ((152); (154); (155)). La sous-unité SSRP1 phosphorylée peut toutefois s'associer avec de l'ADN non lié via ses domaines HMG et CID (156). Cela suggère que la phosphorylation de cette sous-unité pourrait jouer un rôle et réguler le recrutement de FACT au niveau des sites de dommages à l'ADN.

#### I.1.2.2.4 Rôle de FACT durant la transcription.



**Figure 6. Fonctions attribuées au chaperon d'histone FACT.** Le complexe FACT est impliqué dans le remodelage de la chromatine durant la transcription (**A**), la réplication (**B** et **D**) et la réparation de l'ADN (**C**). Images prises de ((124) en (**A**), (135) en (**B**), (127) en (**C**) et (82) en (**D**)).

FACT a été nommé « FACilitates Chromatin Transcription » en raison de son rôle initialement identifié durant la transcription ((157) ; (158)). Des criblages génétiques chez la levure ont montré que des mutations de la sous-unité Spt16 empêchent la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (159). La purification de complexes FACT à partir de cellules humaines a révélé *in vitro* sa capacité à faciliter la transcription d'ADN chromatinisé avec des nucléosomes par l'ARN polymérase de type II ((158) ; (160) ; (161) ; (162)). D'autres études ont aussi montré un enrichissement de FACT au niveau de gènes activement transcrits ((163) ; (164) ; (165)) ainsi qu'une plus forte occupation de nucléosomes au niveau des sites d'initiation de la transcription lorsque la sous-unité Spt16 est mutée (163). Ces travaux suggèrent la capacité de FACT à déstabiliser et à enlever directement ou indirectement des nucléosomes de la chromatine (166) pour favoriser l'accès et le passage de la machinerie transcriptionnelle lors de l'initiation de la transcription (167). Plusieurs groupes proposent notamment que FACT enlèverait effectivement un dimère d'H2A-H2B de la particule de cœur pour déstabiliser les nucléosomes ((160) ; (161) ; (162)). D'autres études plus récentes ont montré que FACT permettrait de les repositionner par la suite et de reconstituer les nucléosomes après le passage de l'ARN polymérase de type II ((168) ; (124)). Les travaux de Chen *et al.*, proposent un modèle (Figure 6) dans lequel FACT interagirait avec l'ADN des nucléosomes et le tétramère d'histone H3-H4 via les domaines HMG et de liaison aux histones de sa sous-unité SSRP1. La sous-unité Spt16 permettrait ensuite d'enlever un dimère d'histones H2A-H2B de la particule de cœur. Ce dimère est ensuite repositionné par Spt16 en coopération avec SSRP1. La délétion du domaine HMG de SSRP1 entraîne en effet la perte presque totale de la capacité de FACT à réassembler les nucléosomes.

Bien que de nombreux travaux suggèrent l'implication de FACT dans l'initiation de la transcription (163), d'autres ont montré à l'inverse peu d'effet malgré son recrutement au niveau de promoteurs de gènes actifs ((166) ; (169)). Le chaperon d'histone FACT serait donc majoritairement impliqué dans la phase d'élongation de la transcription ((165) ; (170) ; (171) ; (172)). Cependant, différentes études montrent peu d'effets sur la transcription lorsque FACT est muté ou inactivé ((163) ; (173) ; (174) ; (175) ; (156) ; (176)). Une faible corrélation a en effet été observée entre la déplétion de FACT et les changements de la transcription de gènes dans des cellules souches embryonnaires de souris (170). FACT pourrait ainsi avoir dans la majorité des cas seulement une fonction de remodelage pour son rôle dans la déstabilisation réversible des nucléosomes et le recyclage des dimères d'histones H2A-H2B ((177) ; (178) ; (168) ; (124)).

#### **I.1.2.2.5 Rôle de FACT durant la réplication de l'ADN.**

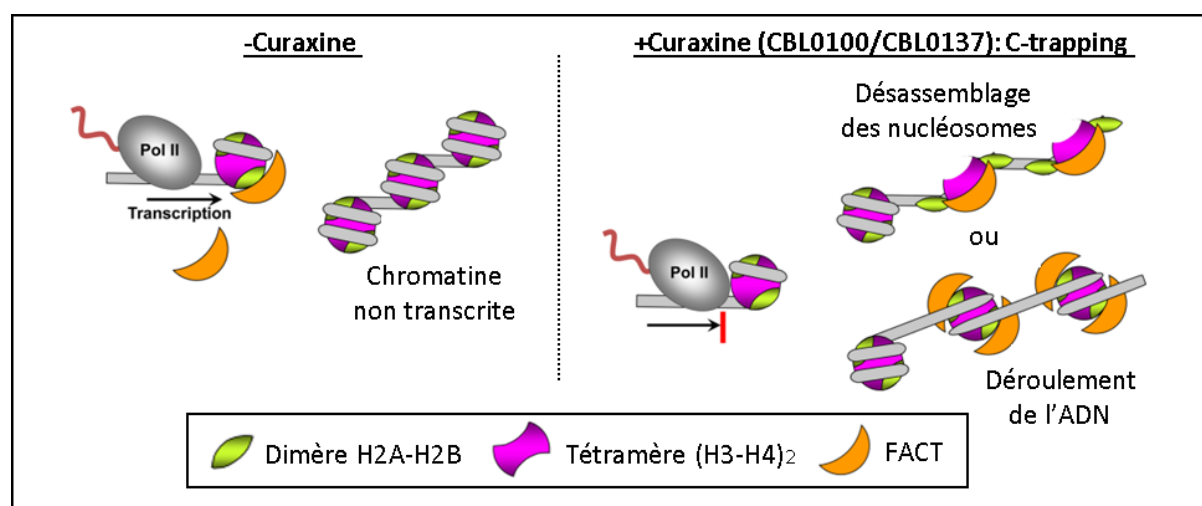
FACT possède également un rôle durant la réplication de l'ADN. Les mécanismes moléculaires qui lui sont associés sont toutefois bien moins connus que ceux décrits pour la transcription (124). Le complexe FACT interagit directement avec différents acteurs moléculaires de la machinerie de réplication. Des travaux ont en effet révélé que FACT peut interagir directement avec la sous-unité MCM4 du complexe hélicase MCM 2-7 (179). Ce complexe hélicase facilite la séparation du double brin d'ADN au niveau de la fourche de réplication. Chez la levure, des interactions de FACT avec l'ADN polymérase  $\alpha$  ((180) ; (181)) et la protéine de liaison à l'ADN simple brin RPA1 (133) ont été décrites. La protéine RPA1 permet de protéger l'ADN simple brin dissocié au niveau de la fourche de réplication de l'ADN (182). Le remodelage de la chromatine par la dissociation des nucléosomes ainsi que la conservation de leurs positions et de leur modifications épigénétiques sont impliqués dans la réplication de l'ADN. Les nucléosomes présents sur le brin d'ADN génomique initial sont nommés nucléosomes parentaux. La dissociation des nucléosomes parentaux est en effet nécessaire à la progression de la machinerie de réplication le long de la chromatine ((183) ; (184)). Leur réassemblage est ensuite nécessaire afin de conserver l'intégrité de la chromatine. De nombreuses études notamment chez la levure ont montré l'implication de FACT dans le réassemblage des nucléosomes parentaux avec les dimères d'histones préexistants (histones parentales). Ils sont redéposés sur le brin d'ADN synthétisé au cours de la réplication ((185) ; (186) ; (135)). D'autres études ont mis en évidence le rôle de FACT dans le dépôt de nouveaux dimères d'histones synthétisés en concertation avec d'autres chaperons d'histones dont CAF1 et ASF1 ((82) ; (135) ; (187)) (voir paragraphe : I.1.2.1). FACT posséderait par conséquent des rôles multiples à la fois dans le maintien de l'intégrité de la chromatine durant la réplication en participant au désassemblage et au réassemblage des nucléosomes au niveau des brins d'ADN néosynthétisés. Les travaux de Yang *et al.*, proposent en effet le modèle dans le quel FACT participerait au dépôt de dimères d'histones H3-H4 nouvellement synthétisés (Figure 6B).

#### **I.1.2.2.6 Rôle de FACT durant la réponse et la réparation aux dommages de l'ADN.**

Un rôle du complexe FACT a également été documenté dans le maintien de l'intégrité de la chromatine lorsque celle-ci est endommagée. Il intervient en effet dans les processus de réponse et de réparation aux dommages de l'ADN en réorganisant la chromatine et en facilitant la réparation au niveau des sites d'ADN endommagés. FACT peut s'accumuler au niveau de sites de cassures simples (188), doubles brins d'ADN (189) et au niveau de sites de dommages de l'ADN causés par les UV ((190) ; (155) ; (191)). Les mécanismes permettant son recrutement restent cependant inconnus. Il est possible que FACT soit recruté en réponse à un changement de la chromatine au niveau des sites endommagés ou par leur reconnaissance directe. Gao *et al.*, ont montré une interaction directe entre le domaine N-terminal de

SSRP1 et de la protéine XRCC1 de réparation de l'ADN (188). Cela pourrait expliquer le recrutement spécifique de FACT au niveau des sites de cassures simples brins. Ces travaux ont également mis en évidence la capacité de SSRP1 à échanger rapidement les histones H2B au niveau des sites de cassures d'ADN simple brin. Lazaro *et al.*, ont rapporté également la capacité de FACT à s'associer avec la kinase DNA-PK ((192) ; (193)). Cette kinase est responsable de la phosphorylation du variant d'histone H2AX. Ce variant d'histone est un marqueur majeur de cassures doubles brins d'ADN (194). Le chaperon d'histone FACT est par ailleurs à ce jour le seul chaperon d'histone impliqué dans le dépôt du variant d'histone H2AX ((195) ; (196)). La chromatine est ensuite rapidement restaurée une fois l'ADN réparé. Pour retrouver l'intégrité initiale des nucléosomes, le complexe FACT échange le variant H2AX par un dimère d'histones canoniques H2A-H2B ((151) ; (197)).

#### I.1.2.2.7 Régulation des niveaux protéiques de FACT, de son activité et inhibition par ARN interférence ou pharmacologique.



**Figure 7. Mécanisme de l'inhibition de FACT par la curaxine (CBL0100 et CBL0137).** L'intercalation de molécules de curaxines dans l'ADN permet de déstabiliser les nucléosomes sans induire de cassures. La déstabilisation des dimères H2A-H2B et l'exposition des tétramères de la particule de cœur des nucléosomes permettent (ou induit par FACT) le recrutement de FACT sur les nucléosomes déstabilisés. FACT y reste ensuite piégé (c-trapping pour « chromatin trapping ») et ne peut plus s'en dissocier. Le complexe FACT serait ainsi inhibé. (Schéma pris de (198) et adaptation de (149) et de (199)).

Les niveaux d'expression de FACT sont variables en fonction des tissus ainsi que des types de cellules de mammifères différenciées (199). L'abondance de FACT est cependant plus élevée dans un nombre important de tumeurs et de lignées cellulaires cancéreuses (141). Un niveau élevé d'expression de la sous-unité SSRP1 corrèle par exemple avec des tumeurs sévères pour le cancer du sein (156). Les curaxines sont une classe de molécules anti-cancéreuses qui ont été mises au point pour inhiber le

complexe FACT ((200) ; (149) ; (198) ; (199)) (Figure 7). Les molécules de curaxines s'intercalent dans l'ADN sans entrainer de cassures et déstabilisent les dimères H2A-H2B et exposent les tétramères de la particule de cœur des nucléosomes (200). Lorsque FACT est recruté au niveau des nucléosomes déstabilisés, il y reste piégé (c-trapping pour « chromatin trapping ») et ne peut plus s'en dissocier. D'autres études proposent que suite au traitement avec la curaxine, le recrutement de FACT est directement impliqué dans la déstabilisation des nucléosomes et y reste ensuite piégé (198). Le complexe FACT est majoritairement piégé au niveau de la chromatine transcriptionnellement inactive. Cela a pour conséquence de diminuer sa densité au niveau de la chromatine transcriptionnellement active et d'inhiber le processus d'élongation au cours de la transcription. Ces molécules ont montré une toxicité plus élevée avec des lignées cellulaires cancéreuses par rapport à des cellules saines ((142) ; (199)). Ces résultats suggèrent que les rôles de FACT et sa nécessité peuvent varier en fonction des types cellulaires considérés. La régulation de son niveau d'expression dans les différentes lignées cellulaires n'est également pas connue. Des travaux par ARN interférence ont montré qu'il existe une co-régulation des 2 sous-unités de FACT (201). Les niveaux de protéines Spt16 dépendent en effet de la présence des ARNm de SSRP1 et ils peuvent ainsi être affectés lors d'expériences de transfection d'ADN plasmidique codant pour SSRP1 ((202) ; (201) ; (141)). Le phénomène inverse est également observé proposant un modèle où l'ARNm d'une sous-unité forme un complexe avec l'autre sous-unité afin de prévenir sa dégradation (201). Cependant, ces mécanismes de cette régulation restent encore inconnus.

De manière analogue à la chromatine cellulaire, le génome ADN de nombreux virus dont l'Adénovirus est compacté et remodelé au cours de l'infection. Ce remodelage permet au génome viral de mimer la chromatine de l'hôte afin d'éviter d'être détecté par la cellule. Il joue également un rôle dans l'initiation des processus de transcription des gènes viraux ainsi que la réplication du génome viral. La compréhension des mécanismes moléculaires dans le remodelage réversible de la chromatine adénovirale reste à ce jour très peu connue. Le prochain chapitre sera consacré à la biologie de l'Adénovirus en nous focalisant pour terminer sur les rôles connus des chaperons d'histones dans la gestion de sa chromatine.

## Chapitre 2

### II. Les Adénovirus.

#### II.1 Introduction générale.

##### II.1.1 Histoire et découverte.

Les Adénovirus (Ad) ont été isolés pour la première fois en 1953 à partir de tissus d'adénoïdes d'enfants souffrant d'infections respiratoires et ont été nommés agent AD (Adenoid Degenerating agent). L'effet cytopathique de l'infection par ces virus fut observé dans les tissus en culture (203). Durant la même période et de façon indépendante, un agent nommé RI-67 (Respiratory Illness agent) a été isolé à partir de sécrétions respiratoires de recrues de l'armée américaine souffrant de troubles respiratoires aigus (204). Le même effet cytopathique a également été observé lors de la mise en culture de ce virus. Il faudra attendre 1956 pour que le terme Adénovirus (AdV ou Ad) soit employé universellement pour ces virus (205). Le terme Adénovirus vient du grec « adeno » signifiant glandes, en référence aux glandes adénoïdes et du grec « virus » signifiant poison. Un très grand nombre de travaux de recherche avec ces virus a été à l'origine de découvertes en biologie cellulaire comme la mise en évidence de l'épissage alternatif ((206) ; (207)). Le prix Nobel sera décerné en 1993 pour ces travaux à Richard J. Roberts et Philip A. Sharp.

##### II.1.2 Classification.

Les Ad font partie de la famille des *Adenoviridae* et sont regroupés en 5 genres en fonction des espèces qu'ils infectent, des séquences des protéines hexon et protéase. On compte ainsi les *Aviadenovirus*, les *Atadenovirus*, les *Siadenovirus*, les *Ichtyadenovirus* et les *Mastadenovirus* (ICTV). Les Ad humains appartiennent à ce dernier genre et ils sont divisés en 7 espèces classées de A à G (Tableau 2). Parmi plus de 100 types d'Ad référencés, soixante-sept types sont connus pour infecter l'Homme (208). Cette classification a été réalisée en fonction de plusieurs critères dont la séquence de la région E3, le tropisme cellulaire, le pouvoir oncogénique chez les rongeurs ou encore de la capacité d'hémagglutination de ces virus (209). L'Ad de type 5 (Ad5) du groupe C est le type le plus fréquemment retrouvé dans les infections respiratoires (210). Avec l'Ad2, l'Ad5 est l'un des types le plus étudié et par conséquent le mieux caractérisé.



Groupe	Type	Récepteur	Type d'infection	Commentaire
A	12, 18, 31, 61	CAR	-Gastrointestinale -Respiratoire -Urinaire -Infection liée à l'obésité -Méningo-encéphalite	-Oncogènes chez les Hamsters
B	B, type 1: 3, 7, 16, 21, 50, 68 B, type 2: 11, 14, 34, 35, 55 (208), 66	CD46/ DSG-2	-Oculaire -Gastrointestinale -Respiratoire -Urinaire -Pneumonie -Méningo-encéphalite	B2: Tropisme rénal à risque pour les immunodéprimés
C	1, 2, <b>5</b> , 6, 57	<b>CAR</b>	-Gastrointestinale <b>-Respiratoire</b> <b>-Pneumonie</b> -Hépatite	-Ad2 et Ad5 sont les plus étudiés
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-65, 67, 69	CAR/ acide sialique	-Infection liée à l'obésité -Méningo-encéphalite	-8, 19 et 37 se lient aux acides sialiques
E	4	CAR	-Respiratoire -Pneumonie -Oculaire	-Virus fortement pathogènes (209)
F	40, 41	CAR	-Gastrointestinale -Diarrhée infantile -Hépatite infantile ? (210)	-Deux tailles de fibres sur la même particule virale
G	52	CAR/ acide sialique	-Gastrointestinale	-Récepteur identifié en 2015 (211)

**Tableau 2. Classification des adénovirus humains.** Les Adénovirus sont classés en fonction de leurs groupes et de leurs types. L'Adénovirus de type 5 (Ad5) de notre étude appartient au groupe C et est montré en rouge. (Adaptation de (208)).

### II.1.3 Pathogénicité.

Les différents types d'Ad sont à l'origine de différentes manifestations cliniques et pathologies en fonction de leur tropisme cellulaire. Plusieurs récepteurs sont en effet connus en fonction de chaque type (Tableau 2). La majorité des infections par les Ad se manifeste par des infections respiratoires, gastrointestinales ou encore oculaires (215). La transmission virale se fait directement de personne infectée à une autre personne via des aérosols respiratoires ou au moyen de « fomites » et de fèces contaminées (216). Les symptômes apparaissent entre 2 à 14 j après l'infection suivant le type de pathologie (217). L'infection par l'Ad est cependant asymptomatique dans la majorité des cas chez les personnes immunocompétentes mais des complications sévères et parfois fatales sont observées chez les personnes immunodéprimées (218) et les enfants en bas âge (219). L'Ad41 a été récemment soupçonné d'être à l'origine d'hépatites en raison de sa détection chez de nombreux enfants malades

(213). Les types 4 et 7 ont été responsables d'un très grand nombre d'infections chez les militaires en raison de leur promiscuité ((220) ; (221)).

#### **II.1.4 Traitements.**

Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique et approuvé pour lutter contre l'infection par l'Ad. Toutefois, l'analogue nucléotidique Cidofovir « cytosine nucleotide » est utilisé chez les personnes immunodéprimées. Cette molécule permet d'inhiber compétitivement la polymérase virale ((222) ; (209)). Si ce traitement est efficace pour lutter contre les infections par le HCMV (223) et par le BKV (224), il reste peu efficace contre l'infection par l'Ad et présente une néphrotoxicité élevée. Le Brincidofovir (CMX001), un conjugué lipidique de Cidofovir, a montré moins de néphrotoxicité et une meilleure biodisponibilité orale que le Cidofovir. Ce traitement est actuellement utilisé chez des receveurs de transplantations d'organes (225).

Un vaccin a été développé et est utilisé dans le secteur militaire depuis 1971 par l'armée américaine comme moyen de prévention contre les types 4 et 7 ((226) ; (227) ; (209) ; (228)). Une protection contre les types 3 et 14 est également possible avec ce vaccin en raison d'une immunité croisée ((229) ; (230)).

#### **II.1.5 Utilisation thérapeutique.**

##### **II.1.5.1 Vaccination.**

Malgré une utilisation limitée de l'Ad en thérapie génique pour lutter contre les maladies génétiques (voir II.1.5.2) (231), il présente l'avantage de pouvoir être modifié pour la conception de vaccins et d'être produit à grande échelle car ce virus se multiplie très efficacement. La capsid de l'Ad peut en effet être modifiée en substituant la région la plus immunogène de la protéine virale hexon par un épitope d'intérêt. En plus de la protéine hexon, d'autres protéines virales majeures (Figure 8) qui constituent la capsid peuvent être modifiées comme le penton, la fibre ou la protéine IX pour exposer un antigène d'intérêt (232).

Le génome de l'Ad peut aussi être modifié pour y insérer le gène codant pour l'antigène d'intérêt. Ce sont ce type de vecteurs adénoviraux qui ont été développés comme vaccins durant la pandémie de SARS-CoV-2 pour exprimer la protéine Spike (S) du SARS-CoV-2 ((233) ; (234)). L'Ad26 humain a été utilisé par exemple par la compagnie Johnson and Johnson pour la réalisation de leur vaccin (Ad26.COV2-S). Le vaccin « Sputnik V » (Gamaleya Research Institute) consiste en une première injection avec le type 26 puis d'une seconde injection avec le type 5. Le vaccin « AstraZeneca » est un

autre exemple de vaccin adénoviral développé à partir d'un adénovirus de chimpanzé (ChAdOX1-nCoV).

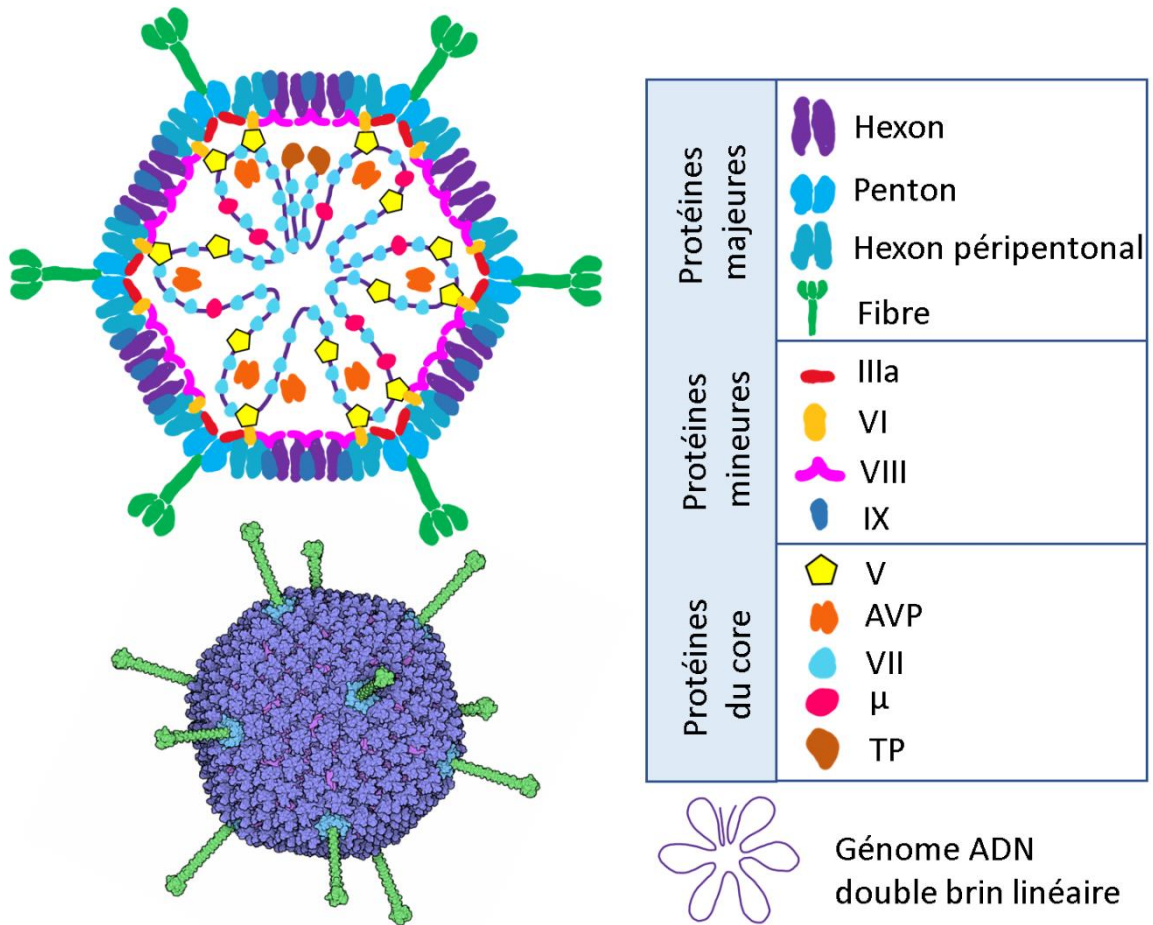
### **II.1.5.2 Vecteurs de thérapie génique.**

Les Ad sont utilisés en thérapie génique comme vecteur permettant un transfert de gène de manière transitoire. Ces virus comportent plusieurs avantages dont leur capacité à infecter de nombreux types cellulaires (Tableau 2), à infecter des cellules quiescentes ou encore de ne pas intégrer leur génome dans celui de la cellule hôte. Le génome viral modifié peut toutefois persister sous une forme épisomale (235). A ce jour, 3 générations de vecteurs ont été mises au point depuis les années 1990 (236). La première génération consiste en un génome viral délété des régions E1 et E3. La seconde génération consiste en la délétion supplémentaire des régions E2 et E4. La dernière génération permet l'insertion d'un transgène pouvant avoir une taille plus grande car ces vecteurs ne contiennent que les régions ITR (nécessaires à la répllication du génome) du génome viral ainsi que la séquence d'encapsidation  $\Psi$  (Figure 9). En 1993, un vecteur de première génération comportant le transgène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) a été directement administré dans les voies respiratoires d'un patient de 23 ans souffrant de la mucoviscidose (237). Après traitement, une perte d'expression du transgène est toutefois observée en moins de 30 jours, cette expression est diminuée après un second traitement et inefficace au troisième traitement. Le développement d'une immunité spécifique contre ces vecteurs ne permet pas des utilisations répétées.

### **II.1.5.3 Vecteurs oncolytiques.**

A l'heure actuelle, les vecteurs adénoviraux sont très étudiés dans les approches de thérapie anticancéreuse et semblent constituer une alternative très prometteuse dans ces traitements. En effet, des vecteurs adénoviraux oncolytiques ont été développés afin de cibler spécifiquement les cellules tumorales (238). Ces vecteurs ont été modifiés pour se répliquer seulement dans les cellules tumorales et induire leur lyse après l'expression d'un ou de plusieurs transgènes. Le vecteur oncolytique ONYX-015 (239) aussi nommé H101 est employé depuis 2006 en Chine afin de soigner certains cancers (240). Un second exemple de vecteur oncolytique nommé CG0070 (241)) est actuellement enregistré en phase III d'essais cliniques contre le cancer NMIBC, un cancer de la vessie. Ce vecteur oncolytique est un Ad5 modifié dans lequel le promoteur spécifique des cellules cancéreuses E2F-1 a été inséré à la place du promoteur adénoviral E1A (Figure 9) conférant une répllication sélective pour les cellules tumorales de vessie défectueuses pour la voie pRb (242).

## II.2 Structure de la particule virale.



**Figure 8. Vues schématiques de la structure d'une particule d'Ad5.** La vue schématique en coupe (haut) ou entière (bas, (243)) d'une particule virale d'Ad5 montre son organisation avec des protéines majeures, mineures et des protéines de core (voir tableau). Le génome viral est protégé dans la capside et est compacté par les protéines VII. (Adaptation de (244) ; (245) ; (246) et (247)).

L'Ad5 est un virus non-enveloppé possédant une capside icosaédrique d'environ 90 nm. Le génome viral est un ADN double brin linéaire de 36 kpb protégé à l'intérieur de la capside. Il est associé aux protéines virales core (ou de cœur) parmi lesquelles on compte 250 à 500 copies de la protéine VII. Ce génome code pour 45 protéines (248) dont 13 protéines de structure qui sont divisées entre les protéines majeures et les protéines mineures. Les protéines majeures forment la structure principale de la capside alors que les protéines mineures ont une fonction de stabilisation. La structure de la capside de l'Ad5 a été définie pour la première fois en 1991 (249) avec une résolution de 35 Å. Depuis, cette structure a été acquise par cryo-microscopie électronique avec une résolution de 3,6 Å et par cristallographie aux rayons X (250) avec une résolution de 3,5 Å (251). Les protéines structurales ont été initialement nommées en fonction de leur profil de migration par électrophorèse et de leur

position. Du poids moléculaire le plus élevé au poids moléculaire le plus faible, on trouve les protéines II (hexon), III (penton), IIIa, IV (Fibre), IVa2, V, VI, VII, VIII et IX.

### II.2.1 Protéines majeures.

La capsidie icosaédrique (T=25) est formée par 3 protéines majeures. La protéine II (hexon, 720 copies) forme des trimères qui composent la structure de base de la capsidie. Deux motifs différents peuvent être formés par les protéines hexons. L'association de 9 protéines hexons (les hexons centraux) constitue les GON (Group of Nine) des 20 faces triangulaires de la capsidie (252). L'association de 5 protéines hexon (les hexons péripentonaux) autour d'une protéine penton forme les GOS (Group of Six) que l'on trouve sur les 12 sommets de la capsidie. Des trimères de protéines IV (fibres) sont présents au niveau des 12 sommets de la particule virale et forment les spicules, aussi appelées fibres dans le cas des Ad à la surface du virus. Ces fibres reposent sur des pentamères de protéines III (pentons) (Figure 8). Les trimères de fibre de l'Ad5 permettent la reconnaissance des cellules cibles par l'interaction de la tête globulaire avec le récepteur cellulaire CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) (253). La structure penton-base est nécessaire pour l'initiation de l'entrée virale en interagissant avec les intégrines cellulaires  $\alpha\beta$  (254).

### II.2.2 Protéines mineures.

Il existe 4 protéines mineures (IIIa, VI, VIII et IX). Ces protéines sont associées à plusieurs fonctions dont la première est d'être essentielles à la stabilisation et au maintien de l'intégrité de la structure de la capsidie. La protéine IIIa (60 copies) forme un anneau en dessous du penton sous la forme de pentamères (Figure 8) et permet de stabiliser les interactions entre les hexons péripentonaux (GOS) et le penton ((251) ; (246)). La protéine IX (240 copies) est la seule protéine mineure à être exposée à l'extérieur de la particule virale et permet de stabiliser les GON (255). Enfin, la protéine VIII est impliquée dans la stabilisation des protéines IIIa et IX et permet respectivement leur liaison aux GOS et aux GON (252). La protéine VI (360 copies) présente aussi une fonction stabilisatrice de la capsidie en interagissant et en stabilisant le penton dans la capsidie (256). Elle est aussi responsable de la rupture de l'endosome et ainsi de l'échappement endosomal du virus (257).

### II.2.3 Protéines core.

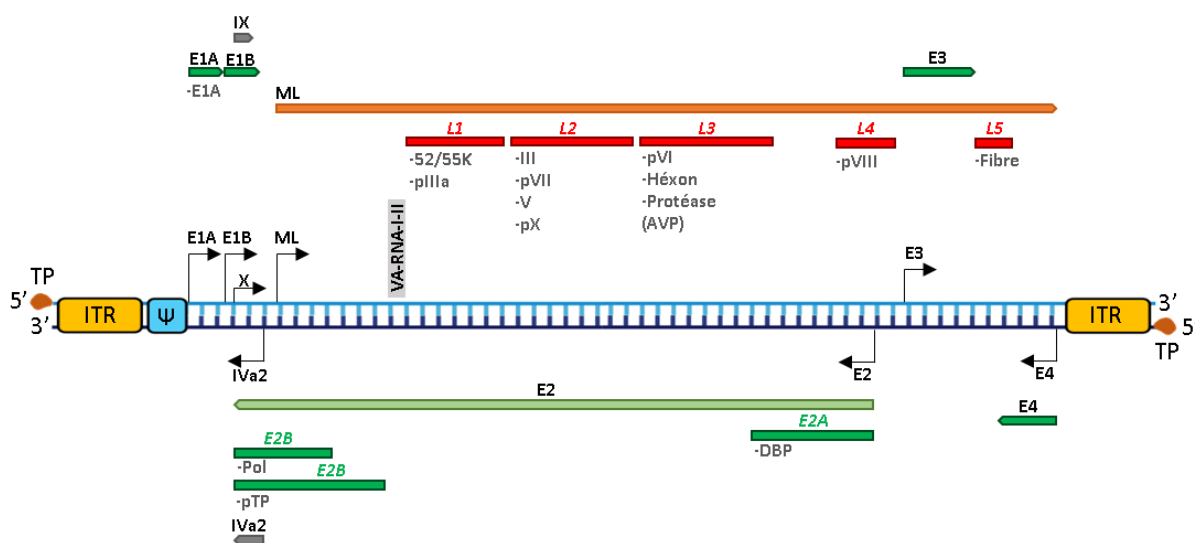
Six protéines core interagissent avec le génome viral : les protéines IVa2, V, VII, Mu (X), TP (Terminal Protein) et la protéase virale AVP (Adenoviral Protease) (258). La protéine IVa2 est présente seulement au niveau de chaque sommet de la capsidie virale (259) (Figure 8). Cette protéine est impliquée dans

l'encapsidation du génome viral ((260) ; (261) ; (262)) en interagissant avec la séquence d'encapsidation  $\Psi$  (261) et dans la régulation de la transcription des gènes tardifs (voir paragraphe II.3.5). La protéine Mu (X) a également un rôle dans l'encapsidation du génome viral (263) quand elle est sous sa forme de précurseur. Une fois clivée par l'AVP, la protéine Mu (X) participe à la libération du génome (263). L'AVP (7 copies) permet la maturation par clivage des protéines virales précurseurs pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pTP et pX.

La protéine virale VII est une protéine basique (23 % d'arginines et 19 % d'alanines) avec 46 % de résidus chargés positivement ou fortement cationiques (264). Cette caractéristique permet à cette protéine de s'associer à l'ADN viral. On estime que 250 à 500 copies de la protéine VII sont associées au génome viral, ce qui représente environ 10 % de la masse de la particule virale (265). Cette protéine multifonctionnelle est impliquée notamment dans la compaction du génome viral ((266) ; (267) ; (268) et (269)) en agissant comme une histone cellulaire ((270) ; (266) ; (271) ; (65)) et en mimant les protéines protamines (272). Cette protéine facilite également la transcription des gènes précoces ((267) ; (273) ; (274) ; (275)) et est nécessaire à l'échappement de l'endosome et à la maturation totales des protéines de capsides par l'AVP. Elle possède également un rôle dans l'import nucléaire du génome à travers les pores nucléaires (276).

Finalement, la protéine TP (Terminal protein) est liée de façon covalente à chaque extrémité 5' du génome viral. Cette protéine est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseur (pTP) qui est ensuite maturée par l'AVP (TP). Les protéines pTP servent d'amorce au cours de l'initiation de la réplication de l'ADN viral, ce qui explique sa présence aux extrémités du génome ((277) ; (278)).

#### II.2.4 Structure du génome viral.



**Figure 9. Schéma simplifié de la structure du génome de l'Ad5.** Le génome de l'Ad5 est un ADN double brin linéaire comportant une séquence d'encapsidation ( $\Psi$ ). Il possède une séquence répétée inversée (ITR) à chaque extrémité. Les 2 extrémités du génome viral sont liées à la protéine TP. Les différentes

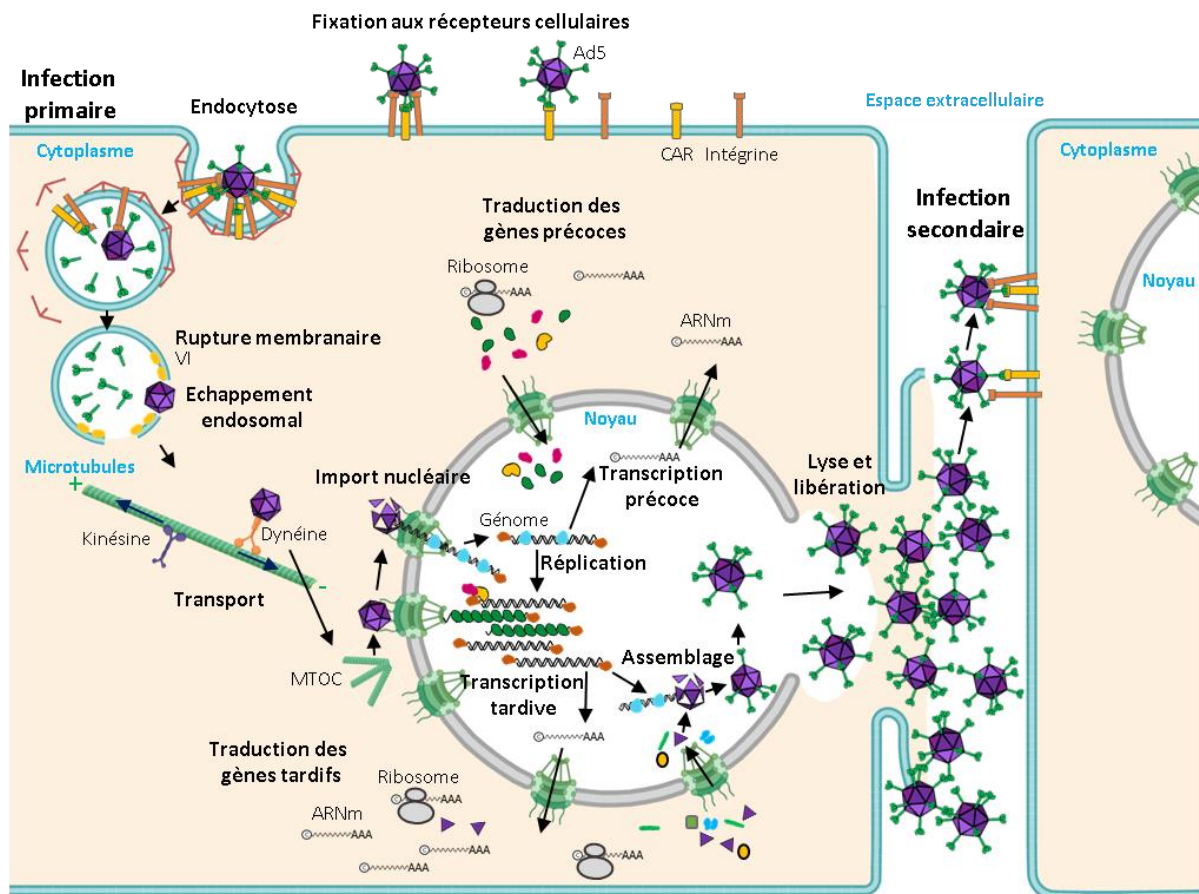
unités de transcription sont représentées en vert (gènes précoces E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4) et en rouge (gènes tardifs L1 à L5 sous le contrôle du promoteur unique MLP). (Adaptation de (278) , de (279) et de (280) *Principle of Virology*, 2015).

L'Ad5 possède un génome double brin linéaire de 36 kpb où une séquence terminale répétée inversée (ITR) est présente à chacune de ses extrémités (Figure 9). Ces séquences constituent l'origine de réplication de l'ADN viral. Une séquence d'encapsidation  $\Psi$  est présente après l'ITR 5' et elle permet son incorporation dans la capsid (281). Le génome de l'Ad peut être associé à des protéines VII ou aux histones cellulaires. Malgré ses interactions avec les nucléosomes, la protéine VII ne remplace pas les histones des nucléosomes (65). Une protéine pré-VII interagit premièrement et de manière indépendante à la séquence d'ADN viral en formant des complexes avec l'ADN et les histones cellulaires (266). Une structure compacte d'ADN double brin viral est ainsi organisée au moyen de 180 nucléosomes (282). Le dépôt réversible de la protéine pré-VII sur le génome viral et au cours de l'infection virale est détaillée plus loin et plus en détails (paragraphe II.4.1) (258). L'expression des gènes viraux est finement régulée au cours de la progression de l'infection. En effet, les gènes précoces E1A, E1B, E2, E3 et E4 (E pour Early) sont les premiers exprimés avant la réplication du génome. Après l'initiation de la réplication de l'ADN viral, les gènes tardifs L1 à L5 (L pour Late) sont enfin exprimés.

Très brièvement, l'unité transcriptionnelle précoce E1A (E pour Early) code pour la protéine E1A servant à activer l'expression des unités transcriptionnelles E1B, E2, E3 et E4. La protéine E1A induit de plus une transition du cycle cellulaire vers la phase S car l'Ad5 a la particularité d'infecter les cellules quiescentes, en phase G0/G1. La région E1B code pour plusieurs protéines possédant des activités anti-apoptotiques (283). La région E2 code pour les protéines nécessaires à la réplication du génome viral ( $\rho$ TP, la Pol et la DNA Binding Protein (DBP)) (284). La région E3 n'est pas nécessaire au cycle viral complet dans les cellules en culture et code pour des protéines immunomodulatrices impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire de l'hôte (285). Enfin, la région E4 code pour plusieurs protéines régulatrices interagissant avec des protéines cellulaires. Elles ont des rôles multiples dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose (286). Des ARN non codants sont exprimés par le génome de l'Ad5 (VA-RNA) (Figure 9). Ces ARN sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire ((287) ; (288)).

Les gènes tardifs (L1 à L5, L pour Late) sont sous le contrôle du promoteur unique MLP (Major Late Promoter) (289) et sont exprimés après l'initiation de la réplication du génome viral. Ces gènes codent pour les protéines de structure du virus et pour d'autres protéines non structurales impliquées dans l'assemblage des capsides.

## II.3 Cycle de réplication de l'adénovirus.



**Figure 10. Cycle simplifié de réplication de l'Ad5.** Le virus se fixe aux récepteurs cellulaires CAR et les intégrines. Après endocytose par la voie dépendante de la clathrine, les particules virales s'échappent de l'endosome grâce à la rupture membranaire induite par la protéine virale VI. Les particules sont transportées le long des microtubules jusqu'au centre organisateur des microtubules (MTOC) par fixation à la dynéine. Aux pores nucléaires, le génome viral est libéré dans le noyau après désassemblage des particules virales. La transcription des gènes précoces a lieu et permet la production de la polymérase virale (Pol), des protéines DBP et pTP. Ces protéines permettent l'initiation de la réplication. Les gènes tardifs dont ceux codant pour les protéines de structure sont ensuite exprimés. Les génomes viraux sont enfin compactés avec la protéine VII et sont incorporés dans de nouvelles particules virales. Après lyse cellulaire, les particules virales sont libérées et peuvent infecter de nouvelles cellules. (Adaptation de (278) et (290)).

### II.3.1 Reconnaissance et entrée de l'Ad5 dans la cellule hôte.

Une première interaction est nécessaire entre la tête de la fibre présente à la surface des capsides d'Ad5 et le récepteur cellulaire CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) ((291) ; (253) ; (292)). La protéine CAR est exprimée de manière ubiquitaire dans presque tous les tissus humains (293). CAR a été renommé ainsi en raison de la découverte initiale de son interaction avec le Coxsackievirus B et les Ad de type C (294). La protéine CAR est impliquée dans la formation des jonctions serrées des



cellules épithéliales ((295) ; (296)) Des études ont montré que la liaison des particules virales avec CAR induit une augmentation de la perméabilité épithéliale et favorise l'infection (297). L'interaction fibre/CAR induit une réorganisation de la capsidie qui permet l'exposition d'un motif RGD (arginine, glycine et acide aspartique) des protéines penton ((298) ; (299)) ainsi qu'un désassemblage partiel des fibres (300). Ce motif est requis pour la fixation du penton sur les intégrines de type  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , ce qui induit une réorganisation du cytosquelette d'actine (301) et favorise l'endocytose du virus par la voie dépendante de la clathrine ((302) ; (254) ; (303)). Les particules virales sont ensuite partiellement désassemblées.

### **II.3.2 Rupture et échappement endosomal.**

Une fois à l'intérieur des endosomes, les capsides d'Ad5 sont libérées dans le cytoplasme entre 15 à 30 min après infection (304). Cet échappement du virus de l'endosome est induit par l'activité lytique de la protéine virale VI (257). Celle-ci est exposée à l'extérieur de la capsidie au cours de son désassemblage partiel dans l'endosome (305). La protéine VI se lie à la membrane interne de l'endosome par une hélice amphipatique présente dans son domaine N-terminal. Cette association permet d'induire la courbure de la membrane endosomale (306) puis sa rupture (305). Le mécanisme précis de cette rupture membranaire reste toutefois encore mal connu. Un modèle suggère cependant que l'orientation oblique de l'hélice amphipatique de la protéine VI dans la membrane serait à l'origine de la réorganisation membranaire et de sa rupture (306). La protéine VI permet dans un second temps et indépendamment à la lyse endosomale, l'échappement du virus des endosomes rompus au moyen de son motif conservé PPxY (x pouvant être n'importe quel acide aminé) (257). Ce motif permet le recrutement de la E3 ubiquitine ligase Nedd4.2 (257). Le rôle précis de Nedd4.2 dans cet échappement endosomal est encore inconnu.

### **II.3.3 Transport de la particule virale vers le MTOC.**

Les capsides sont acheminées jusqu'au noyau le long des microtubules par un processus actif impliquant les moteurs moléculaires cellulaires (307). Parmi eux, la dynéine est le moteur moléculaire impliqué dans le transport rétrograde de cargos de la périphérie cellulaire jusqu'au MTOC. La kinésine permet un transport antérograde (308). Des travaux ont montré que la dynéine est impliquée dans le transport rétrograde de l'Ad2 (309) jusqu'au MTOC par son interaction directe et nécessaire avec la protéine hexon ((310); (311)). Après l'échappement de l'endosome, la protéine VI, via son motif PPxY participe également au transport de la particule jusqu'au MTOC (257) puis jusqu'au noyau où est libéré le génome viral. A ce niveau, une interaction de la capsidie avec le moteur moléculaire Kif5B (famille

de la Kinésine-1), impliqué dans le transport antérograde faciliterait le désassemblage de la capsid et la libération du génome dans le noyau ((312) ; (313) ; (307)).

#### **II.3.4 Libération du génome viral dans le noyau.**

La libération du génome viral dans le noyau est une étape clé, indispensable à l'initiation de la transcription des gènes viraux ainsi que la réplication du génome du virus. Une fois au MTOC, les particules virales sont ensuite transloquées vers le pore nucléaire (NPC). Cette étape nécessite le facteur d'export nucléaire CRM1. L'utilisation de la leptomycine B, un inhibiteur de CRM1, induit en effet une accumulation des particules virales aux MTOC ((314) ; (315)). La taille trop grande des capsides d'Ad5 ne permet pas leur passage direct à travers les pores nucléaires (316). Les capsides doivent être désassemblées pour permettre la libération du génome viral. CRM1 est impliqué dans ce désassemblage, indépendamment de sa fonction d'export (Thèse de Floriane Lagadec ; (315)). L'interaction des particules virales avec les nucléoporines joue également un rôle au niveau du pore nucléaire. L'interaction directe entre la protéine hexon et la nucléoporine Nup214 permet l'ancrage du virus au complexe du pore nucléaire ((317) ; (318)) et la nucléoporine Nup358 facilite l'import nucléaire du génome viral sans affecter le désassemblage des capsides (319). D'autres travaux ont montré un rôle possible de NLS de la protéine VII liée au génome viral ((276) ; (320)) ou encore de l'histone H1 (317).

#### **II.3.5 Expression des gènes viraux.**

L'expression des gènes de l'Ad est régulée dans le temps. Des mécanismes d'épissage alternatifs conduisent à la diversité des ARN messagers viraux. Ceux-ci ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. La première unité transcriptionnelle à être exprimée est E1A en raison de la présence d'un promoteur constitutivement actif. Cette particularité lui permet ainsi d'être exprimée immédiatement et de favoriser l'accumulation de la protéine virale E1A (321). Cette protéine virale est nécessaire à l'activation de l'expression des autres unités transcriptionnelles E1B, E2, E3 et E4 (Figure 9). L'initiation de la réplication du génome viral nécessite au préalable l'expression de la région E2. Cette région code pour les trois protéines pTP, l'ADN polymérase virale (Pol) et la DNA Binding Protein (DBP) indispensables à la réplication du génome viral (284) (Figure 12).

Les gènes tardifs L1 à L5 sont exprimés après l'initiation de la réplication du génome (321). Les gènes tardifs codent pour des protéines impliquées dans l'assemblage des particules et pour les protéines de structure. Ils sont sous le contrôle du promoteur unique MLP (Major Late Promoter) ((289) ; (322)). La production de transcrits L1, codant pour les protéines 52-55K et pIIIa, est toutefois observée en phase

précoce ((323) ; (324)). L'accumulation de génomes viraux permet d'activer l'expression du gène codant la protéine de liaison à l'ADN IVa2. Cette protéine stimule fortement l'expression de la région MLP avec la protéine L4-33KDa (initialement identifiée comme la protéine DEF-A) (325). La région L3 code notamment pour l'AVP, les protéines pVI et hexon. En fonction du type cellulaire et de la quantité de virus utilisée, les cinétiques d'expression des gènes varient fortement mais leur ordre d'expression est conservé. Dans les cellules U2OS, la réplication du génome viral débute environ 12 h après l'infection (326) alors qu'elle démarre après 29 h d'infection pour les cellules IMR-90 (fibroblastes isolés de tissus pulmonaires) (321). Avec ce modèle cellulaire, les ARNm pour le gène E1A commencent à être détectés par exemple après 6 h d'infection pour 2 h avec des cellules HeLa ((327) ; (328) ; (329)). Les gènes E1B, E2 et E3 commencent à être exprimés après environ 12 h d'infection dans les cellules IMR-90 et 3 h avec des cellules HeLa. Les gènes E2A et E4 commencent à être exprimés après environ 6-7 h d'infection des cellules IMR-90 et 3 h pour les cellules HeLa. Ces travaux ont montré que l'expression des gènes tardifs codant pour la protéine hexon, la fibre ou le penton commence avant l'initiation de la réplication et après 13 h d'infection avec des cellules IMR-90. D'autres études n'avaient en effet pas mis en évidence ces résultats avant l'initiation de la phase de réplication (323). Malgré une détection précoce des transcrits pour les gènes précoces et tardifs, les protéines E1A, DBP et les protéines structurales ne sont détectées que plus tardivement et respectivement après 12 h, 18 h et 36 h d'infection avec des cellules IMR-90 (321).

### **II.3.6 La réplication du génome viral.**

Les protéines DBP, Pol et pTP participent à la réplication du génome viral. Cette réplication de l'ADN viral est particulière dans le sens où l'amorce utilisée pour initier la réplication est une protéine. L'ADN polymérase virale, associée à la protéine pTP est recrutée sur une des origines de réplication dans les ITR (330). La protéine pTP permet l'initiation de la réplication du génome en servant d'amorce (Figure 12). Celle-ci sera finalement clivée par la protéase virale AVP plus tardivement (331). Au cours du temps, cette réplication est divisée en deux vagues, une première lente où peu de génomes sont produits puis une seconde, plus rapide (326). Comme pour d'autres virus, la réplication du génome adénoviral s'effectue dans des compartiments de réplication (CR) dont la formation est induite par le virus, dans le noyau. Les mécanismes de la réplication virale dans ces CR seront décrits plus en détails dans le paragraphe II.4.3.

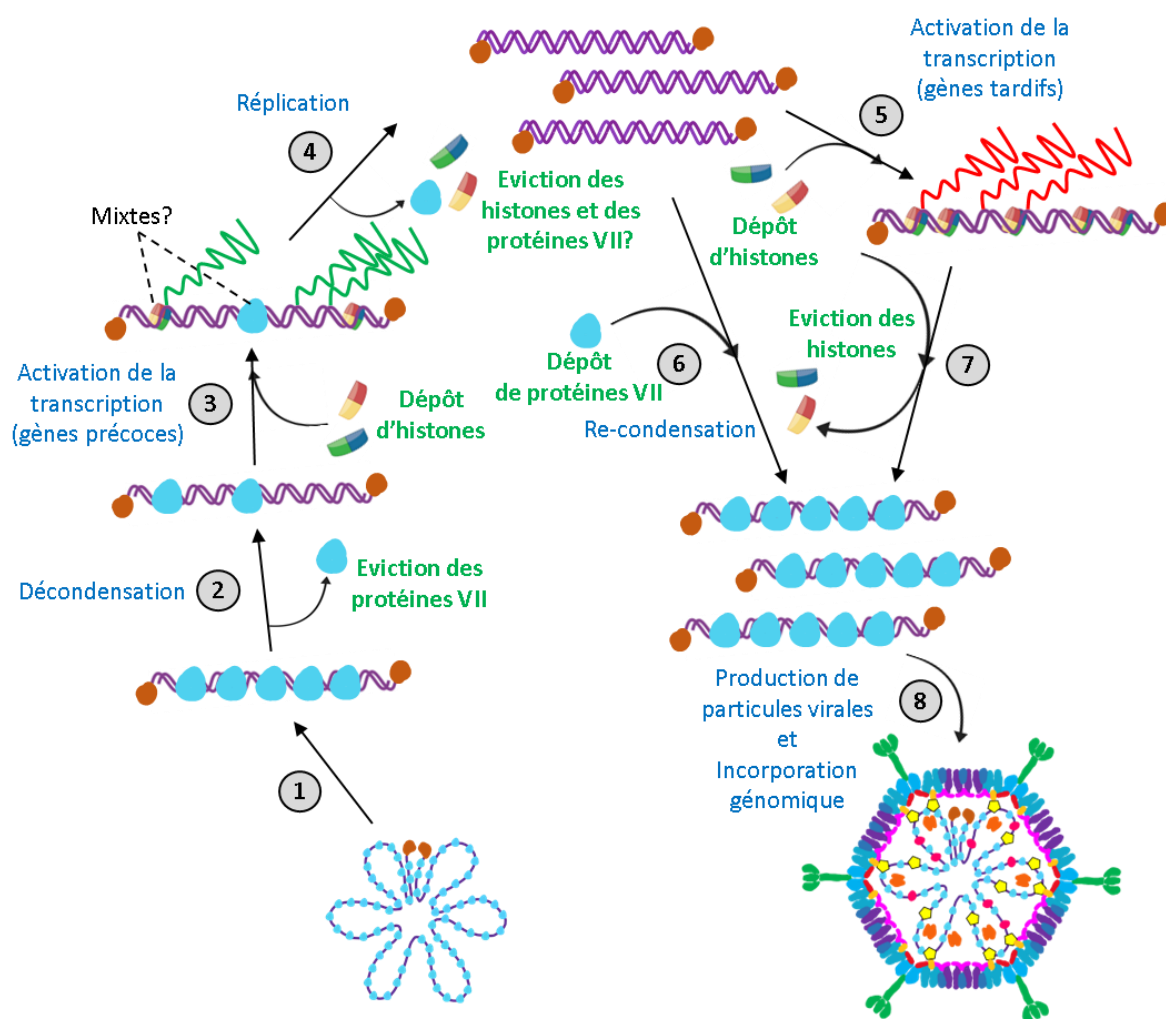
### **II.3.7 Assemblage et sortie virale.**

L'assemblage des nouvelles particules virales s'effectue dans le noyau (332) dans des « usines virales » ou viral factories (333). Les capsides sont formées par l'assemblage des protéines structurales et par

l'encapsidation du génome viral compacté par les protéines VII. L'encapsidation spécifique du génome viral nécessite le signal d'encapsidation  $\Psi$  sur le génome (Figure 9) (334). Des études ont montré que la protéine IIIa (335) et les protéines non structurales IVa2 (336), L4-22K (337), L1-52/55K (338) se fixent *in vivo* sur la séquence  $\Psi$  et sont impliquées dans l'encapsidation du génome viral. D'autres travaux ont révélé que la protéine non structurale L4-33K est nécessaire à l'encapsidation du génome par un mécanisme indépendant de sa fixation sur la séquence  $\Psi$  (339). La protéine V joue un rôle dans l'ancrage du génome viral dans la capsid. Cette protéine interagit en effet à la fois avec la protéine VI liée à la capsid (245) et avec la protéine VII liée au génome viral (340). Des travaux ont montré par ailleurs que la protéine V s'associe aux nucléoles et qu'elle est suffisante à la redistribution du nucléole vers le cytoplasme de la nucléoline et de la nucléophosmine (B23) (341). De nombreuses protéines non structurales sont de plus impliquées comme chaperonnes dans l'assemblage des particules mais n'entrent pas dans leur composition. La formation de trimères d'hexons est par exemple favorisée par la chaperonne virale 100K (342) après l'import de protéines hexon sous la forme de complexes fixés à la protéine VI (343). Les protéines virales sont maturées par l'AVP à l'intérieur de la particule virale. La migration de particules du mutant ts1 (protéase virale inactive ((344) ; (345))) permet de mettre en évidence des protéines structurales non matures pIIIa, pVI, pVIII, pVII et pX (p pour pré-protéine). L'encapsidation du génome viral ne nécessite pas une association avec les protéines VII (265). Les particules virales formées sans protéines VII présentent toutefois un défaut de maturation pour certaines protéines incluant les protéines pVI et pVIII. L'entrée de ces particules délétées n'est pas affectée mais celles-ci présentent un défaut d'échappement endosomal. La lyse de la cellule infectée est induite par l'infection et permet la libération des particules virales. Les mécanismes viraux impliqués dans l'induction de la lyse restent mal connus. La lyse cellulaire est favorisée par l'expression tardive du gène E3 codant pour la protéine virale ADP (Adenovirus Death Protein) (346). D'autres travaux suggèrent également une implication possible de l'autophagie (347). Le cycle complet de l'Ad5 dure approximativement entre 20 et 24 h et il peut varier suivant le type cellulaire utilisé.

## II.4 Le devenir du génome viral dans le noyau : structure, transcription et réplication.

### II.4.1 Chromatinisation réversible du génome adénoviral.



**Figure 11. Modèle de la chromatinisation réversible du génome viral au cours du cycle de l'Ad5.** (1) Le génome viral est compacté par les protéines VII. (2) Une fois libéré dans le noyau, il est décondensé par l'éviction des protéines VII. (3) L'ADN génomique est chromatinisé avec des histones cellulaires pour permettre l'activation de la transcription des gènes précoces. (4) La réplication du génome viral permet la synthèse de nouveaux génomes ADN double brin. (5) Les génomes viraux sont chromatinisés avec des histones pour permettre l'activation de la transcription des gènes tardifs. (6) et (7) : Hypothèse de la compaction des génomes viraux avec des protéines VII à partir soit de génomes viraux nus (6), soit de génomes chromatinisés et pour lesquels les histones ont été au préalable dissociées. (8) Assemblage de nouvelles particules virales et encapsidation de génomes viraux compactés.

Le génome adénoviral n'est pas une molécule d'ADN double brin linéaire nu mais il peut présenter plusieurs formes suivant son association ou non avec des protéines virales et cellulaires au cours du cycle viral. Le génome viral peut en effet être soit associé sous une forme plus ou moins compactée avec des dimères de protéines virale VII (250 à 500 copies de protéines VII par virion) (348) soit associé

à des histones cellulaires (Figure 11) ((349) ; (348)). Il est de plus possible de trouver des molécules intermédiaires associées à la fois avec des protéines VII et avec des histones cellulaires (348). La protéine virale VII possède une séquence protéique similaire aux protamines ((350) ; (345)) ayant un rôle dans la compaction de l'ADN spermatique. En s'associant au génome viral, ces « protamine-like proteins » forment une structure irrégulière de perles sur un fil, semblable à la chromatine de l'ADN cellulaire en s'associant au génome viral (268). Elles restent associées au génome viral durant les premières heures après infection puis sont sélectivement dissociées ((340) ; (351)). La durée de cette association reste cependant sujette à débat ((267) ; (274) ; (76) ; (352)). Certains travaux ont montré que la transcription virale n'est pas requise pour l'éviction des protéines VII du génome viral que ce soit pour la région codante E1A ainsi que celle pour l'hexon (353). D'autres études plus anciennes suggèrent de manière différente qu'en plus de freiner la transcription des gènes viraux précoces, la transcription du gène viral précoce E1A favoriserait la dissociation des protéines VII en conduisant à un remodelage de la chromatine virale et à l'activation de la transcription des gènes viraux tardifs ((267) ; (275)). La réplication virale n'aurait également pas de rôle dans la dissociation des protéines VII comme montré par des travaux utilisant des inhibiteurs de réplication ((351) ; (76)).

Des travaux récents ont montré par MNase-seq que jusqu'à 4 h après infection dans les cellules U2OS, les protéines VII forment de « petits nucléosomes like » puis sont remplacées par des histones cellulaires formant de plus « gros nucléosomes » (348). Le nom d'« adénosomes » a été proposé pour les « petits nucléosomes like ». Les travaux de (348) ont révélé que la chromatinisation du génome viral avec les histones cellulaires est effectuée rapidement après l'entrée du génome viral dans le noyau et elle permet une formation sélective de nucléosomes au niveau des gènes précoces. Ces travaux suggèrent de plus que cette étape serait nécessaire à l'initiation de la transcription des gènes précoces. Les histones cellulaires sont également incorporées plus tardivement au cours de l'infection à de nouveaux génomes viraux répliqués (76). Ces travaux proposent de plus que cette incorporation d'histones serait indépendante de la réplication virale et pourrait avoir un rôle dans l'activation des gènes viraux tardifs (353). Aucune étude à ce jour n'a en effet démontré ce dernier point.

Le génome viral est finalement encapsidé sous une forme compacte avec les protéines virales VII. La protéine VII n'est pas positionnée de manière aléatoire sur le génome viral mais elle dépend de la séquence d'ADN (348). L'existence du génome viral sous plusieurs formes de chromatines en fonction des protéines qui lui sont associées et de son degré de compaction suggère une régulation très fine dans le temps et un remodelage de ce dernier par le dépôt et par l'éviction des histones cellulaires et des protéines virales VII au cours de l'infection. Les acteurs moléculaires impliqués dans le remodelage de la chromatine cellulaire en incorporant et en retirant les histones et les protamines sont les chaperons d'histones.

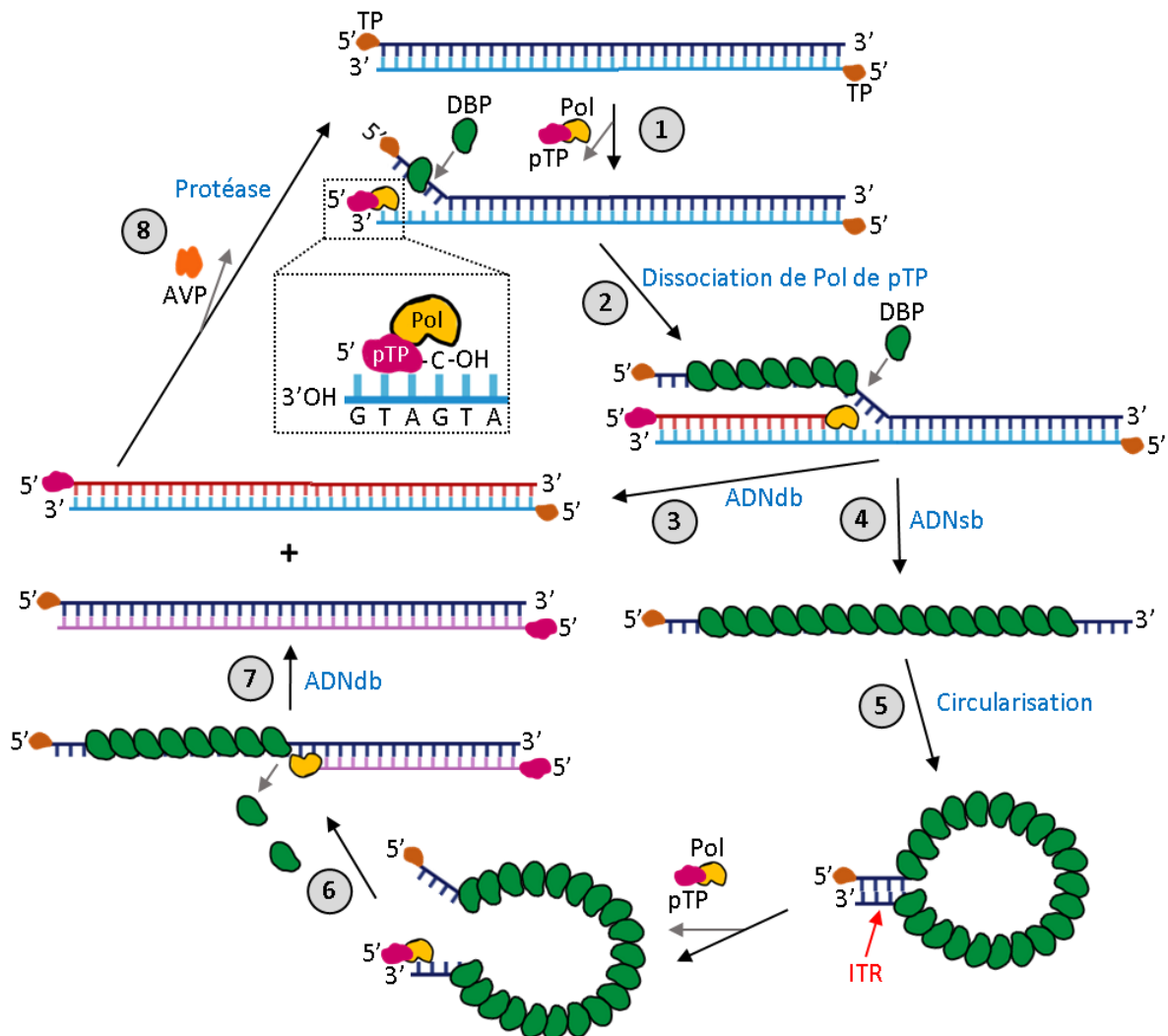
#### II.4.2 Régulation de la chromatine adénovirale par les chaperons d'histones.

Une fois libéré dans le noyau, le génome viral condensé par les protéines VII est remodelé par le recrutement du chaperon d'histone TAF-1 (Template activating factor 1). Ce facteur cellulaire est connu pour son rôle dans la décondensation de la chromatine des spermatozoïdes chez le Xénope (354) en interagissant avec les protéines protamines. Il est aussi impliqué dans la décompaction du génome adénoviral en interagissant avec la protéine VII et il favorise ainsi l'expression des gènes viraux précoces ((355) ; (356) ; (76) ; (352)). Bien que la chromatinisation du génome viral avec des histones cellulaires au cours de l'infection soit connue, les chaperons d'histones impliqués dans ce processus restent encore méconnus. Des travaux précédents pour l'Ad ont examiné l'implication des chaperons d'histones CAF1 (357), DAXX (358) et HIRA ((359) ; (353)). Aucune de ces études n'a cependant démontré un rôle clair de ces candidats dans le dépôt de dimères d'histones. En effet, malgré l'observation d'une relocalisation de CAF1 au niveau des CR, la déplétion de la sous-unité p150 par siRNA dans les cellules HeLa n'a aucun effet sur l'association de l'histone H3 avec les génomes viraux 6 h et 12 h après infection (357). Ces observations (357) sont en adéquation avec le constat que seul le variant d'histone H3.3 est incorporé à la chromatine virale et non H3.1 (353). Les 2 chaperons d'histones DAXX et le complexe HIRA sont connus pour la gestion du variant d'histone H3.3 mais leur rôle dans la chromatinisation du génome adénoviral est controversé. En effet, des études ont révélé pour certaines aucun rôle du complexe HIRA dans le dépôt de dimères d'H3.3-H4 au cours de l'infection par l'Ad5 (353) alors que d'autres ont montré une implication possible avec des vecteurs adénoviraux (359). En revanche, la déplétion d'HIRA par ARN interférence n'a pas d'impact sur l'association du variant H3.3 sur la région codante E1A et sur le génome viral. La déplétion d'HIRA n'affecte pas non plus la production de particules virales 48 h après infection, l'expression des gènes précoces E1A à 8 h ainsi que le gène tardif codant la fibre à 18 h (353).

La synthèse des nouveaux génomes viraux a lieu dans des compartiments de réplication viraux (CR) induits au cours de la réplication virale. Ces génomes viraux nouvellement répliqués et migrant en périphérie des CR sont transcriptionnellement actifs et nécessitent une chromatinisation préalable par les histones cellulaires. Un certain nombre d'études contradictoires sur les mécanismes de chromatinisation ont conduit à l'hypothèse d'un couplage possible du dépôt de dimères d'histones au cours de ces processus par des chaperons d'histones. Les facteurs moléculaires assurant cette régulation de la compaction du génome viral tout au long du cycle viral restent encore à être identifiés et caractérisés, notamment parmi les chaperons d'histones cellulaires. Des travaux sur le chaperon d'histone NPM1 (nucleophosmin 1 ou B23.1) décrivent son rôle potentiel qui favoriserait le dépôt de protéines VII par TAF-III ((355) ; (360) ; (361) ; (362)) et la compaction du génome viral pour son

encapsidation ((360) ; (363)). NPM1 interagit avec les nouvelles particules vides pour favoriser leur assemblage (364).

#### II.4.3 Formation et composition des compartiments de réplication adénoviraux (CR).



**Figure 12. Schéma de la réplication du génome de l'Ad5.** (1) Assemblage d'un complexe de pré-initiation entre la protéine pTP et la Pol (encadré en pointillés). La Pol lie de manière covalente un dCMP à la sérine 580 de la protéine pTP. L'amorce protéique s'associe à un résidu G en position 4 au niveau d'une origine de réplication du génome viral puis un trinuéclotide est formé. (2) Le 3'-OH du trinuéclotide nouvellement synthétisé sert d'amorce pour la réplication par la Pol du génome viral de manière continue et par déplacement de brin dans le sens 5' vers 3'. Les protéines DBP s'associent au brin d'ADN parental simple brin à mesure de la progression de la réplication. (3) Synthèse d'un nouveau génome viral double brin. (4) Formation d'un ADN simple brin parental linéaire associé à de multiples protéines DBP. (5) Le génome ADN simple brin parental se circularise par l'association de séquences ITR complémentaires. (6). Association d'une nouvelle amorce protéique et initiation d'un nouveau cycle de réplication. Les protéines DBP se dissocient du brin parental à mesure de la progression de la Pol. (7) Synthèse d'un nouveau génome viral double brin. (8) La pTP est clivée par la protéase virale (AVP) en protéine TP durant la maturation des particules virales. (Adaptation de (278), de (330) et de (280) *Principle of Virology*, 2015).



La machinerie de réplication de l'Ad est codée par les gènes précoces E2 et E3. Elle comporte au minimum les 3 protéines virales de réplication DBP, la Pol et pTP comme démontré *in vitro* ((365) ; (366)). Les 2 facteurs cellulaires OCT-1 (Octamer-binding transcription factor 1) et NFI (Nuclear factor I) participent également à la réplication de l'ADN viral ((367) ; (368) ; (369)).

La protéine DBP (70 kDa) se fixe sur l'ADN simple brin (370) tous les 10 à 15 nucléotides et indépendamment à la séquence nucléotidique (371). Elle peut également se fixer sur de l'ADN double brin (372) et des molécules d'ARN ((373) ; (374)). Des études par cristallographie ont démontré que la protéine DBP s'associe au génome viral ADN simple brin par oligomérisation ((375) ; (376)). En effet, le bras C-terminal de 17 acides aminés de DBP s'insère dans la partie hydrophobe d'une autre protéine DBP permettant de former une longue chaîne protéique (277). La protéine DBP facilite la réplication de l'ADN viral ((377) ; (378)) en augmentant la processivité de la Pol, en facilitant l'étape d'élongation (378) et en déstabilisant l'ADN double brin (379). Il semblerait que cette déstabilisation dépende de la multimérisation des protéines DBP sur l'ADN simple brin. En s'associant aux intermédiaires d'ADN viral simple brin, la protéine DBP prévient leur possible dégradation par les nucléases. DBP est une protéine multifonctionnelle qui joue aussi un rôle dans la transcription (380), la stabilité des ARN messagers (381) et dans l'assemblage des virions (382)).

La Pol virale (120 kDa) appartient à la famille B des polymérases, qui ont la particularité d'utiliser une protéine comme amorce pour initier la réplication de l'ADN ((383) ; (384)). La moitié C-terminale de la Pol contient les 3 sous-domaines analogues à la forme d'une main avec la paume, les doigts et le pouce, cette structure étant commune aux ADN polymérases dépendantes de l'ADN. La moitié N-terminale de la Pol contient un domaine 3'-5' exonucléase commun à de nombreuses autres ADN polymérases ADN dépendantes, ce qui lui confère une activité correctrice ((385) ; (330)).

La protéine pTP (76,5 kDa) forme un hétérodimère avec la Pol et le complexe de pré-initiation de la réplication de l'ADN viral avec DBP. Une fois le génome viral encapsidé, pTP est maturée en TP (37 kDa) par la protéase virale (AVP) et au niveau de 2 sites de clivage (386) sur les génomes viraux entrants. La réplication du génome viral nécessite la formation du complexe de pré-initiation comprenant Pol, pTP, l'ADN viral et les facteurs cellulaires Oct-1 et NFI ((387) ; (277) ; (387)) (Figure 12). Ce complexe est recruté au niveau d'une origine de réplication du génome viral et lie de manière covalente un nucléotide dCMP au groupe hydroxyle de la sérine 580 de la protéine pTP. Le groupe 3'-OH du dCMP lié à pTP sert à la synthèse du nouveau brin d'ADN par la Pol en s'associant avec le brin matrice sur le G en position 4. La Pol est dissociée de la protéine pTP à la suite de la synthèse des premiers nucléotides et assure l'élongation du brin d'ADN. Cette synthèse est réalisée par déplacement de brin et de manière conservative dans le sens 5' vers 3'. De multiples copies de protéines virales DBP s'associent

par oligomérisation et tout au long de cette synthèse sur le second brin génomique déplacé. Un génome viral ADN double brin et un génome simple brin associé à de multiples copies de DBP sont formés suite à cette première étape de réplication. Le génome viral simple brin peut être circularisé par complémentarité des 2 extrémités ITR. Ces 2 formes peuvent par ailleurs servir de matrice pour initier un nouveau cycle de réplication en raison de la présence d'une origine de réplication à chacune des extrémités du génome viral. La réplication du génome viral a lieu dans des compartiments spécialisés formés au cours de la réplication virale nommés compartiments de réplication viraux (CR).



**Figure 13. Schéma de l'organisation des compartiments de réplication (CR) de l'Ad5.** Schéma des CR précoce (gauche) et tardif (droite) montrant les sites d'accumulation de génome ADN simple brin (ssDAS, abréviation en anglais), l'accumulation de génome double brin (ADNdb) répliqués dans la zone de réplication périphérique (PRZ) et la localisation des ViPR (zones d'accumulation de génomes ADNdb) au centre des CR tardifs. (Adaptation de (388), (278), (389) et de (390)).

Les CR de l'Ad5 se présentent sous la forme d'organelles sans membranes (voir paragraphe II.5.4). Les CR sont des structures très dynamiques et leur morphologie varie au cours de l'infection. Ils adoptent premièrement une morphologie en gouttelettes sphériques et de petite taille (CR précoces) (Figure 13). Puis, ils évoluent sous la forme d'une structure plus irrégulière, semblable à un anneau aux contours très irréguliers (CR tardifs). Ce changement de morphologie coïncide avec la formation de zones d'accumulation importante de génomes viraux. Celles-ci correspondent aux corps de post-réplication induits par le virus (ViPR bodies, appelés ViPR dans la suite du manuscrit) (388). Les ViPR

sont spécifiquement localisés au centre des CR tardifs. Les ViPR sont observés dans différentes lignées cellulaires susceptibles à l'infection par l'Ad comme les cellules U2OS (388) et A549 (363).

Lors de la réplication de l'ADN viral, l'ADN simple brin intermédiaire s'accumule à l'intérieur de structures fibrillaires nommées sites d'accumulation d'ADN simple brin (ssDAS, pour single stranded DNA Accumulation Site). Ces structures peuvent être visualisées par le marquage de la protéine DBP. Le marquage des génomes viraux par des nucléotides modifiés (BrdU) a permis de montrer que la réplication du génome est limitée dans ces ssDAS mais est très active autour de ces structures, dans une zone nommée zone de réplication périphérique (PRZ, pour Peripheral Replicative Zone). Ces observations sont consistantes avec le fait que les protéines virales pTP et Pol sont localisées majoritairement dans cette PRZ (391). De nombreuses études ont permis de montrer que la réplication du génome viral est spatialement séparée de sa transcription (392). En adéquation avec ces observations, le suivi des génomes viraux nouvellement répliqués a montré que leur production au niveau des CR précoces est suivie par leur migration en périphérie où a probablement lieu la transcription des gènes viraux tardifs (388).

En plus des protéines pTP, Pol et DBP virales, au moins 67 protéines cellulaires différentes ont été retrouvées dans les CR (390) et certaines peuvent être utilisées comme marqueurs pour visualiser ces compartiments. C'est le cas par exemple de la protéine USP7 (Ubiquitin Specific peptidase 7) même si sa fonction au cours de l'infection n'est pas connue ((388) ; (326) ; (393)). De la même façon, les ViPR sont caractérisés par le recrutement spécifique de la protéine nucléaire Mybbp1a, son rôle étant là encore indéfini (387).

La compartimentation de la réplication du génome viral dans les CR constitue un moyen de produire de nouveaux génomes dans un environnement privilégié, concentrant les facteurs nécessaires à cette réplication, et, au contraire, excluant ceux qui pourraient inhiber la réplication du virus. Cette compartimentation pourrait jouer un rôle dans la chromatinisation ou la compaction sélective des génomes viraux en fonction de leur localisation et de l'avancée du cycle viral. Les travaux de (388) ont montré que la formation de nouveaux génomes adénoviraux dans les CR tardifs est suivie par leur migration et leur accumulation dans les ViPR, où ils sont dépourvus d'histones cellulaires mais spécifiquement associés à la protéine VII. Les mécanismes régulant la formation des CR viraux, leur évolution morphologique ainsi que ceux régulant à la fois, la réplication de l'ADN viral et sa transcription sont encore mal connus. De même, les mécanismes moléculaires qui assurent la régulation et de la structure du génome viral pour l'adapter à ses différentes fonctions restent largement méconnus. En effet, au cours du cycle viral, ce génome viral associé aux CR peut servir de matrice pour la Pol virale, mais aussi pour la transcription par l'ARN pol II et enfin, comme source de

génomomes compactés par la protéine VII qui seront encapsidés dans les nouvelles particules virales. Cette régulation de la structure du génome viral est aussi une question qui se pose pour d'autres virus à ADN.

#### II.4.4 Chromatinisation réversible connue pour d'autres virus.

Il existe plusieurs exemples de virus dont le génome ADN viral est compacté sous la forme d'une chromatine virale associée à des histones cellulaires dans les particules virales. Le SV40 ((394) ; (77) ; (395)) et les papillomavirus ((396) ; (397)) en sont des exemples. De nombreux virus géants dont le Marseillevirus codent pour des protéines proches des histones cellulaires qui sont associées au génome viral dans les particules ((398) ; (398) ; (399) ; (400)). En revanche, des études de protéomiques n'ont pas révélé la présence d'histones cellulaires dans les particules virales de plusieurs *Herpesviridae* dont le KSHV ((401) ; (402)), l'EBV ((403)), le HSV et le HCMV ((404) ; (405)). Une fois le génome viral libéré dans la cellule hôte, sa structure peut ensuite être modifiée, de façon transitoire ou plus durable selon les virus. Par exemple, la chromatinisation du génome viral par les histones cellulaires est connue pour certains *Herpesviridae* (406) mais aussi pour le virus de l'Hépatite B (407). Ce processus joue de multiples rôles dans la biologie de ces virus comme l'échappement à la réponse aux dommages de l'ADN, la reconnaissance des génomes viraux par les senseurs cellulaires, la régulation de l'expression des gènes viraux, la réplication du génome viral ou encore le maintien du génome viral sous forme épisomale latente.

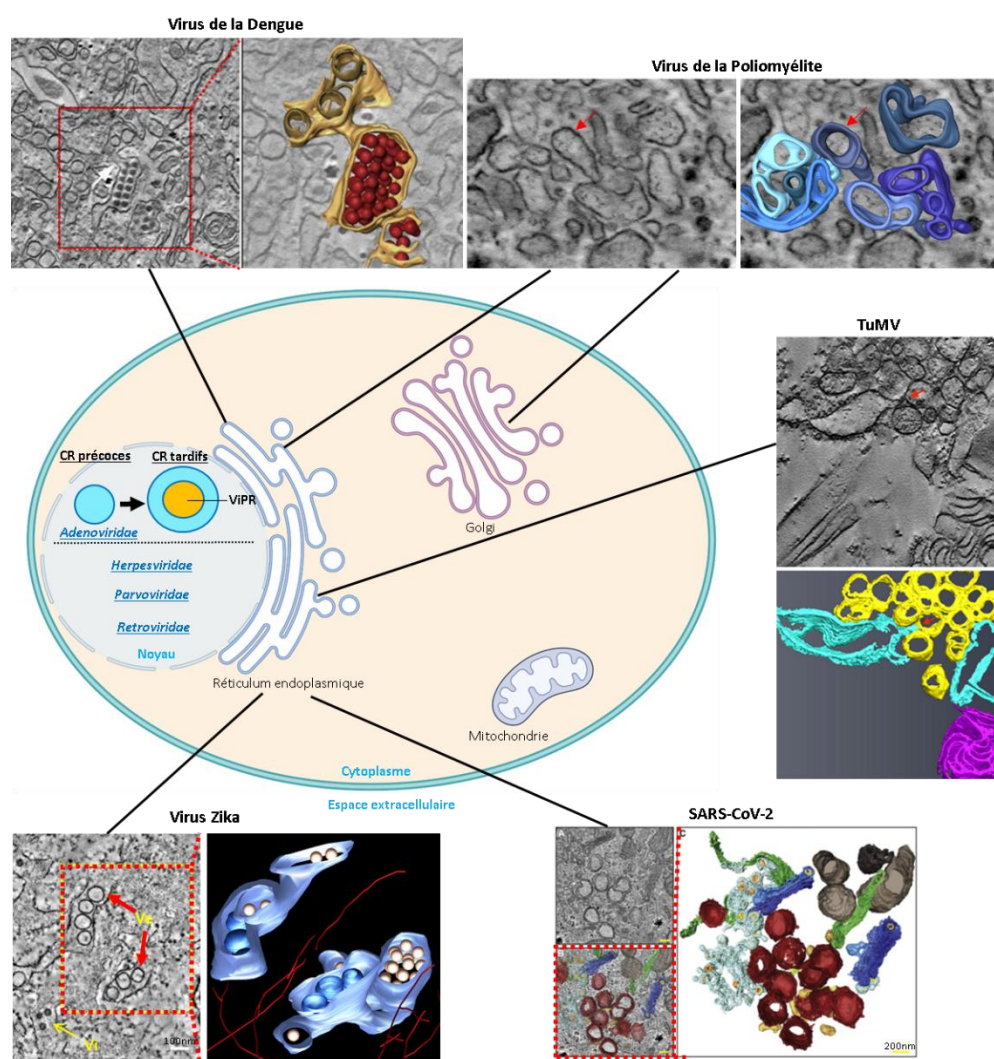
Une association entre le génome viral et des histones H3 a été décrite précocement pour le HSV-1 (406). La chromatinisation du génome du HCMV avec les histones H3.1, H3.2 et le variant d'histone H3.3 a également été rapportée durant les phases d'infections lytiques et latentes de manière indépendante de la réplication et de la transcription virale (408). Les génomes ADN non-intégrés des rétrovirus MLV et VIH-1 sont rapidement associés à des histones cellulaires (125). Pour tous ces exemples, cette chromatinisation du génome viral doit être réversible dans la mesure où ils ne sont plus associés aux histones cellulaires dans les particules virales. Et, en effet dans ce contexte, les principaux acteurs moléculaires capables de réguler la structure du génome viral sont les chaperons d'histones cellulaires.

L'implication des chaperons d'histones DAXX, du complexe HIRA et ASF1 a été documentée pour la chromatinisation du génome du HSV-1 après son entrée dans le noyau et par le dépôt exclusif du variant d'histone H3.3 ((409) ; (410)). Dans ce cas, le dépôt du variant H3.3 semble être impliqué dans la réponse cellulaire antivirale (411). Les travaux de (410) ont de plus montré que cette chromatinisation du génome viral facilite sa transcription et la réplication du virus.

Le dépôt d'histones H3.1 a également été observé plus tardivement durant l'infection par un mécanisme dépendant de la réplication virale. En ce qui concerne les rétrovirus, la déplétion des chaperons d'histones HIRA, NAP1 et CAF1 n'a au contraire pas révélé une diminution de l'association d'histones H3 sur la forme ADN non intégrée des génomes rétroviraux du MLV et du VIH-1 (125).

Notre connaissance des acteurs moléculaires cellulaires et des protéines virales impliqués dans la chromatinisation réversible des génomes viraux reste limitée. Plusieurs travaux ont toutefois identifié que la protéine virale ICPO du HSV-1 joue un rôle dans l'éviction des histones cellulaires présents sur le génome viral au cours du stade d'infection lytique (406). Le mécanisme employé pour cette éviction reste toutefois méconnu mais l'observation que la protéine ICPO facilite l'acétylation des histones H3 pourrait permettre d'aider cette éviction en diminuant l'interaction entre l'ADN viral et les histones (412) comme proposé par (406) et observé *in vitro* par ((413) ; (414)).

## II.4.5 L'infection par de nombreux virus induit la formation de compartiments de réplication viraux.



**Figure 14. Schéma des différents types de compartiments de réplication membranaires (cytoplasme) et sans membranes (noyau) induits au cours de l'infection par de nombreux virus.** Des complexes de réplication viraux (VRC) sont formés par de nombreux virus et sont issus de la membrane du réticulum endoplasmique et du Golgi. Images par microscopie électronique et reconstructions 3D prises de ((415) (virus de la Dengue) ; (416) (virus de la Poliomyélite) ; (417) (virus Zika) ; (418) (SARS-CoV-2) et (419) (TuMV)). Des complexes de réplication viraux (CR) sans membranes sont formés au cours de l'infection par d'autres virus dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 17). (Adaptation de (420) et de (421)). (Schéma généré avec Biorender.com).

L'infection par certains virus induit la formation d'organelles membranaires dans le cytoplasme. Plusieurs noms sont attribués à ces structures comme les « usines virales » (Viral factories) ou encore complexes de réplication viraux (VRC pour viral replication complexes). Les VRC permettent la formation d'un espace isolé du reste du cytoplasme et servent à enrichir ou exclure de nombreux facteurs cellulaires et viraux. De nombreuses fonctions leurs sont également associées comme la réplication, la transcription du génome viral et l'inhibition de la réponse antivirale par l'exclusion des

senseurs antiviraux. Les virus à ARN simple brin (+) comme le virus de la poliomyélite (*Picornaviridae*) (416), le virus de la Dengue ((415) ; (422)), le virus Zika (417), le virus du Nil occidental (*Flaviviridae*) (423), le SARS-CoV-2 (*Coronaviridae*) ((424) ; (418)) et de nombreux virus de plantes comme le TuMV (*Potyviridae*) (419) effectuent leur réplication dans des invaginations membranaires. Elles sont issues et formées à partir du réticulum endoplasmique et d'autres organites cellulaires comme les mitochondries, l'appareil de Golgi ou les lysosomes. Leurs structures présentent des morphologies qui varient selon les virus. Elles peuvent prendre notamment la forme de membranes courbées et ouvertes, de vésicules à simple membrane ou des vésicules à double membrane comme pour le SARS-CoV-2. De manière similaire aux VRC, des organelles sans membranes (MLO pour membrane-less organelles) sont induites par l'infection de nombreux virus dans le cytoplasme ou le noyau. Ces structures sont nommées corps d'inclusion (IB pour inclusion bodies) lorsqu'elles se forment dans le cytoplasme et généralement compartiments de réplication viraux lorsqu'elles se forment dans le noyau (CR pour compartiments de réplication viraux). Le virus respiratoire syncytial (*Pneumoviridae*) ((425) ; (426)), le virus de la rage (*Rhabdoviridae*) (427), le virus de la rougeole (*Paramyxoviridae*) ((428) ; (429)), le virus Ebola (*Filoviridae*) (430) ou encore le virus Nipah (*Paramyxoviridae*) (431) sont connus pour induire la formation de corps d'inclusion intracytoplasmiques.

De nombreux virus à ADN comme le HSV-1 et l'EBV (*Herpesviridae*) ((432) ; (433) ; (434) ; (435) ; (436) ; (437)), les parvovirus (*Parvoviridae*) ((438) ; (439) ; (440) ; (441)), le VIH (*Retroviridae*) ((442) ; (443)) ou les Ad dont l'Ad5 ((389) ; (388) ; (326)) induisent la formation de CR dans le noyau. Malgré une meilleure connaissance des mécanismes de formation réversible des VRC cytoplasmiques, ceux assurant la formation des IB et des CR restent mal connus. L'émergence depuis quelques années de la séparation de phase liquide-liquide (LLPS pour Liquide-liquide phase separation) comme principe physique en biologie cellulaire a permis toutefois de mieux comprendre le mode de formation de nombreux MLO cellulaires ainsi que de certains CR viraux.

## **II.5 Les organelles sans membranes et la séparation de phase liquide-liquide (LLPS).**

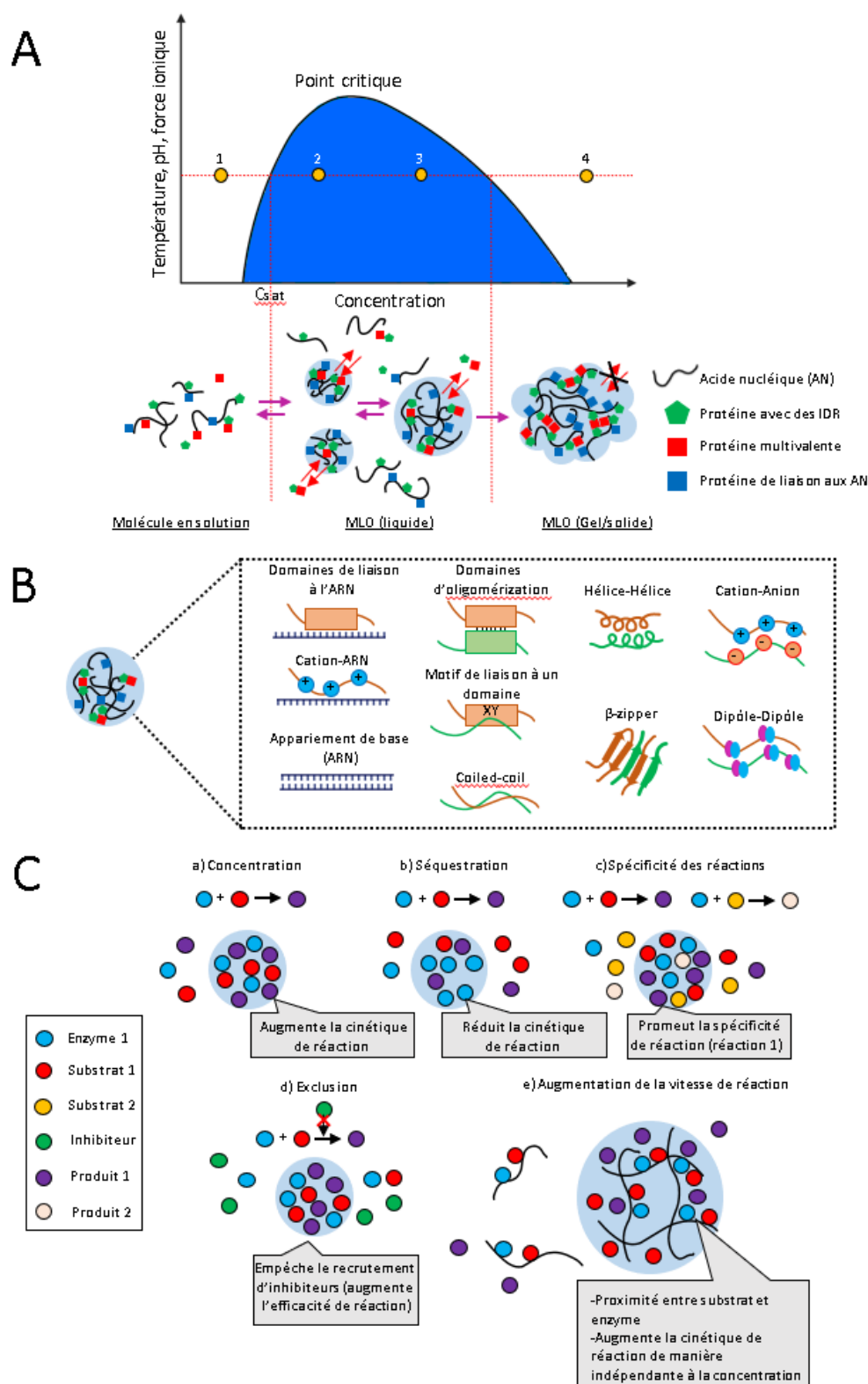
Nous détaillerons dans les prochains paragraphes la notion de LLPS ainsi que les méthodes utilisées pour son étude et son implication dans la formation et la dynamique des organelles cellulaires. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur les CR intranucléaires de virus ADN dont l'Ad.

### **II.5.1 Introduction générale.**

#### **II.5.1.1 Définition, principes physiques généraux et fonctions cellulaires associées aux organelles sans membranes.**

La LLPS est un processus physique réversible consistant en la formation de phases liquides distinctes basée sur l'interaction entre des molécules de soluté et des molécules de solvant ((444) ; (445)). Comme un mélange entre l'huile et l'eau, la formations de plusieurs phases dépend de différents paramètres dont la concentration, la température, la pression ou encore le pH. Dans des systèmes biologiques, des MLO possédant des propriétés liquides peuvent être formées par LLPS avec des macromolécules comme les protéines et les acides nucléiques (ARN et ADN). Les MLO sont des structures dynamiques et réversibles car elles sont formées par un réseau d'interactions multiples et faibles entre les différentes macromolécules (Figure 15B). Très souvent, les protéines impliquées dans la formation des MLO possèdent des domaines intrinsèquement désordonnés (IDR pour intrinsically disordered regions) qui favorisent les interactions multiples (Figure 15A). Ces molécules peuvent être diffuses en solution et former des MLO en s'accumulant quand elles atteignent une concentration de saturation suffisamment élevée (Figure 15A). Les MLO peuvent également former des gouttelettes plus denses sous la forme d'un gel et d'un solide lorsque la concentration en molécules augmente continuellement ((446) ; (447) ; (448)). Des travaux récents ont révélé que de nombreux processus cellulaires ont lieu dans des MLO formés par séparation de phase. Certains sont localisés dans le cytoplasme comme les granules de stress impliqués dans la régulation et la gestion des ARN (voir paragraphe II.5.2). D'autres, comme les nucléoles sont formés dans le noyau et permettent la régulation des processus de réplication, de transcription et de réparation de l'ADN (449) (voir paragraphe II.5.3). Les MLO peuvent favoriser des réactions enzymatiques en concentrant enzymes et substrats au même endroit mais aussi par l'exclusion d'inhibiteurs (Figure 15C) ou au contraire inhiber des réactions en séquestrant des enzymes. De nombreuses autres fonctions leurs sont associées dont notamment la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN ((450); (451)).





**Figure 15. Principe physique de la séparation de phase liquide-liquide (LLPS) et fonctions associées.** (A) Schéma d'un diagramme de phase montrant la formation de MLO en fonction de la concentration moléculaire et de manière dépendante de la température, du pH et de la force ionique. Lorsque la concentration en macromolécules (protéines et acides nucléiques) est inférieure à la concentration de saturation ( $C_{sat}$ ), les molécules restent dispersées dans une seule phase. Lorsque la concentration est supérieure à la  $C_{sat}$ , les macromolécules s'associent par des interactions faibles et multiples et forment des gouttelettes (MLO). Ceci permet la création de 2 phases distinctes. Lorsque la concentration

augmente, les MLO peuvent adopter une structure sous la forme d'un gel ou d'un solide. **(B)** Liste des différentes interactions possibles et qui ont été observées entre les protéines et les acides nucléiques dans les MLO. **(C)** Liste des fonctions associées aux MLO dont la concentration de molécules (a), la séquestration de molécules (b), la spécificité des réactions (c), l'exclusion de molécules (d) et l'augmentation de la vitesse des réactions par le rapprochement de molécules (e). (Adaptation de (452), (453), (454) et (455)). (Schéma généré avec Biorender.com).

Les interactions moléculaires peuvent être facilement modulées et rompues en réponse à divers changements physiologiques comme des changements de concentration en molécules dans la cellule ou l'accumulation d'un nouveau partenaire moléculaire. Ce phénomène peut être mis en évidence par la dissolution d'une des phases du nucléole (voir paragraphe II.5.3) par l'introduction *in vitro* et *in cellulo* de polypeptides (proline-arginine) (456). L'apport d'adénosine triphosphate connue pour être une molécule hydrotrope permet aussi d'inhiber la formation des MLO ou encore les dissoudre (457). Des traitements avec de l'1,6-Hexanediol sont également utilisés pour dissoudre une variété de MLO en déstabilisant les interactions protéine-protéine et protéine-ARN (458).

### II.5.1.2 Méthodes d'étude de la séparation de phase liquide-liquide.

La formation réversible des MLO par LLPS peut être reconstituée *in vitro* en utilisant par exemple des protéines purifiées en solution (459). Ces études permettent de définir la concentration de saturation  $C_{sat}$  à laquelle les MLO commencent à être observées. Pour une concentration en protéines inférieure à la  $C_{sat}$ , les protéines sont diffuses dans la solution. Pour une concentration supérieure à la  $C_{sat}$ , les MLO se forment (Figure 15A). Une autre caractéristique des MLO formées par LLPS est leur turbidité élevée (460), qui peut être déterminée par mesure de densité optique à 340 nm, 400 nm ou 600 nm. Des études par microscopie permettent ensuite de discriminer les MLO formées par LLPS des agrégats en raison de leurs formes sphériques, de leurs mouvements aléatoires et de leurs tailles micrométriques caractéristiques. Dans les cellules, les MLO peuvent être marquées avec des anticorps et observées par immunofluorescence après fixation des cellules. Cependant, les MLO peuvent présenter des différences d'accessibilité aux anticorps dans ces conditions et par conséquent modifier l'apparence des MLO étudiées. En revanche, l'expression de protéines couplées à des protéines fluorescentes et capables de former des MLO permet d'observer leur formation et leur dynamique dans les cellules vivantes, ce qui permet également d'observer leur capacité à fusionner entre elles. Une autre caractéristique des MLO formées par LLPS est les échanges rapides avec l'extérieur et une mobilité moléculaire élevée des éléments les constituant. La technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) est employée à la fois *in vitro* et *in vivo* pour quantifier cette mobilité moléculaire (461). Des techniques de microscopie à super résolution peuvent également être utilisées

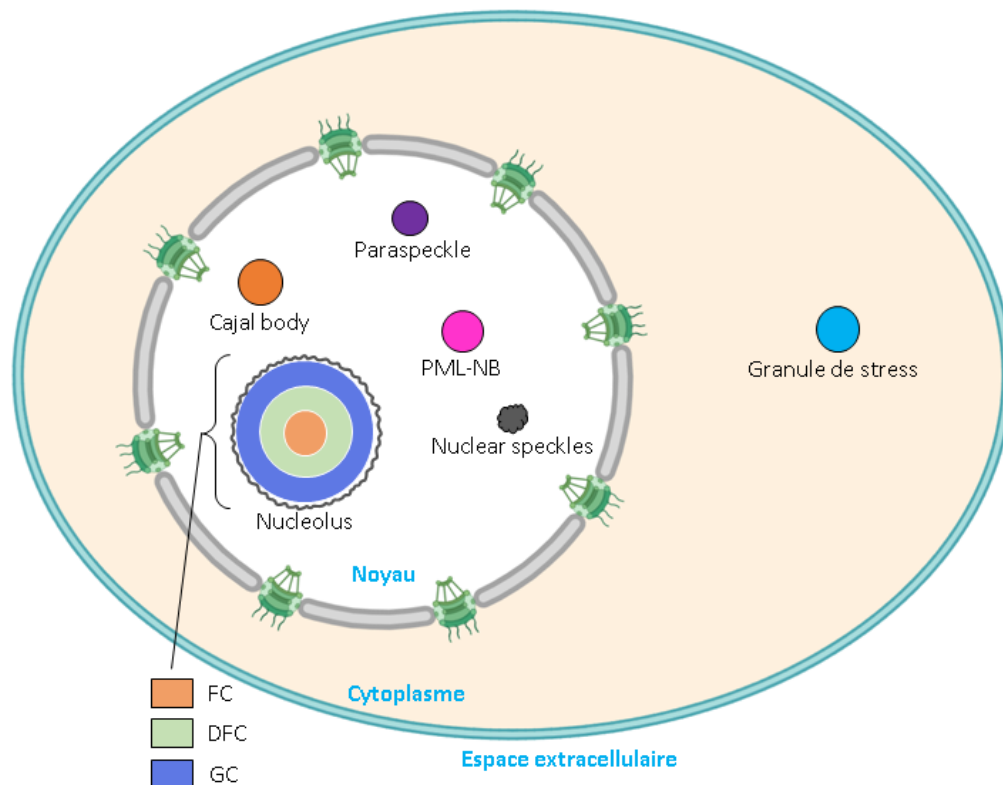
pour étudier la formation, la structure et l'organisation des constituants des MLO. Parmi ces techniques, on peut citer le SIM (Structures Illumination Microscopy), le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) et le LLSM (Lattice Light Sheet Microscopy). Des études corrélatives par microscopie optique et électroniques ou CLEM (Correlated Light and Electron Microscopy) peuvent être aussi utilisées (462). Ces techniques possèdent les avantages de permettre l'étude de MLO plus petits ainsi que leur dynamique quand des cellules vivantes sont notamment utilisées. La structure des granules de stress (200 nm de diamètre) a par exemple été résolue par microscopie STORM en étudiant des cellules U2OS vivantes (463).

### **II.5.2 Des compartiments cytoplasmiques sans membranes se forment par LLPS.**

Les granules de stress (GS) constituent un exemple de MLO se formant dans le cytoplasme des cellules eucaryotes en réponse à de multiples stress cellulaires comme un stress oxydatif ou l'infection par des virus ((464) ; (465) ; (466) ; (467)). Les GS ont notamment pour fonction de réguler le métabolisme des ARN. En réponse à un stress, l'arrêt de l'initiation de la traduction peut induire une augmentation de la concentration cytoplasmique des ARN messagers et entraîner la formation des GS (468). Ces MLO sont formées par des interactions multiples entre ARN et protéines. Ces GS contiennent plusieurs milliers d'ARN (469) et plusieurs centaines de protéines ((463) ; (470) ; (471)). Malgré la capacité d'autoassemblage des ARN (472), des études récentes ont montré le rôle clé de la protéine G3BP1 (GTPase-activating protein-(SH3 domain)-binding protein 1) dans la formation des GS par LLPS (473). La présence de 3 domaines désordonnés IDR dans cette protéine facilite les interactions protéine-protéine et protéine-acide nucléique. Cela favorise la condensation des GS par LLPS en réponse à une augmentation de la concentration en ARN, soit dans les cellules, soit *in vitro* (474). Des travaux récents ont aussi montré un rôle majeur de G3BP1 dans l'activation du senseur cGAS (cyclic GMP-AMP synthase). Ce senseur est impliqué dans la réponse aux dommages cellulaires et dans la réponse antivirale induite par la présence d'ADN cytosolique. Lorsque l'enzyme cGAS est activée en liant de l'ADN, elle catalyse la synthèse de GMP-AMP (cGAMP) (475). Les molécules de cGAMP servent ensuite de second messenger en activant la protéine STING (Stimulator of Interferon Genes). Cette activation de la voie STING induit la production d'interféron de type I (IFN-1) et d'autres cytokines (476). La protéine G3BP1 des GS participe à la précondensation de cGAS et à la formation de MLO temporaires constitués de cGAS et de l'ADN (473). Ces MLO constituent un environnement riche en ADN, en ATP et en GTP favorisant l'activation de cGAS et la synthèse de cGAMP (477). Pour de nombreux virus à ADN comme l'Ad et les virus Herpès, le génome viral doit être acheminé jusqu'au noyau afin que le génome viral soit répliqué et exprimé. Une exposition des génomes viraux dans le cytoplasme peut induire leur détection par le senseur cGAS et ainsi activer la réponse antivirale. Les virus ont cependant

développé des stratégies pour contrecarrer cette détection. La protéine de tégument ORF52 du KSHV peut par exemple former *in vitro* et *in vivo* des MLO par LLPS avec de l'ADN (478). Cette protéine ORF52 inhibe cGAS (479) en s'accumulant et en excluant cGAS des MLO (478). Le mécanisme d'exclusion de cGAS par la protéine ORF52 reste cependant encore inconnu.

### II.5.3 De nombreux organites sans membranes se forment par LLPS dans le noyau.



**Figure 16. MLO intranucléaires et cytoplasmiques se formant par LLPS.** De nombreux MLO se forment par LLPS dans le cytoplasme (granules de stress) et dans le noyau (nucléoles, PML-NB, Cajal bodies, Nuclear speckles et les Paraspeckles). (Adaptation de (480)). (Schéma généré avec Biorender.com).

De nombreux MLO se formant par LLPS sont trouvés dans le noyau dont les nucléoles, les cajal bodies, les nuclear speckles, les paraspeckles ou encore les PML-NB. Les nucléoles constituent les MLO intranucléaires des cellules eucaryotes les mieux caractérisés et identifiés comme usines de production de ribosomes dans les années 1960. Ces MLO sont sous-compartmentés en 3 zones formées par LLPS. La plus au centre se nomme centre fibrillaire (FC pour fibrillar center). La plus en périphérie se trouve le composant granulaire (GC pour granular component) et entre la phase FC et GC se situe le centre fibrillaire dense (DFC pour dense fibrillar center). Il est possible de trouver de multiples phases DFC et FC dans la phase GC. Les phases FC et DFC servent de sites de synthèse des ARN ribosomiques et la

phase GC est le premier site d'assemblage et de maturation des sous-unités ribosomiques. Le nucléole est constitué de plus de 1300 protéines identifiées pour être plus ou moins abondantes dans ces 3 phases. La nucléoline est la protéine la plus abondante du nucléole pouvant être trouvée dans ses 3 phases (480).

Les corps de cajal (cajal bodies) ou corps enroulés (coiled bodies) ont été identifiés en 1903 et sont des MLO se formant au niveau de sites actifs de la transcription des gènes codant de petits ARN nucléaires (481). Ils sont en effet composés d'ARN et de protéines impliquées dans la modification post-transcriptionnelle de petits ARN nucléaires et de petits ARN nucléolaires. Les deux protéines les plus étudiées des cajal bodies sont la coilin et la protéine SMN (Survival of Motor Neurons) impliquées toutes les deux dans le maintien de l'intégrité de ces MLO (482).

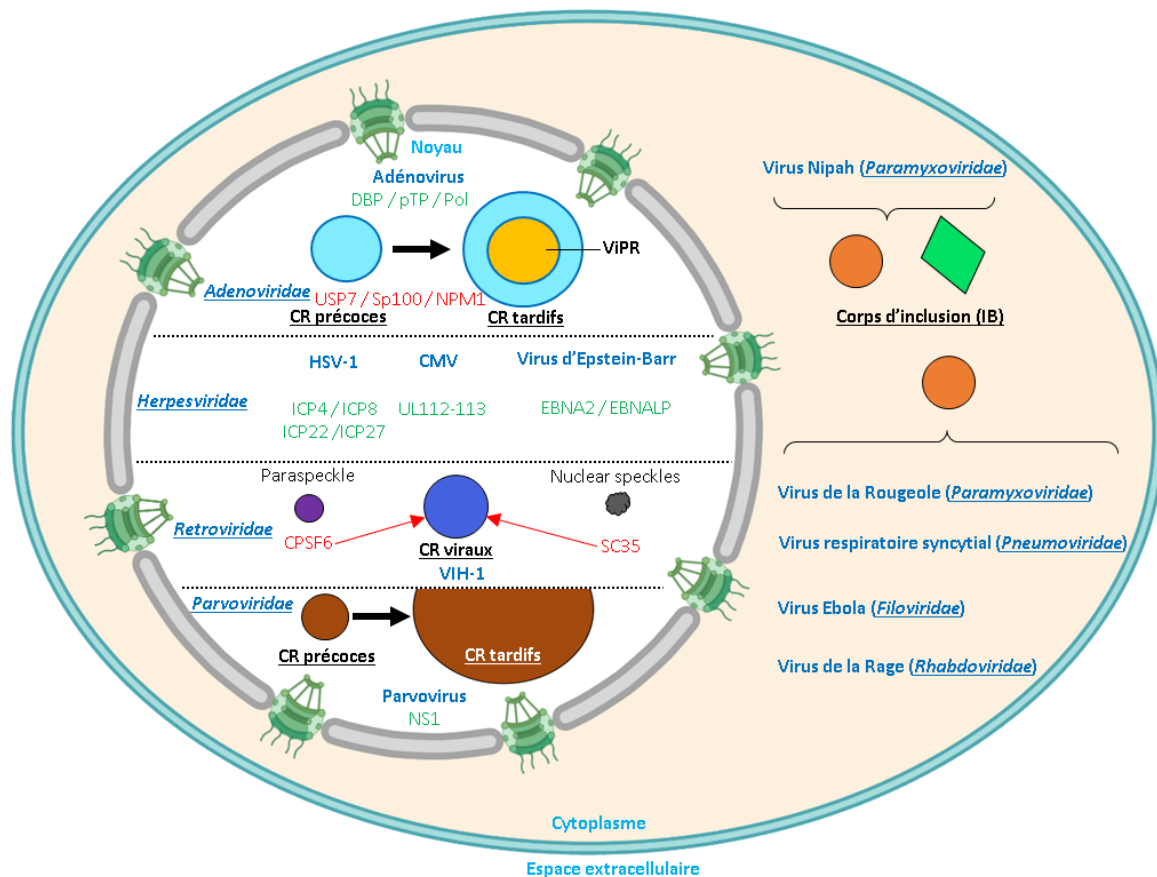
Les PML-NB (Promyelocytic leukemia nuclear bodies) sont un autre exemple de MLO intranucléaires (483). La protéine TRIM19 est celle la plus étudiée pour ces MLO et elle peut être utilisée comme protéine marqueur (484). Les PML-NB sont formés par l'oligomérisation de protéines TRIM19 et de nombreuses protéines SUMOylées permettant une stabilisation de leur structure. La protéine TRIM19 peut en effet subir un grand nombre de modifications post-traductionnelles comme la SUMOylation et contient également un motif d'interaction avec la protéine SUMO (485).

Les nuclear speckles (NS) ont été pour la première fois observés par Santiago Ramon et Cajal en 1910. Ces MLO intranucléaires dépourvus d'ADN sont composées par un grand nombre de protéines comme des facteurs de transcription et des facteurs de traitement des ARN. Les ARN sont en effet rapidement échangés entre les NS et l'environnement extérieur. Ces structures dynamiques peuvent être par exemple dissoutes durant la mitose et se reformer durant la phase tardive de la télophase ((486) ; (487)). Les NS se forment à proximité des sites de transcription de l'ARN polymérase II et ils sont connus pour intervenir dans l'épissage alternatif des gènes. Des composants des NS sont également impliqués dans la localisation des chromosomes (488), la modification de la chromatine, la transcription ((489) ; (490)), la modification des ARN messagers (ARNm), l'export des ARNm ou encore l'assemblage de complexes ribonucléoprotéiques messagers (487). Parmi plus de 360 protéines qui composent ces MLO, les protéines SON et SRRM2 sont les plus enrichies et essentielles à leur formation (491).

Les paraspeckles sont un dernier exemple de MLO intranucléaires spécifiques des cellules de mammifères découverts en 2002. Ils sont composés d'ARN et de plus de 40 protéines. Ces MLO partagent plusieurs constituants avec le nucléole et sont des sites de séquestration de protéines et d'ARN impliqués dans la régulation de l'expression de gènes ainsi que la régulation de l'apoptose (492). Les paraspeckles ont de multiples fonctions dont la régulation de l'expression de gènes en séquestrant par exemple leur ARNm (493), la différenciation cellulaire et la biogenèse des micro-ARN (492).

De manière similaire aux MLO cellulaires, de nombreux MLO sont induites par l'infection d'un grand nombre de virus.

#### II.5.4 Les CR de nombreux virus dont ceux des Ad sont des MLO qui se forment par LLPS.



**Figure 17. Des MLO intranucléaires et cytoplasmiques se forment par LLPS au cours de l'infection par de nombreux virus et servent de sites de réplication.** Des corps d'inclusion (IB) se forment par LLPS dans le cytoplasme au cours de l'infection par le virus de la rougeole, le virus respiratoire syncytial, le virus Ebola, le virus de la rage et le virus Nipah. Des IB périnucléaires avec une structure sphérique (accumulation de protéines N, L et P) et des IB associés à la membrane plasmique avec une structure cristalline (accumulation de protéines M et de nucléocapsides) se forment au cours de l'infection par le virus Nipah. Des MLO se forment par LLPS dans le noyau au cours de l'infection par l'Ad5, le HSV-1, le CMV, le virus d'Epstein-Barr, le VIH-1 et les parvovirus. Les protéines virales constituant ces MLO sont indiquées en vert et celles de l'hôte sont indiquées en rouge (Adaptation de (494)). (Schéma généré avec Biorender.com).

Malgré de nombreuses études sur les composants viraux et cellulaires des MLO virales, peu d'informations existent sur les mécanismes impliqués dans leur formation et leur changement de morphologie au cours de l'infection. Des travaux récents commencent à mettre en évidence le rôle clé

de la LLPS (494). Dans le cas de l'Ad, ces MLO sont les CR qui apparaissent sous la forme de punctuations sphériques (CR précoces) et cette morphologie évolue ensuite vers une forme en anneau (CR tardifs) au centre desquels on retrouve les VIPR qui serviraient de centre de stockage des génomes viraux avant leur encapsidation (388). Plusieurs arguments sont en faveur d'une formation des CR adénoviraux par LLPS dont la propriété des CR précoces à fusionner entre eux (326) et la capacité de la DBP (impliquée dans la réplication du génome viral) à former à elle seule des MLO quand elle est surexprimée (357). Une étude plus récente suggère également que la protéine DBP pourrait promouvoir la formation des CR viraux par LLPS (495). En effet, ces travaux ont montré la capacité de fusion des structures formées par la protéine DBP par imagerie de cellules HFF infectées et vivantes. Des analyses par FRAP de cellules HFF infectées (16 h pi) ont en effet montré un coefficient de diffusion similaire entre la protéine DBP dans les CR et d'autres MLO cellulaires. Ce coefficient varie au cours de l'infection : il est plus élevé 16 h après l'infection et il décroît ensuite à 24 h et à 36 h d'infection. Une augmentation de la concentration en ARN et ADN viraux dans les CR pourrait expliquer ces observations.

De manière similaire à l'Ad, des compartiments de réplication intranucléaires marqués se forment au cours de l'infection par le HSV-1. La surexpression dans des cellules non infectées du facteur de transcription viral ICP4 est suffisante pour induire la formation de MLO par LLPS (496). Ces MLO comportent de nombreuses caractéristiques communes aux MLO comme une morphologie sphérique, une mobilité moléculaire interne élevée, une capacité à fusionner entre elles et d'être rapidement désagrégées par le 1,6-Hexanediol. La protéine UL112-113 du CMV a été aussi récemment rapportée pour former des CR viraux intranucléaires par LLPS (497). Les auteurs ont mis en évidence le rôle de cette protéine virale dans la nucléation des MLO viraux en montrant que les génomes viraux favorisent leur formation en diminuant la concentration en protéines virales dans ces structures. Ils ont également montré la nécessité de son association autour des génomes viraux pour recruter la polymérase virale et par conséquent favoriser la réplication du génome viral.

L'infection par le parvovirus canin (CPV) se caractérise par la formation de CR viraux intranucléaires. Malgré un certain nombre d'arguments en sa faveur, à ce jour, aucune étude utilise le terme LLPS pour qualifier la formation de ces MLO viraux. Ces MLO sont marquées par la protéine virale NS1 (440) et sont produites d'abord sous la forme de petites structures ponctiformes sphériques évoluant par la suite sous la forme de structures pouvant occuper presque l'intégralité du noyau (441). Il s'agit de sites de synthèse et d'accumulation des nouveaux génomes viraux comme démontré par l'incorporation de nucléotides modifiés BrdU (441). Les MLO du CPV possèdent des caractéristiques communes aux autres MLO viraux comme la propriété d'exclure la chromatine cellulaire en périphérie du noyau ainsi qu'une mobilité moléculaire élevée qui diminue fortement au cours de l'infection pour atteindre un

état similaire à un gel. L'observation d'une dissolution de ces MLO par un traitement avec de la DNase-1 suggère la nécessité des génomes viraux dans le maintien de leur intégrité.

Un dernier exemple pouvant être cité est celui des MLO intranucléaires servant de site de réplication viraux et se formant dans le noyau de cellules infectées par le VIH-1 ((443) ; (498) ; (499) ; (442)). Ces MLO contiennent le génome viral sous la forme ADN et ARN ainsi que le facteur SC35 des nuclear speckles et le facteur CPSF6 des paraspeckles.

Un vaste champ d'investigation est en train d'émerger dans la compréhension des MLO induits par les virus et permettra de mieux comprendre les mécanismes et le rôle de la séparation de phase liquide-liquide dans la formation et les changements de la morphologie des CR viraux. Une partie de ce projet de thèse s'inscrit dans ce domaine d'investigation afin d'étudier le rôle de la séparation de phase liquide-liquide dans la formation des CR de l'Ad5.



## Objectifs de la thèse

Dans la particule virale, le génome ADN de l'Ad5 est compacté par les protéines VII et dans la cellule infectée, il doit d'abord être importé dans le noyau puis décompacté et chromatinisé avec des histones cellulaires afin de mimer la chromatine de l'hôte et permettre l'expression des gènes précoces puis tardifs après l'initiation de la réplication du génome viral. Cette dernière s'effectue dans les CR viraux. Les CR précoces servent à la production de génomes viraux transcriptionnellement actifs pour l'expression des gènes viraux tardifs. Les CR tardifs entourent les ViPR qui concentreraient les nouveaux génomes qui seront encapsidés dans les nouvelles particules virales. Ces génomes sont transcriptionnellement inactifs. Ces CR sont des MLO viraux et sont des structures dynamiques dédiées non seulement à la réplication du génome viral mais aussi à la régulation de l'expression des gènes viraux. De ce fait, on peut supposer que leur formation et leur composition au cours du temps permette d'adapter la structure du génome adénoviral à chacune de ces fonctions. Les mécanismes déterminant la formation et les changements de morphologie des MLO adénoviraux ainsi que les acteurs moléculaires impliqués dans la chromatinisation réversible du génome viral sont à ce jour très mal connus. Les objectifs du projet de thèse visent à mieux caractériser le rôle des chaperons d'histones dans le remodelage de la chromatine virale mais également d'étudier l'implication de la séparation de phase liquide-liquide dans la biogénèse des CR adénoviraux et la composition sélective de macromolécules dont les chaperons d'histones.

En raison de l'émergence rapide et brutale du SARS-CoV-2 et d'un contexte épidémique mondial très particulier dans lequel cette thèse a été menée, ces travaux de recherches ont également porté sur l'étude de ce nouveau coronavirus au moyen d'épithéliums bronchiques reconstitués de patients. Ces recherches avaient pour objectifs de caractériser avec ce modèle les différences de susceptibilités observées dans la littérature entre les adultes et les enfants (500). Ce modèle a aussi été utilisé pour étudier l'Ad dans un contexte plus proche de la réalité physiologique.



## MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel.

### I.1 Equipements techniques.

Nom	Compagnie
Hôte de culture cellulaire™ Herasafe KS	ThermoScientific
Incubateur de culture cellulaire™ 150i	ThermoScientific
Centrifugeuse 5417R	Eppendorf
Centrifugeuse 5424	Eppendorf
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
Leica DM6 CFC TCS SP8	Leica
Leica DMI 6000 AFC	Leica
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Microscope de culture Olympus CK40	Olympus
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Boite d'incubation western blot	LI-COR

**Tableau 3 : Equipements et techniques.**

### I.2 Consommables.

Nom	Compagnie
Chambres et lames ibidi	Ibidi
Coverslips (12 ou 15 mm Ø)	Marienfeld
Lamelles de microscopie (76 x 26 mm)	Thermo Scientific
Gel Mini-PROTEAN TGX Stain-Free	Bio-Rad
Parafilm M	Bemis Company, Inc.
Consommables plastiques	Sarstedt, Nalge Nunc International, greiner bio-one
Tubes en polypropylènes	Beckman
Tubes de réactions	Sarstedt, Greiner bio-one, Eppendorf
Slide-a-Lyser™ Dialys Cassettes	Thermo Fisher Scientific
Aiguilles et seringues	Braun, Servoprax
Papier Whatman pour blot	GE Healthcare

**Tableau 4 : Consommables.**

### I.3 Kits.

Nom	Compagnie
Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,2 µm Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad

**Tableau 5 : Kits.**

#### I.4 Logiciels.

Logiciel	Compagnie
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc.
Image J	NIH
Leica LAS-X	Leica
MetaMorph	Molecular Devices LLC
Imaris 9.9	OXFORD Instruments

Tableau 6 : Logiciels.

#### I.5 Produits chimiques et réactifs.

Nom	Compagnie
Agarose (4%)	Thermo Fisher Scientific
DAKO Fluorescent Mounting Medium	AGILENT
Ethanol absolu	VWR Chemicals
Gibco DMEM (X1)	Life Technologies
Gibco opti-meM (X1)	Life Technologies
Gibco Trypsin/ EDTA 0,25 % (X1)	Sigma
Lipofectamine 2000	Life Technologies
Poudre de lait	Régilait
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldéhyde 16 % EM grade	Delta microscopie
PBS 10X	Life technologies
Poly-L-lysine solution 0,1 % (w/ v)	Sigma
Saponine	Sigma
B-Mercaptoéthanol	Roth

Tableau 7 : Produits chimiques et réactifs.

#### I.6 Solutions stocks.

Solutions stocks	Composition
Saponine	10 %, H <sub>2</sub> O
Fluorure de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF)	100 mM

Tableau 8 : Solutions stocks utilisées pour ces travaux.

#### I.7 Tampons et médiums.

Solution	Composition
Tampon de lyse virale	10 mM Tris pH 7,4 ; 0,1 % SDS ; 1 mM EDTA
Tampon de lyse cellulaire (Pierce™ IP Lysis Buffer) Thermo Fisher Scientific	25 mM Tris HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1 % NP-40 ; 1 mM EDTA ; 5 % glycerol
Tampon IF	10 % SVF ; 0,05 % Saponine diluée dans du PBS 1X
PBS 10X	1,37 M NaCl ; 27 mM KCl ; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,5
Tampon réducteur SDS (X4)	125 mM tris pH 6,8 ; 4 % SDS ; 0,02 % bleu de Bromophénol ; 10 % glycérol
TAE (50X)	2 M Tris ; 0,05 M EDTA ; 5,71 % acide acétique
TBS (10X)	1,37 M NaCl ; 27 mM KCl ; 250 mM Tris pH 7,4
Tampon de transport (X10)	200 mM HEPES ; 1,1 M KOAc ; 20 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> ; 10 mM EGTA ; pH 7,3
Tris-Glycine-SDS buffer (10X)	25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 1 % SDS ; pH 8,3
Solution de saturation pour WB	TBS 1X-Tween 0,05 % ; 10 % lait en poudre
Tampon de transfert pour WB (10X)	250 mM Tris, 1,93 M glycine, 0,2 % SDS

Tableau 9 : Tampons et médiums.

## I.8 Lignées cellulaires.

Lignée cellulaire	Origine	Caractéristiques/ Objectifs biologiques
U2OS	ATCC HTB-96 Donnée par M.Piechaczyk, IGMM, Montpellier, France	-Cellules épithéliales osseuses d'ostéosarcomes -possèdent de gros noyaux facilitant nos études microscopiques des cellules infectées)
HEK293 $\alpha\text{V}\beta\text{5}$	ATCC CRL-1573 Donnée par G. Nemerow, Scripps Research Institute La Jolla, USA	-Cellules embryonnaires rénales humaines -Exprime de manière stable les intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ -Exprime de manière stable les protéines virales des régions génomiques E1A et E1B -maintien en culture par ajout de 0,5mg/ mL de généticine (G418) -permet l'amplification de virus répliatifs et de vecteurs viraux non répliatifs
HFF-CAR	Donnée par J. Dechanet-Merville, CIRID, Université de Bordeaux, France	-Fibroblastes de prépuces humains -Exprime de manière stable le récepteur viral CAR de l'Ad5 -Cible primaire virale -permet une meilleure infection virale
MRC5	ATCC CCL-171 Donnée par J. Dechanet-Merville, CIRID, Université de Bordeaux, France	-Fibroblastes pulmonaires fœtales humains immortalisés - Cible primaire virale
U2OS-H2B-tdiRFP	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	-Exprime la protéine histone H2B fusionnée avec l'étiquette tdiRFP -permet la visualisation de la chromatine et des noyaux
U2OS-Mybbp1a-mcherry	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	-Exprime la protéine nucléolaire Mybbp1a fusionnée avec l'étiquette mcherry -maintien en culture par ajout de 0,5mg/ mL de généticine (G418) -permet la visualisation des nucléoles dans les noyaux de cellules non infectées -permet la visualisation des ViPR bodies dans les noyaux infectés
U2OS-USP7-mcherry	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	-Exprime le facteur de l'hôte USP7 fusionné avec l'étiquette mcherry -maintien en culture par ajout de 0,5mg/ mL de généticine (G418) -permet la visualisation des CR viraux précoces et tardifs dans les noyaux infectés

Tableau 10 : Lignées cellulaires.

## I.9 Anticorps.

### I.9.1 Anticorps primaires.

Nom	Espèce	Application	Dilution	Origine	Référence
<b>Projet Adénovirus</b>					
<b>GAPDH</b>	Souris	WB	1/1000	Sigma-Aldrich	G9545
<b>HA (Clone 3F10)</b>	Rat	IF	1 :500	Roche	11867423001
<b>Sérum Ad5</b>	Lapin	IF	1 : 1000	Donné gentiment par : R. Iggo, Institut Bergonié, Bordeaux, France	/
<b>DBP (Clone B6.8)</b>	Souris	IF	1 :10	Donné gentiment par : R. Iggo, Institut Bergonié, Bordeaux, France	/
<b>USP7</b>	Rat	IF	1 :30	Donné gentiment par : T. Dobner, Heinrich-Pette-Institute, Hamburg, Allemagne	/
<b>SSRP1 (FACT)</b>	Lapin	IF WB	1 :250	Proteintech	15696-1-AP
<b>Spt16 (FACT)</b>	Lapin	IF (cellules) IF (EB) WB	1 :200 1 :100 1 :1000	Abcam	Ab204343
<b>NAP1L1</b>	Lapin	IF	1 :200	Proteintech	14898-1-AP
<b>NAP1L4</b>	Lapin	IF	1 :200	Proteintech	16018-1-AP
<b>ANP32A</b>	Lapin	IF	1 :250	Proteintech	15810-1-AP
<b>B23/ NPM1</b>	Souris	IF	1 :200	Proteintech	60096-1-Ig
<b>p150 (CAF1)</b>	Lapin	IF	1 :250	Proteintech	17037-1-AP
<b>p60 (CAF1)</b>	Lapin	IF	1 :200	Abcam	ab109442
<b>HIRA</b>	Lapin	IF	1 :100	Abcam	ab129169
<b>DAXX</b>	Souris	IF	1 :200	Abcam	Ab9091
<b>ASF1A</b>	Lapin	IF	1 :125	Proteintech	66884-1-Ig
<b>NPM2</b>	Lapin	IF	1 :200	Abcam	ab243544
<b>NASP</b>	Lapin	IF	1 :50	Proteintech	11323-1-AP
<b>H2A</b>	Lapin	IF	1 :100	Proteintech	10445-1-AP
<b>H2B</b>	Lapin	IF	1 :100	Proteintech	15857-1-AP
<b>H3</b>	Lapin	IF	1 :100	Proteintech	17168-1-AP
<b>H3.3</b>	Lapin	IF	1 :250	Proteintech	13754-1-AP
<b>H4</b>	Lapin	IF	1 :100	Proteintech	16047-1-AP
<b>MCM7</b>	Lapin	IF	1 :250	Proteintech	11225-1-AP
<b>Projet SARS-CoV-2 et Adénovirus</b>					
<b>Cytokeratin 5 (CytK5)</b>	Lapin	IF	1 :200	Abcam	ab52635
<b>Cytokeratin 5 (CytK5)</b>	Cochon d'Inde	IF	1 :200	Origene	BP5006
<b>Alpha-tubulin-acetyl K40 (AcTub)</b>	Souris	IF	1 :200	Abcam	ab24610
<b>Acetyl alpha tubulin (AcTub)</b>	Lapin	IF	1 :200	Cell Signaling	D20G3
<b>Mucin 5AC (Muc5A)</b>	Lapin	IF	1 :200	Abcam	ab3649 ab198294
<b>Mucin 5 AC (Muc5A)</b>	Souris	IF	1 :200	Abcam	Ab2649
<b>ACE2</b>	Lapin	IF	1 :50	Abcam	Ab15348

Projet SARS-CoV-2					
N (Clone 3G9)	Souris	IF	1 :500	Mis au point durant notre étude et par notre collaboration avec Denis Dacheux	Laboratoire d'Harald Wodrich

Tableau 11 : Liste des anticorps primaires.

### I.9.2 Anticorps secondaires.

Nom	Espèce	Application	Dilution	Origine	Référence
$\alpha$ -souris Alexa-Fluor 520	Chèvre	WB	1 :2500	Bio-Rad	12005866
$\alpha$ -souris Alexa-Fluor 700	Chèvre	WB	1 :2500	Bio-Rad	12004158
$\alpha$ -lapin Alexa-Fluor 520	Chèvre	WB	1 :2500	Bio-Rad	12005869
$\alpha$ -lapin Alexa-Fluor 700	Chèvre	WB	1 :2500	Bio-Rad	12004161
$\alpha$ -lapin Alexa-Fluor 488	Ane	IF	1 :300	Life Technologies	A21206
$\alpha$ -lapin Alexa-Fluor 647	Ane	IF	1 :300	Invitrogen	A31573
$\alpha$ -rat Alexa-Fluor 488	Ane	IF	1 :300	Invitrogen Molecular Probes	A21208
$\alpha$ -rat Alexa-Fluor 647	Ane	IF	1 :300	abcam	ab150155
$\alpha$ -souris Alexa-Fluor 488	Ane	IF	1 :300	Life Technologies	A21202
$\alpha$ -souris Alexa-Fluor 647	Ane	IF	1 :300	Life Technologies	A31571
$\alpha$ -souris Alexa-Fluor 594	Ane	IF	1 :300	Life Technologies	A21203
$\alpha$ -lapin Alexa-Fluor 594	Ane	IF	1 :300	Invitrogen	A21207
$\alpha$ -cochon d'Inde Alexa-Fluor 594	Ane	IF	1 :300	Invitrogen Molecular Probes	A11076
$\alpha$ -GFP Booster Atto488	Alpaga	IF	1:200	Chromotek	Gba488-100

Tableau 12 : Liste des anticorps secondaires.

## II. Culture cellulaire.

### II.1 Lignées cellulaires.

Les lignées cellulaires utilisées sont soit des fibroblastes d'ostéosarcome humains (U2OS), soit des cellules rénales embryonnaires humaines exprimant les intégrines cellulaires  $\alpha\beta 5$  (HEK293-  $\alpha\beta 5$ ), soit des fibroblastes humains (fournis par le Dr. Julie Dechanet-Merville, Université de Bordeaux), issus de prépuces et exprimant le récepteur CAR (HFF-CAR). A noter que les cellules U2OS sont notre modèle cellulaire principal pour ces études car cette lignée à l'avantage de posséder de gros noyaux, facilitant ainsi les études en microscopie. Des lignées U2OS ont également été employées afin d'étudier la localisation de facteurs cellulaires étiquetés (U2OS-Mybbp1a-mcherry ; U2OS-USP7-mcherry) ou pour visualiser la chromatine cellulaire (U2OS-H2BtdiRFP) (Tableau 10).



## II.2 Maintenance des cellules.

Toutes les lignées cellulaires sont maintenues dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) contenant du Glutamax™ et supplémenté avec 100 U / mL de pénicilline, 100 µg / mL de streptomycine et 10 % de sérum de vœu fœtal (SVF). De la généticine est ajoutée pour maintenir certaines lignées modifiées (Tableau 10).

Les cellules sont maintenues à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> dans un environnement humide. Deux fois par semaine, lorsqu'elles atteignent environ 80 % de confluence, elles sont lavées avec 5 mL de PBS 1X (PBS pH 7,4 ; Gibco) puis détachées quelques minutes à 37°C avec 2,5 mL d'une solution de trypsine 0,05 % Trypsine / EDTA (Gibco). Elles sont de nouveau reprises dans 7,5 mL de DMEM complet et centrifugées à 478 g durant 5 min et à température ambiante. Le culot est enfin repris dans 10 mL de DMEM. En fonction du niveau de confluence des cellules, la culture est finalement maintenue en ensemençant 1 mL de cellules dans 9 mL de DMEM complet à 37°C.

Suivant le type d'expérience, les cellules sont dénombrées puis ensemençées avec les quantités adéquates précisées dans le tableau 13.

Plaques	Quantité de cellules/ puits	Volume de milieu final
6 puits	$2,5 \times 10^5$	2 mL
12 puits	$8 \times 10^4$	1 mL

Tableau 13 : Conditions d'ensemencement cellulaire.

## II.3 Transfection d'ADN.

Pour réaliser des transfusions d'ADN plasmidiques permettant l'expression transitoire de protéines étiquetées, les cellules sont transfectées avec de la lipofectamine 2000. Elles sont préalablement lavées avec du PBS 1X puis placées dans le volume désiré d'Optimem (Gibco) à 37°C (Tableau 14). Les conditions utilisées suivant la taille des puits sont listées dans le tableau ci-dessous :

Conditions	Plaques 6 puits	Plaques 12 puits
Nombre de cellules	$2,5 \times 10^5$	$8 \times 10^4$
Solution 1	200 µL Optimem + ADN (0,1 à 3 µg)	100 µL Optimem + ADN (0,8 à 1,5 µg)
Solution 2	200 µL Optimem + 3 µL Lipofectamine 2000	100 µL Optimem + 1,5 µL Lipofectamine 2000
Volume de milieu	+ 800 µL d'Optimem	+ 400 µL d'Optimem

Tableau 14 : Conditions de transfection des cellules U2OS avec de la Lipofectamine 2000.

De l'ADN plasmidique est mélangé avec du milieu Optimem à 37°C (solution 1). En parallèle, la Lipofectamine 2000 est diluée dans du milieu Optimem (solution 2). Les deux solutions sont mélangées et incubées 15 min à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules. Après

incubation 3 h à 37°C, le milieu de transfection est remplacé par du DMEM complet et les cellules sont incubées 24 h à 37°C. Les cellules sont ensuite soit fixées (analyses par IF), soit lysées (analyses par WB) ou bien encore infectées.

Nom	Protéine étiquetée exprimée	Origine	Application	Quantité d'ADN transfectée (µg)
pcDNA3-mCherry-USP7	USP7mcherry	Montpellier Genomic Collections, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier	Transfection	2 µg
pEGFP-N1-Histone H3.3	EGFP-H3.3	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pCAG-Histone H2B-tdiRFP	H2BtdiRFP	Laboratoire de M.-E.Torres-Padilla's (Université de Strasbourg) Addgene : plasmide #47884	Transfection	2 µg
pEGFP-C1-DBP	EGFP-DBPwt	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pEGFP-C1-DBPdeltaC	EGFP-DBPΔC	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pCHA-puro-DBP	HA-DBPwt	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pCHA-puro-DBPdeltaC	HA-DBPΔC	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pEGFP-C1-SSRP1	EGFP-SSRP1	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	0,1-2 µg
pEGFP-C1-CAF-1 p150	EGFP-p150	Générée au laboratoire par le Dr Komatsu	Transfection	2 µg
pEGFP-C1 empty	Contrôle EGFP	Addgene : plasmide #36412	Transfection	0,1-2 µg

Tableau 15 : Liste des plasmides.

#### II.4 Traitements pharmacologiques.

Les deux inhibiteurs du chaperon d'histones FACT (Curaxine), CBL0100 et CBL0137 (selleckchem) ont été généreusement donnés par le Dr Vincent Parissi. Selon les expériences, ils sont utilisés à différentes concentrations (de 0,1 µM à 1 µM). Les drogues sont dissoutes dans du DMSO puis elles sont diluées aux concentrations adéquates dans le milieu de culture cellulaire. L'addition de DMSO seul sert de contrôle sans drogue dans toutes les expériences. Selon les expériences, les cellules sont prétraitées pendant 3 h avant d'être infectées et l'infection synchronisée de 30 min est réalisée sans drogue. Du milieu de culture contenant la drogue ou du DMSO est ensuite ajouté durant toute la période d'infection. Dans d'autres cas, les inhibiteurs sont ajoutés à un temps donné après infection.

### **III. Culture d'épithéliums bronchiques (EB) reconstitués de patients.**

#### **III.1 Génération des épithéliums.**

Les cultures cellulaires des EB sont établies au moyen du protocole décrit dans la partie introductive du chapitre 5 (voir V.1.7 Morphologie et composition cellulaire du tractus respiratoire humain). Les EB utilisés durant ces études ont été générés par le laboratoire du Dr Thomas Trian (Hôpital Haut-Lévêque) et par le doctorant Alexis Celle. La procédure utilisée pour la reconstitution des EB est la suivante. Des frottis bronchiques ou des biopsies bronchiques sont réalisés pour des patients adultes ou pour des enfants entre la troisième et la cinquième génération bronchique (501). Les explants sont cultivés à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> dans du milieu (PneumaCult Ex medium, Stemcell) afin d'amplifier les cellules épithéliales basales. Cinq cent mille cellules sontensemencées et cultivées sur des inserts (Corning) à l'interface air-liquide durant 21 jours en utilisant du milieu ALI (PneumaCult ALI medium, Stemcell). Les cellules basales initiales sont différenciées durant cette période et forment des épithéliums bronchiques fonctionnels, composés de cellules à mucus, de cellules ciliées, de cellules club et de cellules basales. Cette méthodologie possède l'avantage de générer jusqu'à plus de 24 inserts pour le même patient. Des études comparatives sont ainsi possibles et peuvent être menées en parallèle avec différents virus, en utilisant des inhibiteurs mais aussi pour plusieurs patients dans une même expérience. Après avoir été générés, les EB ont été finalement réceptionnés et utilisés pour nos études d'infections.

#### **III.2 Maintenance des épithéliums.**

Le milieu basal de 500 µL est remplacé tous les trois jours par du milieu ALI frais (PneumaCult ALI medium, STEMCELL Technologies) à 37°C et contenant du supplément (STEMCELL Technologies), de l'héparine (STEMCELL Technologies) et de l'hydrocortisone (STEMCELL Technologies) suivant les recommandations fournisseurs. Les épithéliums sont ensuite maintenus dans un environnement humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **IV. Infection par l'Ad5.**

#### **IV.1.1 Infection synchronisée des lignées cellulaires.**

Pour les expériences d'immunofluorescence (IF),  $8 \times 10^4$  de cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits contenant des lamelles de 15 mm de diamètre. Le jour d'après,  $1,2 \times 10^5$  cellules par puits sont considérées pour les infections.

Pour les analyses d'une même population cellulaire à la fois par WB et par IF,  $2,5 \times 10^5$  cellules U2OS sont ensemencées dans des plaques 6 puits contenant des lamelles de 15 mm de diamètre. Le jour d'après,  $3,75 \times 10^5$  cellules par puit sont considérées pour les infections.

Les infections sont réalisées par addition soit de 3000 pp/cellule, soit de 5000 pp/cellule comme indiqué dans les expériences. Des quantités croissantes de particules virales (50 pp, 500 pp et 5000 pp / cellule) ont également été utilisées pour des études par WB.

#### Pour les analyses par WB :

Les cellules sont lavées avec du PBS 1X et infectées avec un inoculum contenant soit 3000 pp/cellule, soit 5000 pp/cellule diluées dans 1 mL de DMEM complet à 37°C. Les contrôles de cellules non-infectées sont réalisés en parallèle par ajout de 1 mL par puits de DMEM complet à 37°C. Les cellules sont incubées en présence de virus à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> pendant 30 min. Le virus est ensuite éliminé et remplacé par du milieu DMEM complet. Cette méthode permet de réaliser une infection quasi synchronisée avec l'Ad5. Dans ce manuscrit, nous considérons que l'infection débute à partir du moment où l'inoculum est ajouté (T<sub>0</sub> d'infection). Les 30 min d'infection sont par conséquent comprises dans le temps d'infection indiqué dans les expériences.

#### Pour les analyses par IF :

Les cellules sont lavées avec du PBS 1X. Les lamelles sont ensuite infectées avec 3000 pp/cellule diluées dans 100 µL de DMEM complet à 37°C. Les contrôles non infectés sont réalisés en parallèle par ajout de 100 µL de DMEM. Les lamelles sont incubées à 37°C à 5 % de CO<sub>2</sub>. Au bout de 30 min, l'inoculum est remplacé par du milieu complet. Comme pour les analyses par WB, on considère l'infection synchronisée et les 30 min sont incluses dans le temps d'infection.

#### **IV.1.2 Infection pour les expériences d'imagerie en temps réel.**

Les cellules ensemencées dans une chambre de culture individuelle (Ibidi) sont lavées après leur adhésion (6 h au minimum) avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite infectées par addition d'1 ml de DMEM contenant 3000 pp/cellule. Les cellules ne sont pas synchronisées pour ces expériences et sont suivies par microscopie dès l'addition du virus (Leica DMI 6000 AFC).

#### **IV.1.3 Infection des épithéliums bronchiques.**

Le milieu ALI basal contenant de l'héparine et de l'hydrocortisone est enlevé et remplacé par 500 µL de milieu ALI préchauffé contenant uniquement de l'héparine. Les épithéliums sont lavés une seule

fois par ajout de 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X à 37°C (face apicale) et par de multiples aspirations afin d'enlever le mucus. Un nombre de  $2,3 \times 10^9$  pp pour la souche standard WT ou pour la souche standard (Ad5- ATCC) sont diluées dans du DMEM (sans SVF) à 37°C. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'inoculum est ajouté au niveau de la face apicale des EB et incubé 1 h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ . L'inoculum est enlevé et l'épithélium est lavé avec 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X à 37°C par de multiples aspirations. Les épithéliums sont enfin de nouveau incubés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ . Le milieu basal de 500  $\mu\text{L}$  est remplacé tous les jours par du milieu ALI complétement à 37°C et contenant de l'héparine. Les EB sont ensuite analysés soit vivants ou soit fixés selon les expériences.

## **V. Immunofluorescence et Microscopie.**

### **V.1 Fixation.**

#### **V.1.1 Fixation des lignées cellulaires.**

Aux temps indiqués dans les différentes expériences, les cellules sont lavées avec une solution de PBS 1X à 37°C. Elles sont ensuite fixées à température ambiante durant 10 min avec 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X / 4 % de paraformaldéhyde (PFA-EM Grade, Delta microscopie). Les lamelles sont enfin lavées trois fois avec du PBS 1X à température ambiante et peuvent être stockées dans du PBS 1X à 4°C avant de réaliser l'IF.

#### **V.1.2 Fixation des épithéliums bronchiques.**

Aux temps indiqués dans les différentes expériences, la face apicale des EB est lavée trois fois par incubation de 2 min avec du PBS 1X à 37°C afin d'enlever un maximum de mucus. Les EB sont fixés durant 30 min avec 500  $\mu\text{L}$  (faces apicale et basale) de PBS 1X / 4 % de paraformaldéhyde (PFA-EM Grade, Delta microscopie) à température ambiante. Les EB sont enfin lavés par immersion complète et par rotations douces dans du PBS 1X à température ambiante. Un stockage dans du PBS 1X à 4°C est possible avant de réaliser l'IF.

#### **V.1.3 Congélation et décongélation des épithéliums bronchiques.**

Ce protocole a été mis au point au laboratoire durant cette thèse. Les EB peuvent être stockés à -20°C après déshydratation avec 500  $\mu\text{L}$  (face apicale et basale) de concentrations successives et croissantes d'éthanol, 50 % éthanol pendant 5 min à température ambiante ; 70 % éthanol pendant 5 min à

température ambiante ; 100 % éthanol pendant 5 min à température ambiante ; 100 % éthanol pendant 10 min à température ambiante.

Les EB sont décongelés et réhydratés avec 500 µL (face apicale et basale) des concentrations successives et décroissantes d'éthanol, 70 % éthanol pendant 2 min à température ambiante ; 50 % éthanol pendant 2 min à température ambiante ; PBS 1X pendant 10 min à température ambiante ; 100% éthanol pendant 10 min à température ambiante.

Un dernier lavage dans un grand volume de PBS 1X est finalement effectué.

## **V.2 Immunofluorescence.**

### **V.2.1 Marquage des lignées cellulaires.**

Les cellules sont perméabilisées et saturées (50 µL par lamelle) pendant 10 min à température ambiante dans du tampon IF (PBS 1X, 10 % SVF, 0,05 % saponine). Les anticorps primaires (Tableau 11) sont dilués dans le tampon IF. Après centrifugation à 4°C pendant 10 min à 21 000 g, 50 µL d'anticorps sont ajoutés par lamelle puis les lamelles sont incubées dans une chambre humide durant 1 h à 37°C. Les lamelles sont ensuite transférées dans les puits d'une plaque puis elles sont lavées par addition de PBS 1X 3 min, 5 min et 10 min sous agitation. Les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (Tableau 12) sont dilués dans du tampon IF. Après centrifugation à 4°C durant 10 min à 21 000 g, 50 µL de mélange sont ajoutés par lamelle et incubés 1 h à 37°C dans une chambre humide à 37°C. Les cellules sont lavées comme précédemment 3 min, 5 min et 10 min sous agitation avec du PBS 1X. Un dernier lavage est réalisé par immersions rapides dans du PBS 1X puis les lamelles sont immergées dans de l'eau déminéralisée, déshydratées dans un bain d'éthanol 100 % et séchées. Les lamelles sont ensuite montées sur une lame avec du milieu de montage (DAKO, Fluorescence Mounting Medium, Agilent), contenant 1 µg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma). Les échantillons sont laissés dans le noir et à température ambiante toute une nuit avant leur observation au microscope.

### **V.2.2 Marquage des épithéliums bronchiques.**

Ce protocole a été mis au point au laboratoire durant les travaux présentés dans ce manuscrit. Les EB sont perméabilisés 10 min à température ambiante (200 µL au niveau apical et 500 µL au niveau basal) avec une solution de PBS 1X, 0,5 % Triton X-100. Après un lavage par immersion rapide de l'insert, une saturation est réalisée avec du tampon IF (PBS 1X, 10 % SVF, 0,05 % saponine) pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps primaires (Tableau 11) sont dilués dans le tampon d'IF. Après centrifugation à 4°C pendant 10 min à 21 000 g, 200 µL d'anticorps dilués sont ajoutés au niveau apical

puis incubés 1 h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite lavés 3 min, 5 min et 10 min sous agitation avec du PBS 1X (200 µl au niveau apical et 500 µl au niveau basal). Les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (Tableau 12) sont dilués dans du tampon IF, PBS 1X contenant 2 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) et de la phalloïdine. Après centrifugation à 4°C pendant 10 min à 21 000 g, 200 µL sont ajoutés et incubés 2 h à température ambiante. Les EB sont de nouveau lavés 3 min, 5 min et 10 min sous agitation avec du PBS 1X (200 µl au niveau apical et 500 µl au niveau basal). Un dernier lavage est réalisé par immersion rapide dans du PBS 1X puis les EB sont immergés dans de l'eau déminéralisée, déshydratés dans un bain d'éthanol 100 % et séchés. Les membranes contenant les épithéliums sont coupées et montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (DAKO, Fluorescence Mounting Medium, Agilent). Les échantillons sont laissés dans l'obscurité et à température ambiante toute une nuit avant leur observation au microscope.

### **V.3 Acquisitions par microscopie et analyses.**

#### **V.3.1 Acquisition à partir de cellules fixées.**

Les lames de microscopie sont observées au moyen d'un microscope plein champs à épifluorescence afin de contrôler les signaux des marquages par immunofluorescence ou des signaux des étiquettes des protéines de fusions après transfection (Leica DMI 6000 AFC). Les études de colocalisations ont été réalisées au moyen d'un microscope confocal SP8 (Leica DM6 CFS TCS SP8) accessible au Bordeaux Imaging Center (Bordeaux). Les acquisitions par microscopie confocale sont effectuées avec des plans focaux de 0,3 µm (de 5 à 10 par cellule), au format 1024 x 1024 pixels, 12 bits avec une taille de pixel de 72 nm et un pinhole fixé à 1 AU.

#### **V.3.2 Acquisition à partir de cellules vivantes.**

Les cellules dans des plaques 12 puits transfectées ou non sont lavées avec du PBS 1X puis détachées par l'addition de 100 µL de trypsine / EDTA pendant 3 min à 37°C. L'effet de la trypsine est neutralisé par l'addition de 900 µL de milieu DMEM complet. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une chambre de culture individuelle (25,5 X 75,5 mm<sup>2</sup>, référence : 80106, Ibidi). Après adhésion (6 h au minimum), les cellules vivantes qui ont été infectées ou non selon les expériences sont observées au moyen d'un microscope plein champs à épifluorescence (Leica DMI 6000B, associé à une caméra Hamamatsu camera C11440 ORCA-flash2.8). Les acquisitions sont réalisées à des temps précis après l'infection ou en suivant individuellement des cellules par acquisitions toutes les 15 min (jusqu'à plus de 24 h).

### **V.3.3 Acquisition des épithéliums bronchiques fixés.**

L'acquisition de l'intégralité des EB est réalisée par microscopie confocale (SP8, X10) en moyen du logiciel LAS-X (Leica) et du mode mosaïque en spirale. Les acquisitions sont réalisées avec un objectif X10 et les plans focaux sont de 2,99  $\mu\text{m}$  ( $\pm 16$  plans), au format 512 x 512 pixels, 12 bits avec une taille de pixel de 2,27  $\mu\text{m}$  et un pinhole fixé à 1 AU. Les acquisitions réalisées avec un objectif X20 ont des plans focaux de 0,55  $\mu\text{m}$ , au format 1024 x 1024 pixels, 12 bits avec une taille de pixel de 0,57  $\mu\text{m}$  et un pinhole fixé à 1 AU.

## **V.4 Analyses et quantification des images.**

### **V.4.1 Traitements.**

Les acquisitions sont analysées au moyen du logiciel Image J (Wayne Rasband, NIH). Dans ce manuscrit, les images confocales des lignées cellulaires sont des projections en Z de 5 plans focaux de 0,3  $\mu\text{m}$  rassemblés en un plan unique (1,5  $\mu\text{m}$  total). Les images des EB sont analysées avec le logiciel Image J ou avec du logiciel IMARIS (version 9.9). Les images confocales prises avec l'objectif X63 pour l'acquisition des EB présentées dans ces travaux sont soit des vues uniques d'un seul plan focal de 0,21  $\mu\text{m}$  (vue orthogonale), soit des projections en Z d'une portion apicale ou de la totalité des  $\pm 40$   $\mu\text{m}$  de l'épithélium. Les images confocales des EB prises avec les objectifs X10 et X20 sont des projections en Z de la totalité des tissus. Les reconstructions 3D des EB sont réalisées avec le logiciel LAS-X (Leica) au moyen du mode 3D-viewer.

### **V.4.2 Quantification.**

La première étape de cette quantification consiste en la projection de 5 plans focaux sur un seul plan. Ensuite, le nombre et la taille des CR fluorescents ont été déterminés avec le logiciel Image J au moyen d'une macro. La région d'intérêt (ROI) est tracée manuellement pour délimiter le seul noyau. Un seuil d'intensité de fluorescence est ensuite appliqué à chaque image pour permettre de distinguer uniquement les signaux d'intérêts correspondant aux CR. Le logiciel dresse ensuite le nombre et la taille des objets ainsi sélectionnés dans un tableau de données.

### **V.4.3 Elaboration des profils d'intensité.**

Les profils d'intensités ont été réalisés avec le logiciel Image J avec le plugin « RGB Profile Plot ». Une image composite est premièrement réalisée à partir d'une image acquise par microscopie confocale. Le composite est ensuite enregistré en format RGB. Un axe linéaire est tracé de part et d'autre du



noyau en traversant par exemple plusieurs CR viraux suivant le type d'analyse souhaitée. Les profils d'intensités selon l'axe tracé sont représentés par un graphique au moyen du plugin « RGB Profile Plot ». Trois courbes sont ainsi visibles sur le graphique. Ces courbes correspondent aux signaux individuels des marquages réalisés. Les valeurs d'intensité de chaque signal le long de l'axe sont sauveées dans un tableau de données. Le profil d'intensités est enfin généré à l'aide des valeurs ainsi déterminées sous la forme d'un graphique par le logiciel PRISM.

## **VI. Microscopie électronique.**

### **VI.1 Fixation et traitement des épithéliums bronchiques.**

Des études préliminaires d'EB infectés par l'Ad5 ont été menées par microscopie électronique pendant ces travaux. Après l'infection virale, la face apicale des EB est lavée par trois incubations successives de 2 min avec du PBS 1X préchauffé afin d'enlever un maximum de mucus. Pour fixer les EB, 500 µL d'une solution tampon phosphate 0,1 M contenant 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde et 2 % (v/v) de paraformaldéhyde sont ajoutés au niveau de la face apicale et de la face basale durant 2 h à température ambiante. Le reste des étapes de ce protocole a été effectuée par Sabrina Lacomme (Laboratoire de Marc Landry). Les EB sont lavés avec une solution de phosphate 0,1 M et fixés une seconde fois dans le noir et à température ambiante avec une solution tampon phosphate 0,1 M contenant 1 % (v/v) d'osmium tétroxyde. Après lavage avec de l'eau déminéralisée, les EB sont déshydratés au moyen d'une série de concentrations croissantes d'éthanol puis finalement incubés 2 h dans un mélange d'éthanol 100 % et de résine époxy (Epon 812 ; Delta Microscopy, Toulouse, France) 50/50 (v/v). Après polymérisation de la résine entre 24 h et 48 h à 60°C, les échantillons sont sectionnés par ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienna, Austria) en utilisant un diamant (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland). Des sections ultrafines de 70 nm sont finalement positionnées sur des grilles en cuivre et marquées avec une solution sans uranyle et avec du citrate de plomb.

### **VI.2 Acquisition des images.**

Les grilles sont observées avec un microscope électronique à transmission (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) à 80 kV au BIC par Sabrina Lacomme (Laboratoire de Marc Landry).

## **VII. Biochimie.**

### **VII.1 Lyse cellulaire.**

Les cellules sont lavées avec du PBS 1X puis incubées 2 min avec une solution de PBS 1X, 0,6mM EDTA à 37°C. Après décollement, les cellules sont récoltées et centrifugées pendant 5 min à 4°C à 5000 g.

Les culots sont enfin repris dans un volume de 160  $\mu$ L de tampon de lyse (Pierce™ IP Lysis Buffer ; Thermo Fisher Scientific) contenant 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et incubés 10 min dans la glace. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 21 000 g à 4°C. Le surnageant est enfin récupéré et les lysats peuvent par ailleurs être conservés à -20°C avant leur analyse.

### **VII.2 Dosage protéique par méthode Bradford.**

La concentration en protéines des lysats cellulaires est déterminée par dosage colorimétrique avec la méthode Bradford. Une gamme étalon de 0 à 20  $\mu$ g d'albumine sérique bovine dans un volume final de 800  $\mu$ L de PBS 1X est réalisée. Deux microlitres de lysat cellulaire sont dilués dans un volume final de 800  $\mu$ L de PBS 1X. Deux cents microlitres de réactif Bradford sont ajoutés et mélangés aux échantillons de gamme et des lysats cellulaires. L'absorbance à 595 nm est finalement mesurée par spectrométrie après 5 min d'incubation dans l'obscurité. La courbe étalon permet de déterminer la concentration en protéine des lysats cellulaires analysés.

### **VII.3 Electrophorèse des protéines en gel dénaturant et réducteur (SDS-PAGE).**

Trente microgrammes de protéines sont dénaturés 15 min à 100°C dans du tampon de charge (50 mM Tris pH 6,8 ; 2 % SDS, 10 % Glycérol, 1 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,05 % bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide précoulé (SDS-PAGE) (4-20 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Long Shelf Life Precast Protein Gels, 10 puits, Bio-Rad). L'électrophorèse est ensuite réalisée dans un tampon de migration TGS 1X (25 mM Tris pH 8,3 ; 192 mM glycine, 1 % SDS) durant 30-40 min à 180 V.

### **VII.4 Coloration par technologie « Stain Free ».**

Après électrophorèse, le gel est activé par une exposition de 450 nm et les signaux sont visualisés par l'émission de fluorescence avec un système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad). Les gels pré-coulés commerciaux utilisés contiennent en effet des molécules trihalo pouvant se lier de manière covalente aux résidus tryptophanes des protéines après activation par la lumière (technologie Stain Free).

### VII.5 Western Blot.

Après révélation Stain Free, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm (Amersham Protran, GE Healthcare). Le gel et la membrane sont déposés entre deux éponges (3 MM CHR, GE Healthcare) préalablement tous trempés dans une solution de transfert commerciale (Trans-Blot Turbo 5X, Bio-Rad). Le transfert est finalement effectué par l'utilisation d'un Turbo Trans-blot (Bio-Rad) dans une cuve de transfert (Bio-Rad) durant 7 min (protocole Mixed MW).

La membrane est incubée pendant 30 min sous agitation dans du tampon de saturation, TBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,4), 0,1 % de Tween 20 (Euromedex), 10 % de poudre de lait écrémé. Elle est enfin incubée toute la nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires (Tableau 11) dilués dans 5 mL de tampon de saturation. La membrane est lavée le lendemain 3 fois avec du tampon de lavage (TBS 1X, 0,1 % Tween 20) (10 min par lavage). La membrane est incubée 1 h avec les anticorps secondaires, couplés à un fluorochrome (Tableau 12) et dilués dans 5 mL de tampon de saturation. La membrane est finalement lavée 3 fois avec 5 mL de tampon de lavage (10 min par lavage) et stockée dans du tampon TBS 1X. A noter que deux révélations peuvent être réalisées successivement au moyen d'un premier anticorps secondaire Alexa 700 puis d'un second anticorps secondaire Alexa 520 après incubation dans les mêmes conditions comme citées précédemment avec un anticorps primaire d'une autre espèce.

### VII.6 Révélation et quantification.

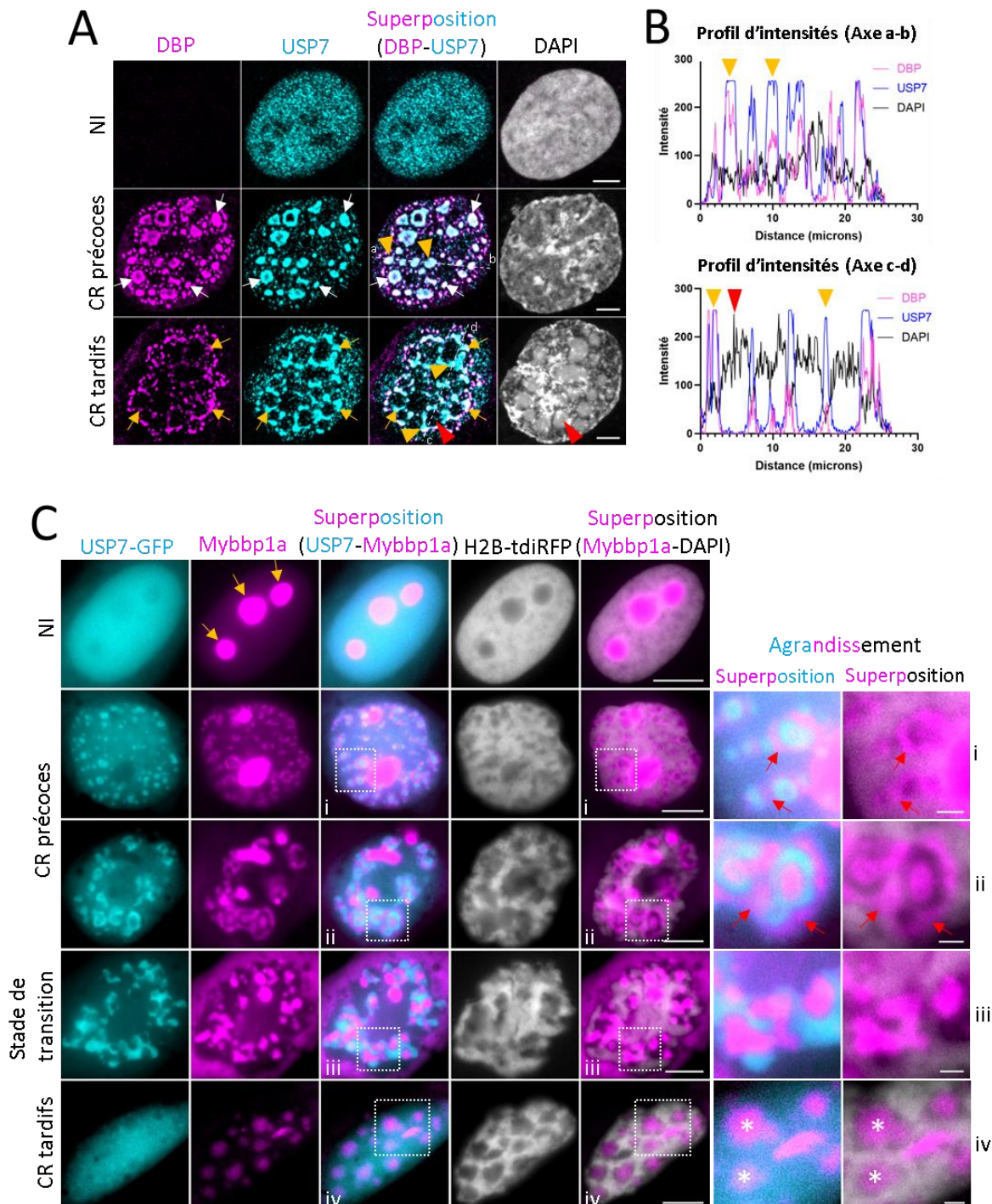
Les signaux des anticorps secondaires sont révélés avec un système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio- Rad). Les temps d'exposition sont ajustés en fonction de l'intensité des signaux. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel Image J (Wayne Rasband, NIH) où l'intensité des signaux est déterminée.

RESULTATS

# Chapitre 1

## I. Les compartiments de réplication de l'Ad5 sont dépourvus d'histones.

### I.1 Mise en évidence et caractérisation des CR de l'Ad dans les cellules U2OS.



**Figure 18. Visualisation des CR de l'Ad5 par le marquage des protéines DBP/USP7 et des ViPR marqués par la protéine Mybbp1a. (A)** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (magenta) et anti-USP7 (cyan). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m).

**(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (CR précoces) et c-d (CR tardifs). **(C)** Des cellules U2OS-Mybbp1a-mcherry sont transfectées avec les 2 plasmides codant pour les protéines USP7-GFP et H2B-tdiRFP. Les cellules sont infectées (24 h après transfection) dans les mêmes conditions qu'en (A) puis les signaux Mybbp1a-mcherry, H2B-tdiRFP et USP7-GFP sont analysés 20 h plus tard (cellules vivantes). Microscopie plein champs (X63). (Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$  pour les agrandissements i, ii, iii et iv).

Comme d'écrit dans l'introduction, la réplication du génome de l'Ad5 s'effectue dans des CR nucléaires dont la morphologie évolue au cours de l'infection, allant des CR précoces aux CR tardifs qui entourent les ViPR (388). Ils peuvent être visualisés par marquage de la protéine virale DBP, qui est directement impliquée dans la réplication du génome viral et la protéine cellulaire USP7 qui est recrutée dans les CR tout au long de la réplication virale.

Pour mettre en évidence ces CR dans notre modèle d'étude, les cellules humaines U2OS (issues d'un ostéosarcome) sont infectées de façon synchronisée par l'Ad5 réplicatif et délété de la région E3. Pour ce faire, les cellules sont incubées en présence de virus à 3000 pp/cellule pendant 30 min puis, le virus est retiré et remplacé par du milieu complet. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules sont fixées et analysées par IF à l'aide d'anticorps anti-DBP et anti-USP7. Elles sont ensuite observées par microscopie confocale. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage de l'ADN par du DAPI (Figure 18A). Les résultats montrent qu'il est possible de distinguer les 2 types de CR dans ces conditions expérimentales. Les CR précoces sont caractérisés par un marquage ponctiforme, plus ou moins large, où la DBP et USP7 colocalisent dans le noyau (flèches blanches). Les CR tardifs quant à eux, sont caractérisés par un marquage de DBP en forme d'anneaux irréguliers et de taille variable. USP7 colocalise partiellement avec DBP au niveau de ces structures. On peut observer également qu'à l'intérieur de ces anneaux, le marquage DAPI est plus prononcé que dans le reste du noyau. Dans les cellules non infectées, aucun marquage avec les anticorps anti-DBP n'est visible et les signaux pour USP7 sont diffus dans le noyau. Ces caractéristiques morphologiques des CR précoces et tardifs sont en accord avec ceux décrits par de précédents travaux du laboratoire (388).

Pour visualiser plus précisément les colocalisations entre les 3 signaux, l'intensité de fluorescence de chacune des protéines ainsi que celle du marquage DAPI ont été mesurées le long d'un axe choisi, passant par plusieurs CR (indiqué sur les images en lettres minuscules) et ce, sur un plan focal. Pour chaque marquage, cette intensité est rapportée en fonction de la distance le long de cet axe (Figure 18B). Par exemple, pour les CR précoces (Figure 18B, graphique du haut), l'intensité des signaux a été rapportée selon l'axe a-b dessiné sur la Figure 18A. Les résultats montrent que les intensités les plus élevées pour DBP et USP7 se superposent pratiquement systématiquement le long de l'axe. En revanche, ce sont les signaux les moins intenses du DAPI qui coïncident le plus souvent avec les pics des 2 protéines. La même analyse est réalisée pour les CR tardifs (Figure 18B, graphique du bas) selon

l'axe c-d. De la même façon, les résultats montrent que les pics des signaux DBP et USP7 apparaissent au même endroit et que l'intensité du marquage par le DAPI est faible dans ces zones, suggérant une faible concentration d'ADN dans ces zones. Ces pics successifs de DBP et USP7 correspondent à la bordure des anneaux caractéristiques des CR tardifs (têtes de flèches jaunes). Si l'on considère le signal DAPI entre 2 pics des protéines DBP et USP7 d'un même CR, on constate une nette augmentation de la fluorescence qui corrèle avec une accumulation d'ADN dans ces structures (tête de flèche rouge).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de distinguer les CR précoces et tardifs de l'Ad5 dans ces conditions expérimentales et d'étudier avec précision leur composition et leur morphologie.

Il a été montré que les CR tardifs enrichis en DBP et USP7 entourent les ViPR où se concentrent l'ADN viral répliqué, la protéine nucléolaire Mybbp1a et la protéine VII du virus. En revanche, les histones cellulaires sont exclues de ces ViPR (388). La formation des différents CR et des ViPR est un processus extrêmement dynamique dans la cellule infectée par l'Ad5. Pour les visualiser dans notre modèle d'étude, la lignée cellulaire U2OS-Mybbp1a-mcherry construite par le Dr Tetsuro Komatsu a été utilisée (Figure 18C). Celle-ci exprime constitutivement la protéine Mybbp1a fusionnée à la protéine fluorescente mCherry (388). Ces cellules ont été cotransfectées avec les plasmides codant pour USP7-GFP et l'histone H2B-tdiRFP. Vingt-quatre heures après transfection, une infection synchrone est réalisée comme précédemment mais cette fois-ci, les cellules vivantes sont observées par microscopie. Vingt heures après infection, on observe une très grande majorité de cellules avec des CR précoces et quelques cellules avec des CR tardifs. Dans les cellules non infectées, la protéine USP7-GFP est diffuse dans le noyau alors que la protéine Mybbp1a est concentrée dans les nucléoles (flèches jaunes), dont le signal DAPI est bien exclu. Dans les cellules infectées, les CR précoces apparaissent bien sous la forme d'un marquage ponctiforme de USP7-GFP et une partie de la protéine Mybbp1a est relocalisée autour des CR. Les CR tardifs apparaissent sous forme d'un marquage de USP7-GFP en anneau irrégulier. Les ViPR apparaissent à l'intérieur de ces anneaux et leur structure circulaire est visualisée par la protéine Mybbp1a (astérisques blanches). Comme pour les CR précoces, les CR tardifs et les ViPR possèdent des signaux H2B-tdiRFP faibles. Ces résultats sont en accord avec ceux de précédents travaux (388) et montrent que les CR et les ViPR sont dépourvus d'histones cellulaires H2B. Comme décrit dans l'introduction, les génomes viraux sont soit associés au cours du cycle viral avec la protéine VII (chromatine virale), soit à des histones cellulaires ou aux deux (348). Des travaux précédents ont en effet montré une association précoce dès 1 h d'infection du génome de l'Ad5 avec l'ensemble des histones H2A, H2B, H3 et H4 (76). Par ailleurs et comme montré précédemment, les CR et les ViPR comportent de très faibles signaux pour l'histone H2B. Cela suggère qu'ils sont dépourvus de génomes viraux associés aux histones H2B. Nous avons ensuite réalisé une étude complète afin de

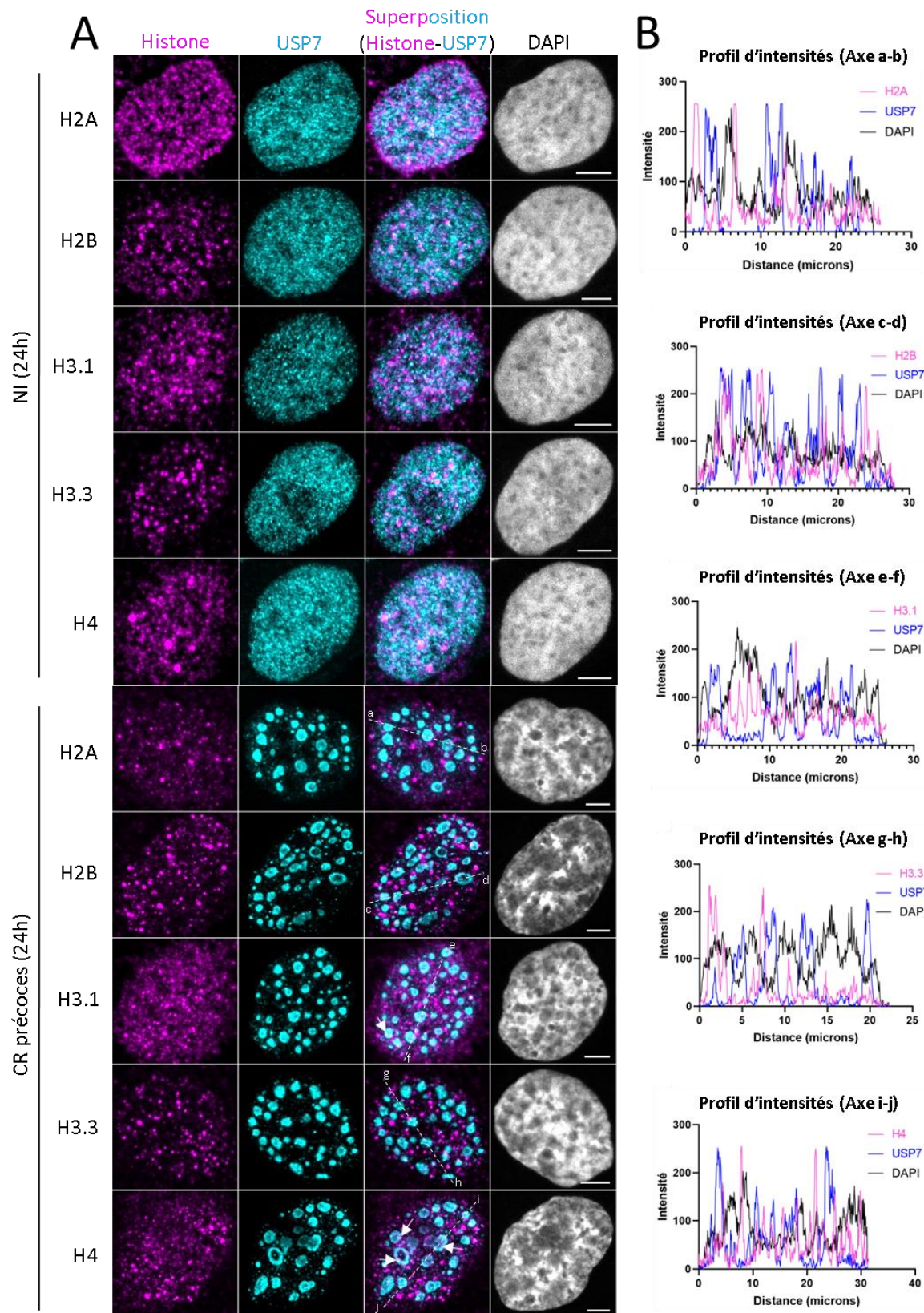
savoir si toutes les histones cellulaires sont exclues ou non des CR et des ViPR comme pour l'histone H2B.

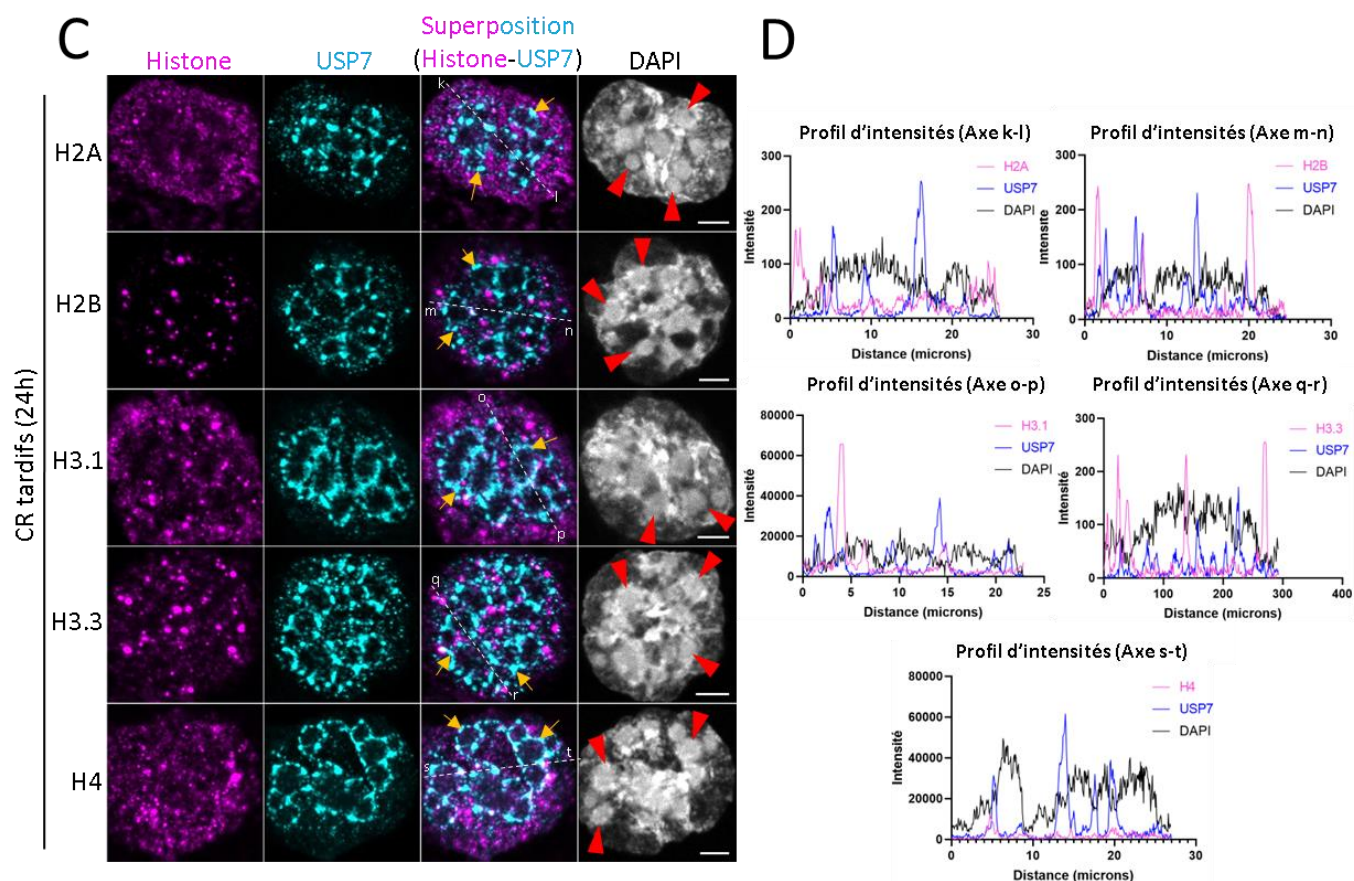
### **I.2 Les CR de l'Ad5 sont dépourvus d'histones cellulaires dans les cellules U2OS.**

Afin de mettre en évidence l'exclusion ou non de l'ensemble des histones cellulaires des CR et des ViPR, des cellules U2OS ont été infectées dans les mêmes conditions que celles décrites en figure 18. Les cellules ont ensuite été fixées 24 h après infection et analysées par IF avec des anticorps anti-histones. Les histones H2A, H2B, H4 et les variants d'histones H3.1, H3.3 ont ainsi été étudiés individuellement par microscopie confocale. Comme attendu, toutes les histones cellulaires sont bien observées dans les noyaux des cellules non infectées, sous la forme de signaux plus ou moins diffus pour les histones H2A et H4 (Figure 19A). Seuls de très rares signaux sous la forme de ponctuations ont été détectés dans les CR précoces et pour les histones H3.1 et H4 (flèches blanches). Comme pour la figure 18, des profils d'intensités ont été rapportés le long d'axes choisis et analysés pour toutes les histones (Figure 19B). Les pics d'intensités USP7 correspondant aux CR précoces coïncident avec les faibles intensités des signaux des histones et du DAPI. Les CR tardifs et les ViPR sont également dépourvus d'histones cellulaires (Figure 19C et 19D). Seuls de rares ponctuations pour les histones ont été trouvées dans les CR tardifs (flèches jaunes).

Ces résultats montrent que les CR et les ViPR sont dépourvus d'histones cellulaires dans nos conditions expérimentales et sont en accord avec ceux documentés pour l'histone H3.3 (357).







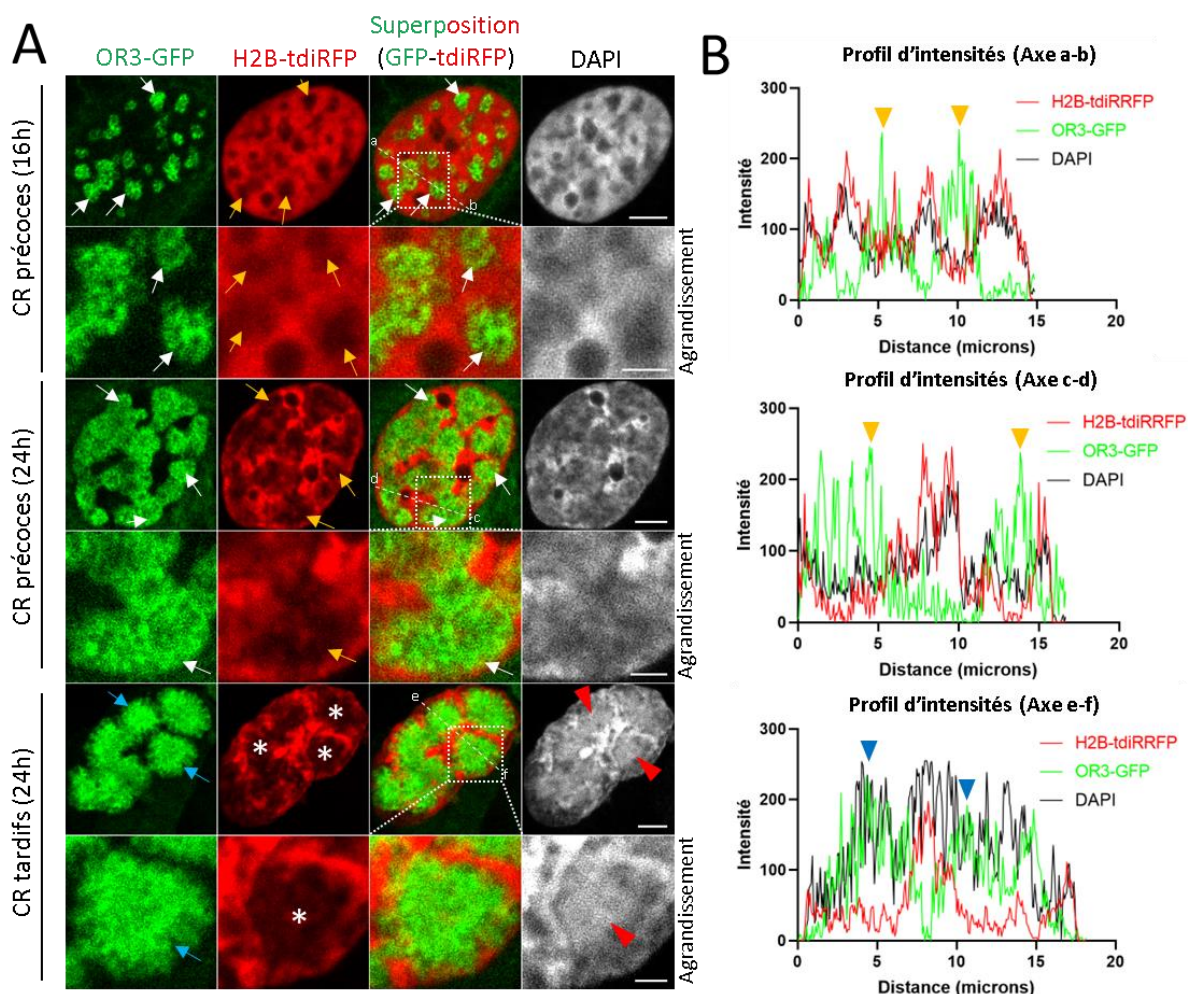
**Figure 19. Les CR précoces, les CR tardifs et les ViPR sont dépourvus d'histones cellulaires.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et les anti-histones (H2A, H2B, H3.1, H3.3 et H4) (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. **(A)** Contrôles non infectés (NI) et CR précoces. **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (H2A), c-d (H2B), e-f (H3.1), g-h (H3.3) et i-j (H4) pour les CR précoces. **(C)** CR tardifs. **(D)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes k-l (H2A), m-n (H2B), o-p (H3.1), q-r (H3.3) et s-t (H4) pour les CR tardifs. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m).

### I.3 Au cours de l'infection, les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments dépourvus d'histones et d'ADN cellulaire.

Afin de confirmer l'absence d'histones H2B dans les CR viraux et les ViPR dans des cellules fixées, la lignée cellulaire U2OS-H2B-tdiRFP construite par le Dr Komatsu, a été utilisée. Les cellules ont été infectées dans les mêmes conditions expérimentales que la figure 18. Cette fois, les cellules ont été co-infectées avec le virus modifié Ad5-ANCHOR et le virus Ad5 répliquatif (déléte de la région E3) comme dans (326). Le génome du virus Ad5-ANCHOR comporte à la fois une cassette d'expression codant pour la protéine OR3-GFP et une séquence de 10 nucléotides nommée *Anch*. Lorsque le génome viral est libéré dans le noyau, la cassette OR3-GFP est exprimée et les protéines OR3-GFP s'accumulent dans le noyau infecté. La reconnaissance et la liaison par oligomérisation transitoire de ces protéines sur *Anch*



permet la visualisation des génomes viraux double brin. Ce virus modifié permet ainsi de suivre par microscopie la localisation des génomes doubles brins dans le noyau des cellules infectées et ce tout au long du cycle viral. Après 16 h ou 24 h après infection, les cellules ont été fixées et analysées par microscopie confocale. Seize heures post infection (pi), seules des zones circulaires intranucléaires plus ou moins larges et avec des signaux élevés pour OR3-GFP sont observées (Figure 20A).

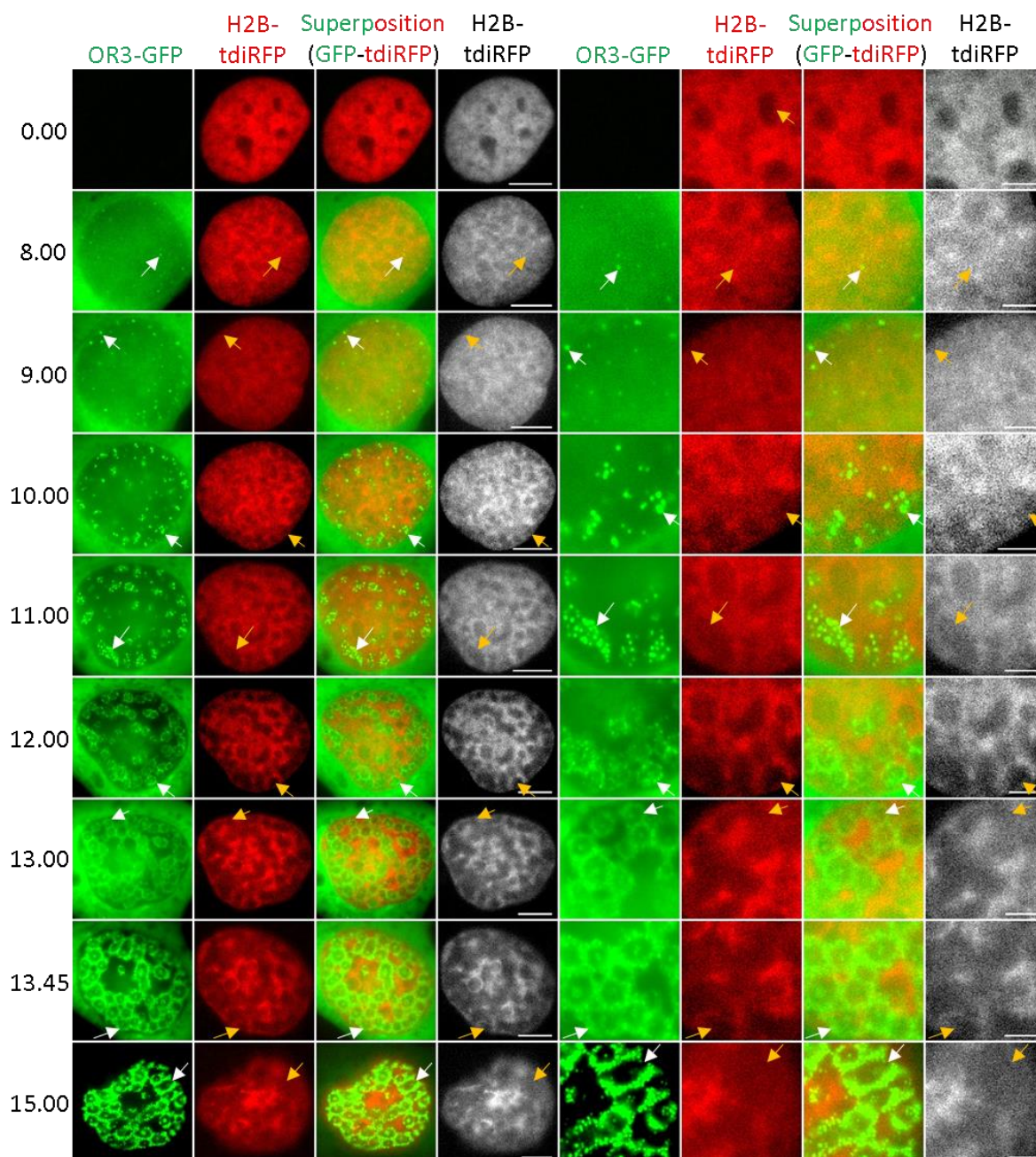


**Figure 20. Les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments intranucléaires dépourvus en histones et en ADN cellulaire. (A)** Des cellules U2OS-H2B-tdiRFP sont incubées avec le virus modifié Ad5-ANCHOR pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (16 h et 24 h) et les noyaux ont été marqués par du DAPI (gris). La protéine OR3-GFP (vert) permet de visualiser les génomes viraux et la chromatine est visualisée par l'histone H2B-tdiRFP (rouge). **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (CR précoces à 16 h), c-d (CR précoces à 24 h) et e-f (ViPR). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m).

Vingt-quatre heures après l'infection, les CR précoces (flèches blanches) et les ViPR (flèches bleues) présentent tous deux des signaux faibles pour H2B-tdiRFP. Les intensités de fluorescence pour les deux protéines OR3-GFP et H2B-tdiRFP ont été reportées en plus de celle du DAPI le long d'axes choisis (Figure 20B). Les pics OR3-GFP correspondant soit à des CR précoces (axes a-b, c-d et e-f), soit à des ViPR (axe g-h) coïncident systématiquement avec les signaux les plus faibles pour H2B-tdiRFP (flèches

jaunes pour les CR précoces et flèches bleues pour les ViPR). Seuls les ViPR comportent des signaux élevés pour le DAPI, reflétant l'accumulation de l'ADN viral dans ces structures.

Ces résultats montrent que les CR précoces et tardifs ainsi que les ViPR sont bien des zones dépourvues d'histones. Par la suite, nous avons voulu suivre l'évolution des génomes viraux et des histones en temps réel dans les cellules infectées.



**Figure 21. Les génomes viraux répliqués s'accumulent dans des compartiments intranucléaires qui grossissent et qui excluent la chromatine cellulaire au cours de l'infection.** Des cellules U2OS sont transfectées avec 2  $\mu$ g de plasmide codant pour la protéine H2B-tdiRFP. Les cellules sont infectées sans synchronisation d'infection (24 h après transfection) avec le virus modifié Ad5-ANCHOR. Une cellule vivante est suivie toutes les 15 minutes dès le début de l'infection (0.00) jusqu'à 15 h (15.00). Les signaux OR3-GFP (vert) et H2B-tdiRFP (rouge et gris) sont analysés. Microscopie plein champs (X63). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m et 1  $\mu$ m pour les agrandissements).

Les cellules U2OS ont été transfectées avec le plasmide codant pour H2B-tdiRFP puis infectées 24 h après la transfection avec à la fois le virus modifié Ad5-*ANCHOR* et avec la souche Ad5 délétée de la région E3. Sans réaliser de synchronisation d'infection pour cette expérience, une cellule dès le début de l'infection, a été suivie par microscopie plein champs. Les acquisitions ont été effectuées toutes les 15 min jusqu'à 15 h après infection. Les premiers signaux OR3-GFP des génomes viraux sont détectés à partir de 8 h après l'infection et sous la forme de ponctuations intranucléaires discrètes (Figure 21, flèches blanches, condition à 8 h). Ces zones adoptent une morphologie sphérique et s'élargissent à mesure de la progression de l'infection. A partir de 12 h après infection, les signaux OR3-GFP sont de plus en plus marqués et ils se localisent en majorité en périphérie de ces structures sphériques. Dans toutes les zones où s'accumulent les génomes viraux, on observe un faible signal pour H2B-tdiRFP (flèches jaunes) jusqu'à 15 h. Ces résultats montrent que les génomes viraux répliqués dans les différentes structures ne sont pas associés à des histones cellulaires.

#### **I.4 Conclusion générale du chapitre.**

En accord avec les travaux antérieurs du laboratoire (388), l'ensemble de ces résultats montre que dans notre modèle d'étude, l'infection des cellules U2OS par l'Ad5 induit la formation de structures associées au génome viral, les CR précoces, les CR tardifs et les ViPR. Que ce soit dans les cellules vivantes ou les cellules fixées, ces expériences suggèrent que toutes ces structures sont dépourvues d'histones cellulaires et, par conséquent que les génomes viraux qui s'y accumulent (soit pendant la réplication du génome, soit après dans les ViPR) ne sont pas chromatinisés par les histones cellulaires. Il est à noter que la protéine Mybbp1 caractérisant les ViPR est retrouvée à la périphérie des CR précoces dans les cellules U2OS.

## Chapitre 2

### II. Les chaperons d'histone CAF1 et FACT sont associés aux compartiments de réplication de l'Ad5.

Les mécanismes expliquant comment les histones cellulaires sont exclus des CR et des ViPR sont encore méconnus. Deux possibilités non mutuellement exclusives pourraient expliquer cette exclusion des histones de la chromatine cellulaire. La première possibilité pourrait être liée à la formation des CR viraux par LLPS. Ceci pourrait expliquer les propriétés sélectives des CR pour certaines macromolécules comme les histones cellulaires et à l'inverse la concentration d'autres macromolécules comme les génomes viraux ou les protéines DBP et USP7. Cependant, les histones ne sont pas sous forme libre dans les cellules mais sont soit associées à l'ADN, soit à des chaperons d'histones. Les chaperons d'histones sont impliqués dans la gestion des dimères d'histones pour les véhiculer de leur site de synthèse jusqu'au noyau et pour permettre leur dépôt ou leur éviction de l'ADN pour former la chromatine. La seconde possibilité est le recrutement spécifique (indépendamment ou non de la LLPS) de certains chaperons d'histones dans les CR. La suite de ce travail consiste à étudier la présence ou non de plusieurs chaperons candidats au niveau des CR et des ViPR induits par l'Ad.

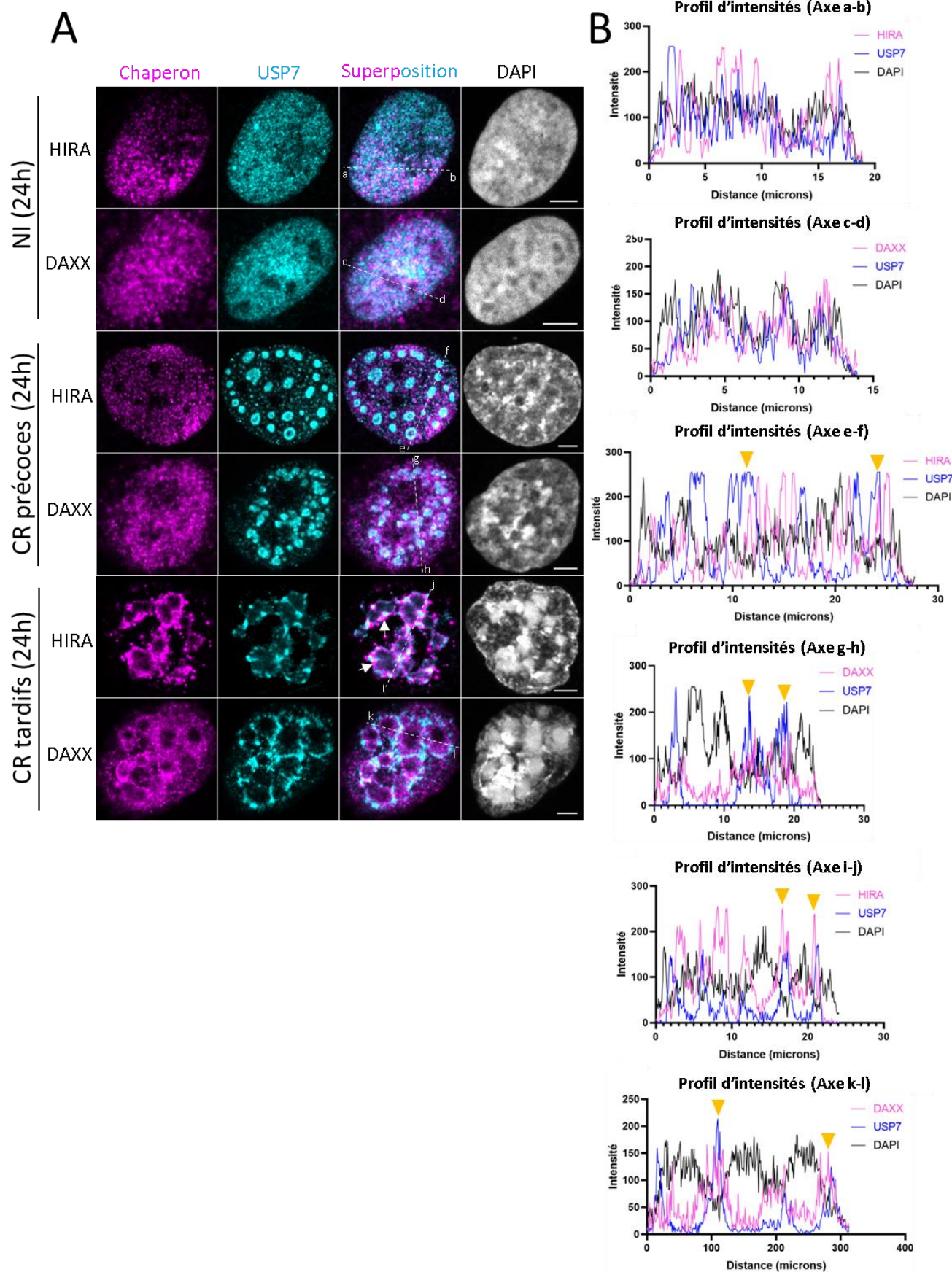
#### II.1 Localisation des chaperons d'histones dans les cellules U2OS infectées par l'Ad5.

##### II.1.1 HIRA et DAXX : chaperons d'histone H3.3.

Le dépôt de dimères d'histones par les chaperons d'histones est un processus qui dépend, ou non, de la réplication du génome cellulaire. Nous nous sommes d'abord intéressés aux chaperons d'histones HIRA et DAXX impliqués dans le dépôt du variant d'histone H3.3 indépendamment de la réplication. Des cellules U2OS ont été infectées dans les mêmes conditions que celles décrites à la figure 18A. Vingt-quatre heures après infection, les cellules ont été fixées et analysées par IF à l'aide d'anticorps anti-USP7, anti-HIRA et anti-DAXX. Les observations par microscopie confocale (Figure 22A) révèlent que HIRA et DAXX sont diffuses dans le noyau de cellules non infectées (NI) (Figure 22A) mais aussi dans les CR précoces des cellules infectées (Figure 22A). Les profils d'intensités (Figure 22B) rapportés le long de l'axe e-f pour HIRA (Figure 22A) et le long de l'axe g-h pour DAXX ne montrent aucun enrichissement spécifique dans les CR précoces au fort signal USP7 (têtes de flèches jaunes). En ce qui concerne les CR tardifs, HIRA est relocalisé au niveau de ces structures, à la fois à l'intérieur et en périphérie (Figure 22A). Le profil d'intensités (Figure 22B) rapporté le long de l'axe i-j révèle que les pics des signaux HIRA coïncident avec les pics des signaux USP7 correspondant aux CR tardifs (têtes de



flèches jaunes). De plus, les signaux HIRA sont systématiquement les plus faibles dans le reste du nucléoplasme par rapport aux CR. DAXX colocalise aussi partiellement avec les CR tardifs (Figure 22A).



**Figure 22. Les chaperons d'histones HIRA et DAXX sont relocalisés au niveau des CR tardifs dans des cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan), anti-DAXX (magenta) et anti-HIRA (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux **(A)** Contrôles non infectés (NI) (première et seconde lignes), CR précoces (troisième et quatrième lignes) et CR tardifs (cinquième et sixième lignes). **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, HIRA), c-d (NI, DAXX), e-f (CR précoces, HIRA), g-h (CR précoces, DAXX), i-j (CR tardifs, HIRA) et k-l (CR tardifs, DAXX). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 5 µm).

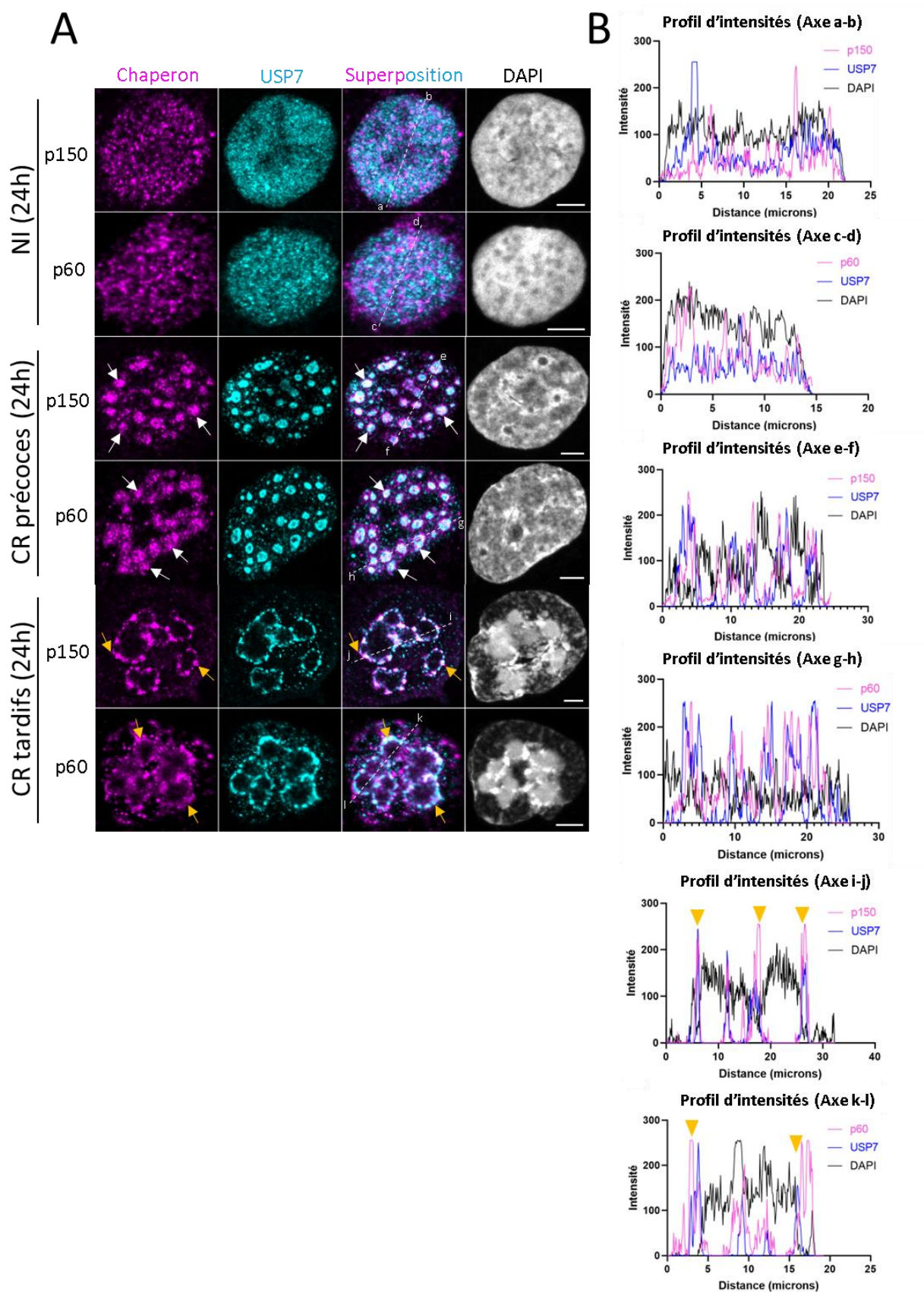
En plus d'être présent à l'intérieur des CR, DAXX est enrichi en périphérie et des signaux à l'intérieur des ViPR sont détectés. Le profil d'intensités (Figure 22B) révèle que les pics des signaux DAXX coïncident systématiquement avec les pics des signaux USP7 correspondant aux CR tardifs (têtes de flèches jaunes). Toutefois, des signaux élevés pour DAXX sont détectés dans la partie périphérique des ViPR et diminuent vers le centre des ViPR.

### II.1.2 CAF1 : chaperon d'histone H3.1.

Nous nous sommes ensuite intéressés au chaperon d'histone CAF1 connu pour être impliqué dans le dépôt du variant d'histone H3.1 durant la réplication du génome cellulaire. CAF1 est constitué des 3 sous-unités p150 (CHAF1a), p60 (CHAF1b) et p48 (RbAp48). Les cellules U2OS ont été infectées et analysées par IF comme précédemment à l'aide des anticorps anti-USP7 et des anticorps anti-p150 et anti-p60. Les 2 sous-unités p150 et p60 sont observées sous la forme de petites ponctuations dans tout le noyau de cellules non infectées (NI) (Figure 23A). Des signaux apparaissent aussi dans le cytoplasme. Dans les cellules infectées, p150 et p60 sont relocalisés à l'intérieur et en périphérie des CR précoces sous la forme de ponctuations, ce qui est confirmé par l'analyse des profils d'intensités (Figure 23B). Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux de Komatsu *et al.*, (357).

Pour ce qui est des CR tardifs, nos observations montrent pour la première fois que p150 et p60 sont relocalisés à l'intérieur et en périphérie de ces structures (Figure 23A). L'analyse des profils d'intensités (Figure 23B) montre que les signaux les plus élevés pour les 2 sous-unités coïncident systématiquement avec les pics des signaux USP7 des CR tardifs.



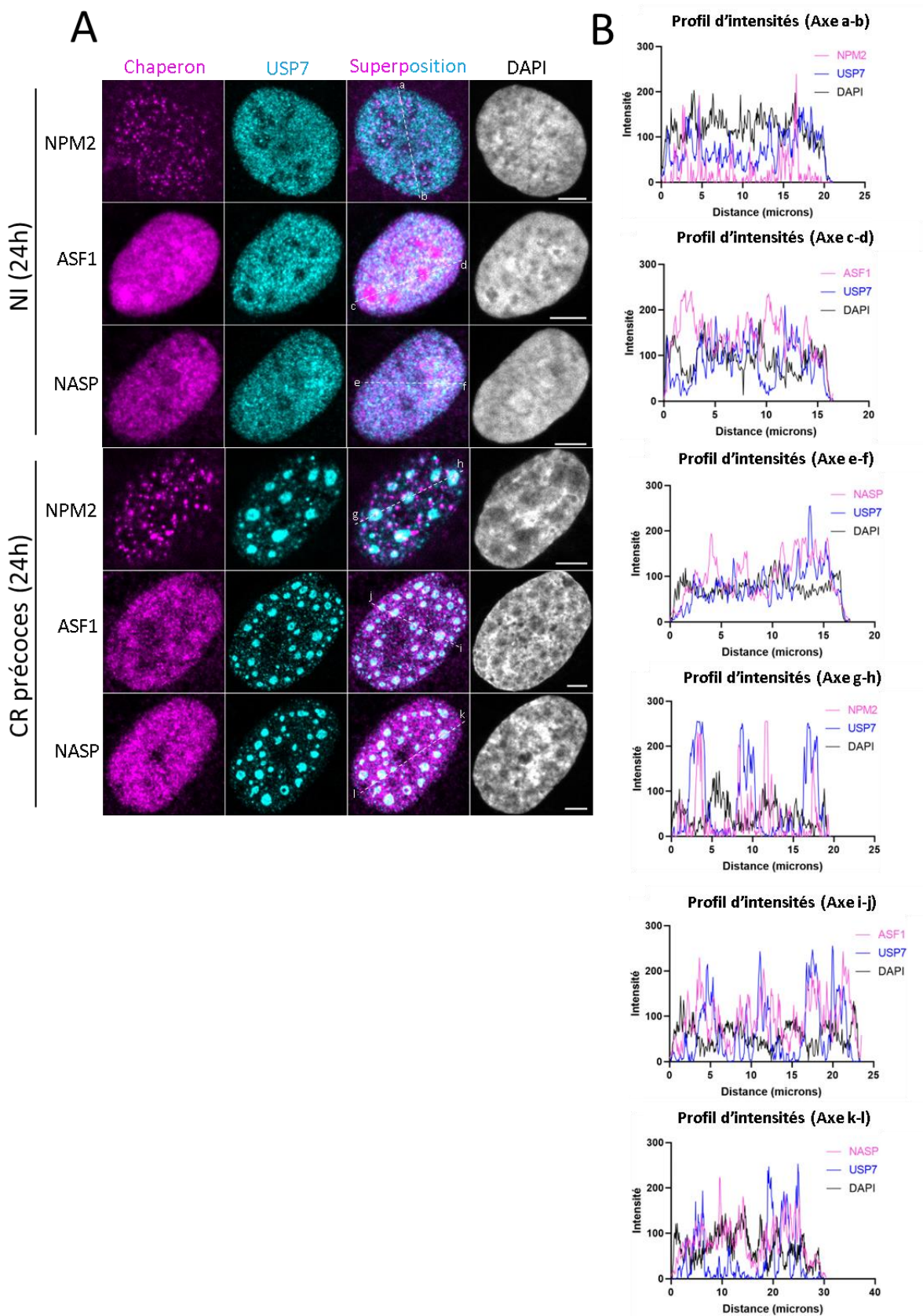


**Figure 23. Le chaperon d'histones CAF1 est relocalisé au niveau des CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les

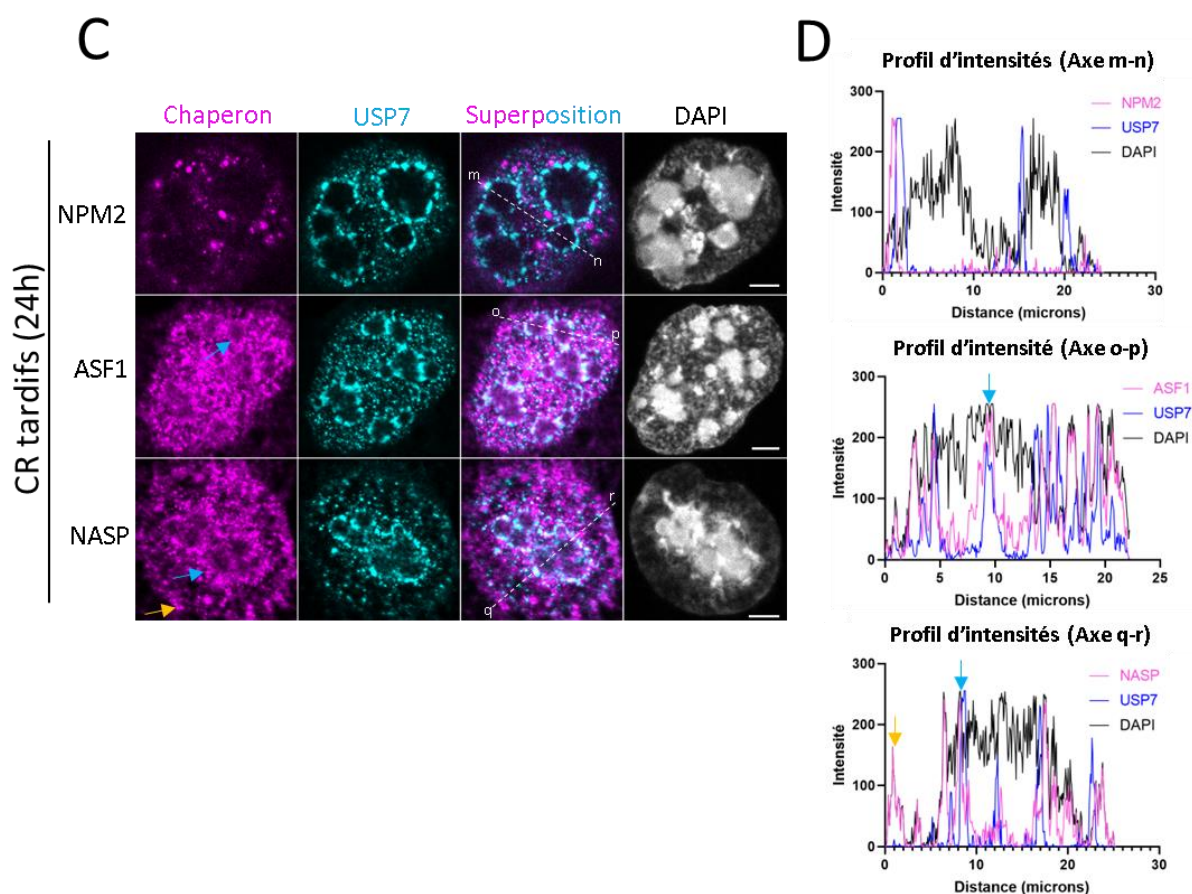
anticorps anti-USP7 (cyan), et les 2 anticorps anti-p150 (magenta) et anti-p60 (magenta) dirigés contre deux des 3 sous-unités de CAF1. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux **(A)** Contrôles non infectés (NI) (première et seconde lignes), CR précoces (troisième et quatrième lignes) et CR tardifs (cinquième et sixième lignes). **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, p150), c-d (NI, p60), e-f (CR précoces, p150), g-h (CR précoces, p60), i-j (CR tardifs, p150) et k-l (CR tardifs, p60). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m).

### II.1.3 NPM2, ASF1 et NASP : chaperons d'histones cargo et de stockage d'histones.

Nous avons également testé les chaperons d'histones ASF1, NASP et NPM2. NPM2 et ASF1 sont respectivement impliqués dans l'acheminement des dimères H2A-H2B et H3-H4 du cytoplasme au noyau et leur transmission à d'autres chaperons d'histones. NASP a été étudié pour son rôle de stockage des dimères H3-H4. Dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées précédemment, des cellules U2OS ont été infectées et analysées par IF par des anticorps anti-USP7 et des anticorps anti-NPM2, anti-ASF1 et anti-NASP. Les analyses par microscopie confocale révèlent que les signaux anti-ASF1 et anti-NASP sont diffus dans le noyau de cellules non infectées (NI) (Figure 24A). NPM2 est également détecté dans le noyau de cellules NI sous la forme de ponctuations et dans le cytoplasme sous la forme d'un signal faible et diffus (Figure 24A). Dans les cellules infectées, on n'observe pas de relocalisation de NASP ou de ASF1 dans les CR précoces. En revanche, les signaux NPM2 sont en partie associés aux CR précoces (Figure 24A et 24C). Pour ce qui est des CR tardifs, les signaux ASF1 et NASP colocalisent avec le marquage USP7 (Figure 24A et 24C). NPM2 est aussi détecté sous la forme de ponctuations pour lesquelles certaines colocalisent avec les CR tardifs et d'autres sont trouvées à proximité des CR tardifs (Figure 24D). Le profil d'intensité (Figure 24D, graphique du haut) rapporté le long de l'axe m-n présente un pic pour les signaux NPM2 à proximité d'un pic de USP7 correspondant à un CR tardif (pics de gauche). Il s'agit en effet d'une ponctuation NPM2 qui ne colocalise pas mais qui est à proximité d'un CR tardif. NPM2 est par conséquent rarement associé aux CR tardifs à la différence des chaperons d'histone ASF1 et NASP. Ils sont en effet à la fois associés aux CR et enrichis.





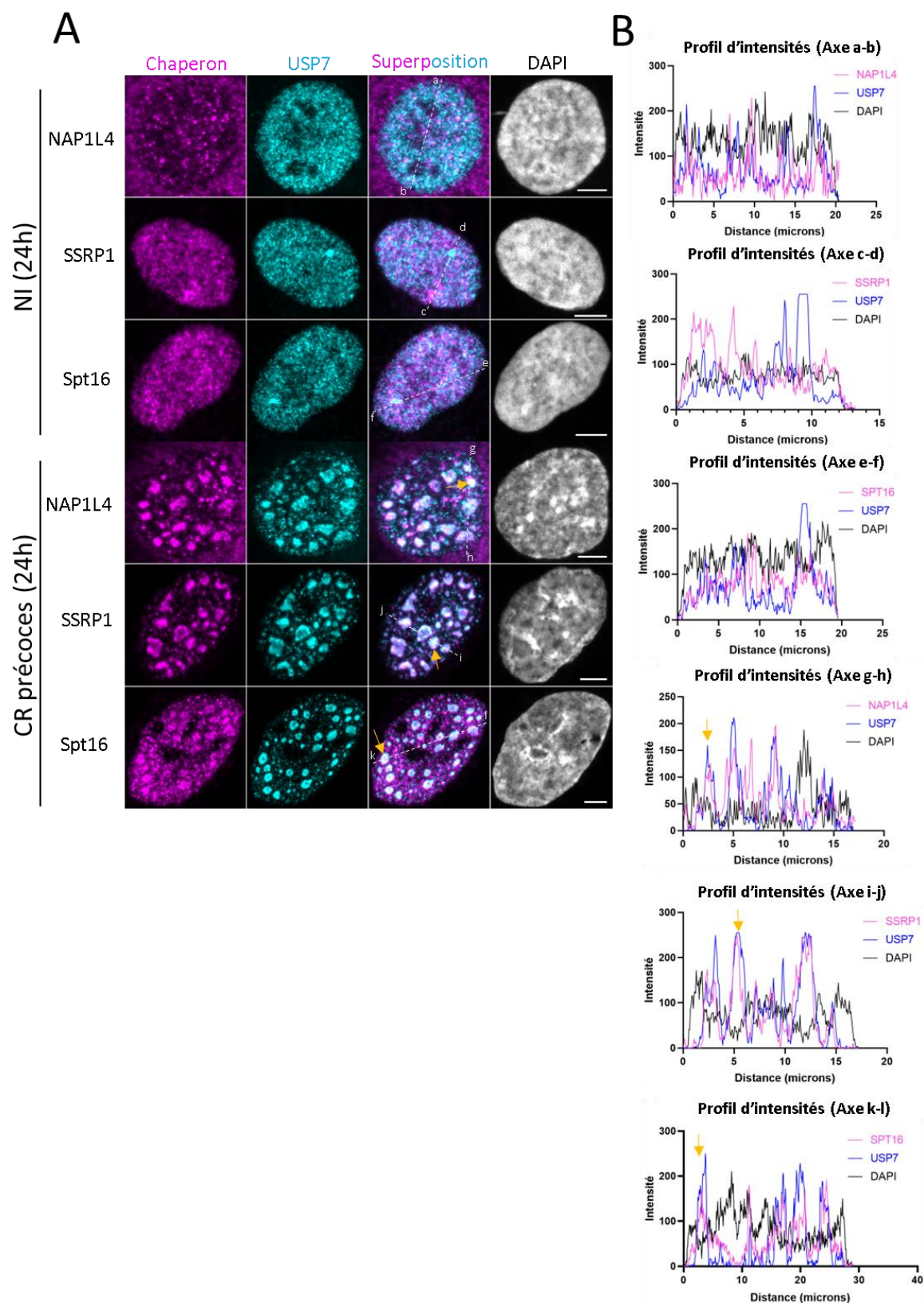


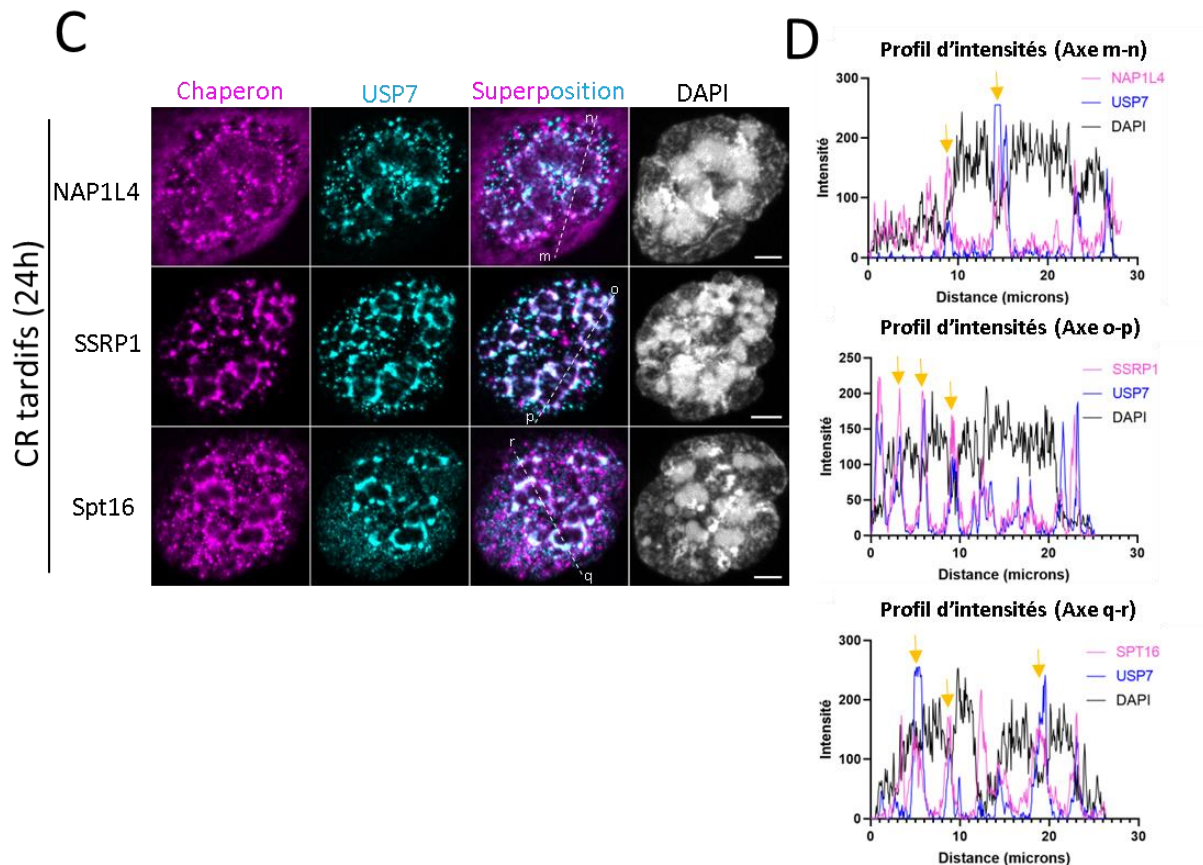
**Figure 24. Les chaperons d’histones NPM2, ASF1 et NASP sont associés aux CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l’infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan), et les anticorps anti-NPM2 (magenta), anti-ASF1 (magenta) et anti-NASP (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux **(A)** Contrôles non infectés (NI) (première, seconde et troisième lignes), CR précoces (quatrième, cinquième et sixième lignes). **(B)** Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, NPM2), c- d (NI, ASF1), e-f (NI, NASP), g-h (CR précoces, NPM2), i-j (CR précoces, ASF1) et k-l (CR précoces, NASP). **(C)** CR tardifs. **(D)** Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes m-n (CR tardifs, NPM2), o-p (CR tardifs, ASF1) et q-r (CR tardifs, NASP). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d’échelle, 5 µm).

#### II.1.4 NAP1L4 et FACT : chaperons de dimères d’histones H2A-H2B.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux chaperons d’histones NAP1L4 et FACT qui sont impliqués dans la gestion des dimères H2A-H2B. Si FACT est bien caractérisé dans la littérature pour avoir des rôles dans le dépôt *de novo* durant la réplication ou dans l’éviction et le repositionnement d’H2A-H2B durant la transcription du génome cellulaire (124), les fonctions de NAP1L4 (NAP2) restent peu décrites hormis un rôle dans la formation de nucléosomes par dépôt d’H2A-H2B (104). Comme précédemment, les cellules U2OS ont été infectées et analysées par IF avec des anticorps anti-USP7 et des anticorps

anti-SSRP1 (sous-unité de FACT), anti-Spt16 (sous-unité de FACT) et anti-NAP1L4. Les observations par microscopie confocale montrent que les 2 sous-unités de FACT sont localisées de manière diffuse dans les noyaux des cellules non infectées (NI) (Figure 25A).





**Figure 25. Les chaperons d’histones NAP1L4 et FACT sont relocalisés au niveau des CR précoces et tardifs dans des cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l’infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan), les anticorps anti-NAP1LA (magenta) et les 2 anticorps anti-SSRP1 (magenta) et anti-Spt16 (magenta) dirigés contre les 2 sous-unités de FACT. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux **(A)** Contrôles non infectés (NI) (première, seconde et troisième lignes), CR précoces (quatrième, cinquième et sixième lignes). **(B)** Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, NAP1L4), c-d (NI, SSRP1), e-f (NI, Spt16), g-h (CR précoces, NAP1L4), i-j (CR précoces, SSRP1) et k-l (CR précoces, Spt16). **(C)** CR tardifs. **(D)** Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes m-n (CR tardifs, NAP1L4), o-p (CR tardifs, SSRP1) et q-r (CR tardifs, Spt16). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d’échelle, 5 µm).

NAP1L4 est quant à elle détectée sous la forme de ponctuations dans le noyau et diffuse dans le cytoplasme des cellules NI (Figure 25A). En revanche, dans les cellules infectées, une relocalisation très nette est observée pour les protéines NAP1L4 et SSRP1 dans les CR précoces (Figure 25A). Des ponctuations pour ces 2 protéines sont également visibles à proximité des CR. Les profils d’intensités (Figure 25B) montrent que les pics de ces deux protéines coïncident presque systématiquement avec les pics USP7. Ces résultats démontrent que NAP1L4 et la sous-unité SSRP1 de FACT colocalisent avec les CR précoces et y sont enrichis. Le même résultat a été observé pour la sous-unité Spt16 de FACT (Figure 25A et 25C). Toutefois, la relocalisation de Spt16 est moins contrastée car cette protéine est également trouvée dans le reste du nucléoplasme mais avec des signaux plus faibles. Comme pour les

CR précoces, NAP1L4 et les 2 sous-unités de FACT colocalisent avec les CR tardifs (Figure 25C) et sont visibles à proximité des CR. Les profils d'intensités (Figure 25D) montrent que les signaux les plus élevés pour ces protéines coïncident presque systématiquement avec les pics USP7 des CR tardifs. L'ensemble des résultats montre que NAP1L4 ainsi que les 2 sous-unités de FACT (SSRP1 et Spt16) sont relocalisées et enrichies dans les CR précoces et tardifs.

## **II.2 Localisation des chaperons d'histones dans les cellules MRC5 et HFF-CAR infectées par l'Ad5.**

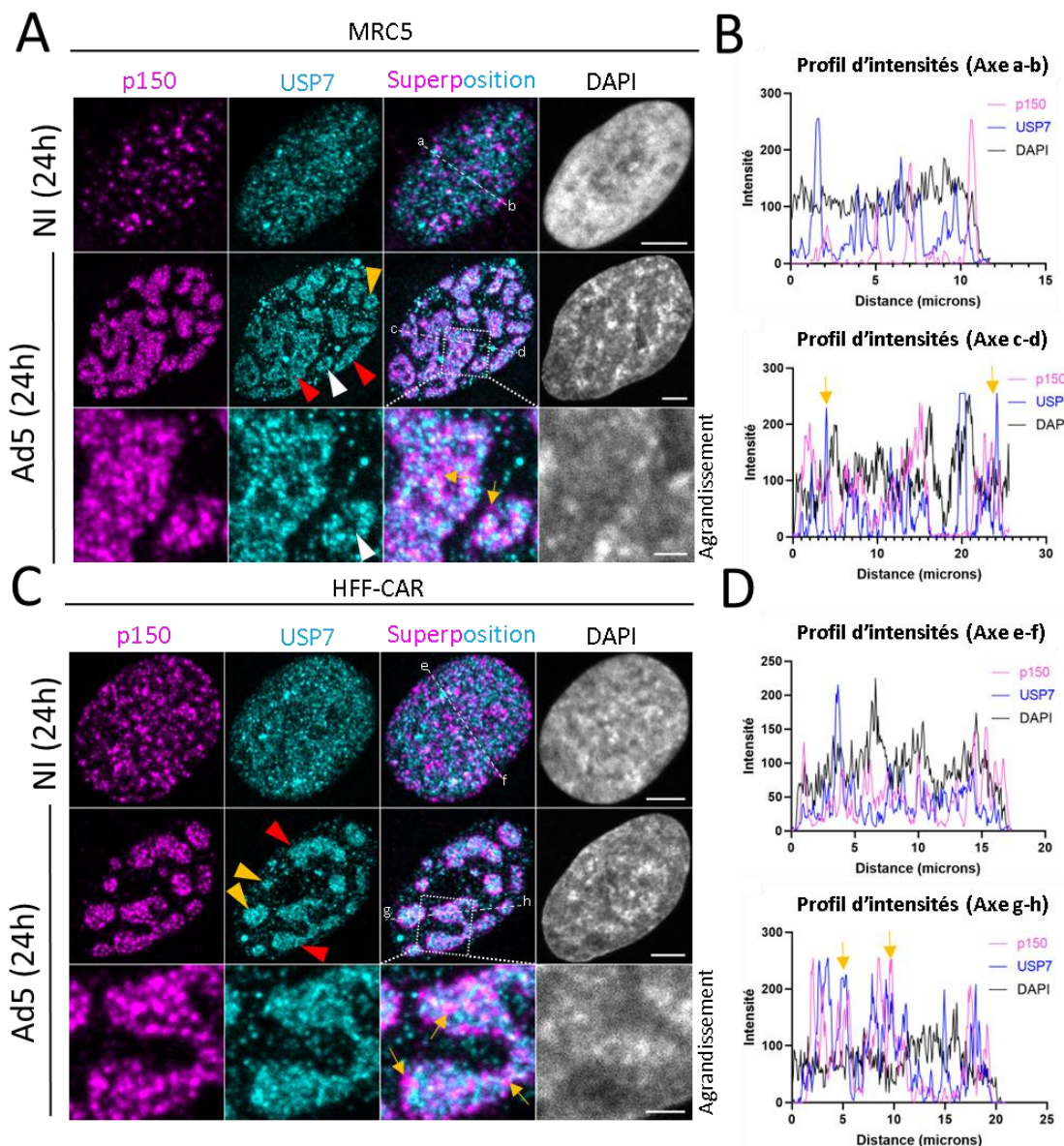
Nous avons voulu confirmer nos résultats précédents avec 2 autres lignées cellulaires permissives à l'infection de l'Ad5. La lignée cellulaire MRC5 (Normal Human Foetal Lung Fibroblast Cells) et des fibroblastes humains immortalisés (HFF-CAR, Human Foreskin Fibroblast) ont ainsi été utilisés.

### **II.2.1 CAF1 : chaperon d'histone H3.1.**

Les 2 lignées cellulaires MRC5 et HFF-CAR sont infectées dans les mêmes conditions expérimentales que les U2OS. Les cellules sont fixées 24 h après infection et analysées par IF au moyen d'anticorps anti-USP7 et anti-p150. Les observations par microscopie confocale montrent que la sous-unité p150 de CAF1 est détectée dans le noyau de cellules MRC5 (Figure 26A) et le noyau de cellules HFF-CAR (Figure 26C) non infectées (NI) sous la forme de ponctuations plus ou moins nombreuses. Vingt-quatre heures après infection et dans ces conditions expérimentales, les cellules infectées comportent essentiellement des CR précoces avec une morphologie plus ou moins sphérique et allongée (Figure 26A et 26C) et des CR précoces avec une morphologie en anneau (Figure 26A, tête de flèche blanche). Il a été montré que les CR tardifs se forment plus tardivement avec la lignée cellulaire HFF (36 h) (389) ou encore avec des cellules épithéliales bronchiques à 34 h après infection (278). Les CR tardifs ont une morphologie en anneaux irréguliers et pour lesquels des signaux élevés pour le DAPI sont présents au centre et correspondent à une accumulation de génomes viraux concordant avec les ViPR décrits pour les cellules U2OS (388).

Comme pour la lignée cellulaire U2OS, la sous-unité p150 de CAF1 est relocalisée et enrichie dans les CR précoces pour les 2 lignées MRC5 (Figure 26A) et HFF-CAR (Figure 26C). Les signaux anti-p150 colocalisent en effet presque totalement avec les CR visualisés par les signaux USP7. Les profils d'intensités (Figure 26B et 26D) montrent que les pics p150 coïncident presque systématiquement avec les pics USP7 correspondant aux CR précoces.

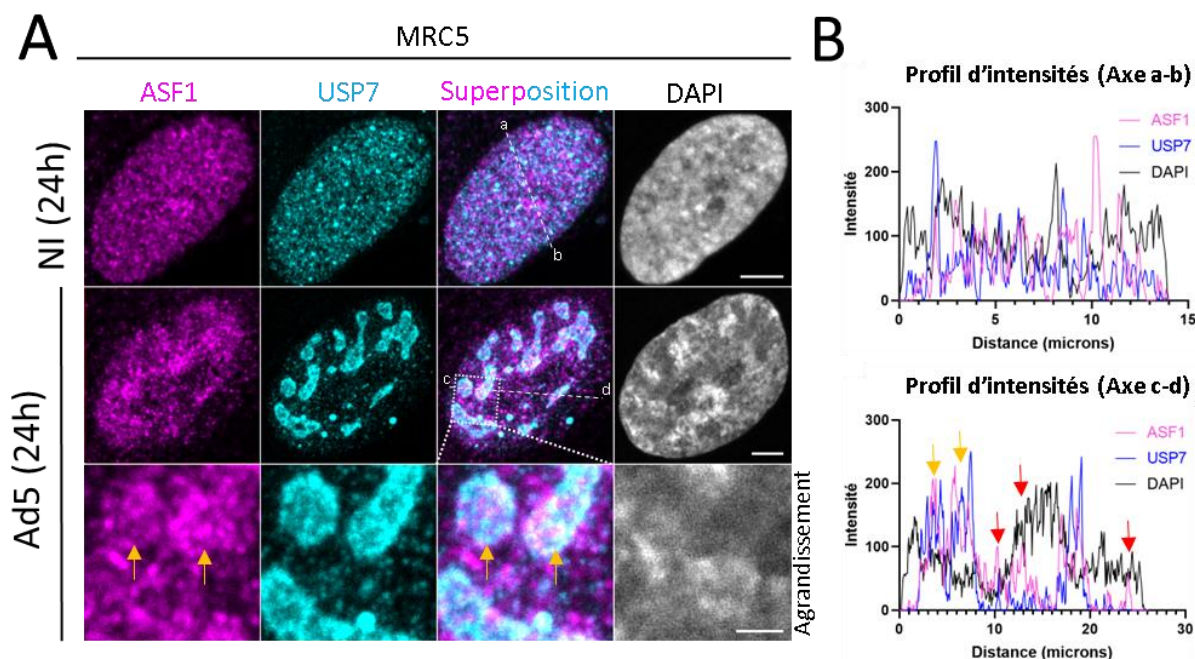




**Figure 26. Le chaperon d'histones CAF1 est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.** Des cellules MRC5 (A) et HFF-CAR (C) sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-p150 (magenta) pour visualiser une des 3 sous-unités de CAF1. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux (A) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (MRC5). (B) Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, MRC5) et c-d (CR précoces, MRC5). (C) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (HFF-CAR). (D) Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, HFF-CAR) et c-d (CR précoces, HFF-CAR). (E) Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes e-f (NI, HFF-CAR) et g-h (CR précoces, HFF-CAR). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 5 µm).

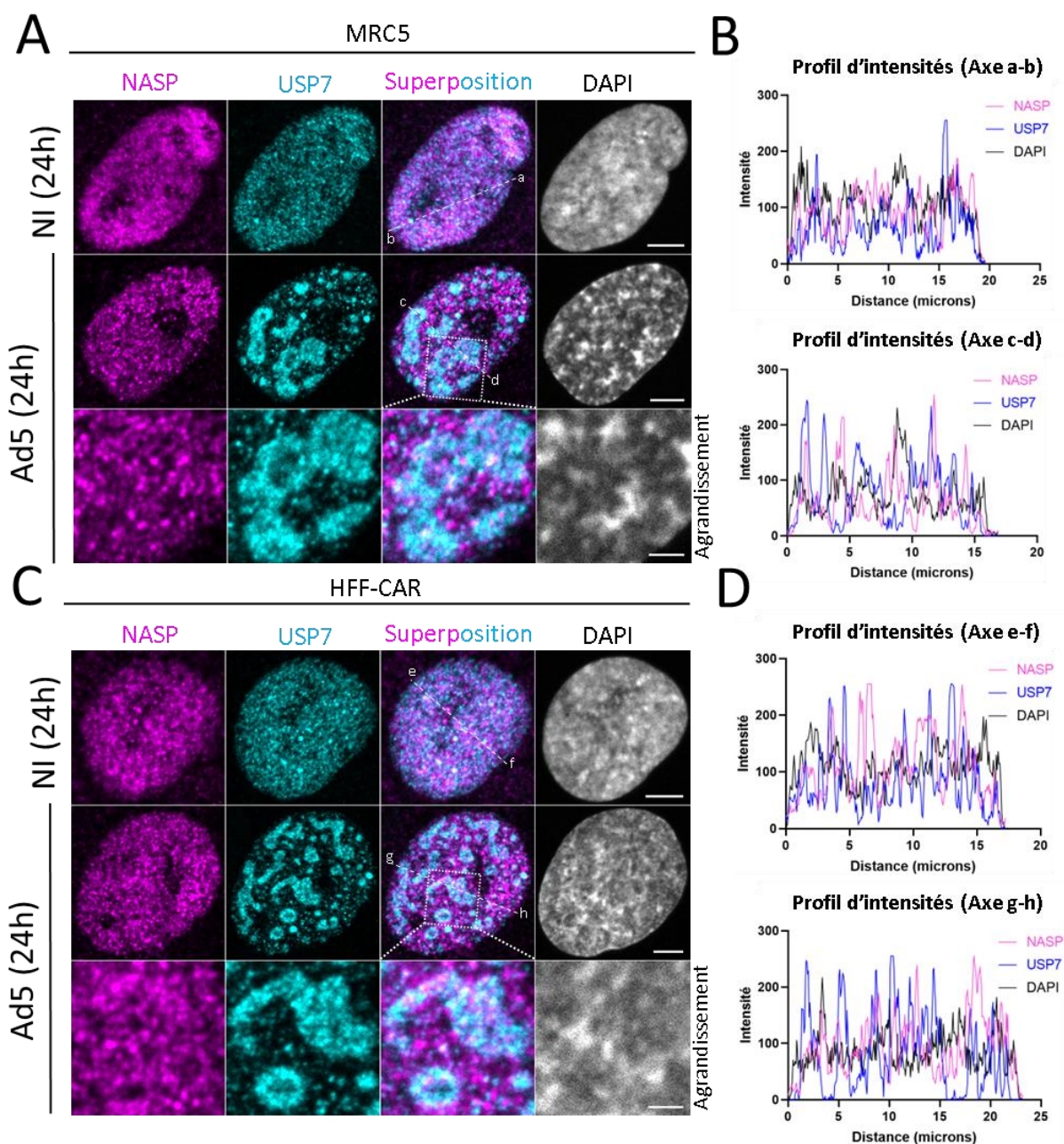


## II.2.2 ASF1 et NASP : chaperons cargo et de stockage de dimères d'histones H3-H4.



**Figure 27. Le chaperon d'histones ASF1 est présent et faiblement enrichi dans les CR précoces et dans des cellules MRC5 infectées.** Des cellules MRC5 sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-ASF1 (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. **(A)** Contrôles non infectés (NI) et (CR précoces). **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI) et c-d (CR précoces). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ ).

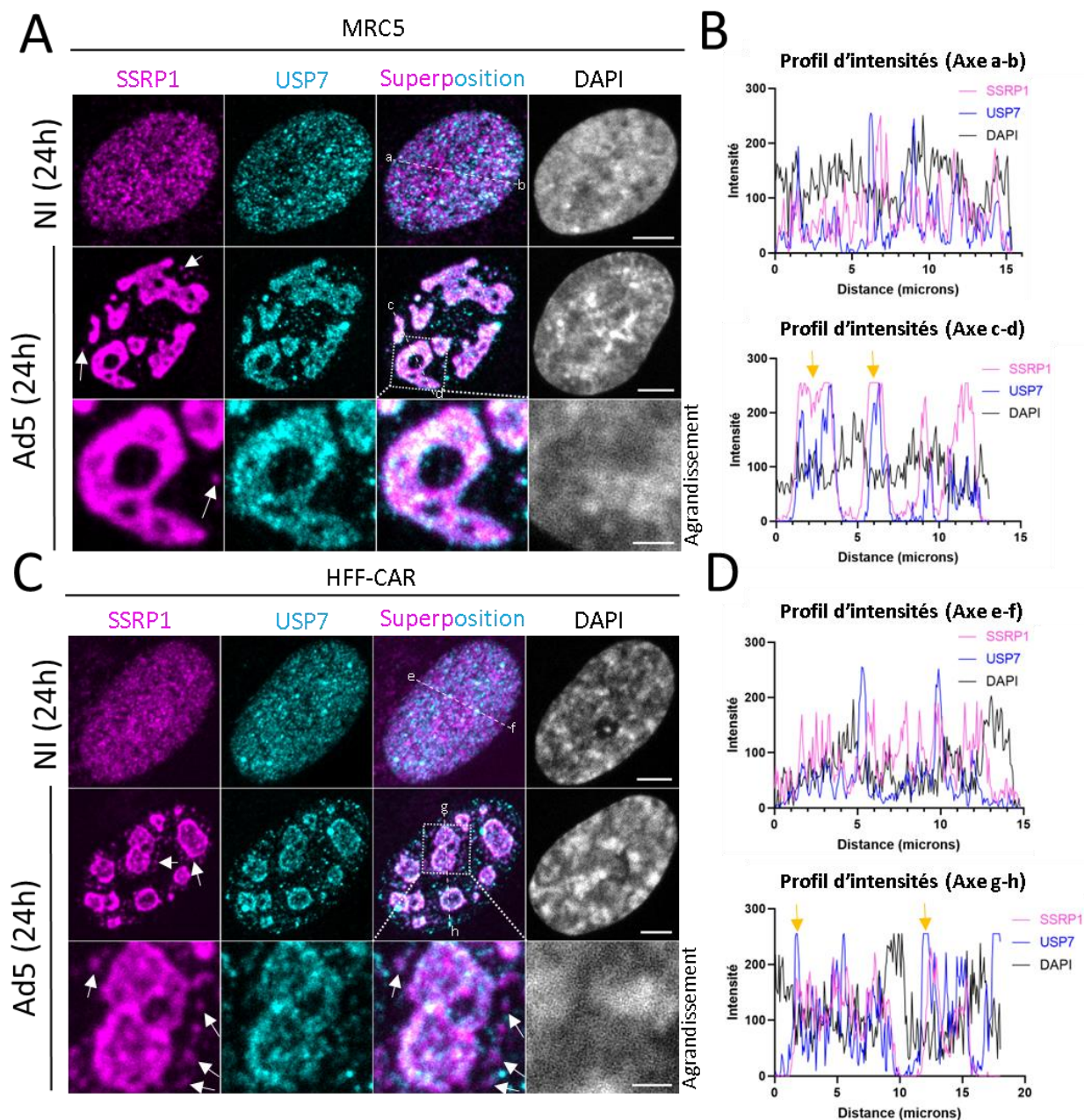
Comme pour les cellules U2OS, les chaperons d'histones ASF1 (Figure 27) et NASP (Figure 28) ont une localisation diffuse dans les noyaux non infectés (NI) et ce pour les 2 lignées MRC5 et HFF-CAR. Dans les cellules infectées, nous n'observons pas d'enrichissement spécifique dans les CR, ni pour ASF1, ni pour NASP dans les cellules MRC5. L'analyse des profils d'intensités pour les cellules MRC5 infectées corrobore ces observations (Figure 27B et 27B). Les mêmes résultats ont été obtenus avec NASP et les cellules HFF-CAR (Figure 28C).



**Figure 28. Le chaperon d’histones NASP est associé aux CR dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.** Des cellules MRC5 (A) et HFF-CAR (C) sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l’infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-NASP (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux (A) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (MRC5). (B) Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, MRC5) et c-d (CR précoces, MRC5). (C) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (HFF-CAR). (D) Profils d’intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes e-f (NI, HFF-CAR) et g-h (CR précoces, HFF-CAR). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d’échelle, 5 µm).

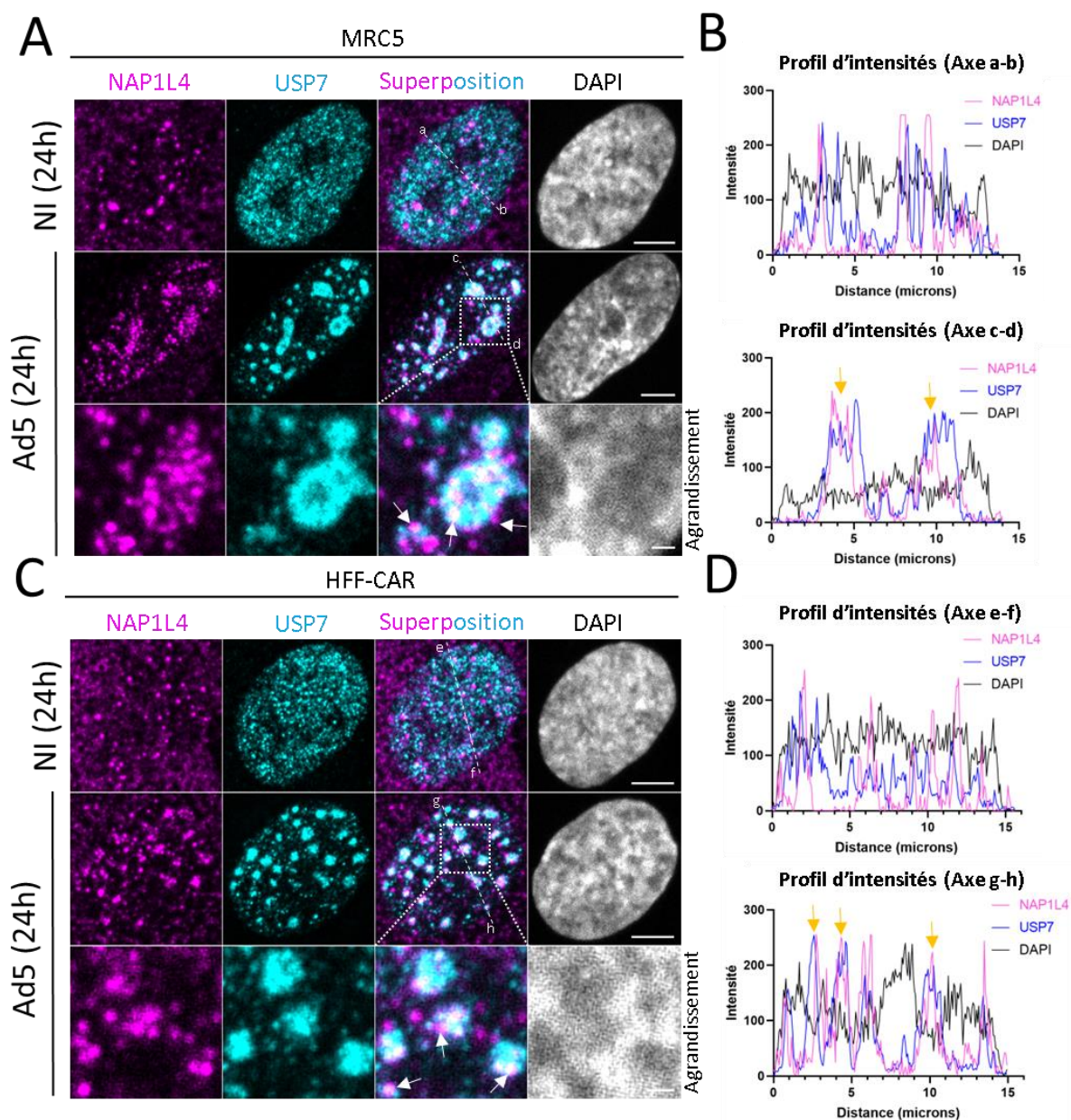


II.2.3 FACT et NAP1L4 : chaperons de dimères d'histones H2A-H2B.



**Figure 29. La sous-unité SSRP1 du chaperon d'histones FACT est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR.** Des cellules MRC5 (A) et HFF-CAR (C) sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-SSRP1 (magenta) pour visualiser une des 2 sous-unités de FACT. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux (A) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (MRC5). (B) Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, MRC5) et c-d (CR précoces, MRC5). (C) Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (HFF-CAR). (B) Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes e-f (NI, HFF-CAR) et g-h (CR précoces, HFF-CAR). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 5 µm).

Dans les cellules MRC5 (Figure 29A) et HFF-CAR (Figure 29C) non infectées, la sous-unité SSRP1 du complexe FACT est diffuse dans le noyau. En revanche, dans les cellules infectées, on observe une relocalisation très nette de SSRP1 dans les CR pour les deux lignées cellulaires. L'analyse des profils d'intensités (Figure 29B et 29D) montre que les pics SSRP1 coïncident systématiquement avec les pics d'USP7.



**Figure 30. Le chaperon d'histones NAP1L4 est relocalisé au niveau des CR précoces dans des cellules MRC5 et HFF-CAR infectées.** Des cellules MRC5 (A) et HFF-CAR (C) sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-NAP1LA (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. **(A)** Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (MRC5). **(B)** Profils d'intensités des signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes a-b (NI, MRC5) et c-d (CR précoces, MRC5). **(C)** Contrôles non infectés (NI) et CR précoces (HFF-CAR). **(D)** Profils d'intensités des

signaux rapportés en fonction de la distance le long des axes e-f (NI, HFF-CAR) et g-h (CR précoces, HFF-CAR). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ ).

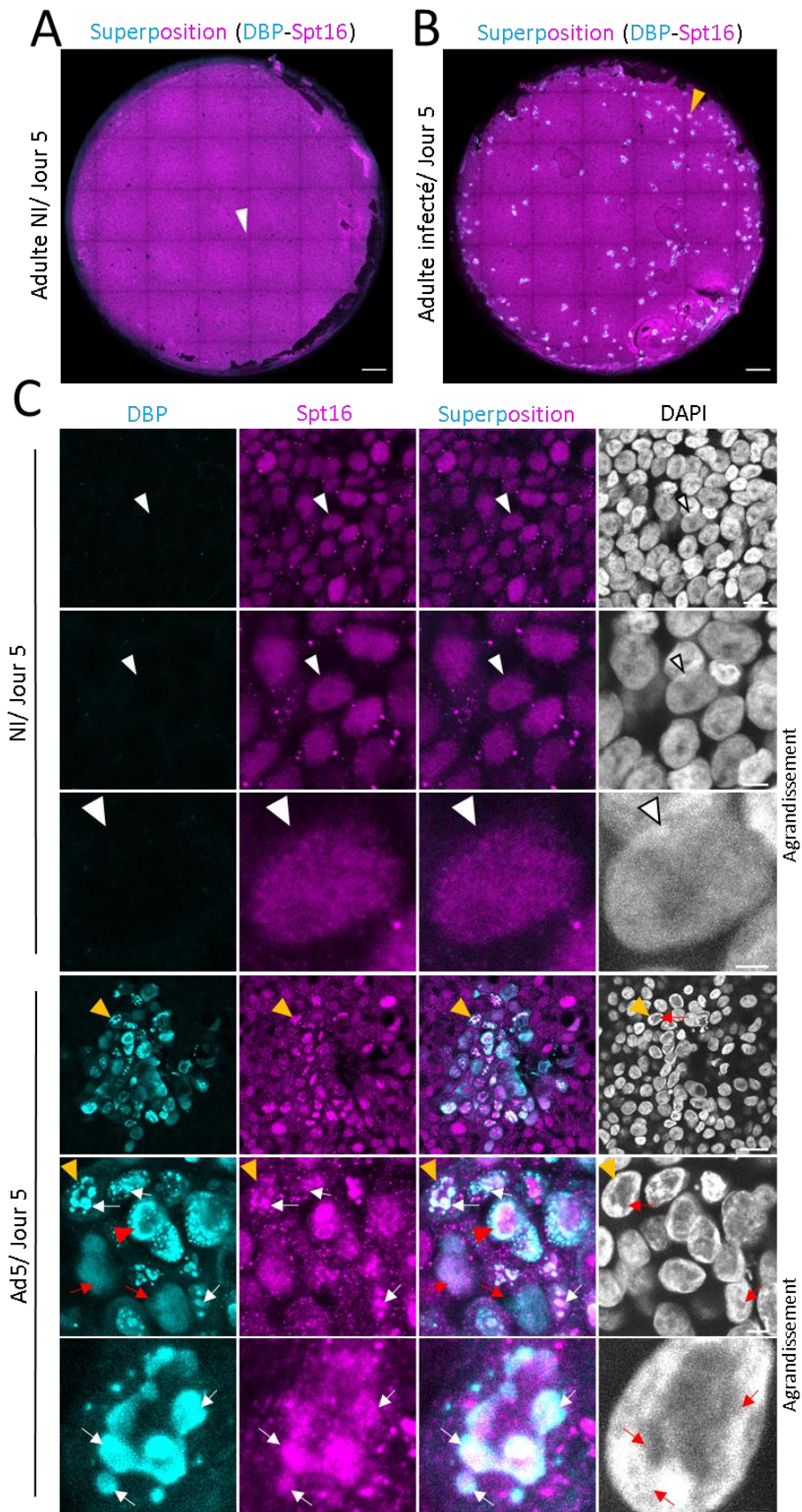
En ce qui concerne NAP1L4, cette protéine est détectée sous la forme de ponctuations intranucléaires dans les cellules MRC5 (Figure 30A) et HFF-CAR (Figure 30C) non infectées. Cette protéine est également détectée dans le cytoplasme des 2 lignées cellulaires. Dans les cellules infectées, NAP1L4 est enrichie dans les CR sous la forme de petites ponctuations (flèches blanches) que ce soit avec les MRC5 (Figure 30A) ou avec les cellules HFF-CAR (Figure 30C). Cette association de NAP1L4 avec les CR est confirmée avec les profils d'intensités (Figure 30B et 30D).

#### **II.2.4 Localisation de la sous-unité Spt16 de FACT dans des cellules infectées d'un épithélium bronchique reconstitué.**

Comme détaillé dans le matériel et méthode, un modèle primaire d'épithéliums bronchiques reconstitués d'adultes a été utilisé pour étudier l'infection par le SARS-CoV-2 et par l'Ad5. Nous avons voulu savoir si, dans ce système plus proche de la réalité physiologique que les lignées cellulaires, la sous-unité Spt16 de FACT était bien relocalisée dans les CR des cellules infectées. Pour ce faire, des épithéliums bronchiques d'adultes ont été reconstitués à partir de biopsies de tissus bronchiques de patients (voir matériel et méthode). Ils ont ensuite été infectés avec  $2.3 \times 10^9$  pp d'Ad5 par épithélium pendant 1 h avant d'être lavés pour éliminer les virus libres. Cinq jours après l'infection, les épithéliums sont fixés et analysés par IF avec des anticorps anti-DBP pour visualiser les cellules infectées et avec l'anticorps anti-Spt16. Le même marquage avec l'anticorps anti-SSRP1 a également été réalisé en parallèle et les mêmes résultats ont été obtenus (données non montrées). A faible grossissement, l'observation par microscopie confocale de l'intégralité des épithéliums, montre la présence de zones circulaires floues visualisées par les signaux DBP (Figure 31B, flèche jaune). Ces régions correspondent à des foyers d'infection. L'un de ces foyers a été observé et analysé à plus fort grossissement (Figure 31C). Il se compose de nombreuses cellules dans lesquelles un signal pour DBP est visible dans le noyau. Un de ces noyaux a été analysé à plus gros grossissement (Figure 31C, flèche jaune). Plusieurs types de marquages DBP sont observés dans ces épithéliums. DBP est détectée soit diffuse dans certains noyaux (tête de flèche rouge), soit sous la forme de ponctuations plus ou moins sphériques (flèches blanches) semblables à des CR précoces ou encore sous la forme d'un marquage en anneau semblable à des CR tardifs (tête de flèche rouge). Dans ces conditions expérimentales, il est difficile de distinguer de façon certaine les CR précoces des CR tardifs car l'infection des cellules n'est pas synchronisée. La propagation du virus semble en effet inégale comme suggérée par des signaux DBP diffus dans les noyaux infectés en bordure des foyers d'infection. De plus, les signaux DAPI sont systématiquement



exclus lorsque DBP est sous la forme d'un marquage en anneau ou ponctiforme (têtes de flèches jaunes).



**Figure 31. Spt16 est observée au niveau des CR dans un contexte physiologique au sein d'un épithélium bronchique reconstitué d'adulte 5 j pi.** Deux épithéliums bronchiques reconstitués d'adulte, infecté en (B), (C, lignes 3 à 4) et non infecté (NI) en (A) et (C, lignes 1 à 3) sont infectés avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium puis lavés 1 h après infection. Après fixation (5 j), une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (cyan) et anti-Spt16 (magenta) pour visualiser une des 2 sous-unités de FACT. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. **(A)** Vue globale de l'épithélium non infecté (NI). **(B)** Vue globale de l'épithélium infecté. **(C)** Vues agrandies. Contrôle (NI, lignes 1 à 3) et épithélium infecté (lignes 4 à 6). Microscopie confocale (X10) en (A), (B) et (X63) en (C). Projections en Z (48  $\mu\text{m}$ ) en (A) et (B). (Barre d'échelle, 500  $\mu\text{m}$ ). Projections en Z, 1  $\mu\text{m}$  (C, lignes 1, 2, 3, 5 et 6), 1,5  $\mu\text{m}$  (C, ligne 4). (Barres d'échelles, 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  respectivement pour les lignes 1 à 3 et 20  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  respectivement pour les lignes 4 à 6).

Comme pour les lignées cellulaires U2OS, MRC5 et HFF-CAR, la sous-unité Spt16 du chaperon d'histone FACT colocalise et est relocalisée dans les CR dépourvus de marquage DAPI dans ces épithéliums bronchiques reconstitués.

L'ensemble des résultats obtenus pour différents chaperons d'histones, dans les différents modèles cellulaires sont récapitulés dans le Tableau 16. Nos résultats montrent que les 2 chaperons CAF1 et FACT sont relocalisés dans les CR au cours de l'infection.

<b>Chaperons d'histones</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Localisation CR précoces</b>	<b>Localisation CR tardifs</b>
HIRA	Dépôt du variant H3.3 (Indépendant de la réplication)	Association (U2OS)	Association en périphérie Relocalisation et enrichissement (U2OS)
DAXX	Dépôt du variant H3.3 (Dépendant de la réplication)	Association (U2OS)	Relocalisation et enrichissement (U2OS)
CAF1 (sous-unités p150 et p60)	Dépôt du variant H3.1 (Dépendant de la réplication)	-p60: Enrichissement et présence en périphérie (U2OS) -p150: Enrichissement et présence en périphérie (U2OS, MRC5 et HFF-CAR)	Enrichissement (U2OS) et forte proximité
NPM2	-Cargo, stockage et donneur d'H2A-H2B. -Dépôt d'H2A-H2B?	Association et à proximité (U2OS)	Faible association et à proximité (U2OS)
ASF1	-Cargo et donneur d'H3-H4 -Dépôt d'H3-H4 (Dépendant de la réplication)	Faible enrichissement (U2OS, MRC5 et HFF-CAR)	Enrichissement et à proximité (U2OS)
NASP	Stockage d'H3-H4	Association et pas d'enrichissement (U2OS, MRC5 et HFF-CAR)	Enrichissement et présence en périphérie (U2OS)
NAP1L4	-Dépôt d'H2A-H2B (Dépendant et indépendant de la réplication?) -Eviction d'H2A-H2B (?)	Relocalisation et enrichissement (U2OS, MRC5 et HFF-CAR)	Relocalisation et enrichissement (U2OS)
FACT (sous-unités SSRP1 et Spt16)	-Dépôt d'H2A-H2B (Dépendant de la réplication) -Eviction réversible d'H2A-H2B (transcription)	-Spt16: Relocalisation et enrichissement (U2OS et épithélium bronchique reconstitué) -SSRP1: Relocalisation et enrichissement (U2OS, MRC5 et HFF-CAR)	Relocalisation et enrichissement (U2OS)

**Tableau 16. Tableau bilan de l'étude de la localisation des chaperons d'histones.**

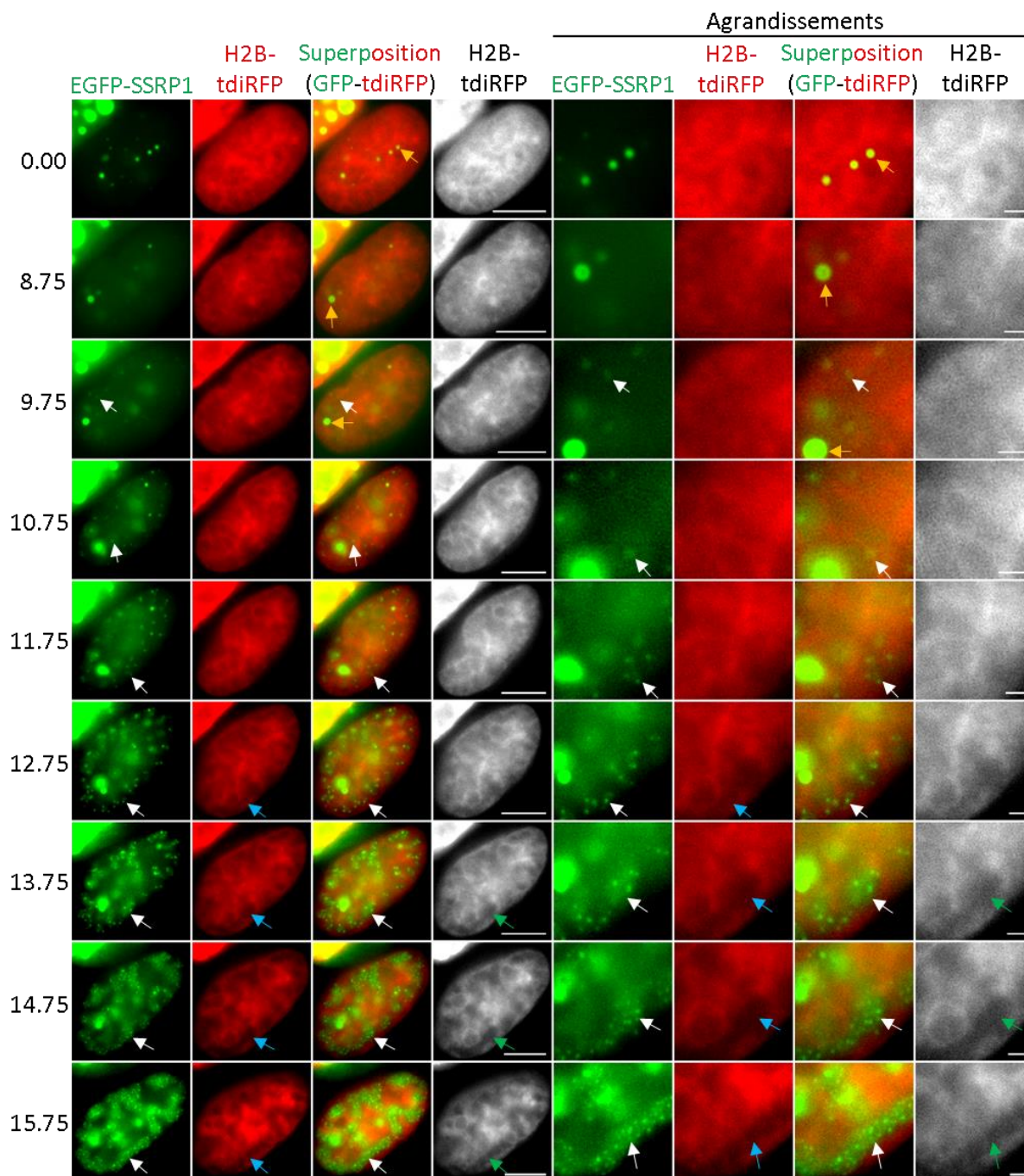
### II.3 CAF1 et SSRP1 sont relocalisés dans les cellules infectées par l'Ad5.

#### II.3.1 SSRP1 est recrutée dans les zones dépourvues d'histones au cours de l'infection.

Comme nous l'avons observé précédemment avec les cellules fixées, la sous-unité SSRP1 de FACT est relocalisée dans les CR précoces et tardifs 24 h après infection. Nous avons voulu déterminer la dynamique de cette association et vérifier l'absence d'histones dans ces structures. Pour cela, la lignée U2OS-H2B-tdiRFP a été transfectée avec un plasmide codant pour la protéine SSRP1 fusionnée à la protéine EGFP. L'expression de EGFP-SSRP1 nous permet de suivre sa localisation en temps réel dans



les cellules vivantes. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été infectées sans synchronisation avec 3000 pp/cellule.



**Figure 32. SSRP1 est recrutée dans les zones dépourvues d’histones au cours de l’infection par l’Ad5.** Des cellules U2OS-H2B-tdiRFP sont transfectées avec 2 µg de plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1. Les cellules sont infectées sans synchronisation d’infection (24 h après transfection) avec 3000 pp/cellule. Une cellule vivante exprimant EGFP-SSRP1 est suivie toutes les 15 minutes dès le début de l’infection (0.00) jusqu’à 15,75 h (15.75). Les signaux EGFP-SSRP1 (vert) et H2B-tdiRFP (rouge) ont été analysés. Microscopie plein champs (X63). (Barre d’échelle, 5 µm et 1 µm pour les agrandissements).

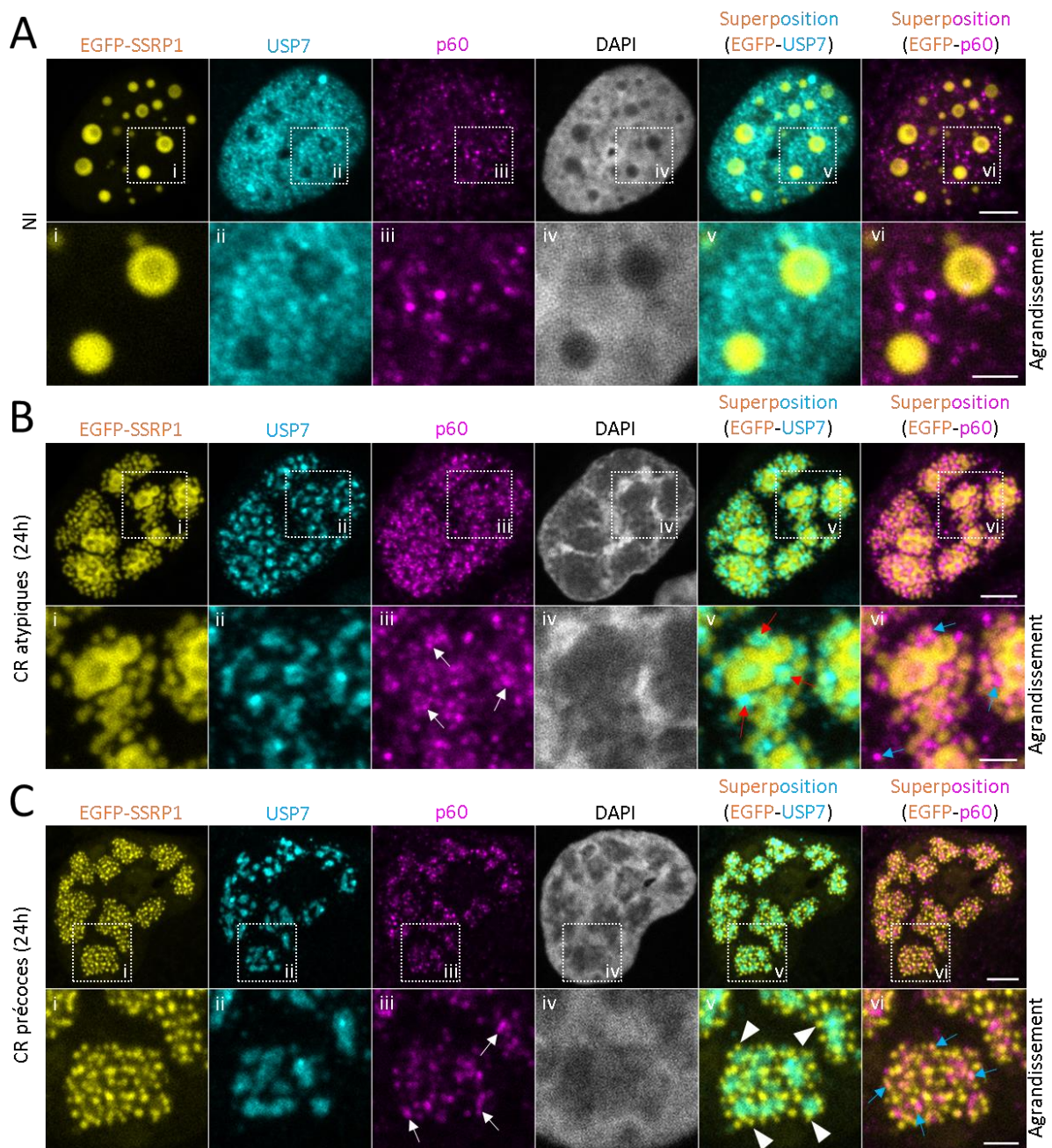
Une cellule exprimant la protéine EGFP-SSRP1 (flèches jaunes) a été choisie au commencement de l'infection (0.00 h sur le film) et elle a été suivie par microscopie plein champs à épifluorescence. Les acquisitions ont été effectuées toutes les 15 min jusqu'à 15,75 h. Un nombre important de petites ponctuations EGFP-SSRP1 (flèches blanches) apparaissent dans le noyau à partir de 9,75 h. A mesure que l'infection progresse, de plus en plus de ponctuations (flèches blanches) sont observées à partir de 11,75 h et ce jusqu'à 15,75 dans des zones du noyau dépourvues de protéines H2B-tDiRFP (flèches bleues). Un agrandissement de ces zones confirme l'absence de H2B-tDiRFP dans ces structures. Dans nos conditions expérimentales, la réplication du génome viral commence entre 8 h et 10 h après l'infection. Ces observations sont donc en faveur d'un recrutement de la protéine EGFP-SSRP1 au niveau des génomes viraux. Par ailleurs, les ponctuations EGFP-SSRP1 ont une localisation très similaire aux ponctuations observées précédemment pour la sous-unité p150 de CAF1. En raison de ces résultats, nous avons voulu savoir si les protéines SSRP1 et p150 sont recrutées au niveau des mêmes structures virales. En effet, comme le chaperon d'histones CAF1 est impliqué dans le dépôt de dimères d'histones H3-H4 et que FACT est lui nécessaire au dépôt de dimères H2A-H2B, leur colocalisation simultanée serait en faveur de la formation de nouveaux nucléosomes sur l'ADN viral répliqué.

### **II.3.2 SSRP1 et p60 sont relocalisées dans les mêmes structures au cours de l'infection.**

Afin de visualiser une colocalisation potentielle de EGFP-SSRP1 (FACT) et p60 (CAF1), des cellules U2OS ont été transfectées avec 2 µg de plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été infectées avec 3000 pp/cellule de façon synchrone. Vingt-quatre heures après, les cellules ont été fixées et analysées par IF avec les anticorps anti-USP7 et anti-p60. Dans les noyaux des cellules non infectées, EGFP-SSRP1 est observée sous la forme de nombreuses ponctuations sphériques dont USP7 et p60 sont exclues (Figure 33A).

Dans les cellules infectées, une accumulation de grosses ponctuations EGFP-SSRP1 plus ou moins ovoïdes et amorphes est observée (Figure 33B). De petites ponctuations EGFP-SSRP1 sont visibles à leur périphérie. La morphologie des CR semble altérée dans ces conditions. En effet, ces CR atypiques forment de nombreuses structures avec des morphologies plus ou moins allongées, moins sphériques par rapport aux CR de cellules non transfectées (Figure 18A) et souvent plus proches les unes des autres. Ces CR atypiques sont observés en périphérie des structures sphériques EGFP-SSRP1 (flèches rouges). La localisation de la protéine p60 n'est toutefois pas altérée et elle reste associée en périphérie des CR précoces (flèches blanches). Certaines ponctuations p60 colocalisent également avec EGFP-SSRP1 (flèches bleues). D'autres noyaux infectés ont été observés avec de nombreux signaux EGFP-SSRP1 (têtes de flèches blanches), sous la forme de petites ponctuations associées aux

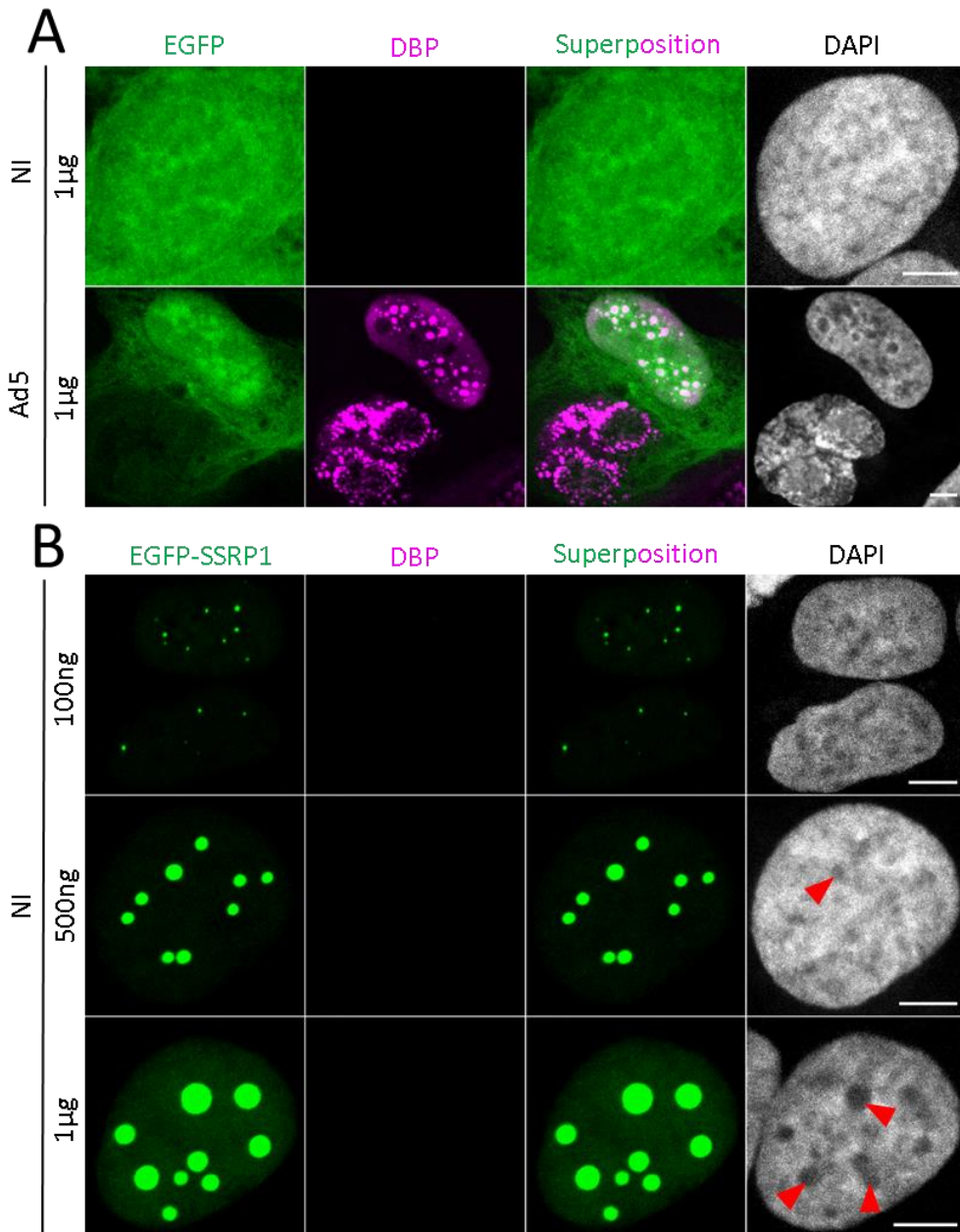
mêmes structures virales pauvres en signaux DAPI (Figure 33C). De manière similaire, la protéine p60 endogène (flèches blanches) est associée autour des CR.

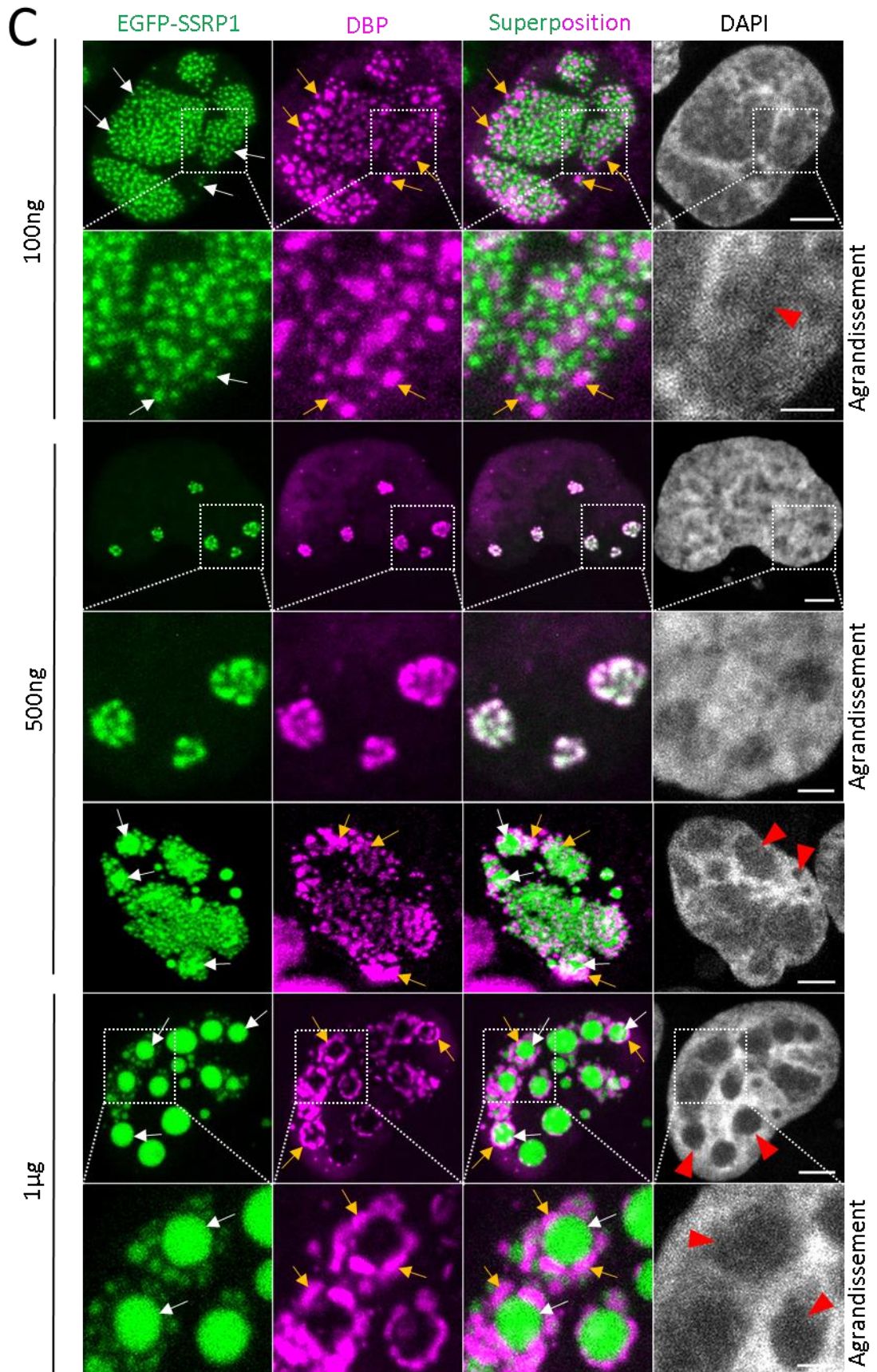


**Figure 33. SSRP1 et p60 sont relocalisées dans les mêmes structures dans des U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont transfectées avec 2 µg de plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1. Les cellules sont incubées (24 h après transfection) avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l’infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-p60 (magenta) pour visualiser une des 3 sous-unités de CAF1. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Les vues i, ii, iii, iv, v et vi, vii correspondent à des agrandissements des carrés en pointillés de la première ligne. **(A)** Contrôle non infecté (NI). **(B)** Cellules infectées avec une accumulation de grosses ponctuations EGFP-SSRP1. **(C)** Cellules infectées avec des petites ponctuations EGFP-SSRP1. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d’échelle, 5 µm et 2 µm pour les agrandissements).



Nous pouvons également observer que parmi les ponctuations EGFP-SSRP1 associées à ces structures, certaines colocalisent avec p60 (flèches bleues). La protéine p150 a été étudiée et des résultats similaires ont été trouvés (données non montrées). Les nombreuses colocalisations entre la protéine p60/p150 et la protéine EGFP-SSRP1 sont en faveur d'un recrutement simultané des 2 chaperons d'histones CAF1 et FACT sur des génomes viraux associés aux CR précoces. Ces résultats nous interrogent sur la possible formation de nouveaux nucléosomes par ces 2 chaperons d'histones sur l'ADN viral répliqué.





**Figure 34. La surexpression d'EGFP-SSRP1 perturbe la morphologie des CR viraux formés dans des noyaux de cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont transfectées avec des quantités différentes de plasmides (100 ng, 500 ng et 1  $\mu$ g) codant pour la protéine EGFP-SSRP1 et pour la protéine EGFP. Les cellules sont incubées (Ad5) ou non (NI) (24 h après transfection) avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Les signaux EGFP sont analysés (vert). **(A)** Cellules transfectées avec 1  $\mu$ g de plasmides codant la protéine EGFP, non infectées (NI) et infectées (Ad5). **(B)** Cellules transfectées avec des quantités différentes de plasmides codant pour la protéine EGFP-SSRP1 (100 ng ; 500ng et 1  $\mu$ g) et non infectées (NI). **(C)** Cellules transfectées avec des quantités différentes de plasmides codant pour la protéine EGFP-SSRP1 (100 ng ; 500ng et 1  $\mu$ g) et infectées (Ad5). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m et 2  $\mu$ m pour les agrandissements en (C)).

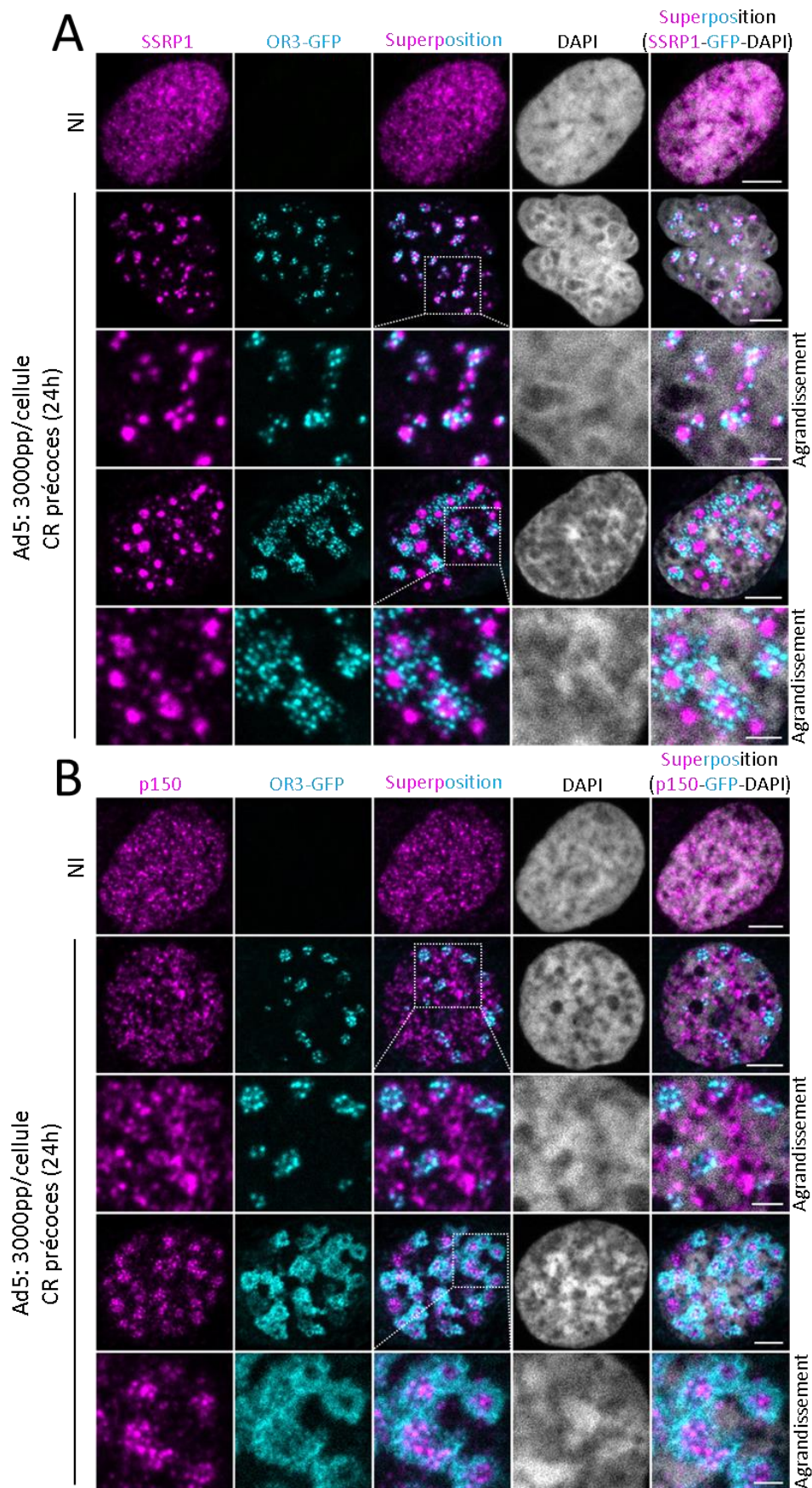
Nous nous sommes demandés si la surexpression de la protéine EGFP-SSRP1 pouvait altérer la morphologie des CR viraux en raison de nos précédentes observations de CR atypiques ovales et amorphes (Figure 33B). Pour le savoir, les cellules U2OS ont été transfectées avec des quantités croissantes de plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1 et les cellules ont été infectées 24 h plus tard (Figure 34). Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules ont été fixées et analysées par IF avec les anticorps anti-DBP. Les cellules non infectées (NI) révèlent un très faible nombre de noyaux avec un signal pour EGFP-SSRP1 avec 100 ng de plasmide (Figure 34B, première ligne) et l'on observe une augmentation de la taille de ces structures avec celle de la quantité de plasmides. Dans les cellules infectées, de nombreuses ponctuations EGFP-SSRP1 (flèches blanches) sont associées avec la protéine DBP (flèches jaunes). On observe également des CR de morphologie atypique à la périphérie des ponctuations EGFP-SSRP1 lorsque la surexpression de EGFP-SSRP1 est forte, comme pour 500 ng de plasmide par exemple (flèches blanches). Ces résultats suggèrent une altération de la morphologie des CR par la surexpression de SSRP1, ceux-ci pouvant se former en périphérie des gouttelettes EGFP-SSRP1.

### **II.3.3 SSRP1 et p150 sont relocalisées au niveau de l'ADN viral au cours de sa réplication dans les cellules infectées.**

La détection des CR par le marquage de la DBP comme dans les expériences précédentes est un moyen indirect de détecter les génomes en cours de réplication. Pour les visualiser de façon plus précise, et vérifier que les protéines SSRP1 (FACT) et p150 (CAF1) sont bien recrutées au niveau de génomes viraux répliqués, les cellules U2OS ont été coinfectées de façon synchrone avec le virus modifié Ad5-*ANCHOR* et l'Ad5 sauvage. Les cellules ont été fixées 24 h après infection et analysées par IF avec les anticorps anti-SSRP1 et anti-p150. Dans les cellules non infectées (Figures 36A et 36B), aucun signal OR3-GFP n'apparaît alors que SSRP1 et p150 sont diffuses dans les noyaux. Dans les cellules infectées, les ponctuations OR3-GFP du génome viral sont associées à la périphérie de p150 (Figure 35B) ou sont



associées et dans les CR précoces avec la protéine SSRP1 (Figure 35A). Aucune cellule infectée avec des CR tardifs n'a été observée dans nos conditions expérimentales.



**Figure 35. SSRP1 et p150 sont relocalisées au niveau de l'ADN viral au cours de sa réplication dans des cellules U2OS infectées.** Des cellules U2OS sont incubées avec 3000 pp/cellule d'Ad5 WT et le même nombre de particules avec le virus modifié Ad5-*ANCHOR* pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules non infectées (NI) et infectées (Ad5) sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-SSRP1 (magenta) en **(A)** et les anticorps anti-p150 (magenta) en **(B)**. La protéine OR3-GFP (cyan) permet de visualiser les génomes viraux. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Pour chaque condition en **(A)** et **(B)**, 2 noyaux infectés sont analysés avec soit des petites ponctuations OR3-GFP (lignes 2 et 3), soit avec des groupements de ponctuations plus nombreuses (lignes 4 et 5). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$  pour les agrandissements).

Cette expérience a été réalisée seulement une seule fois et il serait intéressant de la reproduire sur des temps d'infection plus longs pour étudier les CR tardifs. Dans nos conditions expérimentales, des colocalisations entre OR3-GFP et p150 (Figure 35B) peuvent être observées mais elles sont moins nettes que pour SSRP1. Ces résultats démontrent bien une association entre les génomes viraux et la sous-unité SSRP1 de FACT et suggèrent une association avec p150. Ces observations sont en faveur du recrutement spécifique des 2 chaperons d'histones FACT et CAF1 et par conséquent de la formation possible de nouveaux nucléosomes sur des génomes viraux nouvellement répliqués.

#### II.4 Conclusion générale du chapitre.

L'ensemble de ces résultats montre que l'association et/ou l'enrichissement de certains des chaperons d'histones testés aux différents CR de l'Ad : HIRA et DAXX sont relocalisés au niveau des CR tardifs et CAF1, NAP1L4 et FACT sont relocalisés et enrichis au niveau des CR tardifs (Tableau 16). Cependant, ces résultats ne permettent pas de déterminer le rôle de l'association de ces chaperons d'histones dans la formation des CR et les changements de structure du génome viral. En effet, par exemple, des études ont révélé que la déplétion de la sous-unité p150 (CAF1) par ARN interférence n'impacte pas l'association des génomes viraux avec l'histone H3 12 h dans les cellules HeLa (357). Cela suggère que CAF1 n'est pas impliqué ou du moins n'a pas un rôle majoritaire dans la chromatinisation des génomes viraux dans ces conditions expérimentales. On peut aussi supposer une complémentation fonctionnelle par un autre chaperon d'histones pour le dépôt des dimères d'histones H3-H4. Malgré l'observation de DAXX au niveau des CR tardifs dans les cellules U2OS, ce candidat n'a pas été retenu pour la suite de ce travail en raison d'études ayant montré la dégradation de ce chaperon d'histones durant l'infection par l'Ad5 de cellules humaines hépatocytaires (358). De la même façon, nous n'avons pas retenu le complexe HIRA, notamment car Giberson *et al.*, ont montré que ce candidat n'a pas de rôle dans le dépôt des dimères H3-H4 pour l'Ad5 sauvage (353).

En revanche, le candidat FACT possède l'avantage d'être le mieux caractérisé dans la littérature et pour lequel des fonctions comptant le dépôt d'H2A-H2B *de novo* (dépendant de la réplication) mais



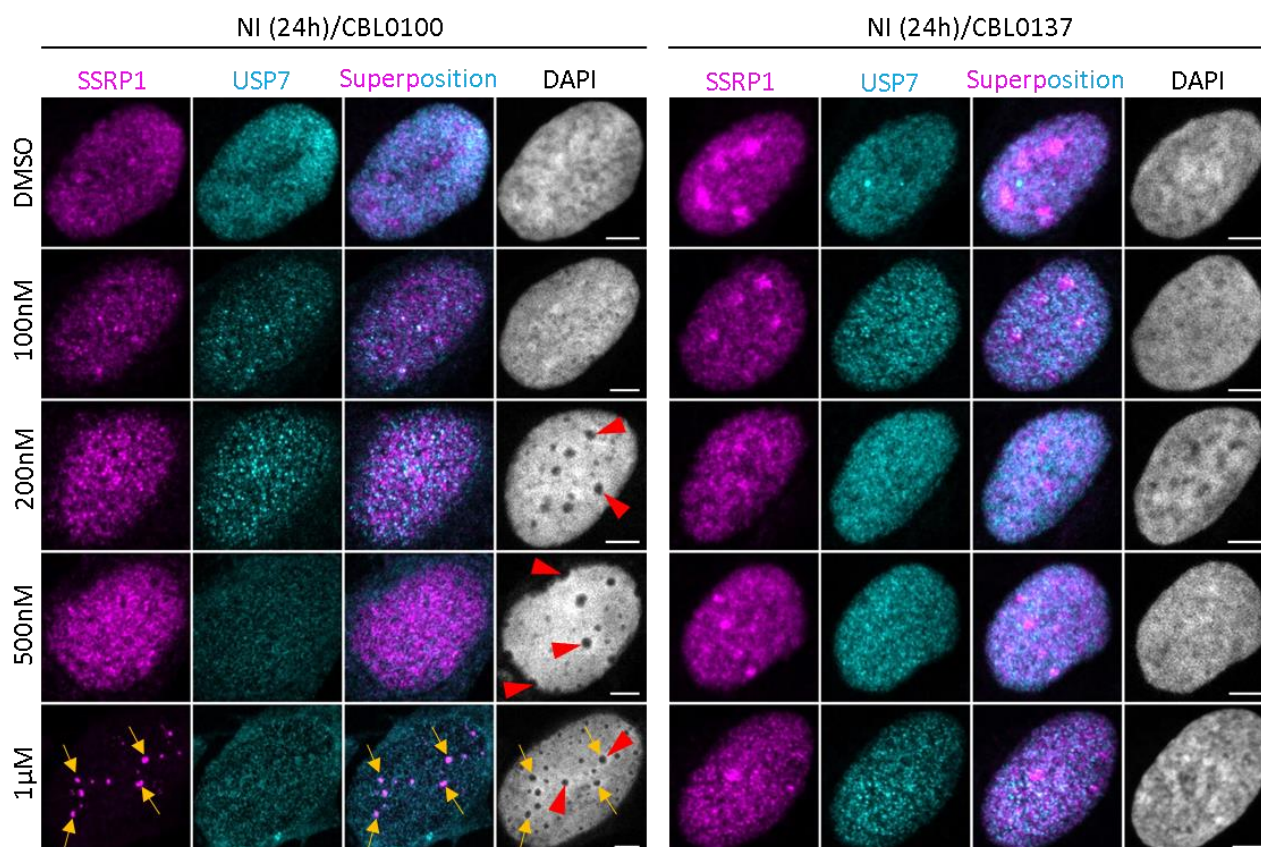
également l'éviction et le repositionnement d'H2A-H2B durant la transcription (indépendant de la réplication) sont connues. Comme FACT a une implication dans la chromatinisation réversible du génome cellulaire durant la réplication et la transcription, nous avons supposé qu'il puisse jouer un rôle clé potentiel dans la régulation de la structure du génome de l'Ad5. Enfin, des inhibiteurs (curaxine) existent pour ce chaperon d'histones. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons fait le choix de focaliser la suite de ce travail sur le candidat FACT.

## Chapitre 3

### III. Etude du chaperon d'histone FACT et son rôle au cours de l'infection par l'Ad5.

#### III.1 Inhibition pharmacologique du chaperon d'histone FACT par la curaxine.

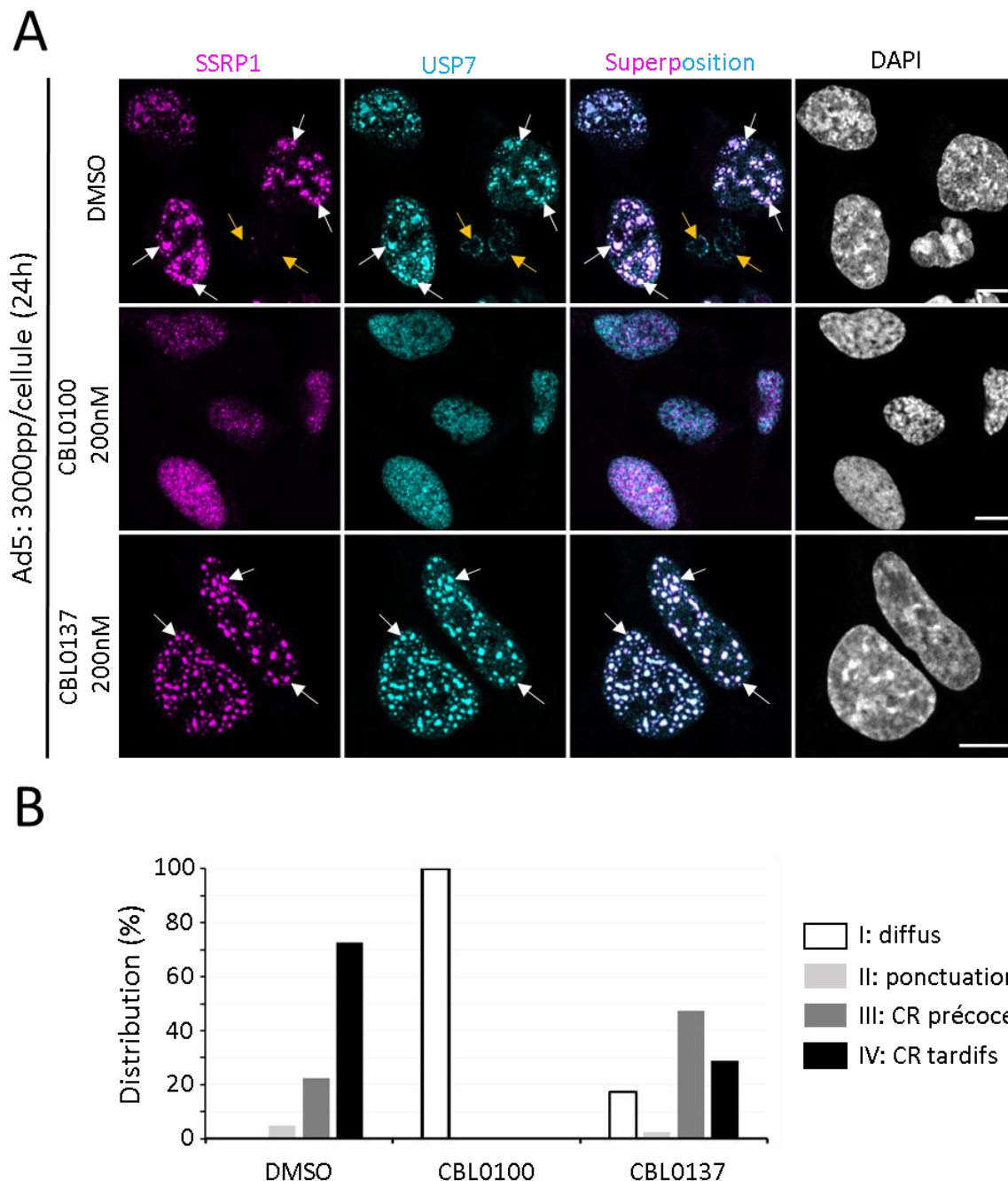
Pour savoir si FACT est un chaperon d'histone impliqué dans la progression du cycle viral, nous avons utilisé 2 inhibiteurs de type curaxine. Il s'agit d'une classe de molécules anti-cancéreuses (dont les drogues CBL0100 et CBL0137) induisant la déstabilisation des nucléosomes en s'intercalant dans la double hélice d'ADN sans en induire de cassures. En conséquence de la déstabilisation des nucléosomes, FACT est piégé et inhibé ((200) ; (198)).



**Figure 36. Tests de cytotoxicité de la curaxine (CBL0100 et CBL0137) avec des cellules U2OS.** Des cellules U2OS non infectées sont incubées avec des concentrations croissantes (100 nM, 200 nM, 500 nM et 1 µm) de l'inhibiteur de FACT CBL0100 ou CBL0137. Une condition avec du DMSO sert de contrôle. Les cellules sont fixées (24 h après ajout des drogues) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 5 µm).

Sachant que ces drogues peuvent être toxiques pour les cellules, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de CBL0100 et CBL0137 sur la localisation de SSRP1 et d'USP7 (marqueur des CR) dans les cellules U2OS non infectées. Pour cela, les cellules U2OS ont été incubées durant 24 h

avec 100 nM, 200 nM, 500 nM et 1  $\mu$ M de chacune des 2 drogues (Figure 36). La condition avec seulement du DMSO sert de contrôle. Elles ont ensuite été fixées et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 et anti-SSRP1. Les observations par microscopie confocale n'ont pas révélé de changement de localisation de SSRP1 et de USP7 entre le contrôle sans drogue et en présence des différentes concentrations de CBL0137.



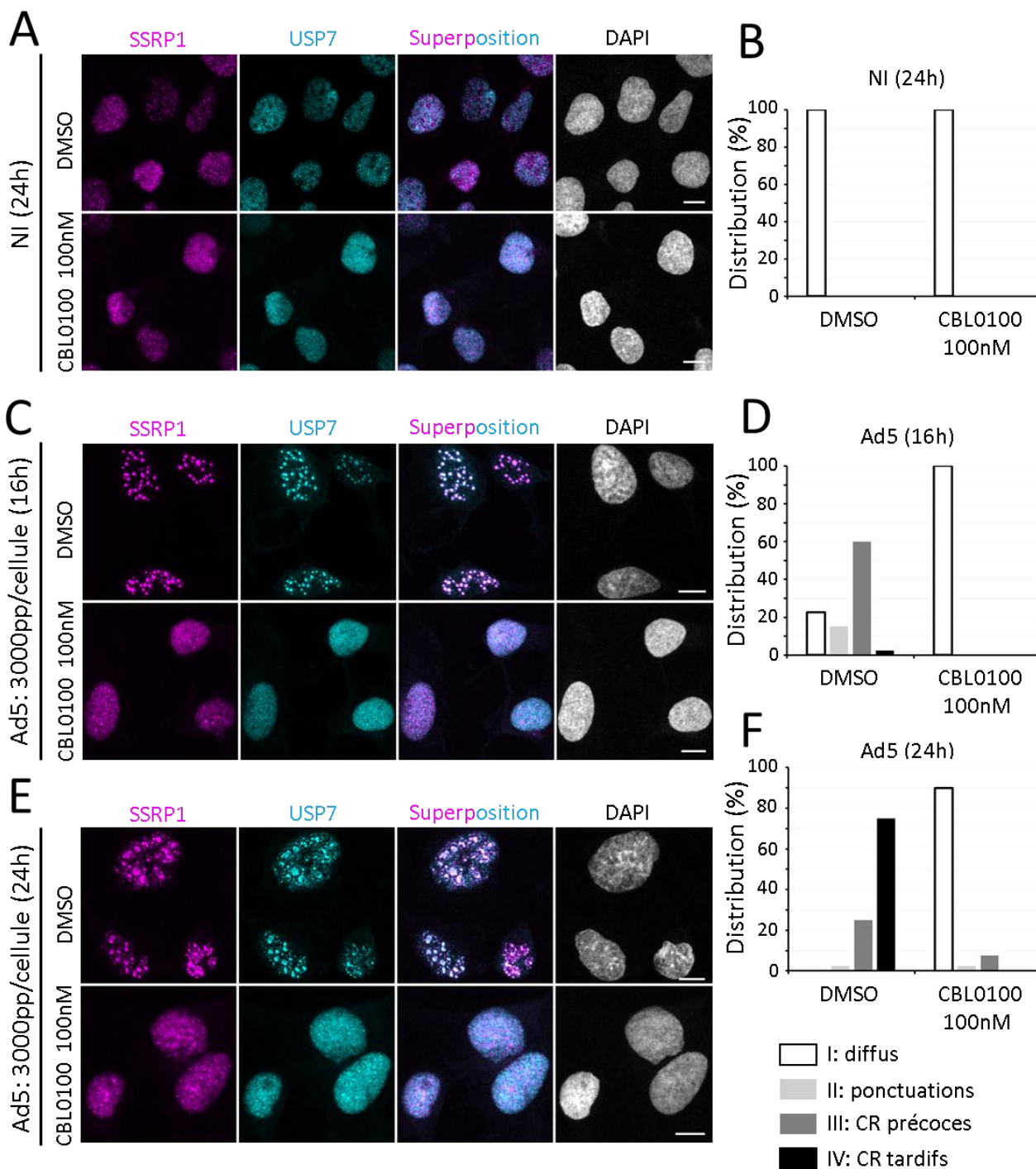
**Figure 37. Effet inhibiteur de CBL0100 et non de CBL0137 sur la formation des CR dans les cellules U2OS infectées. (A)** Des cellules U2OS sont incubées durant 3 h avec 200 nM de CBL0100 ou de CBL0137. La condition avec du DMSO sert de contrôle. Les cellules sont ensuite infectées sans drogues

avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont incubées le reste de l'infection avec les mêmes concentrations en drogues. Les cellules sont fixées (24 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. **(B)** Quantifications. Les cellules sont comptées, catégorisées et le pourcentage de cellules avec les différents phénotypes (type I : diffus ; type II : petites ponctuations ; type III : CR précoces ; et type IV : CR tardifs) est déterminé (n = 40 cellules/condition). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 10 µm).

De la même façon, le marquage DAPI des noyaux ne présente aucune modification. En revanche, pour CBL0100, à partir d'une concentration de 200 nM, des zones sphériques dépourvues de chromatine (triangles rouges) apparaissent, sans changement notable de la localisation de USP7. A 1 µM, ces changements sont beaucoup plus drastiques avec la relocalisation et la concentration de SSRP1 dans ces zones dépourvues d'ADN (flèches jaunes). La protéine USP7 est aussi modifiée et apparaît diffuse dans le noyau et dans le cytoplasme à partir de 500 nM. Comme FACT est décrit pour être inhibé dans la gamme de concentrations de curaxine utilisée (502) mais également afin de réduire l'impact cytotoxique de ces drogues dans nos conditions expérimentales, des concentrations inférieures ou égales à 200 nM pour CBL0100 et CBL0137 ont été utilisées.

Pour étudier si le chaperon d'histone FACT est nécessaire ou non pour la progression du cycle viral, nous avons utilisé le CBL0100 et le CBL0137 pour mesurer leur effet sur la formation des CR viraux. Pour cela, les cellules U2OS ont été prétraitées durant 3 h avec 200 nM de CBL0100 ou de CBL0137 et les drogues ont été retirées. Les cellules ont ensuite été infectées de façon synchrone et les mêmes concentrations de drogues ont été ajoutées et conservées le reste de l'infection. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules sont fixées et analysées par IF à l'aide d'anticorps anti-SSRP1 et anti-USP7. Des analyses par microscopie confocale (Figure 37) ont révélé que les 2 drogues ont un effet inhibiteur sur la formation et la morphologie des CR viraux. L'inhibiteur CBL0100 possède l'effet le plus fort en induisant une inhibition totale de la formation des CR viraux et seulement l'observation de signaux diffus dans les noyaux pour la protéine USP7. Pour CBL0137, on observe dans le noyau une accumulation de ponctuations très régulières où SSRP1 et USP7 colocalisent. Celles-ci peuvent correspondre à l'accumulation de CR très précoces dont la transition en CR tardifs a été inhibée. Pour quantifier l'effet des drogues, nous avons déterminé le pourcentage de cellules présentant 1/ un signal diffus pour USP7 (pas de CR), 2/des CR très précoces (ponctuations de petite taille), 3/des CR précoces et 4/ des CR tardifs (Figure 37B). Vingt-quatre heures après infection, en absence de drogues, on détecte 5 % de cellules aux CR très précoces, 22,5 % avec des CR précoces et une majorité avec des CR tardifs (72,5 %), et aucune avec un marquage diffus de USP7. En revanche, pour CBL0100, on observe aucun marquage typique de CR, quel qu'il soit. Pour CBL0137, non seulement on détecte 17,5 % de cellules sans CR mais, contrairement au contrôle sans drogue, on constate une accumulation de

cellules aux CR précoces (47,5 %) par rapport à celles présentant les CR tardifs (29 %). Ces résultats suggèrent que CBL0100 inhibe la formation des CR alors que CBL0137 induit un retard de la transition des CR précoces en CR tardifs. En raison de la forte inhibition de la formation des CR viraux par CBL0100, nous avons réalisé d'autres expériences afin de caractériser son effet sur la progression du cycle viral.



**Figure 38. Effet inhibiteur de CBL0100 sur la formation des CR dans les cellules U2OS infectées (16 h pi et à 24 h pi).** Des cellules U2OS sont incubées durant 3 h avec du CBL0100 (100 nM). Les conditions avec du DMSO servent de contrôles. Les cellules sont incubées sans drogues avec 3000 pp/cellule

pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont incubées le reste de l'infection avec la même concentration en drogue. Les cellules non infectées (NI et 24 h en **(A)**) et infectées (16 h en **(C)** et 24 h après infection en **(E)**) sont fixées et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). **(B)**, **(D)** et **(F)** Quantifications. Les cellules sont comptées, catégorisées et le pourcentage de cellules pour les différents phénotypes (type I : diffus ; type II : petites ponctuations ; type III : CR précoces ; et type IV : CR tardifs) est déterminé (n = 40 cellules/condition). Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 10 µm).

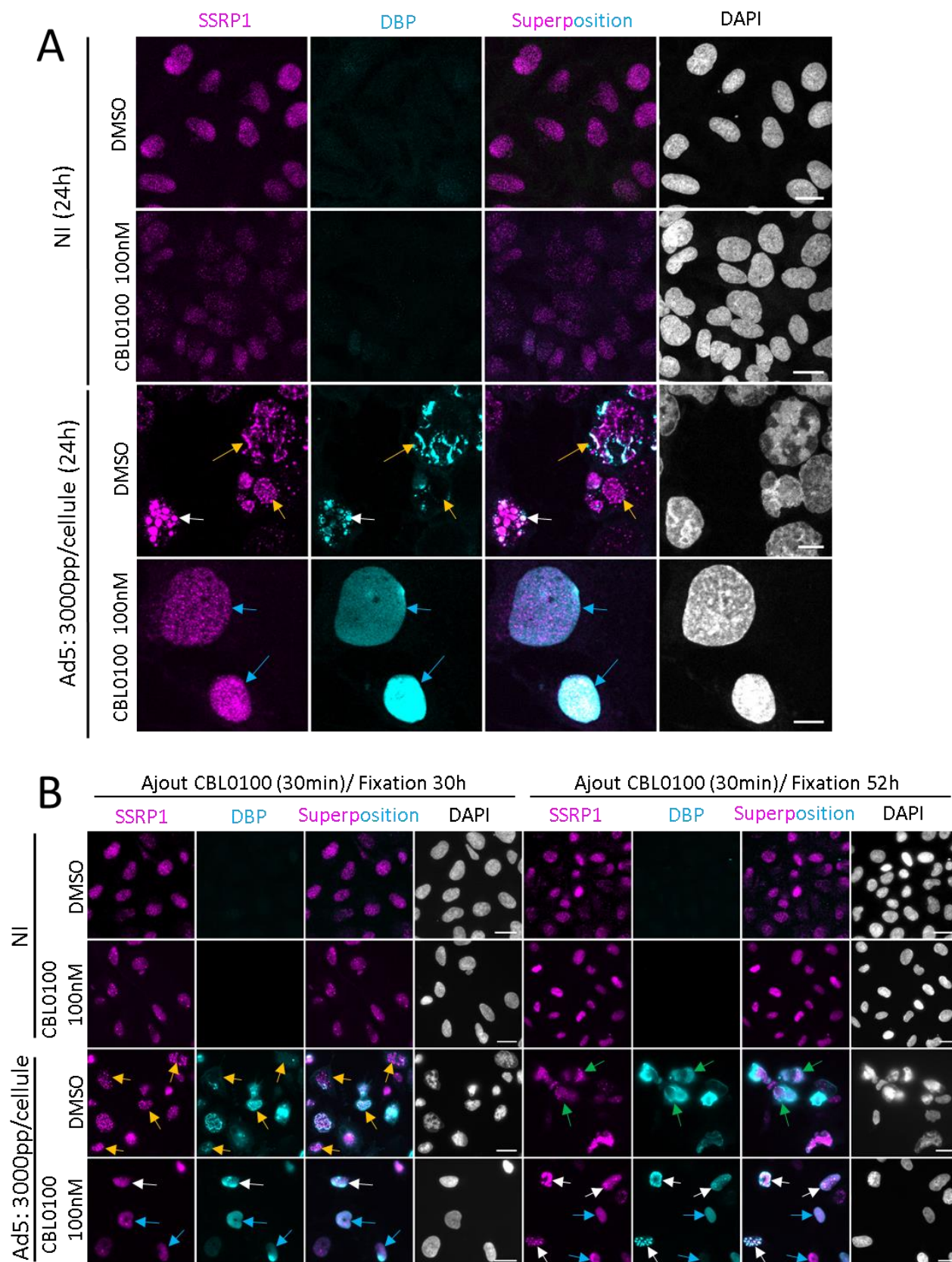
Pour évaluer si l'inhibition de la formation des CR viraux persiste avec des concentrations plus faibles de CBL0100, nous avons choisi de tester une concentration de 100 nM et de vérifier si cet effet a lieu tôt dans le cycle de réplication. En utilisant le même protocole expérimental que précédemment, les cellules U2OS infectées ont été fixées soit 16 h, soit 24 h après infection. Nos observations en microscopie confocale (Figure 38B, 38D et 38F), montrent que quel que soit le temps analysé, la formation des CR viraux est très fortement inhibée avec 100 nM de CBL0100 (Figure 38). Comme seule la protéine USP7 marquant les CR viraux a été étudiée, nous nous sommes demandés si l'inhibition de la formation des CR viraux est due à un défaut de production de la protéine DBP ou à un effet direct de l'inhibiteur.

L'ensemble de ces résultats suggère que FACT est impliqué dans l'initiation de la formation des CR viraux dans lesquels le génome viral est répliqué. Sachant que l'expression des gènes précoces des régions E2 codant pour la Pol, DBP et pTP est nécessaire pour initier la réplication du génome et que le chaperon d'histone FACT est impliqué dans la transcription de gènes cellulaires, l'effet de l'inhibiteur CBL0100 pourrait être un effet indirect dû à l'inhibition de la transcription de ces gènes précoces et non un effet direct sur la formation des CR.

Pour le savoir, une expérience a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment mais cette fois-ci des anticorps anti-DBP ont été utilisés pour vérifier la présence ou non de cette protéine précoce en présence de drogue (Figure 39A). Les observations montrent que la protéine DBP est bien exprimée dans les cellules infectées sans drogue et en présence de CBL0100. Cependant, au lieu d'être localisée dans les CR précoces (flèches blanches) ou dans les CR tardifs (flèches jaunes), elle est diffuse dans le noyau des cellules (flèches bleues). Pour vérifier si l'absence des CR induite par la drogue est bien une inhibition de la formation des CR et non un délai dans leur formation, la même expérience a été réalisée et les cellules ont été fixées à des temps plus long après infection (Figure 39B). Sans drogue, les CR tardifs sont plus difficiles à distinguer à 30 h après infection. Aucune structure précise n'est en effet visualisable avec le marquage de la DBP (flèches jaunes). Ceci est dû à l'observation d'un important effet cytopathique induit par la réplication virale. Cet effet cytopathique est encore plus marqué après 52 h (flèches vertes). Au même temps et en présence de



drogue, nous avons pu constater que seuls de très rares noyaux infectés présentent des CR précoces (Figure 39B, flèches blanches). A 52h, un nombre plus important de noyaux avec des CR précoces est observé (flèches blanches). Ces résultats suggèrent que la synthèse de la DBP ne soit pas altérée par la

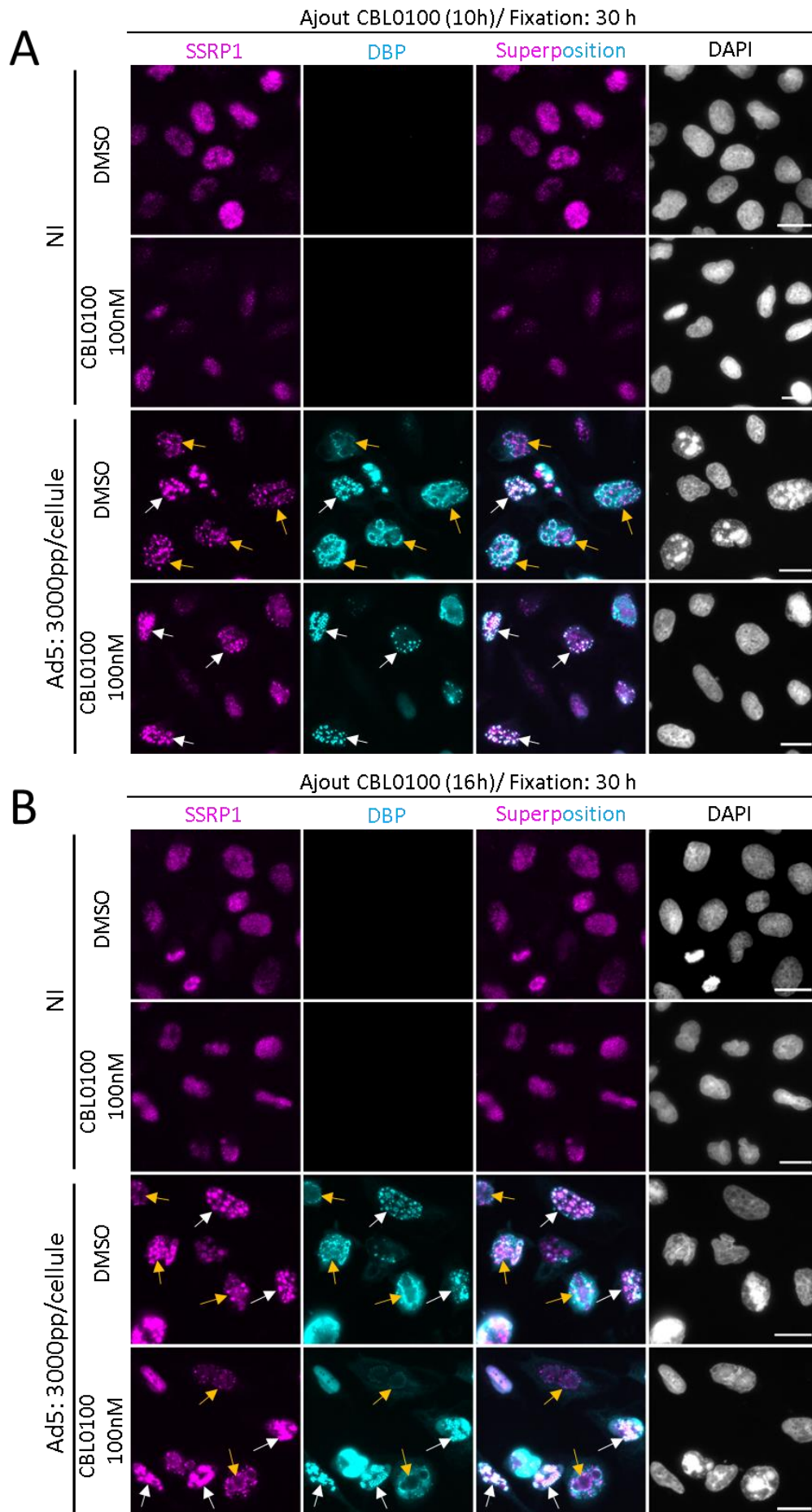


**Figure 39. DBP s'accumule au sein de noyaux malgré l'effet inhibiteur de CBL0100 sur la formation des CR avec des cellules U2OS infectées (24 h pi). CBL0100 induit un délai d'accumulation pour DBP et les protéines structurales, inhibant la formation des CR avec des U2OS infectées (29 h pi et 52 h pi).** Des cellules U2OS sont incubées durant 3 h avec du CBL0100 (100 nM) en **(A)** ou seulement à partir de 30 min après infection en **(B)**. Les conditions avec du DMSO servent de contrôles. Les cellules sont ensuite incubées sans drogue avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont incubées le reste de l'infection avec la même concentration en drogue. Les cellules sont fixées (24 h après infection en **(A)**, 30 h et 52 h en **(B)**) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Microscopie confocale (X63) en **(A)**. Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 20 µm (lignes 1-2) et 10 µm (lignes 3-4)). Microscopie plein champs (X63) en **(B)**. (Barre d'échelle, 20 µm).

curaxine. Nous ne pouvons cependant pas exclure que la quantité de la DBP soit diminuée en présence de la drogue. Ces analyses par IF ne permettent qu'une étude qualitative de la présence de la DBP et ne sont en effet pas suffisantes pour conclure sur une telle diminution. Ces résultats montrent que la formation des CR est fortement retardée par la drogue. Ils indiquent également que la réplication virale est très certainement inhibée par la drogue en raison d'absence d'effet cytopathique jusqu'à 52 h après infection. L'ensemble de ces observations suggère que FACT serait nécessaire pour la formation des CR viraux et non pour l'expression des gènes précoces comme DBP.

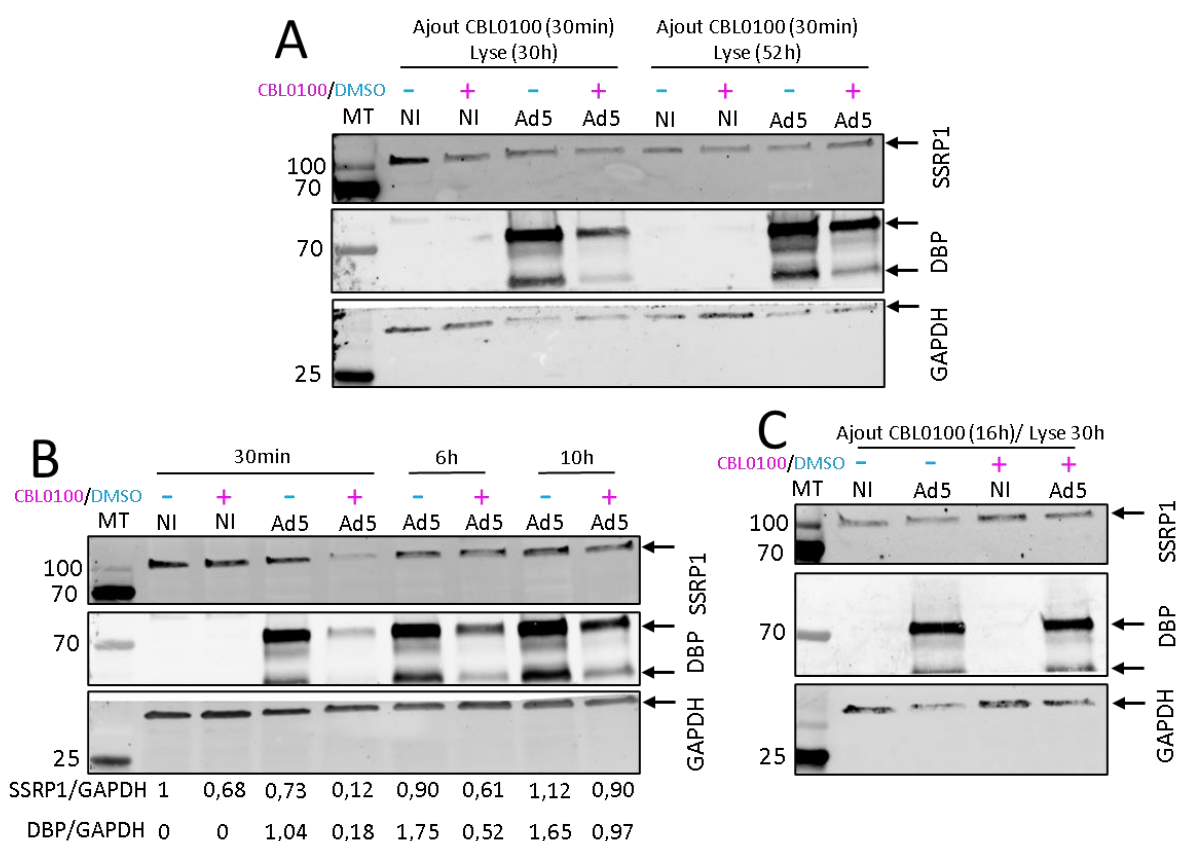
Pour savoir si FACT intervient dans des étapes plus tardives du cycle viral, nous avons réalisé la même expérience que ci-dessus mais cette fois l'inhibiteur CBL0100 a été introduit après la formation des CR, soit 10 h ou 16 h après infection (et en conservant cette drogue le reste de l'infection). Les cellules ont ensuite été fixées 30 h après infection et une IF a été réalisée avec les anticorps anti-DBP et anti-SSRP1. Dans les conditions sans drogue, il est possible d'observer à la fois des cellules infectées avec des CR précoces (flèches blanches) et avec des CR tardifs (flèches jaunes). De manière similaire à l'expérience précédente, les CR tardifs sont plus difficiles à distinguer en raison de l'observation d'un important effet cytopathique induit par la réplication virale. Lorsque la drogue est ajoutée à 10 h après infection, la grande majorité des cellules possèdent des CR précoces. Lorsqu'elle est ajoutée à 16 h après infection, des cellules avec des CR précoces et d'autres avec des CR tardifs sont observées. Comme pour la condition contrôle sans drogue, un important effet cytopathique est également observé pour un grand nombre de cellules. Cet effet témoigne à nouveau d'une importante réplication virale malgré l'ajout de la drogue à 16 h après infection. Ces résultats suggèrent que l'inhibition plus tardive de FACT par la curaxine retarde la transition des CR précoces en CR tardifs. Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition de FACT après 16 h d'infection par la curaxine n'aurait toutefois plus d'effet.





**Figure 40. La production de DBP est atténuée à mesure d'un traitement tardif par CBL0100 et non effectif après 10 h pi avec des cellules U2OS.** Des cellules U2OS sont infectées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection sans drogue. Du CBL0100 (100 nM) est ajouté à 10 h après infection en (A) et à 16 h après infection en (B) durant le reste de l'infection. Les conditions avec du DMSO servent de contrôles. Les cellules sont fixées (30 h après infection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Microscopie plein champs (X63). (Barre d'échelle, 20 µm).

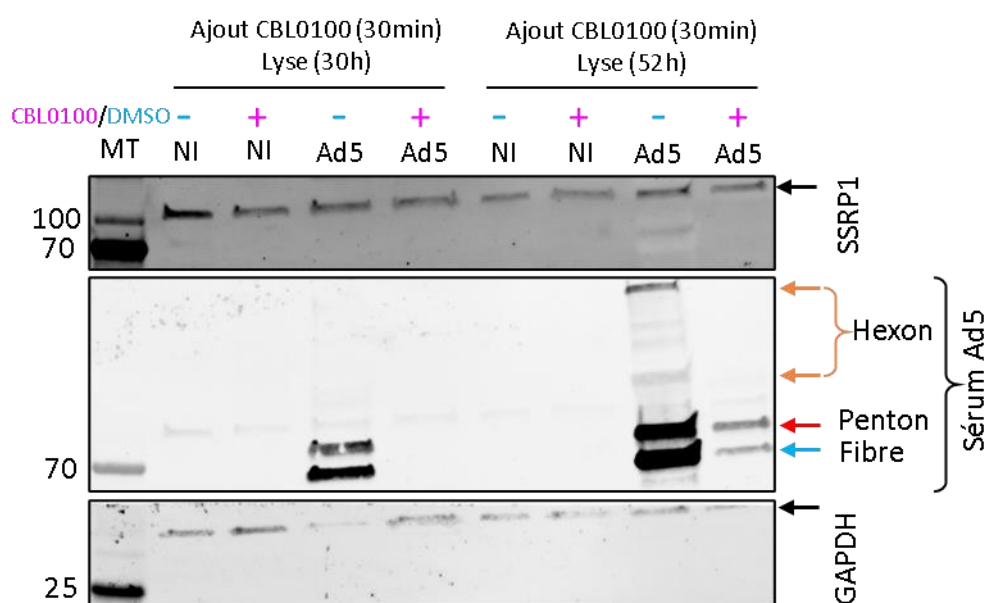
Pour confirmer que l'inhibition de FACT par CBL0100 n'empêche pas la transcription et la synthèse de DBP, les cellules U2OS ont été infectées de façon synchrone et incubées avec 100 nM de CBL0100 puis elles ont été lysées 30 h et 52 h après infection. Les extraits cellulaires ont été analysés par western blot avec les anticorps anti-DBP mais aussi avec des anticorps dirigés contre SSRP1 pour vérifier que sa quantité ne varie pas au cours de l'infection. La GAPDH sert de contrôle de charge mais l'intensité des bandes n'étant pas identique entre les pistes (Figure 41A), aucune quantification du signal n'a été réalisée.



**Figure 41. L'inhibiteur de FACT CBL0100 induit une diminution de la quantité de la protéine DBP dans les cellules U2OS infectées.** Des cellules sont incubées avec 3000 pp/cellule ou non (NI) pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis du CBL0100 (100 nM) est ajouté à 30 min après infection en (A), aux différents temps après infection (30 min, 6 h et 10 h) en (B) et à 16 h après infection en (C). La drogue est maintenue le reste de l'infection. Les conditions avec du DMSO servent de contrôles. Les cellules sont lysées (30 h et 52 h après infection) en (A), à 30 h après infection en (B) et (C) puis 30 µg de protéines totales pour toutes les conditions sont analysées par western blot. La protéine SSRP1

(anti-SSRP1, taille théorique : 86 KDa) et DBP (anti-DBP, taille : 70 KDa) sont étudiées. La GAPDH (anti-GAPDH : taille : 37 KDa) sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes est mesurée et les rapport SSRP1/GAPDH et DBP/GAPDH sont calculés. MT : Marqueur de taille protéique.

Cependant, il semblerait que, dans ces conditions expérimentales, le niveau de SSRP1 ne soit pas affecté, quelles que soient les conditions. En revanche, quel que soit le temps analysé après infection, il semblerait que la drogue induise une diminution de la quantité de DBP dans les cellules infectées. En réalisant la même expérience mais où cette fois-ci, la drogue est ajoutée soit 30 min, 6 h, 10 h ou 16 h après infection (et en conservant cette drogue le reste de l'infection), on peut observer que la quantité de DBP est également altérée (Figure 41B et 41C). Plus la drogue est introduite tôt durant l'infection et plus cette quantité en DBP est diminuée. Cependant, la quantité de DBP ne semble pas changée lorsque la drogue est ajoutée à 16 h après infection. Ces résultats suggèrent que FACT serait directement nécessaire à l'expression du gène précoce E2A codant pour la DBP et ceux avant la formation des CR visibles en microscopie optique.



**Figure 42. L'inhibiteur de FACT CBL0100 induit une diminution de la quantité des protéines de structure du virus dans les cellules U2OS infectées (30 h pi et 52 h pi).** Des cellules sont incubées avec 3000 pp/cellule pendant 30 min pour synchroniser l'infection puis les cellules sont incubées avec du CBL0100 (100 nM) pour le reste de l'infection. Les conditions avec du DMSO servent de contrôles. Les cellules sont lysées (30 h et 52 h après infection) puis 30 µg de protéines totales sont analysés par western blot. La protéine SSRP1 (anti-SSRP1 : 86 KDa) est étudiée. Le sérum anti-Ad5 permet de révéler les trois protéines de structure fibre (61 KDa), penton (68 KDa) et hexon (108 KDa). La GAPDH (anti-GAPDH : 37 KDa) sert de contrôle de charge. MT : Marqueur de taille.

Pour étudier si l'inhibition de FACT altère l'expression des gènes tardifs de manière similaire au gène précoce E2A, la même expérience que celle présentée en figure 41A a été réalisée. Les extraits cellulaires ont été analysés par western blot et les trois protéines de structure fibre, penton et hexon

ont été étudiées en utilisant le sérum anti-Ad5. Des anticorps dirigés contre la protéine SSRP1 ont également été utilisés pour vérifier que sa quantité ne varie pas au cours de l'infection. La GAPDH sert de contrôle de charge mais l'intensité des bandes n'étant pas identique entre les pistes, aucune quantification du signal n'a été réalisée. Comme pour la protéine DBP, il semblerait que la drogue induise une diminution de la quantité de la fibre (flèche bleue), du penton (flèche rouge) et de l'hexon (flèches marron) à 52 h après infection (Figure 42). A la différence d'une observation des protéines fibre et penton dans la condition sans drogue, ces deux protéines ne sont plus détectées à 30 h après infection. Ces expériences n'ayant pu être réalisées plusieurs fois en raison de la pandémie de COVID 19, il serait nécessaire de les reproduire afin de confirmer ces résultats. La diminution de l'expression des gènes tardifs par l'inhibition de FACT suggère une implication directe de ce chaperon d'histone dans leur transcription. Il n'est toutefois pas à exclure que la diminution de l'expression des gènes tardifs puisse être la conséquence de la diminution de l'expression du gène précoce E2A, de la diminution de la production de la DBP et d'un défaut de la formation des CR (Figure 39).

### III.2 Conclusion générale du chapitre.

Pour appréhender le rôle de FACT dans le cycle viral, nous avons testé l'effet de l'inhibition pharmacologique de FACT par CBL0100 et CBL0137. CBL0100 bloque la formation des CR précoces alors que CBL0137 semble inhiber la transition des CR précoces / CR tardifs, ce qui suggérerait un rôle de FACT dans la formation des CR dans les cellules infectées par l'Ad5. Cependant, nous avons montré que CBL0100 inhibe aussi l'expression de DBP, indispensable à la réplication du génome viral et à la formation des CR précoces. Cette observation corrèle avec le défaut d'expression des gènes tardifs (protéines de structure) normalement exprimés après la formation des CR. Ces résultats laissent supposer un rôle de FACT dans la transcription des gènes précoces, qui pourrait être lié à une implication dans la régulation de la structure du génome viral, accessible aux facteurs de transcription viraux et cellulaires.

Cependant, il est à noter que les drogues utilisées ne sont pas des inhibiteurs spécifiques de FACT. D'autres facteurs cellulaires comme p53 et NF- $\kappa$ B peuvent aussi être affectés (199). Il n'est donc pas exclu que les effets observés sur le cycle viral ne soient pas dus à une inhibition spécifique de FACT mais aux effets secondaires de ces molécules. Pour valider ces résultats, nous avons envisager d'inhiber FACT plus spécifiquement en bloquant son expression par ARN interférence. Ces expériences ont été initiées mais les données restent très préliminaires et ne seront par conséquent pas décrites dans ce manuscrit.



## Chapitre 4

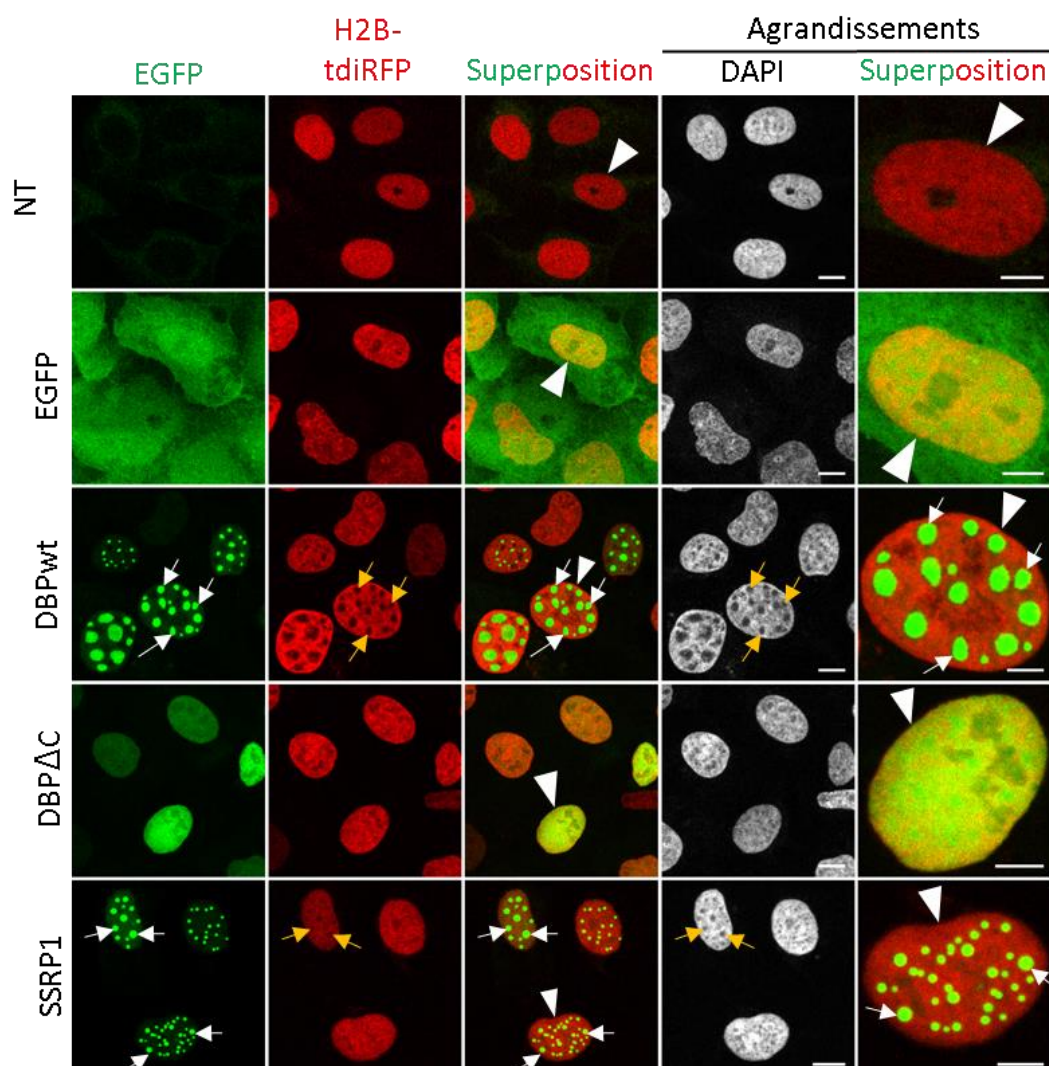
### IV. SSRP1 et DBP sont capables de former des structures semblables à des compartiments sans membranes dépendants de la séparation de phase liquide-liquide (LLPS).

Dans les CR induits par l'Ad5 dans les cellules infectées, sont concentrées les protéines virales de la réplication dont DBP et le génome viral répliqué ou en cours de réplication. Les données de la littérature pour l'Ad5 indiquent que les CR sont les MLO, qui pourraient se former par LLPS. En effet, il a été montré que la protéine DBP seule est suffisante pour former des structures sans membranes, des gouttelettes (357) et que les CR précoces de l'Ad5 fusionnent entre eux au cours de l'infection virale (495). La protéine mutante DBP $\Delta$ C, tronquée dans sa partie C-terminale pour les acides aminés 512 à 529, ne permet plus la formation de telles gouttelettes car elle ne peut plus en effet s'oligomériser (357). Tout comme la protéine DBP sauvage, nous avons montré que la sous-unité de FACT, SSRP1 est enrichie dans les CR viraux. De plus, nous avons pu observer, notamment dans les expériences de surexpression de la protéine EGFP-SSRP1, que celle-ci forme des structures sphériques très régulières dans le noyau de cellules transfectées (non infectées), capables d'exclure la chromatine comme les CR viraux. Selon le niveau d'expression de EGFP-SSRP1 transfectées et infectées, la localisation de la DBP varie : les 2 protéines colocalisent quand le niveau d'EGFP-SSRP1 est faible ; en revanche, quand le niveau est élevé et que de grosses gouttelettes apparaissent, DBP est exclue et relocalisée à leur périphérie. Nous avons voulu savoir si ces observations dépendaient ou non de la présence de facteurs viraux comme l'ADN viral répliqué par exemple.

#### IV.1 La surexpression de DBP et de SSRP1 induit la formation de structures intranucléaires dépourvues d'histones.

Pour ce faire, nous avons étudié les propriétés de SSRP1 et DBP exprimées seules ou en combinaison dans des cellules non infectées. Dans un premier temps, les cellules U2OS-H2B-tDiRFP qui permettent de visualiser la chromatine cellulaire, ont été transfectées avec les plasmides codant pour les protéines EGFP-DBPwt, EGFP-DBP $\Delta$ C, EGFP-SSRP1 ou la protéine EGFP. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été fixées et analysées par microscopie confocale (Figure 43). Les cellules surexprimant la protéine contrôle EGFP présentent des signaux diffus à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 43). Au contraire, les cellules surexprimant EGFP-DBPwt présentent de nombreuses structures nucléaires sphériques parfaites ou ovoïdes de taille variable (diamètres allant de 0,5  $\mu$ m à 15  $\mu$ m). En accord avec les résultats de *Komatsu et al.* (357), la protéine EGFP-DBPwt seule est suffisante pour former des structures semblables aux gouttelettes intranucléaires dans les cellules U2OS. Leur

formation dépend du domaine C-terminal de DBP car aucune gouttelette n'est détectée pour le mutant EGFP-DBP $\Delta$ C.



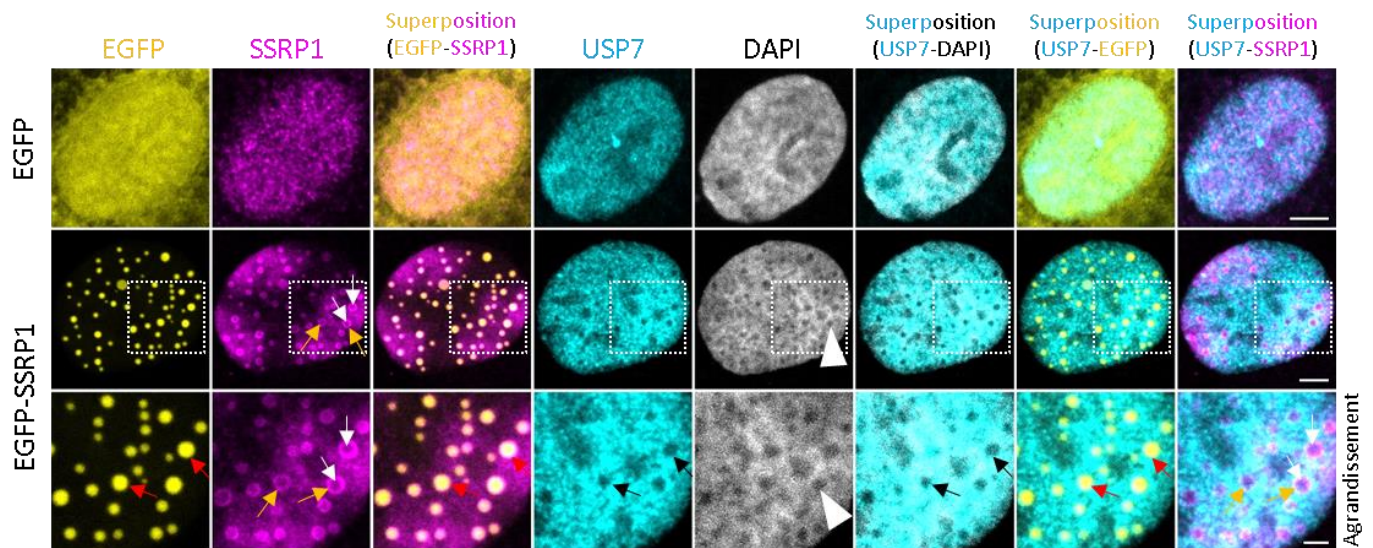
**Figure 43. DBP et SSRP1 sont capables de former des organelles sans membranes dépourvues en histones et en ADN cellulaire.** Des cellules U2OS-H2B-tdiRFP sont transfectées avec 2  $\mu$ g de chaque plasmide codant pour la protéine EGFP-DBPwt, pour la protéine EGFP-DBP $\Delta$ C, pour la protéine EGFP-SSRP1 et pour la protéine EGFP. Les cellules sont fixées (24 h après transfection) et le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Les signaux EGFP (vert) et H2B-tdiRFP sont analysés. NT : contrôle non transfecté. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 10  $\mu$ m et 5  $\mu$ m pour les agrandissements).

La protéine EGFP-SSRP1 forme elle aussi des structures intranucléaires sphériques semblables à des gouttelettes dont la chromatine est bien exclue car aucun marquage H2B-tdiRFP ou DAPI n'est observé dans ces structures.



Ces expériences révèlent qu'individuellement, les 2 protéines DBP et SSRP1 sont suffisantes pour former des structures intranucléaires et sphériques, dépourvues de chromatine, en faveur d'une formation par LLPS.

#### IV.2 Les structures formées par SSRP1 sont partiellement accessibles aux anticorps



**Figure 44. Les structures formées par SSRP1 sont partiellement accessibles aux anticorps dans les cellules U2OS.** Des cellules U2OS sont transfectées avec les plasmides codant pour la protéine EGFP-SSRP1 (2  $\mu$ g) et pour la protéine EGFP (2  $\mu$ g). Les cellules sont fixées (24 h après transfection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-USP7 (cyan) et anti-SSRP1 (magenta). Les signaux GFP sont analysés (jaune). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Les vues en troisième ligne correspondent aux agrandissements (carrés en pointillés) de la seconde ligne. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 2  $\mu$ m et 5  $\mu$ m pour les agrandissements).

Une propriété décrite pour les organelles sans membranes est d'être faiblement accessibles aux anticorps lorsqu'on utilise des cellules fixées et des IF pour les détecter (461). Ceci dépend des anticorps utilisés mais également des conditions de fixation. Par exemple, lorsque la protéine de fusion HA-DBP est surexprimée, les anticorps anti-HA révèlent l'ensemble de la gouttelette alors que les anticorps anti-DBP marquent principalement sa périphérie (357). Ce phénomène reflète le caractère dense de ces structures (454). Pour évaluer cette éventuelle différence de détection avec SSRP1, les cellules U2OS ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1 ou EGFP seule comme contrôle. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été fixées et analysées par IF avec des anticorps anti-SSRP1 et anti-USP7. La protéine USP7, recrutée dans les CR de manière similaire à la protéine SSRP1, a été marquée afin d'étudier sa localisation sans infection par rapport aux gouttelettes formées par la protéine EGFP-SSRP1.

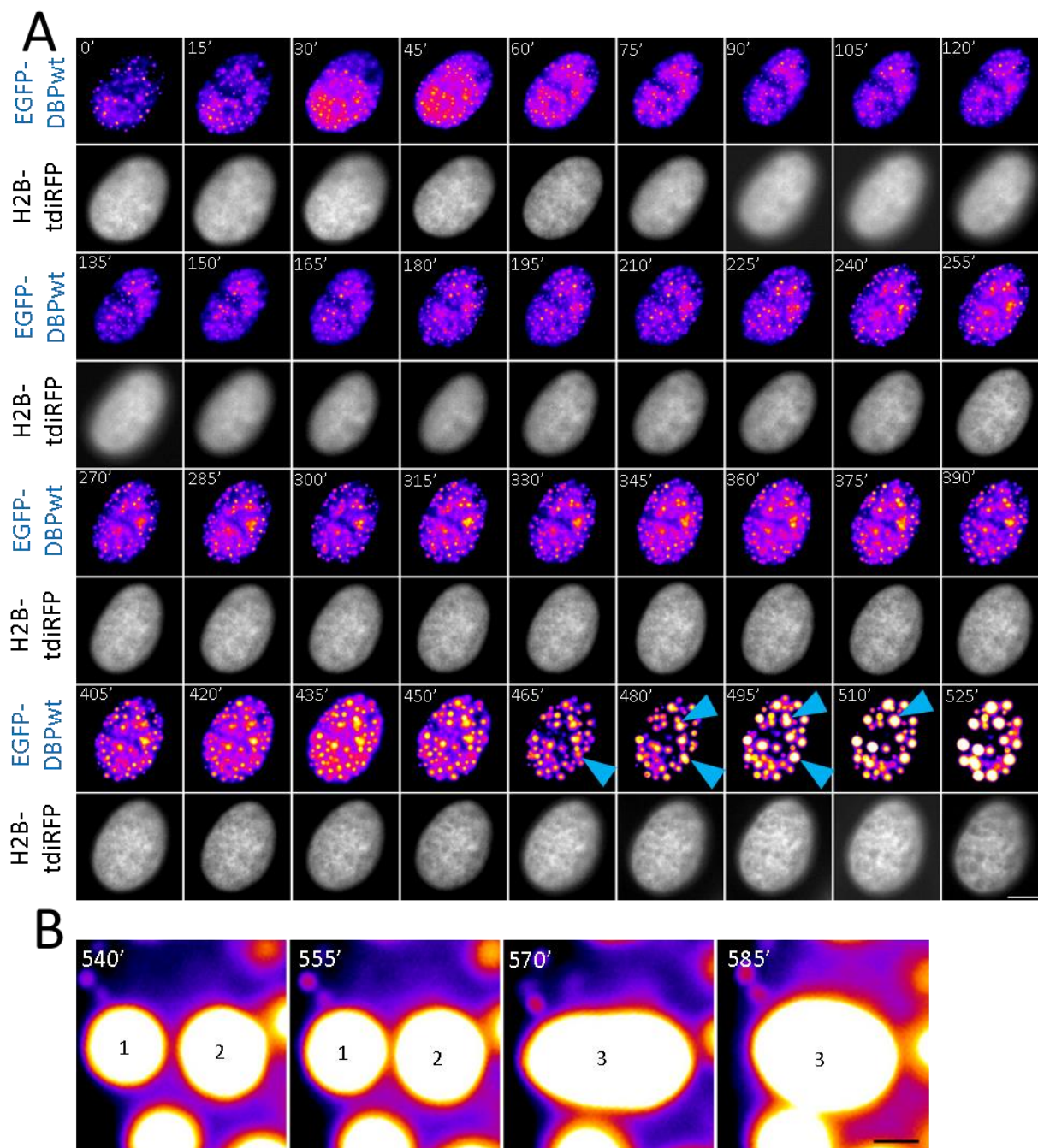
Les cellules exprimant la protéine EGFP-SSRP1 forment bien des structures sphériques dans le noyau et celles-ci sont également révélées par les anticorps anti-SSRP1 (Figure 44). Cependant, les signaux les plus intenses sont trouvés en périphérie de ces structures (flèches jaunes). Leur centre est moins marqué (flèches blanches). Dans ces conditions expérimentales, la protéine USP7 (flèches noires) ainsi que la chromatine cellulaire sont exclues de ces structures. Cette expérience révèle ainsi une plus faible accessibilité des anticorps anti-SSRP1 à l'intérieur des gouttelettes formées par EGFP-SSRP1.

Cette observation est en faveur d'une formation de ces structures par LLPS. Une autre caractéristique de la formation possible par LLPS est la capacité des gouttelettes à fusionner entre elles.

### **IV.3 Les structures formées par DBP ou par SSRP1 fusionnent entre elles.**

#### **IV.3.1 Structures formées par la protéine virale DBP.**

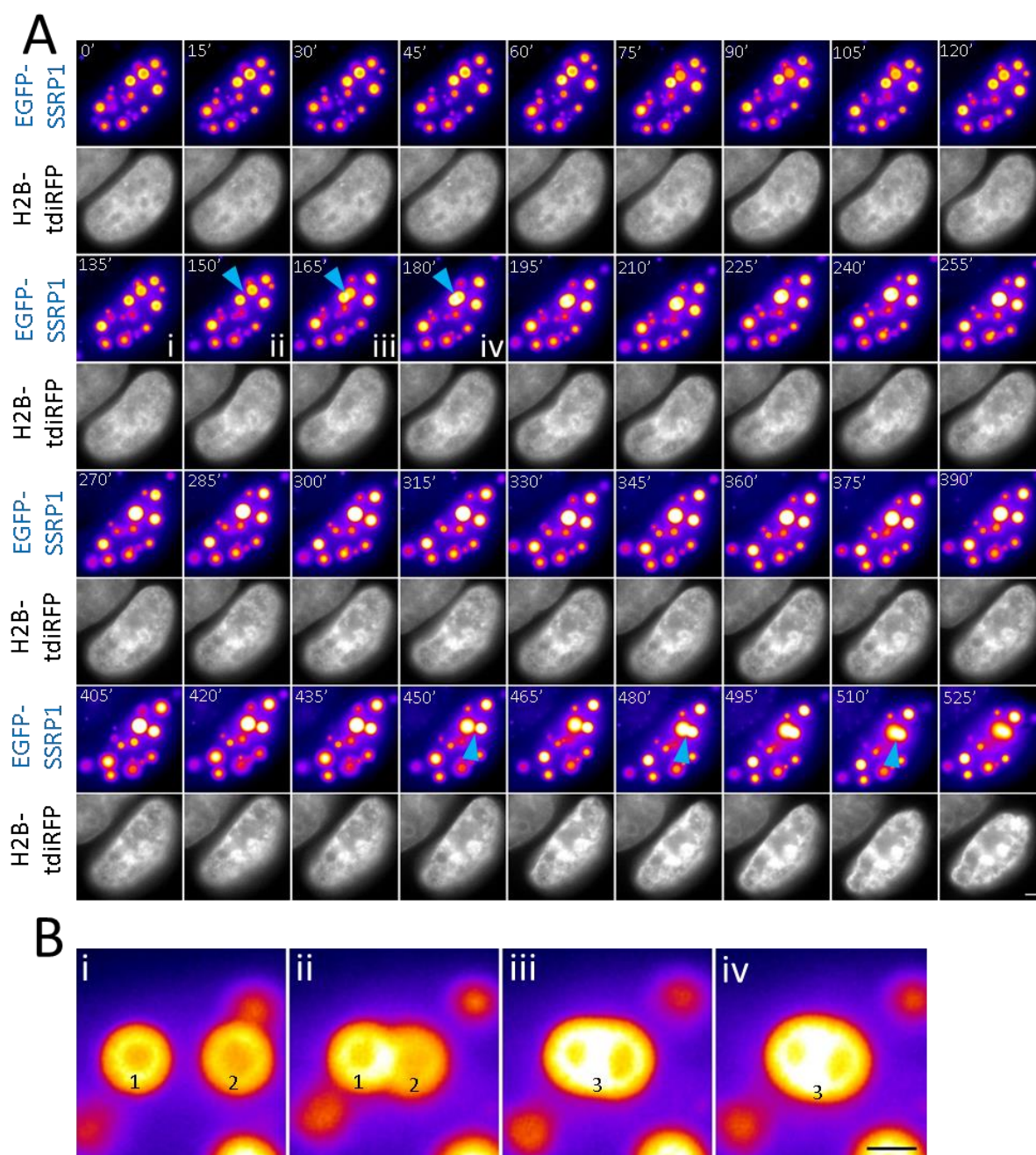
Pour étudier la capacité de fusion des gouttelettes DBP, les cellules U2OS-H2B-tdiRFP ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine EGFP-DBPwt. Vingt-quatre heures après transfection, la fluorescence de l'EGFP et de tdiRFP a été suivie dans les cellules vivantes toutes les 15 min pendant presque 10 h par microscopie à épifluorescence (Figure 45A). Au début de l'acquisition (0'), les noyaux comportent de petites ponctuations sphériques d'EGFP-DBPwt. Au fur et à mesure des acquisitions, des événements de fusion entre gouttelettes DBP sont observés (par exemple entre les temps 465 min et 495 min ou entre 540 min et 570 min) (flèches bleues, Figure 45A). L'agrandissement des images (Figure 45B) permet de décomposer cet événement où 2 gouttelettes à proximité (540 min), se rapprochent et fusionnent entre elles pour former une gouttelette de plus grande taille et ovoïde (570 min). Celle-ci évolue rapidement en une structure sphérique quasi parfaite (585 min). Dans ce film, on peut également constater que les gouttelettes EGFP-DBPwt sont dépourvues de signaux H2B-tdiRFP. Ceci est d'autant plus facile à observer lorsque les gouttelettes sont de grande taille. Ces résultats montrent la capacité de la DBP à former des gouttelettes capables de fusionner, une caractéristique de la LLPS.



**Figure 45. Les structures formées par DBP fusionnent entre elles dans les cellules U2OS. (A)** Des cellules U2OS-H2B-tdiRFP sont transfectées avec 2  $\mu$ g de plasmide codant pour la protéine EGFP-DBPwt. Une cellule vivante est suivie toutes les 15 min (24 h après transfection) durant 9,75 h (585' ou 585 min). Les signaux EGFP-DBPwt (Filtre « Fire » du logiciel Image J) et H2B-tdiRFP (gris) sont analysés. **(B)** Agrandissements de 2 structures (1 et 2) fusionnant pour former une plus grosse structure (3) et acquissent entre 540 min et 585 min. Microscopie plein champs (X63). (Barre d'échelle, 5  $\mu$ m en (A) et 1  $\mu$ m pour les agrandissements en (B)).



## IV.3.2 Structures formées par la protéine SSRP1.

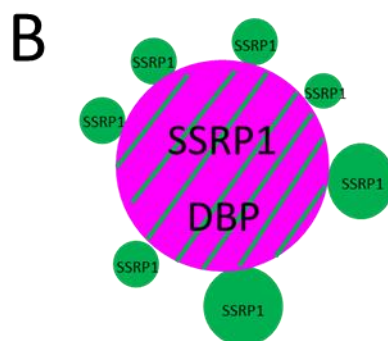
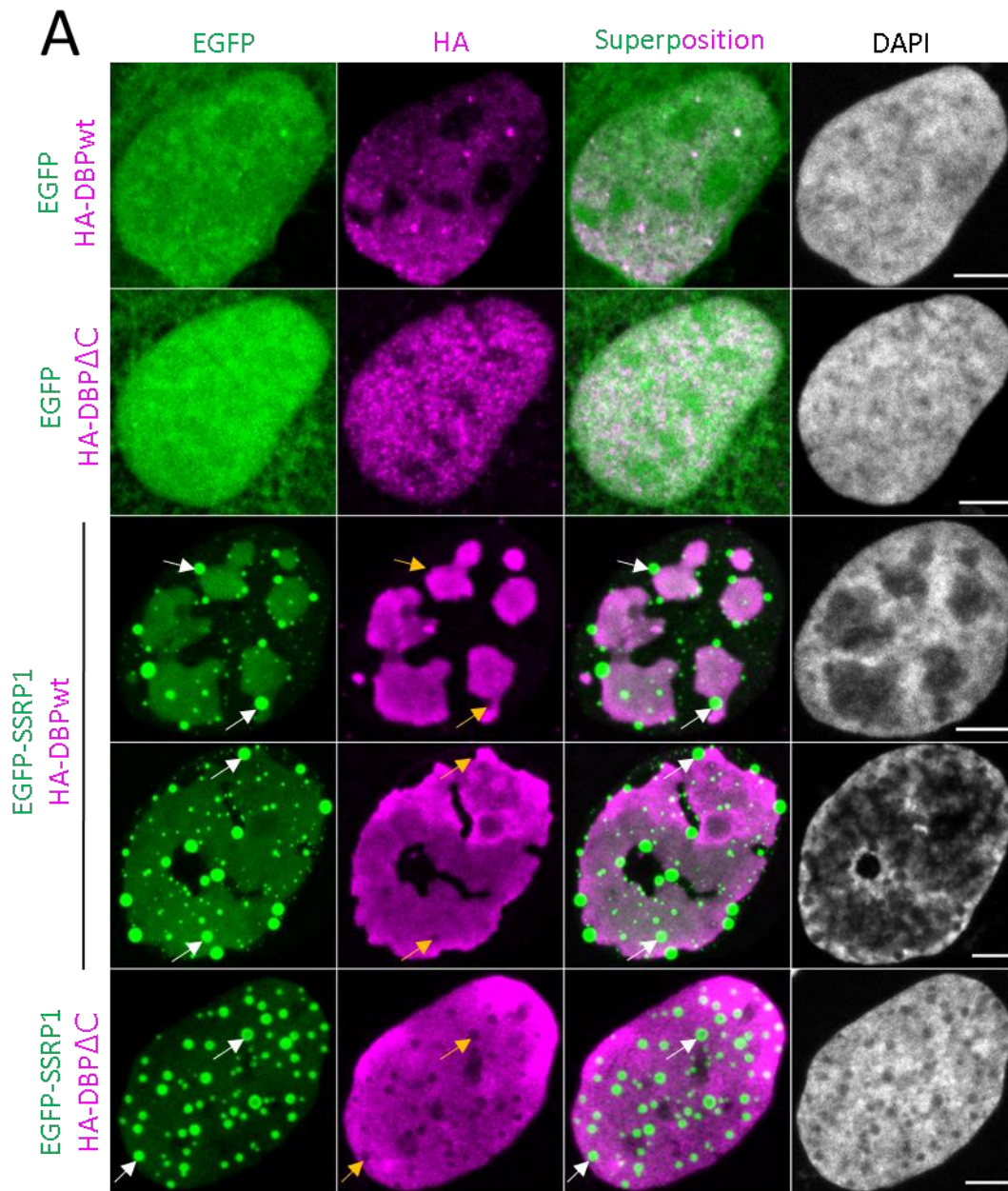


**Figure 46. Les structures formées par SSRP1 fusionnent entre elles dans les cellules U2OS. (A)** Des cellules U2OS-H2B-tdiRFP sont transfectées avec 2  $\mu\text{g}$  de plasmide codant pour la protéine EGFP-SSRP1. Une cellule vivante est suivie toutes les 15 min (24 h après transfection) durant 8,75 h (525' ou 525 min). Les signaux EGFP-SSRP1 (Filtre « Fire » du logiciel Image J) et H2B-tdiRFP (gris) sont analysés. Les vues i, ii, iii et iv correspondent aux temps d'acquisition pour lesquels les structures pointées par des flèches bleues sont agrandies en (B). **(B)** Agrandissements de 2 structures (1 et 2) en (i), fusionnant pour former une plus grosse structure (3) en (iii et iv) et suivies entre 135 min et 180 min. Microscopie plein champs (X63). (Barre d'échelle, 2  $\mu\text{m}$  en (A) et 1  $\mu\text{m}$  pour les agrandissements en (B).

La même expérience que précédemment a été réalisée pour SSRP1 et ce phénomène de fusion a ainsi été observé entre 2 gouttelettes EGFP-SSRP1 (Figure 46A). Ces gouttelettes EGFP-SSRP1 sont également dépourvues de chromatine cellulaire y compris pendant la fusion comme le démontre l'absence de signal H2B-tdiRFP dans ces structures.

La capacité des protéines DBP et SSRP1 à former individuellement des organelles sans membranes sous la forme de gouttelettes capables de fusionner entre elles après un contact, est un argument fort en faveur d'une formation des gouttelettes par LLPS.

IV.3.3 Les structures SSRP1 et DBP colocalisent dans des structures intranucléaires dépourvues d'histones similaires aux CR viraux.



**Figure 47. Les structures SSRP1 et DBP colocalisent dans des structures intranucléaires dépourvues d'histones similaires aux CR viraux. (A)** Des cellules U2OS sont co-transfectées avec les différentes combinaisons de plasmides : HA-DBPwt (2 µg) + EGFP (2 µg), HA-DBPΔC (2 µg) + EGFP (2 µg), HA-DBPwt (2 µg) + EGFP-SSRP1 (2 µg) et HA-DBPΔC (2 µg) + EGFP-SSRP1 (2 µg). Les cellules sont fixées (24 h après transfection) et une IF est réalisée avec les anticorps anti-HA (signal magenta). Les signaux GFP sont analysés (vert). Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux. Microscopie confocale (X63). Projections en Z (1,5 µm). (Barre d'échelle, 5 µm). **(B)** Schéma bilan montrant la colocalisation entre les protéines DBPwt et SSRP1 dans les mêmes structures sphériques intranucléaires excluant la chromatine cellulaire. Des structures sphériques indépendantes et formées par la protéine SSRP1 y sont également associées.

Dans les expériences précédentes, nous avons observé que la protéine DBP dans les cellules infectées présentait une localisation différente en fonction du niveau de surexpression de SSRP1, avec une colocalisation quand le niveau est faible et une association autour des gouttelettes de SSRP1 quand le niveau est fort. Nous avons voulu savoir si ces 2 protéines exprimées en l'absence d'infection par l'Ad5 gardaient ces propriétés, qui semblent étroitement liées à leur capacité à former des MLO par LLPS. Pour ce faire, les cellules U2OS ont été cotransfectées avec différentes combinaisons de plasmides et avec une quantité de 2 µg pour chaque plasmide : HA-DBPwt + EGFP, HA-DBPΔC et EGFP (contrôles), HA-DBPwt et EGFP-SSRP1, HA-DBPΔC et EGFP-SSRP1. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été fixées et analysées par IF à l'aide d'anticorps anti-HA (Figure 47A). Les cellules exprimant la combinaison des deux protéines HA-DBPwt et EGFP-SSRP1 révèlent la présence de gouttelettes HA-DBPwt plus ou moins sphériques. La grande majorité des cellules possèdent des structures sous des formes plus amorphes (troisième ligne). D'autres cellules comportent des structures HA-DBPwt occupant presque la totalité du noyau (quatrième ligne). Comme précédemment observé (Figure 43), la protéine HA-DBPΔC est diffuse dans le noyau car elle n'est plus capable de former des gouttelettes (Figure 47A, cinquième ligne). La protéine EGFP-SSRP1 colocalise avec les structures marquées par la protéine HA-DBPwt. La protéine EGFP-SSRP1 est également présente seule sous la forme de gouttelettes sphériques plus petites, excluant la protéine EGFP-DBPwt (flèche jaune) et excluant la chromatine cellulaire. Comme pour les expériences de transfection d'EGFP-SSRP1 et d'infections virales (Figure 34), des petites gouttelettes EGFP-SSRP1 sont ainsi localisées en périphérie des gouttelettes marquées par les 2 protéines HA-DBPwt et EGFP-SSRP1 (Figure 47B). La protéine EGFP-SSRP1 est également suffisante pour former des gouttelettes sphériques (flèches blanches), excluant la protéine HA-DBPΔC (flèches jaunes) et excluant la chromatine cellulaire. Ces résultats suggèrent que la protéine SSRP1 pourrait être recrutée dans les CR de manière indépendante de son association aux génomes viraux ou avec une autre protéine virale.



#### **IV.4 Conclusion générale du chapitre.**

Nous avons pu mettre en évidence que la sous-unité de FACT SSRP1 seule possède la capacité à former des MLO, tout comme DBP. Comme pour les CR viraux, ces MLO se forment dans le noyau et ont individuellement la propriété d'exclure la chromatine cellulaire. Nous avons également constaté que ces 2 protéines peuvent colocaliser à l'intérieur de gouttelettes semblables à celles formées par LLPS. Ces résultats récapitulent leur colocalisation au sein des CR viraux. Cette observation suggère que la protéine SSRP1 pourrait être recrutée dans les CR viraux de manière indépendante de son association avec une protéine virale ou aux génomes viraux. Sa capacité à se concentrer par LLPS associée à la protéine DBP, aux mêmes propriétés liquides permettrait cette relocalisation, tout en excluant la chromatine cellulaire. Nous avons mis en évidence plusieurs caractéristiques en faveur d'une formation de ces MLO par LLPS avec 1) la formation de gouttelettes caractéristiques, 2) leur faculté de fusion et 3) l'accessibilité partielle aux anticorps. Nos travaux comme pour d'autres (495) mettent en lumière des arguments forts en faveur d'une formation des CR viraux par LLPS en décomposant les CR viraux et en étudiant leurs constituants individuellement.

# RESULTATS

## (Parties SARS-CoV-2, Ad5 et EB)

La pandémie de SARS-CoV-2 m'a donnée l'opportunité de rejoindre le projet de recherche ANACONDA « Analysis of COVID-19 infection and inflammatory response on a fully differentiated human bronchial epithelium model ». Ce projet, mené au sein de l'université de Bordeaux par de nombreux acteurs avait pour objectifs de caractériser l'infection par le SARS-CoV-2 au moyen d'épithéliums bronchiques (EB) reconstitués de patient (503). Les EB ont été générés et cultivés par le doctorant Alexis Celle à l'hôpital de Haut-Lévêque (Laboratoire de Thomas Trian, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux (INSERM), Equipe Remodelage bronchique). Les infections et la fixation des EB ont été faites par Marie-Lise Blondot et Patricia Recordon-Pinson (Equipe de Marie-Line Andreola, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (CNRS), Equipe Andevir). Avec Harald Wodrich et Muriel Faure au laboratoire, ma contribution a été d'optimiser un protocole d'IF à partir des échantillons fixés, puis de réaliser les IF et les acquisitions par microscopie confocale (Bordeaux Imaging Center). Les acquisitions confocales ont enfin été quantifiées par Noémie Pied, post-doctorante au laboratoire. J'ai également profité de ce nouveau modèle au laboratoire pour étudier l'infection par l'Ad5, qui est, lui aussi un virus respiratoire. Le chapitre 5 de ce manuscrit regroupe les résultats sur le SARS-CoV-2 qui ont fait l'objet d'une publication et le chapitre 6 présente les résultats préliminaires obtenus pour l'Ad5.

## Chapitre 5

### V. Etude entre adultes et enfants de l'infection par le SARS-CoV-2 avec des épithéliums bronchiques reconstitués de patient : l'infection par le SARS-CoV-2 est restreinte par l'interféron de type III et induit la formation de syncytiums.

#### V.1 Introduction générale.

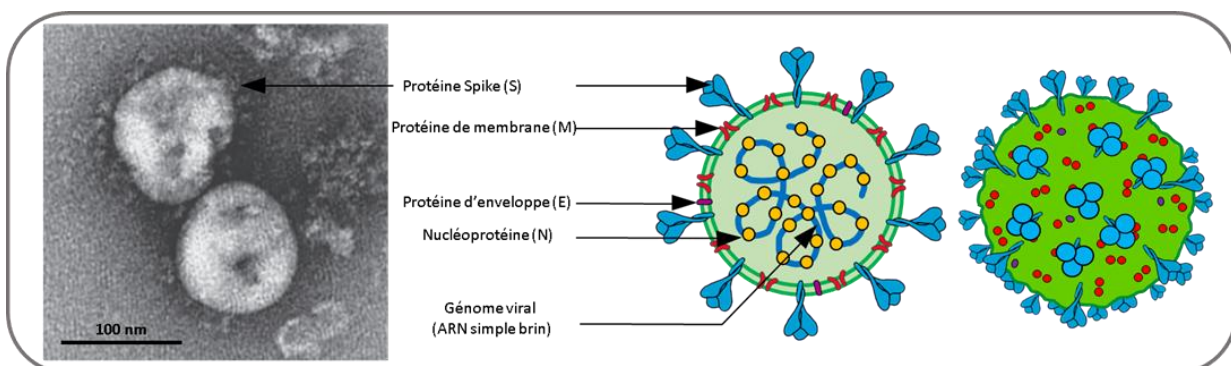
Le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) ou SARS en anglais (Severe acute respiratory syndrome) est une pathologie respiratoire grave causée par plusieurs virus appartenant à l'ordre des *Nidovirales* et plus particulièrement à la famille des *Coronaviridae*. Les coronavirus (CoV) sont des virus enveloppés et ils possèdent un génome à ARN simple brin, non segmenté, à polarité positive d'une taille d'environ 30 000 bases. Cette famille de virus est divisée en 4 genres avec les *Alphacoronavirus*, les *Betacoronavirus*, les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus*. Sept coronavirus sont connus pour infecter l'espèce humaine (« Human Coronavirus » ou HCoV). Deux appartiennent aux *Alphacoronavirus* (HCoV-229E et HCoV-NL63) et 5 appartiennent aux *Betacoronavirus* (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2). Le SARS-CoV-1 a été à l'origine d'une pandémie qui a touché 29 pays dans le monde. Malgré un signalement par de nombreux cas de pneumonies sévères atypiques depuis novembre 2002 dans la province chinoise de Guangdong, le SARS-CoV-1 a été détecté à Hong Kong en février 2003. A la fin de cette pandémie en juillet 2003, 774 personnes reportées ont perdu la vie pour 8096 cas au total (504). Le nouveau *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), initialement nommé 2019-nCoV, a été détecté pour la première fois en fin 2019 dans la ville chinoise de Wuhan (province de Hubei) et s'est ensuite rapidement propagé dans toutes les régions du monde. Le réservoir naturel du SARS-CoV-2 est encore inconnu mais il est très probablement la chauve-souris car sa séquence génomique possède 96,2 % d'homologie avec celle de la souche virale RaTG13, identifiée chez la chauve-souris (505). Il partage de plus 79 % d'homologie avec le SARS-CoV-1 et seulement 51,8 % avec le MERS (506). Ce virus est l'agent pathogène à l'origine de la maladie nommée COVID 19 (Coronavirus disease 2019). Bien que la pandémie de SARS-CoV-2 se poursuive encore à la date du 14 mai 2023, elle a causé jusqu'à présent plus de 6,9 millions de morts pour plus de 765 millions de cas dans le monde (WHO, <https://covid19.who.int/>). La communauté internationale s'accorde toutefois sur le fait que ces nombres restent largement sous-estimés (507).

#### V.1.1 Transmission et pathogénicité.

Le SARS-CoV-2 est transmis par des gouttelettes et des aérosols (508), par contact direct et par le contact avec des objets contaminés. Les premiers symptômes apparaissent après une période d'incubation entre de 4 à 5 j. Ce virus cible en majorité les cellules ciliées ((509) ; (510)) des voies

respiratoires inférieures (Figure 53). Dans la majorité des cas, les personnes infectées sont asymptomatiques, ou bien elles présentent des symptômes bénins. Cela peut inclure une perte d'odorat, de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue, des nausées, des courbatures ou encore de la diarrhée. Dans un nombre de cas plus restreint, les conséquences peuvent être fatales en menant à un syndrome de détresse respiratoire aigu ou « acute respiratory distress syndrome » (ARDS) en anglais (503). Cela se caractérise généralement après 7 j par une surcharge en fluide (511), une inflammation des voies respiratoires, une hypoxémie sévère et une insuffisance cardiaque. Le risque de contracter un COVID sévère est augmenté pour les hommes et chez les personnes présentant des facteurs de risque comme l'obésité, le diabète, des pathologies cardiaques, des pathologies pulmonaires ou encore l'âge ((512) ; (513) ; (514) ; (515)). Une corrélation entre âge et mortalité a été constatée avec une mortalité diminuée pour les enfants de moins de 9 ans (moins de 0,001%) et de plus de 8% pour les adultes de plus de 80 ans ((515) ; (516)). Malgré une observation possible de cas sévères ((517) ; (518)), cette protection conférée aux enfants s'explique par un contrôle plus rapide de l'infection et par une réponse inflammatoire plus faible (519). Plusieurs analyses par transcriptomique ont en effet révélé une pré-activation de la réponse IFN de type I et de type III (voir V.1.6) dans les voies respiratoires des enfants et qui décroît avec l'âge ((520) ; (521)). Des études ont également montré qu'en réponse à l'infection, des niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 (Interleukine 6) sont produits chez les enfants ((522) ; (523)). De manière similaire à ces travaux, nous avons observé que les EB d'enfants infectés par rapport à ceux provenant d'adultes produisent plus rapidement de l'IFN de type III (509). Nous avons montré qu'un traitement d'EB d'adultes avec de l'IFN de type III exogène permet de restreindre l'infection. Au contraire, une réponse déficiente de l'IFN de type III promeut l'infection. Nous avons également constaté une réponse inflammatoire atténuée chez les enfants.

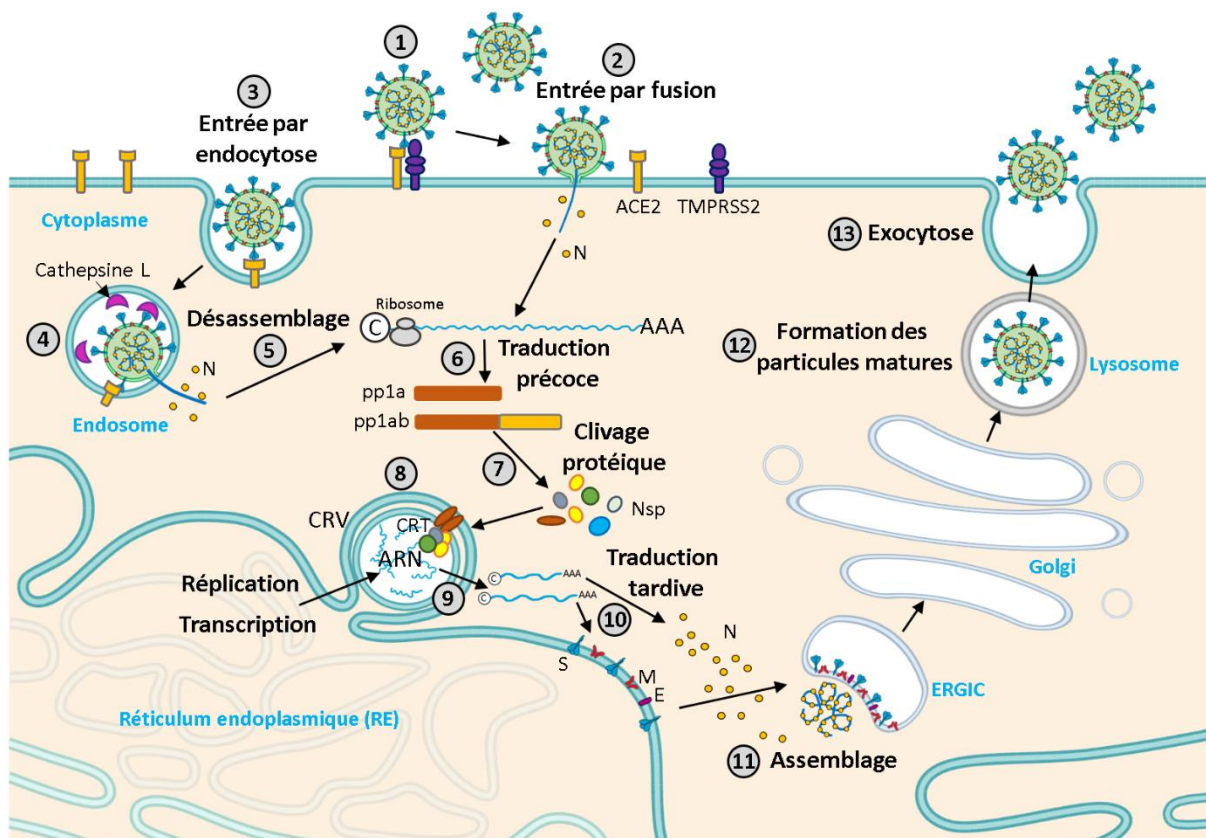
### V.1.2 Structure de la particule du SARS-CoV-2.



**Figure 48. Vues schématiques d'une particule virale de SARS-CoV-2.** Les vues schématiques en coupe (centre) ou entière (droite) d'une particule virale de SARS-CoV-2 montrent la constitution d'une nucléoprotéine composée par l'association du génome viral et de multiples copies de protéines

structurales N. La nucléoprotéine est protégée par une enveloppe lipidique comportant les protéines de structure S (Spike), M (Membrane) et E (Enveloppe). Particule virale par microscopie électronique (source image : (524)). (Adaptation de (525)).

Les particules du SARS-CoV-2 ont une taille d'environ 100 nm (526). Elles sont formées par les protéines de structure, la glycoprotéine de surface Spike (S) formant la « grosse » spicule, la protéine de membrane (M) et celle d'enveloppe (E). Ces 3 protéines sont insérées dans l'enveloppe.



**Figure 49. Cycle viral simplifié du SARS-CoV-2.** (1) Le SARS-CoV-2 se lie au récepteur cellulaire ACE2 via sa protéine S. Elle est ensuite clivée par la protéase TMPRSS2. (2) Le virus pénètre dans la cellule cible par fusion avec la membrane plasmique (Entrée par fusion). (3) Les particules peuvent emprunter la voie d'endocytose s'il n'y a pas de clivage par TMPRSS2. (4) Une fois dans l'endosome, la protéine S est clivée par la cathepsine L. Cela permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. (5) Après libération du génome ARN, (6) les 2 polyprotéines pp1a et pp1ab sont traduites et (7) clivées en protéines non structurales Nsp. (8) Des complexes de réplication viraux constitués par l'invagination de doubles membranes issues du réticulum endoplasmiques sont mis en place. Ils permettent la réplication et (9) la transcription virale. (10) Les protéines de structure et accessoires sont finalement synthétisées par la traduction des ARN subgénomiques. (11) De nouvelles particules virales sont formées au niveau de la voie ERGIC par incorporation de génomes viraux associés aux protéines N à l'intérieur d'une enveloppe membranaire comportant les protéines S, M et E. (12) Les particules virales sont ensuite maturées dans l'appareil de Golgi et dans les lysosomes et (13) sont finalement libérées par exocytose. (Adaptation de (527) et de (525)). (Schéma généré avec Biorender.com).

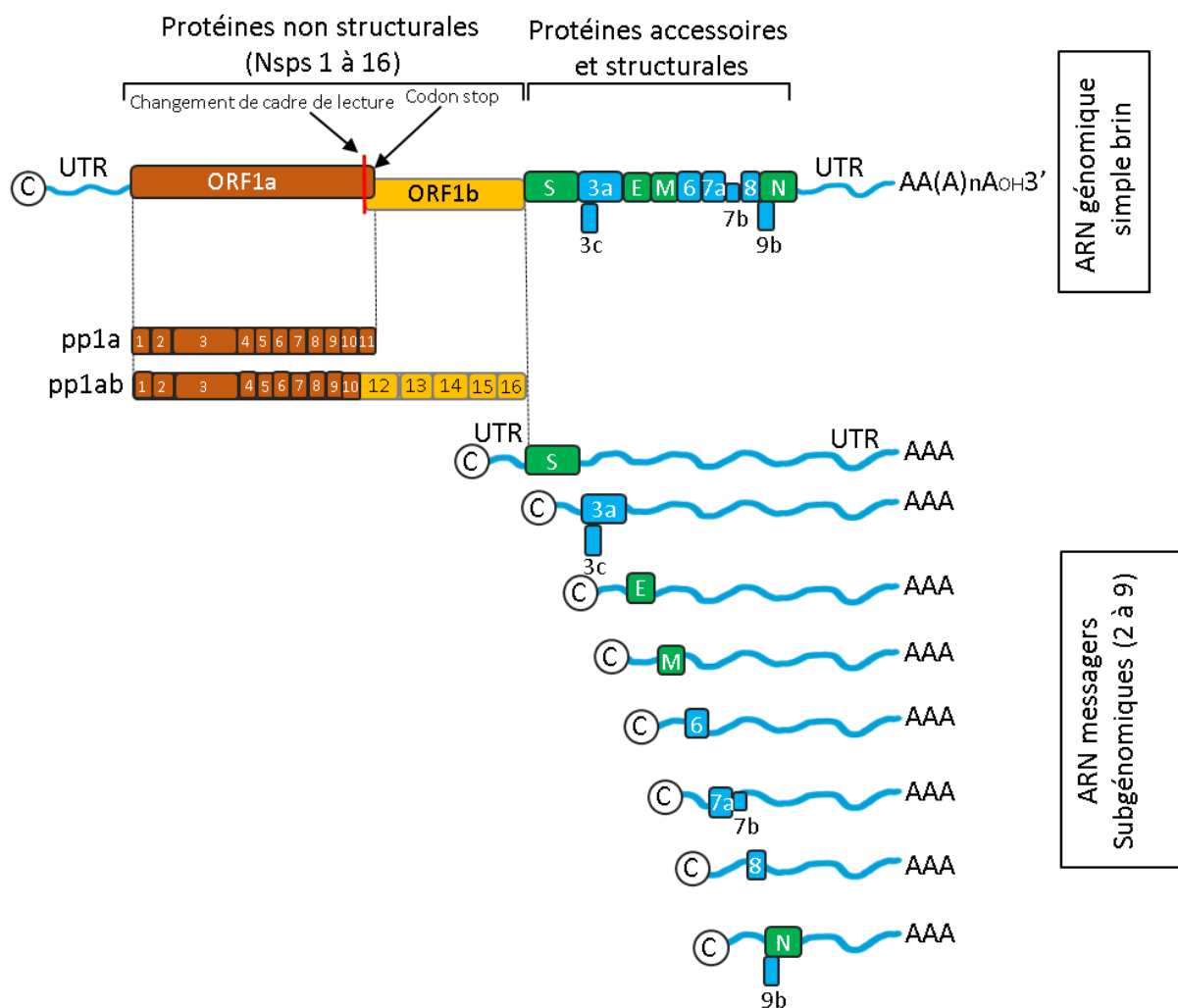
La protéine E forme un canal ionique participant à l'assemblage des particules (528). La protéine M est essentielle à l'incorporation du génome viral durant l'assemblage des particules ((529) ; (530)). La

protéine S se lie au récepteur cellulaire « enzyme de conversion de l'angiotensine 2 » ou « angiotensin-converting enzyme 2 » (ACE2) et permet l'entrée virale dans les cellules par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique ou endosomale (Figure 49) (531). La nucléocapside hélicoïdale est formée par l'association de multiples protéines de nucléoprotéine (N) avec l'ARN viral.

### V.1.3 Organisation génomique du SARS-CoV-2.

Le génome de l'isolat initial du SARS-CoV-2 de Wuhan possède une taille de 29903 bases (NCBI : MN908947.3) (532). Il comporte 14 cadres ouverts de lecture (ORFs) et code pour 29 protéines virales connues (Figure 50). A l'extrémité 5' UTR se trouve une coiffe et la partie 3' UTR est polyadénylée. Les 2 premiers tiers du génome viral possèdent 2 grands cadres de lecture nommés ORF1a et ORF1b. Ces cadres de lecture codent pour 16 protéines non-structurales (Nsp 1 à Nsp 16). De nombreuses fonctions sont attribuées aux protéines Nsp comme l'inhibition de la traduction des ARN messagers cellulaires par Nsp1 ((533) ; (534) ; (535)) ou la formation du complexe de réplication et de transcription viral par Nsp12 et les protéines Nsp7, Nsp8, Nsp9 et Nsp13 ((536) ; (537)). Les protéines Nsp3 et Nsp4 sont impliquées dans la formation des vésicules de réplication virales à double membrane ((538) ; (539)). Des ARN subgénomiques sont transcrits à partir de la partie 3' et possèdent les mêmes régions 5' UTR et 3' UTR. Ils codent pour les 4 protéines de structure S, M, E, S et pour 9 protéines accessoires ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9a, ORF9b et ORF10. Les protéines accessoires jouent un rôle dans le contrôle de la réponse antivirale et du métabolisme cellulaire (540).





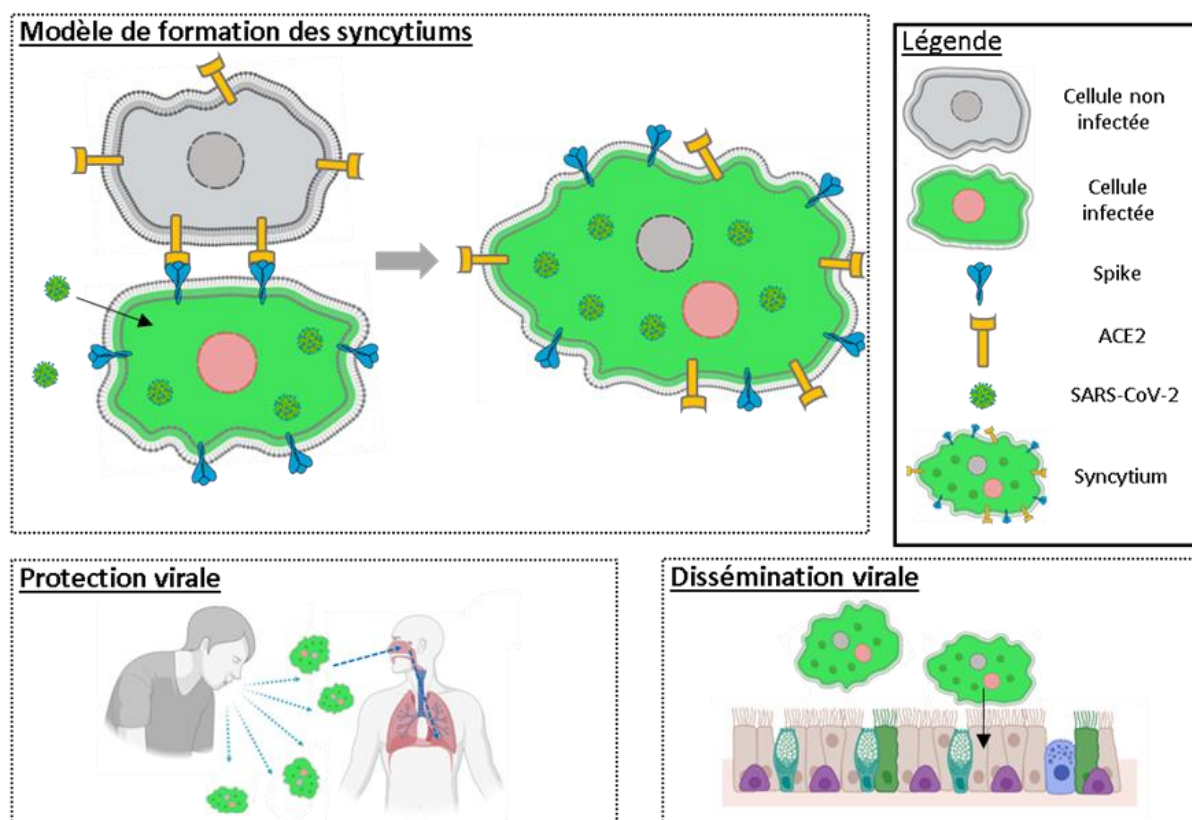
**Figure 50. Schéma simplifié de l'organisation du génome ARN simple brin du SARS-CoV-2.** Le génome ARN simple brin d'environ 30 000 bases est constitué des 2 cadres de lectures chevauchant ORF1a et ORF1b codant respectivement pour les polyprotéines pp1a et pp1ab. Les polyprotéines sont ensuite clivées et permettent la formation des protéines non structurales Nsp. La partie 5' possède une coiffe et la partie 3' est polyadénylée. Des régions non codantes UTR sont également trouvées aux extrémités génomiques. Les protéines structurales et accessoires sont exprimées à partir des ARN subgénomiques, codés par la région 3' du génome. Ils codent pour les protéines S, E, M, N et pour les protéines accessoires. (Adaptation de (537)).

#### V.1.4 Emergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2.

Depuis l'émergence du SARS-CoV-2 à Wuhan (Wuhan-Hu-1) (541) et de sa diffusion dans le monde entier, de nombreux variants sont apparus et se sont continuellement succédés ((525) ; (542)). Ces nouveaux variants sont caractérisés par l'accumulation de mutations dans les domaines RBD (Receptor Binding Domain) et S1 de la protéine S. D'autres mutations apparaissent également dans les autres protéines structurales comme la protéine N ((543) ; (544)) et non structurales comme la protéine Nsp6 (545). Ces mutations sont associées à une virulence plus élevée, une plus forte transmissibilité et confèrent la possibilité d'une évasion immunitaire par une neutralisation diminuée des anticorps

dirigés contre le domaine RBD et le motif de liaison au récepteur (RBM) ((546) ; (547) ; (548) ; (543)). Les variants les plus fréquents qui se sont succédés sont les variants Alpha (B.1.1.7) (549), Beta (B.1.351) (550), Delta (B.1.617.2) (551), Epsilon (B.1.427/B.1.429) (552) et Omicron (B.1.529) (553). Des études ont de plus montré une efficacité vaccinale diminuée pour le variant Omicron. Les anticorps neutralisants issus des 2 premières doses vaccinales (souche Wuhan-Hu-1) ne permettent pas d'inhiber efficacement ce variant ((554) ; (555) ; (556)). L'émergence plus récente du nouveau variant d'Omicron (XBB.1.5) (557) et qui s'est propagé rapidement aux Etats-Unis semble être caractérisé par une plus forte contagiosité en raison d'une affinité plus élevée pour le récepteur cellulaire ACE2 (558).

**V.1.5 Les syncytiums se forment durant l'infection de nombreux virus par fusion de cellule à cellule.**



**Figure 51. Formation et fonctions des syncytiums durant l'infection par le SARS-CoV-2.** L'association de cellules infectées et non-infectées par l'interaction entre les protéines virales Spike (S) et le récepteur cellulaire ACE2 induit la formation de syncytiums par fusion des membranes cellulaires. De nombreux rôles hypothétiques peuvent être attribués aux syncytiums formés durant l'infection par le SARS-CoV-2. Nous formulons comme d'autres (559) les hypothèses d'une dissémination virale au sein du tractus respiratoire ou de la protection de particules virales pour une dissémination entre individus. (Adaptation de (559)). (Schéma généré avec Biorender.com).

Les syncytiums sont des cellules géantes polynucléées formées par la fusion de plusieurs cellules. Les syncytiums peuvent être observés au sein de tissus musculaires (560), de tissus placentaires (561) ou

peuvent également être induits par l'infection de nombreux virus. Ils sont notamment observés durant l'infection par le VIH ((562) ; (563)), le virus respiratoire syncytial RSV ((564) ; (565)), les virus Influenza ((566) ; (567)), les *Herpesviridae* dont le HCMV ((568) ; (569)) ou par l'EBV (570). La formation de syncytiums a déjà été décrite pour le SARS-CoV-1 dans des tissus pulmonaires de patients (571) mais également dans des lignées cellulaires infectées comme les cellules Vero E6 (572). Des syncytiums sont également induits par l'infection du SARS-CoV-2 ((573) ; (574) ; (575) ; (576) ; (577) ; (510)). La protéine S du SARS-CoV-2 est en effet suffisante pour induire la fusion de cellule à cellule en interagissant avec le récepteur cellulaire ACE2 ((578) ; (505)) (Figure 51). Les fonctions des syncytiums dans la pathogénicité du SARS-CoV-2 restent méconnues. Des rôles hypothétiques sont cependant attribués (559) comme l'activation de l'inflammation, la dissémination virale ((510) ; (579)), l'élimination de cellules immunitaires ((580) ; (581)) ou encore pour une évasion du système immunitaire (582).

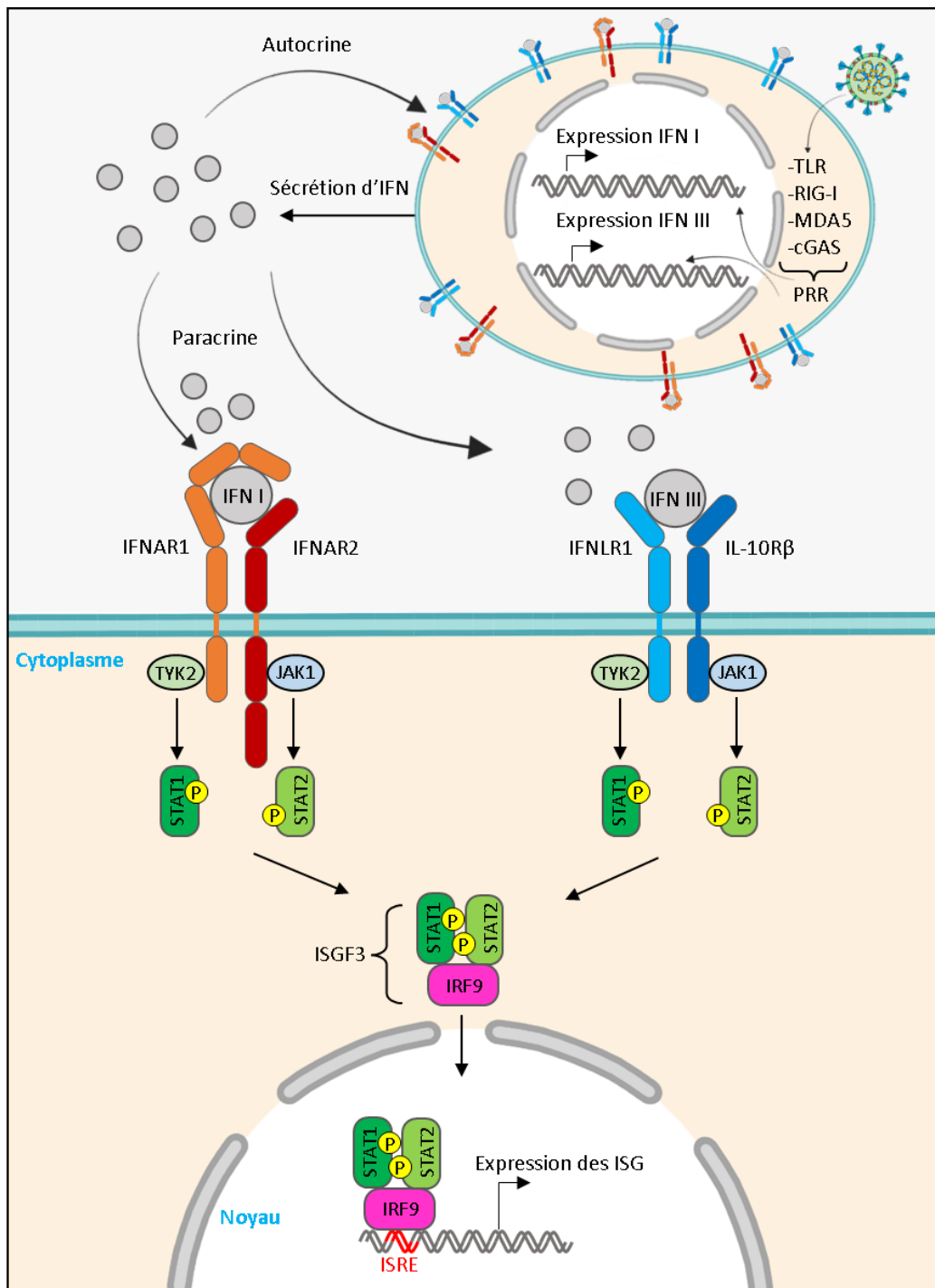
#### **V.1.6 Infection virale et contrôle de la réponse interféron.**

Les IFN sont des cytokines qui participent à la réponse immunitaire notamment lors d'une infection virale (583). Les IFN sont divisés en 3 types (I, II et III) en fonction du récepteur sur lequel ils se fixent.

Les IFN de type I sont composés de multiples sous-types : l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  et des autres IFN moins bien caractérisés (IFN- $\delta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\omega$  et IFN- $\zeta$  (souris)). L'IFN- $\alpha$  est produit généralement par les cellules immunitaires dont les monocytes et les cellules dendritiques. Tous les IFN de type I se fixent au même récepteur hétérodimérique formé par les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2.

L'IFN de type II est essentiellement composé par l'IFN- $\gamma$ . Il n'est pas directement sécrété par les cellules infectées mais par les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T.

Les IFN de type III (IFN  $\lambda$ ) sont divisés entre l'IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), l'IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), l'IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) et l'IFN- $\lambda$ 4 (584). Les IFN- $\lambda$  peuvent être sécrétés par tous les types cellulaires dont les cellules épithéliales pulmonaires (585) durant une infection virale à la différence des IFN- $\alpha$ . Tous les IFN de type III se fixent sur le même récepteur hétérodimérique IFNLR formé par les sous-unités IFNLR1 (IL28R $\beta$ ) et IL10R $\beta$ . Les IFN de type III se lient premièrement à la sous-unité IFNLR1. La seconde sous-unité est ensuite recrutée pour former un complexe permettant d'induire une cascade de signalisation.



**Figure 52. Voies de signalisation de l'IFN de type I et de type III.** Une fois la cellule infectée par un virus, celui-ci peut être détecté par des PRR cellulaires. Cette détection active l'expression et la sécrétion d'IFN (type I et type III). Les IFN lient leur récepteur et induisent leur propre production par la cellule infectée (fonction autocrine) ou par les cellules environnantes (fonction paracrine) afin de prévenir l'infection. Le récepteur de la voie de signalisation de l'IFN de type I est un hétérodimère composé de l'IFNAR2 et de l'IFNAR1. Pour la voie de l'IFN-III, celui-ci est également un hétérodimère formé de IFNLR1 et de IL-10Rβ. Les 2 sous-unités IFNAR2 et IL-10Rβ interagissent avec JAK1 et les 2 sous-unités IFNAR1 et IFNLR1 interagissent avec TYK2. L'activation de la voie de signalisation conduit ensuite à l'assemblage du facteur de transcription ISGF3 permettant d'induire de multiples ISG après sa translocation dans le noyau (Adaptation de (586) et de (585)). (Schéma généré avec Biorender.com).

Malgré la présence de plusieurs récepteurs en fonction des différents types d'IFN, les voies de signalisation activées par les IFN de type I et III sont communes ainsi que leurs réponses transcriptionnelles ((587) ; (586) ; (585)) (Figure 52). D'une manière simplifiée, l'activation des kinases TYK2 (Tyrosine kinase 2) et JAK1 (Janus kinase 1) suite à la dimérisation des 2 sous-unités des récepteurs aux IFN permet d'induire la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Le facteur de transcription ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) est ensuite formé entre ces 2 protéines phosphorylées et la protéine IRF9. Ce facteur de transcription est transloqué dans le noyau et permet d'induire la transcription des ISG (Interferon-stimulated genes) en se liant aux séquences ISRE (Interferon-Sensitive Response Element). Plusieurs centaines d'ISG ont été décrits et codent pour des protéines qui, par divers mécanismes, permettent de restreindre l'infection virale ((588) ; (589)). L'enzyme OAS1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1) inhibe par exemple l'infection virale et la production de virions notamment pour le SARS-CoV-2 (590). L'enzyme CH25H (Cholesterol-25-Hydroxylase) permet par exemple d'inhiber l'entrée virale en modifiant le métabolisme du cholestérol ((591) ; (592)).

Les IFN de type I et III peuvent également être produits après la détection de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par divers PRR cellulaires (Pattern-Recognition Receptors). La localisation des PRR au niveau des endosomes comme les Toll-Like Receptors (TLR3 et TLR4) ou dans le cytosol (RIG-I, MDA5 et cGAS) permet d'orienter la production d'IFN de type I ou de type III. La signalisation causée par le TLR4 au niveau de la membrane plasmique induit par exemple une réponse IFN de type III (593) alors que celle induite au niveau des endosomes active une réponse IFN de type I (594). D'une manière très simplifiée, la signalisation engendrée par les PRR permet d'activer des facteurs de transcription de la famille des IRF (Interferon Regulatory Factor). La formation de complexes entre ces IRF et le facteur NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-Kappa B) entraîne l'expression des IFN lorsqu'ils sont transloqués dans le noyau (585).

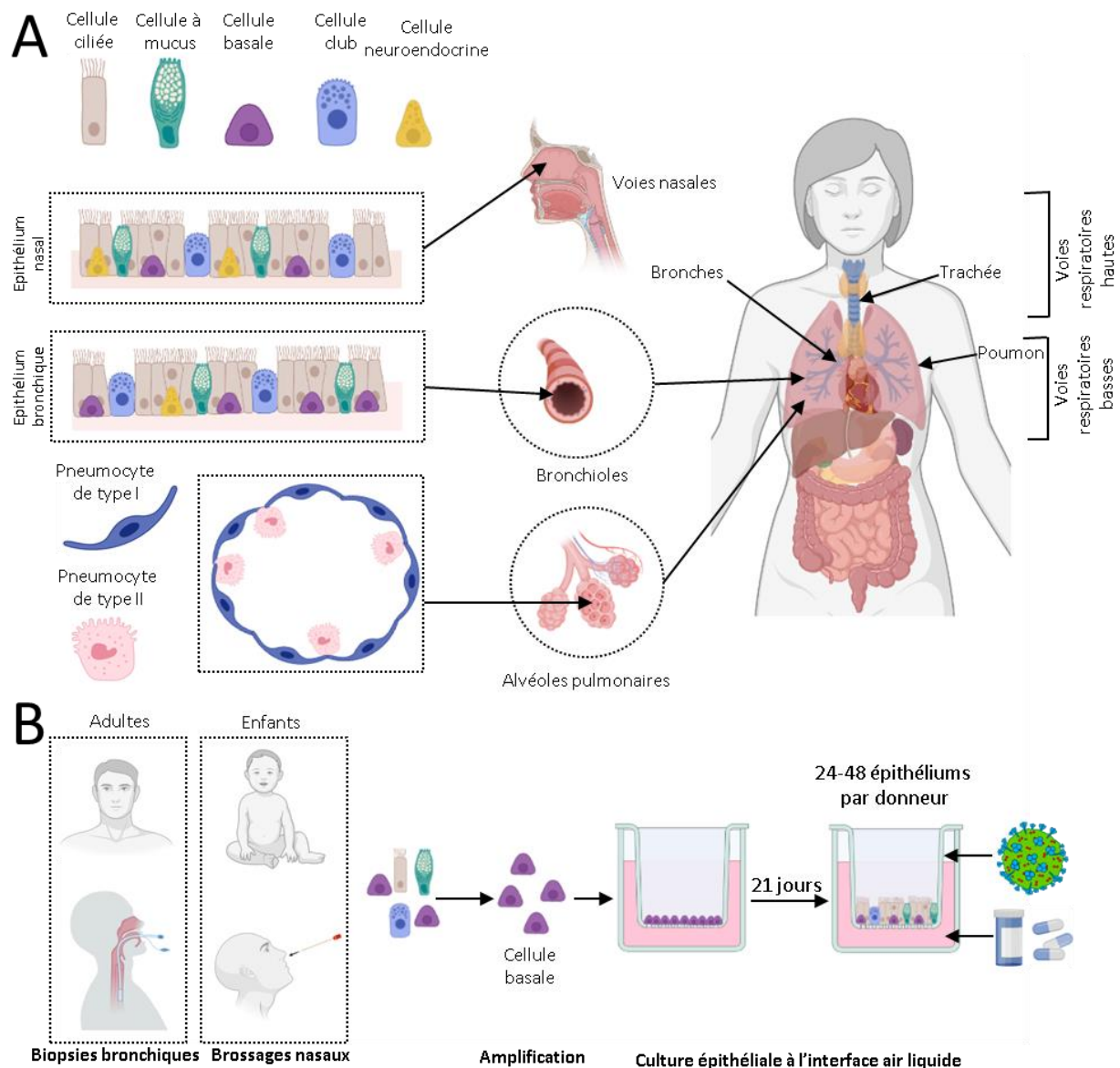
Les IFN sont sécrétés par les cellules infectées et peuvent à nouveau les auto-stimuler (fonction autocrine). Les IFN activent d'une manière paracrine les cellules non infectées environnantes afin de stimuler l'expression d'ISG et prévenir l'infection ((591) ; (585)).

Depuis l'émergence du SARS-CoV-2, il a été montré que les IFN de type I et III jouent de multiples rôles cruciaux depuis les phases précoces jusqu'aux phases avancées de l'infection ((595) ; (596) ; (597) ; (598)). La réponse IFN au début de l'infection détermine notamment une protection plus ou moins élevée comme montré par un contrôle rapide de l'infection chez les enfants à la différence des adultes ((519) ; (520) ; (521)). L'importance de la réponse IFN dans le contrôle de l'infection est également visible par la description de cas sévères en raison de déficiences pour les voies de la réponse IFN ((599)

; (600) ; (601)) et des mutations dans l'ISG codant pour OAS1 (602). Dès le début et tout au long de l'infection, le SARS-CoV-2 contrôle la réponse IFN par de multiples mécanismes d'évasion impliquant presque la totalité des protéines virales ((598) ; (603)). La protéine S inhibe par exemple la réponse IFN de type I en se fixant au facteur de transcription IRF3 (604). La réponse IFN est également contrôlée par l'inhibition de l'import nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et STAT1 par la séquestration des sous-unités RAE1 et NUP68 du pore nucléaire (605). L'ensemble de ces études a contribué à proposer des moyens thérapeutiques en utilisant les IFN en combinaison avec des antiviraux. L'Intron A (IFN- $\alpha$ 2b), l'Avonex (IFN- $\beta$ 1a) et le Peginterferon Lambda-1a (IFN- $\lambda$ 1) sont par exemples utilisés en clinique (606).

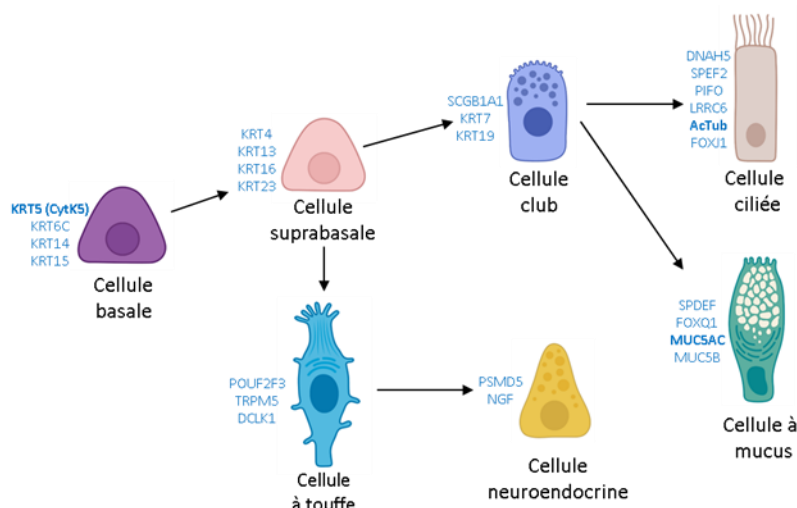
#### **V.1.7 Morphologie et composition cellulaire du tractus respiratoire humain et des EB reconstitués.**

Le tractus respiratoire humain est composé par les voies respiratoires hautes (voies nasales, le pharynx, le larynx et la trachée) et par les voies respiratoires basses (les poumons) (Figure 53). Les poumons assurent les échanges gazeux entre l'environnement extérieur et le sang en permettant d'assimiler le dioxygène et de libérer le dioxyde de carbone. L'air est acheminé dans les poumons au travers d'un arbre bronchique se ramifiant jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Cet arbre bronchique est constitué par 23 ramifications commençant par la trachée puis les bronches, les bronchioles et se terminant par les alvéoles pulmonaires situées en partie la plus distale (607). Les alvéoles pulmonaires sont constituées de pneumocytes de type I (fonction de structuration) et de pneumocytes de type II (fonction sécrétrice de surfactant) permettant d'assurer les échanges gazeux (608). Les épithéliums nasaux possèdent une organisation tissulaire et cellulaire similaire aux épithéliums bronchiques. Ces épithéliums sont pseudostratifiés et polarisés. Ils se composent de cellules ciliées, de cellules sécrétrices de mucus, de cellules club et de cellules neuroendocrines (525). Sur la face apicale, les cellules à mucus ont un rôle de protection en produisant du mucus. Les cils des cellules ciliées permettent par des mouvements hélicoïdaux répétés, une élimination du mucus. Les cellules basales se situent sur la face basale des tissus et possèdent une fonction de soutien.



**Figure 53. Composition du tractus respiratoire humain et des épithéliums bronchiques reconstitués de patients. (A)** Schéma de l'organisation cellulaire et tissulaire des voies respiratoires humaines. Les voies nasales (voies respiratoires hautes) possèdent une organisation tissulaire et cellulaire similaire aux bronches et bronchioles pulmonaires (voies respiratoires basses). Les épithéliums pseudostratifiés sont polarisés et se composent de cellules ciliées, de cellules sécrétrices de mucus, de cellules club et de cellules neuroendocrines. Les cellules basales se situent sur la face basale des tissus. Les alvéoles pulmonaires sont constituées de pneumocytes de type I et II et permettent les échanges gazeux et l'assimilation de dioxygène dans le sang. **(B)** Schéma de la procédure utilisée pour générer les EB reconstitués de patients (adultes et enfants). Les EB sont reconstitués *in vitro* à l'interface air-liquide au moyen de cellules basales prélevées par biopsies ou par des brossages nasaux. Entre 24 et 48 EB sont produits pour chaque donneur et permettent des études comparatives. (Adaptation de (525) et de (609)). (Schéma généré avec Biorender.com).





**Figure 54. Voies simplifiées de différenciation des cellules épithéliales respiratoires.** Les cellules progénitrices basales peuvent se différencier en cellules suprabasales et peuvent générer à la fois les cellules club ou les cellules à touffe. Les cellules neuroendocrines sont produites par les cellules à touffe et les cellules ciliées et à mucus sont produites à partir des cellules club. Des marqueurs cellulaires permettent de différencier et de caractériser ces différents types cellulaires comme la cytokératine 5 (KRT5 ou CytK5) pour les cellules basales, la mucine 5AC (Muc5AC) pour les cellules à mucus, la tubuline acétylée (AcTub) ou encore FoxJ1 pour les cellules ciliées. (Adaptation de (610) et de (609)). (Schéma généré avec Biorender.com).

Les cellules basales sont de plus des cellules progénitrices pouvant être identifiées par les marqueurs protéiques dont TP63 (transformation-related protein) ou les protéines du cytosquelette intermédiaire CytK5 (Cytokeratin 5) et KRT14 (Cytokeratin 14) ((611) ; (612)). A la suite d'une lésion et afin de rétablir l'intégrité de l'épithélium, les cellules basales se dédifférencient en cellules club (dont le marqueur est SCGB1A1) puis en cellules à mucus (marqueur MUC5AC) ou en cellules ciliées (marqueur FOXJ1 (Forkhead box protein J1) et tubuline acétylée)) (Figure 54). Les cellules à mucus et les cellules club ont également la capacité de se dédifférencier en l'absence des cellules basales et devenir des cellules progénitrices (KRT5<sup>+</sup>/TP60<sup>+</sup>) ((613) ; (614)).

Les cultures des EB sont établies selon le protocole décrit en figure 53B. Brièvement, des frottis bronchiques ou des biopsies bronchiques sont réalisés pour des patients adultes ou pour des enfants entre la troisième et la cinquième génération bronchique (501). Les EB sont générés à partir de la dédifférenciation des cellules basales collectées et amplifiées avec les prélèvements bronchiques. Après une mise en culture à l'interface air-liquide en présence de facteurs de croissance adaptés durant 21 j, les cellules basales initiales reconstituent des EB fonctionnels.

L'avantage de ce modèle d'épithéliums respiratoires est qu'il utilise des cellules primaires de patients, plus proches du contexte physiologique des voies respiratoires humaines. Un autre avantage de ce modèle est de permettre des études comparatives entre des adultes, des enfants, des patients sains

ou encore des patients avec des pathologies. Comme présenté en figure 53, (609) les EB sont pseudostratifiées et sont constitués des 3 types cellulaires identifiés, cellules ciliées, cellules à mucus et cellules basales. Ce modèle est déjà utilisé pour l'étude du SARS-CoV-1 (615) et du RSV (616). Depuis la pandémie de COVID 19, un nombre croissant d'études sur le SARS-CoV-2 a été réalisé avec ce modèle, soit commerciaux (509), soit avec des EB dérivés de patients adultes (617) ou d'enfants (618) comme ceux utilisés dans notre étude (510). D'autres travaux ont été menés avec des EB reconstitués à partir de cellules nasales ((619) ; (620)).

Les résultats de nos travaux sur le SARS-CoV-2 sont présentés dans un premier temps sous la forme de l'article publié dans le journal PNAS (*Beucher et al., 2022* (510) ; voir V.2). D'autres résultats complémentaires figurants dans la partie « Informations supplémentaires » de cet article mais également non publiés sont inclus et commentés dans la seconde partie (voir V.3).

V.2 Résultats publiés

PNAS

RESEARCH ARTICLE

MICROBIOLOGY

OPEN ACCESS



# Bronchial epithelia from adults and children: SARS-CoV-2 spread via syncytia formation and type III interferon infectivity restriction

Guillaume Beucher<sup>a,1</sup>, Marie-Lise Blondot<sup>a,1</sup>, Alexis Celle<sup>b,1</sup>, Noémie Pied<sup>a</sup>, Patricia Recordon-Pinson<sup>a</sup>, Pauline Esteves<sup>b</sup>, Muriel Faure<sup>a</sup>, Mathieu Métifiot<sup>a</sup>, Sabrina Lacomme<sup>a</sup>, Denis Dacheux<sup>a,d</sup>, Derrick R. Robinson<sup>a</sup>, Gernot Längst<sup>e</sup>, Fabien Beaufrils<sup>b,f</sup>, Marie-Edith Lafon<sup>a,g</sup>, Patrick Berger<sup>b,h</sup>, Marc Landry<sup>c,i</sup>, Denis Malvy<sup>j</sup>, Thomas Trian<sup>b,2</sup>, Marie-Line Andreola<sup>a,2</sup>, and Harald Wodrich<sup>a,2</sup>

Edited by Linda Saif, The Ohio State University, Wooster, OH; received February 12, 2022; accepted May 17, 2022

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections initiate in the bronchi of the upper respiratory tract and are able to disseminate to the lower respiratory tract, where infections can cause an acute respiratory distress syndrome with a high degree of mortality in elderly patients. We used reconstituted primary bronchial epithelia from adult and child donors to follow the SARS-CoV-2 infection dynamics. We show that, in epithelia from adult donors, infections initiate in multiciliated cells and spread within 24 to 48 h throughout the whole epithelia. Syncytia formed of ciliated and basal cells appeared at the apical side of the epithelia within 3 to 4 d and were released into the apical lumen, where they contributed to the transmittable virus dose. A small number of reconstituted epithelia were intrinsically more resistant to virus infection, limiting virus spread to different degrees. This phenotype was more frequent in epithelia derived from children versus adults and correlated with an accelerated release of type III interferon. Treatment of permissive adult epithelia with exogenous type III interferon restricted infection, while type III interferon gene knockout promoted infection. Furthermore, a transcript analysis revealed that the inflammatory response was specifically attenuated in children. Taken together, our findings suggest that apical syncytia formation is an underappreciated source of virus propagation for tissue or environmental dissemination, whereas a robust type III interferon response such as commonly seen in young donors restricted SARS-CoV-2 infection. Thus, the combination of interferon restriction and attenuated inflammatory response in children might explain the epidemiological observation of age-related susceptibility to COVID-19.

SARS-CoV-2 | bronchial epithelia | syncytia | interferon response | children

In late 2019, clusters of patients with pneumonia were identified in Wuhan, China, and were subsequently shown to be infected with the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (1–3). SARS-CoV-2 infections are associated with acute respiratory illness referred to as COVID-19. Since its description, SARS-CoV-2 infections are at the root of an enduring worldwide pandemic, having caused over 5.4 million deaths and more than 300 million confirmed infections (<https://coronavirus.jhu.edu/>).

SARS-CoV-2 is an enveloped virus with a positive single-stranded RNA of around 30 kb. The virus particle contains four structural proteins, the genome packaging Nucleocapsid (N) and the transmembrane proteins Envelope (E), Membrane (M), and Spike (S) (4–6). The surface exposed Spike protein gives the virus its crown-like appearance in electron microscopy (EM) and mediates the attachment to the main cellular receptor ACE2 (7). Coronaviruses can cause a wide range of respiratory illnesses, from mild upper respiratory tract infections up to a severe acute respiratory syndrome (8). The latter is characterized by a delayed interferon (IFN) response, excessive cytological damage, and inflammation (9). Postmortem biopsies in patients that died from COVID-19 point to airways and lungs as primary targets of the disease (10, 11), with advanced diffuse alveolar damage, pulmonary thrombosis, and abnormal syncytia formation (12, 13). Several studies suggest that cytokine storm and inflammatory infiltrates in the alveolar space are associated with disease severity and death in response to COVID-19 (14, 15).

While SARS-CoV-2 is genetically close to SARS-CoV, it shows much higher effective transmissibility (16, 17). One reason for this higher contagiousness is an active virus replication in tissues of the upper respiratory tract at an early stage of infection, with large amounts of virus produced 4 d after the beginning of symptoms, and an active replication in the throat (18, 19). Furthermore, the viral load detected in

## Significance

Bronchial epithelia are the primary target for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections. Here, we reconstituted bronchial epithelia from adult and child donors and show that SARS-CoV-2 infections spread fast, resulting in the formation and synchronized release of large clusters of infected cells and syncytia into the apical lumen, contributing to virus dissemination. Some epithelia, for the most part from children, revealed an intrinsic resistance to infection and virus spread. This infection control correlates with faster type III interferon secretion and can be transferred to permissive epithelia through exogenous interferon application. Child epithelia also showed a muted inflammatory response compared with adult, suggesting a specific and age-adapted epithelial response to SARS-CoV-2 infection that may explain why children are less susceptible to severe COVID-19.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2022 the Author(s). Published by PNAS. This open access article is distributed under Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

<sup>1</sup>G.B., M.-L.B., and A.C. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: thomas.trian@u-bordeaux.fr, marie-line.andreola@u-bordeaux.fr, or harald.wodrich@u-bordeaux.fr.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2202370119/-/DCSupplemental>.

Published June 24, 2022.



asymptomatic patients was similar to that of symptomatic patients on the fourth day after symptom onset (20), suggesting equal transmission potential of asymptomatic or minimally symptomatic patients at very early stages of infection (21).

Epidemiological data show that all ages of the population are susceptible to SARS-CoV-2 infection; however, the SARS-CoV-2 infection severity differs between the child and adult population, consolidating a large discrepancy in death rates of SARS-CoV-2-infected patients associated with age (22). Children under the age of 9 y have very low fatality rates of SARS-CoV-2 infection (under 0.001%) compared to older patients (increasing to 8% in elderly patients >80 y). A recent metadata analysis of several studies confirmed this correlation between age and disease severity (23). Still, the reason for this age-related difference is not clear.

Only limited information is available considering the mechanisms of intraepithelial viral spreading and virus release, or interindividual transmission. Over the course of a 51-d period, infection of a reconstituted human airway epithelium infected with SARS-CoV-2 showed multiple waves of viral replication associated with the degradation of tight junctions and a decrease in the number of cilia in the epithelial cells (24, 25). In this model, plaque-like cytopathic structures could be observed with the formation of multinucleated cells reminiscent of fused cells forming syncytia (26). Syncytia formation due to Spike-ACE2 interactions were readily observed in cultured cells, but their pathophysiological role remains unclear (27, 28).

IFN induction appears to be limited in the most severe clinical cases (29–31). Viral RNA production in bronchial epithelia (BE) increased at 2 d postinfection (dpi). In contrast, release of IFN lambda (IFN  $\lambda$ ) was induced at 4 dpi of BE, suggesting a delay in the induction of the cellular antiviral response. Recent reports studying cell-intrinsic changes occurring in cells derived from upper airways from children, adults, and the elderly infected with SARS-CoV-2 have shown that aging contributed to viral load, transcriptional responses, IFN signaling, and antiviral responses (32). Another study using single-cell transcript analysis from upper airway cells of different age group donors suggested that children mount an accelerated antiviral immunity in the upper respiratory tract due to elevated baseline levels of innate sensors such as MDA5 and RIG-I (33). Innate sensing of SARS-CoV-2 triggers type I and III IFN responses, and MDA5, and possibly RIG-I, are emerging as main specific pathogen recognition receptors (34–36). A strong correlation between severe COVID-19 and inborn errors in the IFN system further highlights the importance of the IFN response in SARS-CoV-2 infection control (31). Despite this emerging picture, studies addressing the SARS-CoV-2 infection process in the BE, a model mimicking the primary infection site, are limited. Here we reconstituted BE in air-liquid interface derived from BE samples of adult and child donors. We monitored the replication of SARS-CoV-2 over several days and followed virus spread in the epithelia. Imaging revealed the synchronized and vast formation and apical release of cells and syncytia occurring between 3 and 4 dpi. The released cells retained infectivity, suggesting they contribute to the spreading of the virus in the epithelium. Furthermore, we observed reconstituted BE, mostly from children, with very low viral production and restricted viral spread correlated to rapid type III IFN release. In addition, permissive child epithelia showed an attenuated inflammatory response compared to adults. These results may explain the clinical and epidemiological observations that SARS-CoV-2 infections have a more severe clinical manifestation in older patients.

## Results

**Generation of a Fully Differentiated BE Model.** Primary infections with SARS-CoV-2 often initiate in the upper respiratory tract, from which they can spread to the lower respiratory tract to cause severe disease (17). BE are pseudostratified cell layers with typical tight junctions to connect the epithelia layer, as well as a mucus layer and beating cilia on the lumen side (37, 38). To study the SARS-CoV-2 infection process in a physiologically relevant model, we established a cellular in vitro model of BE differentiated in air-liquid interface from individual donors (*SI Appendix, Fig. S1*). Primary BE cells were collected from surgical bronchial resection or fibroscopy from individual adult donors collected in the bronchial tree between the third and fifth generation at Bordeaux University hospital. Patients were between 29 and 74 y old, with a normal body mass index (BMI) (Table 1). Moreover, all donors had normal or subnormal lung function, with a percentage of FEV1  $\geq$  70 and a FEV1/FVC ratio  $\geq$  0.7. Basal epithelial cells were expanded in vitro and differentiated on cell culture inserts at the air-liquid interface for  $\sim$ 21 d (*SI Appendix, Fig. S1A*). This differentiation protocol generated between 12 and 24 individual inserts from a single donor, allowing comparative analysis. Immunofluorescence (IF) analysis confirmed the presence of differentiated cell types. Detection of acetylated tubulin (AcTub), mucin 5A (Muc5A), and cytokeratin 5 (CytK5) identified multiciliated cells, goblet cells, and basal cells, respectively (*SI Appendix, Fig. S1 B and C* and *Movies S1* and *S2*), confirming the pseudostratified apical-to-basolateral organizational integrity of the BE, for example, a single-cell layer of apical multiciliated cells covering a layer of basal cells. This organization was verified by EM, showing the presence of well-differentiated cilia and tight junctions (*SI Appendix, Fig. S1D*). Next, we determined the localization of ACE2, the primary receptor for SARS-CoV-2, using IF analysis (*SI Appendix, Fig. S1E* and *Movie S3*). Colabeling with antibodies against ACE2 and AcTub confirmed that ACE2 was expressed in apical multiciliated cells as previously reported (2, 39). Moreover, our data showed the pronounced exposure of ACE2 on individual cilia reaching into the apical lumen, which suggests that the ACE2 entry receptor can be easily accessed by viruses from the respiratory tract.

**SARS-CoV-2 Monitoring and BE Infection.** Next, BE were inoculated on the apical side with 1,200 plaque-forming units (PFU) of SARS-CoV-2 for 1 h, followed by inoculum removal.

**Table 1. Clinical and functional characteristics of subjects**

Characteristic	Adults	Children
No. of patients	12	7
Sex (M/F)	5/7	3/4
Age, y	58.67 $\pm$ 2.46	9.02 $\pm$ 1.36
Range, y	29–74	4–12
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	23.20 $\pm$ 0.72	15.51 $\pm$ 0.72
Lung function		
Smoking status (no. current/former/nonsmoker)	2/7/3	NA
FEV1%	92.20 $\pm$ 7.74	86.20 $\pm$ 19.1
FEV1/FVC ratio	0.83 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.05

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Lung function was measured only in four children, and was not measured in the three children under 5 y old. FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced volume capacity; NA, not applicable.



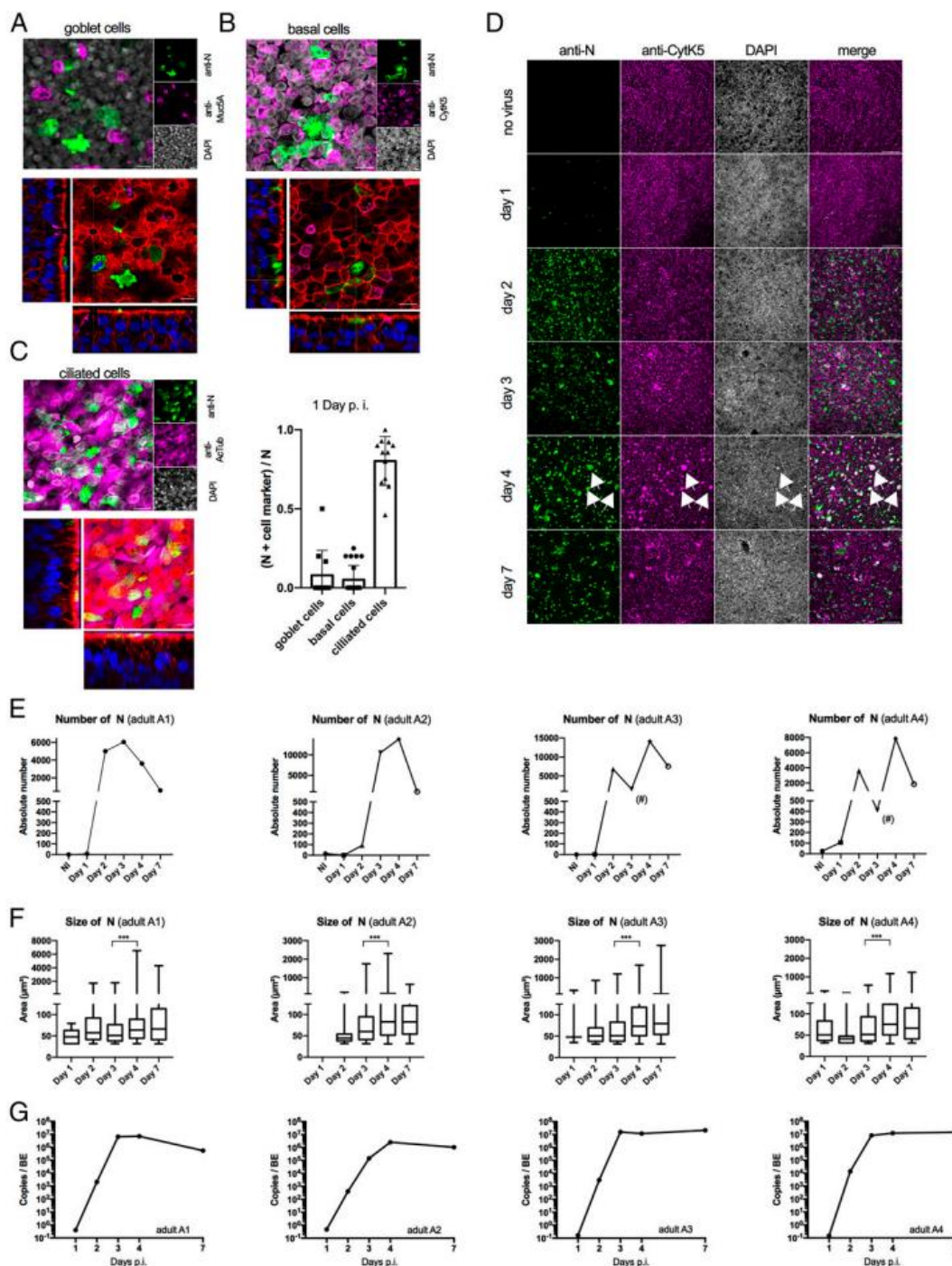
Apical and basolateral compartments were collected 3 dpi and used to infect Vero E6 cells for 3 d. Infectivity was determined 3 dpi by endpoint titration, showing a median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) between  $5.24 \times 10^4$ /mL and  $1.68 \times 10^4$ /mL (corresponding to 36,156 and 11,592 PFU/mL) for the apical compartment. Infectivity for the basolateral compartment was below the detection limit (20.7 PFU/mL). These data demonstrated that SARS-CoV-2 actively replicates in reconstituted BE and that newly produced virions are released from the apical side 3 dpi. To detect virus-infected cells, we generated monoclonal antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (N). Clone 3G9 was selected, which specifically recognized N (SI Appendix, Fig. S2A) and stained infected cells (SI Appendix, Fig. S2B). To identify the primary cell target during SARS-CoV-2 infection, fully differentiated BE were infected following the above infection protocol. BE were fixed 1 dpi and processed for IF analysis using SARS-CoV-2 N-specific antibodies (Fig. 1 A–C). Specific colabeling with antibodies against Muc5A (Fig. 1A and Movie S4) or CytK5 (Fig. 1B and Movie S5) showed that neither goblet nor basal cells were the primary cell target at the beginning of the infection. Conversely, at 1 dpi, anti-N staining was systematically associated with staining for AcTub, a specific marker for multiciliated cells (Fig. 1C and Movie S6). Quantification revealed that over 80% of infected cells costain with the ciliated cell marker, confirming that ciliated cells are the primary target (Fig. 1C, Right). This is consistent with previous reports that apical multiciliated cells are the primary target cells for SARS-CoV-2 infection (2, 26, 40). BE were also costained with fluorescent phalloidin to mark cell boundaries for three-dimensional (3D) imaging of the entire epithelial depth (3D imaging; displayed as Movies S1–S12). Infected cells were exclusively located at the apical surface of the BE, confirming TCID<sub>50</sub> results in the apical vs. basolateral compartment.

To understand how SARS-CoV-2 spreads in the epithelium after initial infection of multiciliated cells, we next infected BE from several individual adult donors and monitored them over the course of 7 d. For four adult donors (A1 to A4), we used IF detection of infected cells and performed image analysis at different dpi (Fig. 1). Anti-N-specific signals could be detected as soon as 1 dpi in a small number of cells. The number of infected cells and signal intensity increased drastically starting at 2 dpi and decreased slightly toward the end of the 7-d observation period (Fig. 1D, adult A3). Similar results were obtained with the other adults, suggesting rapid onset of viral replication and spread (SI Appendix, Fig. S3). We next quantified the number of anti-N-positive signals for each donor, confirming that the number of infected cells strongly increased within 2 dpi to 3 dpi, reaching a maximum around 4 dpi, and decreased somewhat by 7 dpi (Fig. 1E). At the peak of infection, the staining with anti-N antibodies revealed several enlarged structures. These structures colabeled with CytK5, the marker for basal cells (see arrows in Fig. 1D and SI Appendix, Fig. S3), and appeared at 3 dpi but were most prominent at 4 dpi for all donors. This was confirmed by quantifying the size of the anti-N signals over time (Fig. 1F), showing a statistically significant increase in average signal size between 3 and 4 dpi. In parallel, release of newly produced viruses into the apical lumen was quantified by RT-qPCR (Fig. 1G). For all four donors, the viral RNA copy number present in the lumen correlated with the observed cellular anti-N labeling, with a fast increase from 2 dpi reaching a plateau between 3 and 4 dpi. These data confirm that apical SARS-CoV-2 inoculation of BE resulted in efficient infection and subsequent progeny production and release into the apical lumen.

**Infected Multiciliated Cells Form Syncytia with Basal Cells at the Apical Side of the BE.** The enlarged N-positive structures forming at 3 dpi to 4 dpi were revealed as multinucleated cells reminiscent of syncytia when observed at high magnification. They could be found in all areas of the infected epithelia derived from the four donors but were absent in noninfected control BE (Fig. 1 and SI Appendix, Fig. S3). Unexpectedly, the N-positive syncytia-like structures also stained positive for the basal cell marker CytK5 (Fig. 2A), despite the fact that basal cells were rarely infected and did not form syncytia-like structures at earlier time points. To verify that these structures were indeed multinucleated syncytia, we quantified the number of nuclei from ~30 syncytia-like structures, randomly at 4 dpi, selected based on the N signal for each of the four donors (Fig. 2B). Several analyzed structures had multiple nuclei, with two of the donors (A3 and A4) having a larger average number of nuclei and thus likely being in an advanced infection state. This analysis confirmed that syncytia are formed upon BE infection within 3 dpi to 4 dpi. To better understand syncytia formation, we next quantified the number of double-positive cells (i.e., anti-N and anti-CytK5) over time (Fig. 2C). The proportion of double-positive cells (i.e., syncytia) increased constantly and reached a maximum at 4 dpi, after which we observed a drastic drop in the number of double-positive cells (Fig. 2C, Left). Normalization of the double-positive cells for either the total number of basal cells (Fig. 2C, Middle) or the total number of infected cells (Fig. 2C, Right) revealed that double-positive cells, but not total infected cells, disappeared at 4 dpi. When observed at high magnification, we saw that syncytia in different regions of the BE also frequently lost their stain for AcTub (Fig. 2D, Upper). Syncytia that still expressed AcTub showed an amorphous staining pattern, rarely distinguishing cilia features. Part of the syncytial structures also failed to stain with phalloidin used to delineate the cellular actin cortex (e.g., Fig. 2D, Lower). Furthermore, 3D imaging showed that syncytia formed exclusively on the apical side of the BE, often identified as an elevated layer on top of the epithelia (Fig. 2A, Right and Fig. 2D, Bottom; see also Movies S7 and S8). Such cell extrusions in infected epithelia were also observed using EM (Fig. 2E, white asterisk), but never in the context of noninfected epithelia (SI Appendix, Fig. S1). Extruded cells had only reminiscent cilia structures, unlike multiciliated cells in noninfected epithelia, consistent with a previous report that SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells triggers partial loss of cilia (25). Importantly, using EM, we observed vesicular inclusions within the extruded cells that contained viral particles, indicating that multinucleated infected cells actively produced viruses (Fig. 2E, black arrows). Taken together, our IF analysis strongly suggested that syncytia were formed through the fusion of infected ciliated cells with basal cells, coinciding with the loss of cilia and reorganization of cytoskeletal features including the actin and tubulin cytoskeleton. To validate this assumption, we performed triple labeling at 4 dpi with antibodies against basal and ciliated cell marker (CytK5 and AcTub) and identified infected cells via N stain (Fig. 2F). This analysis confirmed that syncytia formation occurred only on the apical side of the BE, commonly showing loss of cell identity defining features. Moreover, syncytia stained positive for both cell markers (i.e., CytK5 and AcTub), indicating a possible fusion event between ciliated and basal cells (top view in Fig. 2F and side view in Fig. 2G; see also Movie S9).

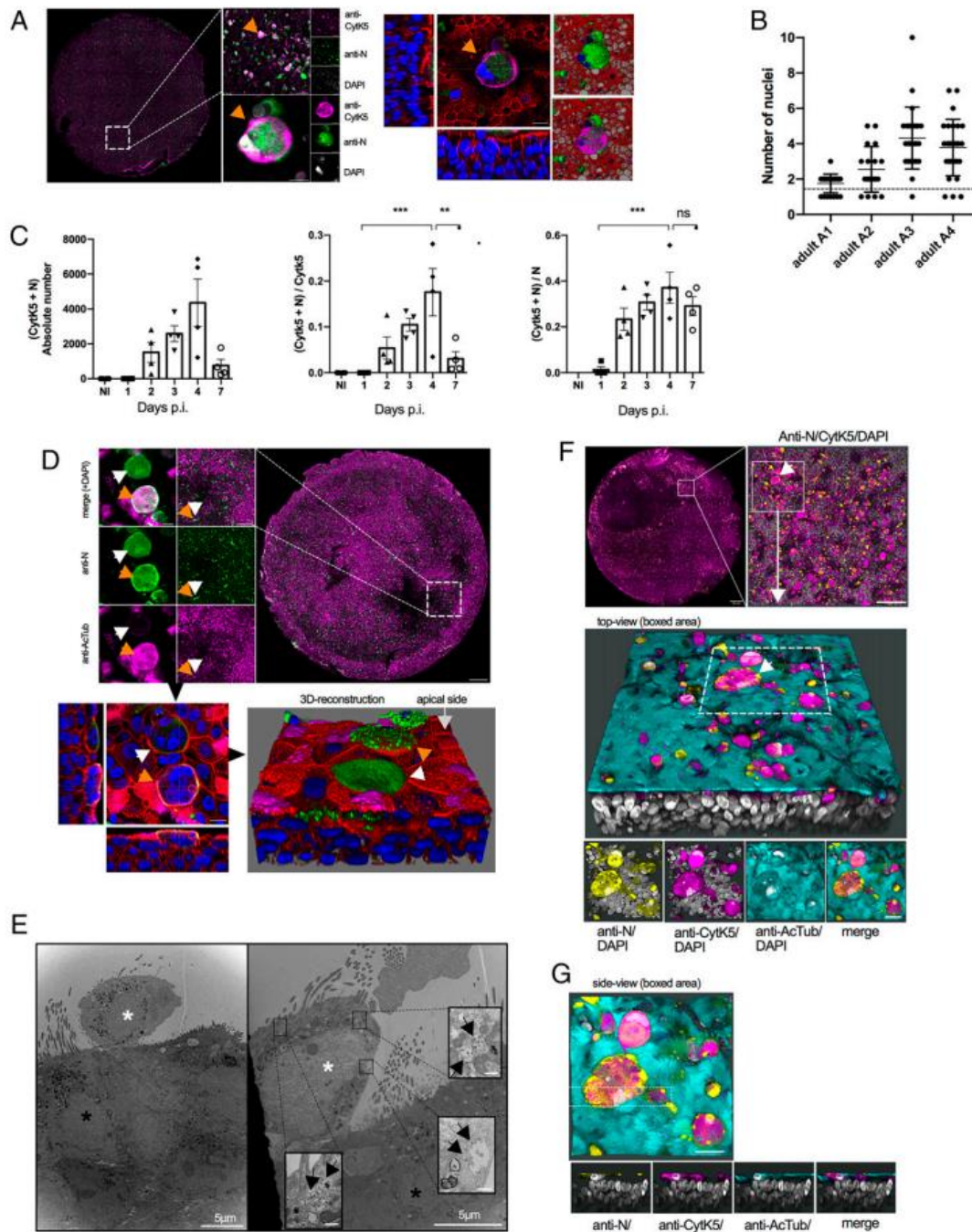
**Infected Cells and Syncytia Are Released into the Apical BE Lumen and Transmit Infection.** Because cells and syncytia were extruding from the epithelium, we wondered whether infected cells/syncytia could be released from the epithelium and account





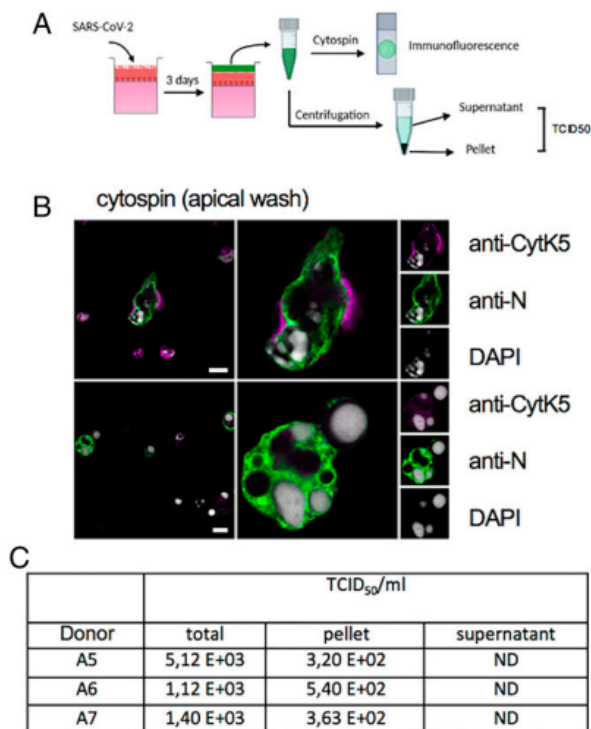
**Fig. 1.** SARS-CoV-2 infection of BE. (A) Differentiated BE were infected with SARS-CoV-2 and stained 24 h postinfection with anti-N (green signal) to identify infected cells and with anti-Muc5A to detect goblet cells (magenta signal) and counterstained with DAPI (gray signal). *Top* shows a Z projection, and *Bottom* shows an individual Z section counterstained with phalloidin (red signal) and DAPI (blue signal). (Scale bar, 10  $\mu$ m.) For full Z stack, see [Movie S4](#). (B) As in A but stained with anti-N (green signal) and anti-CytK5 to identify basal cells (magenta signal). (Scale bar, 10  $\mu$ m.) For full Z stack, see [Movie S5](#). (C) (Left) As in A but stained with anti-N (green signal) and anti-ActTub to identify multiciliated cells (magenta signal). (Scale bar, 10  $\mu$ m.) For full Z stack, see [Movie S6](#). (Right) Quantification of the colocalization of N vs. ActTub, CytK5 or Muc5A for at least 11 images per marker from one or two donors. (D) SARS-CoV-2 infection kinetic of BE: representative widefield microscopy images of BE from adult donor (A3) at low resolution. (Scale bar, 50  $\mu$ m.) BE were fixed at days 1, 2, 3, 4, and 7 as indicated to the left of each row; noninfected controls were also fixed at day 7. BE were stained with anti-N antibodies to detect infected cells (green signal, first column) and anti-CytK5 to detect basal cells (magenta signal, second column), counterstained with DAPI (gray signal, third column), and merged (fourth column). Large specific signals in all channels are apparent on day 4 (white arrows). (E) The absolute number of N-positive signals was determined for each BE for the whole epithelia on each day and is shown as absolute number of N dots at different dpi (detailed in [SI Appendix, Supplemental Methods \(Imaging\)](#)); \*partial BE damage. (F) Signals quantified in E were classed by size and plotted as min to max box and whisker plots, \*\*\* $P < 0.001$  based on one-way ANOVA analysis. (G) Apical washes for each BE were subjected to RT-qPCR analysis to determine genome copy numbers at days 1, 2, 3, 4, and 7 postinfection as indicated.





**Fig. 2.** SARS-CoV-2 infection of BE produces apical syncytia. (A) Analysis of entire BE 4 dpi (Left). BE were stained with anti-N (green signal) and anti-CytK5 antibodies (magenta signal) and counterstained with DAPI (gray or blue signal). Individual syncytia (orange arrow) are further magnified as maximum Z projection (Left) or as individual Z stack (Right, with phalloidin counterstain in red), or as 3D image reconstruction to see its apical location. (Scale bar, 10  $\mu$ m for the right panel and magnified bottom left panel, 50  $\mu$ m for the magnified top left panel and 500  $\mu$ m for the BE overview.) See also *Movie S7*. (B) Quantification of the number of nuclei per syncytia-like structure for donors A1 to A4 ( $n = 30$  per epithelia). Multinucleated cells are above the dashed line. (C) Quantification of the total number of double-positive cells (N and CytK5, Left) and normalized for total number of basal cells (Middle) and total number of infected cells (Right) using semiautomatic quantification. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 4$  (donors A1 to A4). \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ , ns = non significant, based on one-way ANOVA analysis. (D) Analysis of entire BE 4 dpi as in A. BE were stained with anti-N (green signal) and anti-AcTub antibodies (magenta signal) and counterstained with DAPI (upper panel, gray or lower panel, blue signal) and represented as 3D image reconstruction with phalloidin counterstain (lower panel, red signal). Double-positive syncytia are marked by an orange arrow, and single-positive syncytia are marked by a white arrow. (Scale bar, 10  $\mu$ m for the highest magnification (upper left and 3D image), 200  $\mu$ m for the intermediate magnification (upper middle), and 500  $\mu$ m for the BE overview.) See also *Movie S8*. (E) Electron micrograph of infected BE 4 dpi. The large images show extruded cell on the apical side of the epithelia (white asterisk) adjacent to multiciliated cells (black asterisk). Insets show virus-containing vacuoles in the extruded cell indicated by black arrows. (Scale bars, 5  $\mu$ m for large images and 200 nm for *Inserts*.) (F) Analysis of entire BE 4 dpi as in A. BE were triple labeled and pseudo colored following staining with anti-N (yellow signal), anti-CytK5 (magenta signal), and anti-AcTub antibodies (cyan signal) and counterstained with DAPI (gray signal). A syncytia (marked by white arrow)-containing area is shown as a lateral 3D reconstruction. The boxed area is further shown as top view with individual signal combinations as indicated. (Scale bar, 20  $\mu$ m for the mag regions and 500  $\mu$ m for the BE overview.) See also *Movie S9 a-c*. (G) Image and analysis as in F with area shown as side view, cut through the syncytia (boxed area) with individual signal combinations below as indicated.





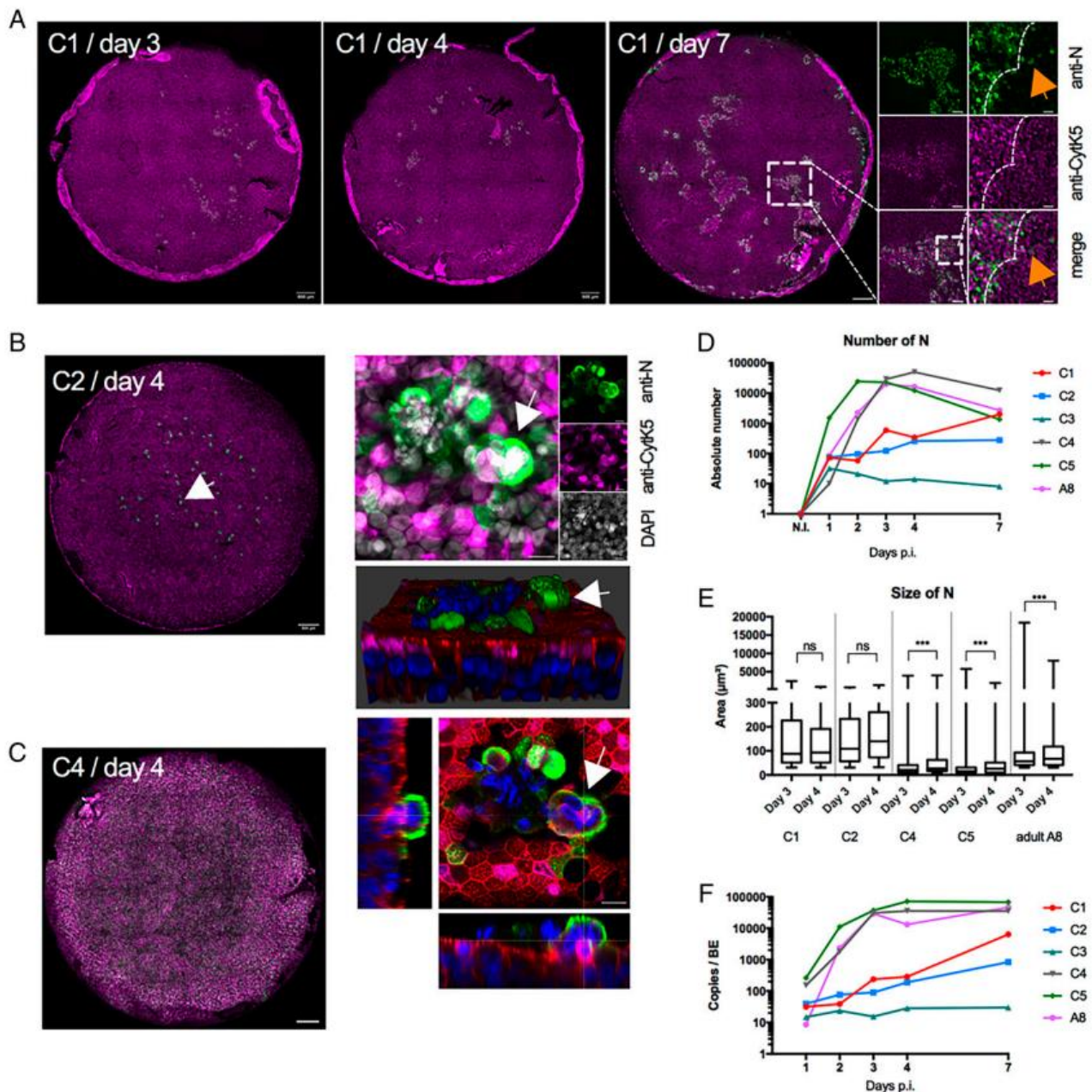
**Fig. 3.** Apical released cells and syncytia transmit infection. (A) Experimental design. Apical washes from three donors (A5 to A7) were fixed at 3 dpi and concentrated on slides using cytopsin (Top) or collected and separated into supernatant and cell pellet and used to infect Vero E6 cells (Bottom). (B) Representative image from cytopsin, stained with anti-N (green signal) and anti-CytK5 antibodies (magenta signal) and counterstained with DAPI (gray signal). Arrows indicate syncytia in the overview and magnified to the left. Individual channels are as indicated. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (C) Infectivity determination of apical washes for three donors determined by TCID<sub>50</sub>. ND, nondetected.

for the spreading of the infection. To test this hypothesis, we infected epithelia from three donors. At 4 dpi, apical BE washes were concentrated on microscope slides via cytopsin for IF analysis or used for infectivity studies (Fig. 3A). The IF analysis showed that apical washes contained individual infected cells but also several virus-containing syncytia, showing their accumulation in the apical BE lumen (Fig. 3B). To test the relative infectivity, apical washes were separated by centrifugation into a cell-containing fraction and a cell-free supernatant (Fig. 3C, pellet and supernatant). The cellular fraction was resuspended in an equal volume of fresh medium, and both fractions were subsequently used to infect Vero E6 cells and compared to total apical washes infectivity (total). The relative infectivity of both fractions was determined 3 d later by endpoint titration. Surprisingly, only the fraction containing cells/syncytia showed significant infectivity after 3 d, while the cell-free supernatant had not resulted in measurable infectivity at this time (Fig. 3C). Taken together, this analysis suggests that BE produce and release virus into the apical lumen. Importantly, a significant fraction of the infectious virus dose stems from cell-associated virus, including syncytia, although entrapment in mucus cannot be excluded.

**BE from Children Exhibit Differential Levels of SARS-CoV-2 Infection.** Each BE sample can be traced to an individual donor. While almost all of the adult donors were highly permissive to SARS-CoV-2 infection, we observed a more restricted pattern of infection for a rare number of adult donors with low virus

production in the apical lumen at 3 and 4 dpi quantified by RT-qPCR (see adult A11 in Fig. 5). The adult donors in this study were between 29 and 74 y old, with a mean of 58 y old (Table 1), which places them, statistically, into either a medium- or high-risk group to develop severe COVID-19. Children, on the other hand, are a group much less susceptible to severe forms of COVID-19 (41, 42). To investigate how SARS-CoV-2 infects child BEs, we next prepared epithelia from BE cells obtained from children aged 5 y to 12 y that have undergone bronchial fibroscopy (Table 1). Fully differentiated BE from children showed the same cellular arrangement (epithelial cells, basal cells, goblet cells) and physiological properties (cilia beating, mucus production) as adult epithelia. To characterize the SARS-CoV-2 infection dynamics, child BE and two independent adult controls were infected, and virus production was monitored by RT-qPCR. In addition, BE were fixed at 1, 2, 3, 4, and 7 dpi, including noninfected donor controls. Infection of the adult BE resulted, again, in rapid infection and progeny production. In contrast, the child BE showed distinct infection kinetics. When the BE were processed for IF analysis using antibodies against CytK5 and N, three out of five child BE (C1 to C3; *SI Appendix, Fig. S4*) showed a severely restricted infection profile, while the two others (C4 and C5; *SI Appendix, Fig. S4*) showed an infection kinetic comparable to the adult BE (e.g., A8; *SI Appendix, Fig. S4*). Interestingly, each restricted child BE had unique features. In BE derived from donor C1, we observed a slow but substantial increase in infected cells over time (Fig. 4A). Consecutive IF analysis of the entire epithelia from donor C1 revealed that initial infections were limited to a few cells that grew over time into infection foci and further enlarged by infecting surrounding cells at their periphery. Cells at the foci border stained strongly, while several cells in the foci vicinity stained weakly positive for SARS-CoV-2 N. This suggested a front of highly replicating cells with forward cell-to-cell or short-range spread as the infection mode (Fig. 4A, *magnified boxed area*). In comparison, BE derived from donor C2 showed a much slower increase in the number of infected cells after the initial appearance of positive cells and strongly restricted infection spread (Fig. 4B, *Left*). For C2, most of the initially infected cells developed into local clusters of infected cells without much lateral spread. Some clusters contained infected cells fused to form syncytia with basal cells with apical localization (Fig. 4B, *Right* and *Movie S10*), reminiscent of syncytia formation in adult BE. Lateral spread into small foci could only be observed at 7 dpi, resembling observations made for donor C1 at earlier time points (2 dpi to 3 dpi). The BE derived from C3 only ever showed very few infected cells throughout the whole observation period, suggesting an abortive infection (*SI Appendix, Fig. S4 D and G, Left*). In contrast, BE from the permissive child C4 (Fig. 4C) and C5 (*SI Appendix, Fig. S4 F and G, Middle*) or adult donor controls (*SI Appendix, Fig. S4 A and G, Right*) showed fast increase in cell infection (within 2 d) and extensive formation of syncytia at 4 dpi, as previously observed. Quantifying the number of infected cells or cell cluster between nonpermissive child BE vs. permissive child BE and the adult control confirmed the slower infection progress (Fig. 4D). This included a more heterogeneous signal size distribution for infected cells, with no significant differences observed between day 3 and day 4, unlike for the permissive children or the adult (Fig. 4E). By comparison, IF analysis of the permissive child BE showed no difference from the adult BE, neither in the overall number of infected cells nor in the size distribution of syncytia formation or the kinetics of their appearance (see *SI Appendix, Fig. S4* for representative experiment). The different staining profile corresponded to the quantification of viral





**Fig. 4.** SARS-CoV-2 infection of BE from children. (A) BE Infection kinetic from donor C1 (C, child). Entire BE are shown, and dpi is indicated on the top. BE were stained with anti-N antibodies to detect infected cells (green signal) and anti-CytK5 marking basal cells (magenta signal). The boxed area containing infection foci is magnified to the right. The higher magnification shows the infection front (dashed line) and individual infected cells in the vicinity of the infection front (orange arrow). (Scale bar, 20  $\mu\text{m}$  for the highest magnification of the boxed area, 100  $\mu\text{m}$  for the intermediate magnification of the boxed area and 500  $\mu\text{m}$  for the BE overview) (B) (Left) BE from donor C2 at 4 dpi presented as in A. The white arrow in the entire BE points at a syncytium further magnified as a maximum Z projection (Right Top) or individual Z stack (Right Bottom, with phalloidin counterstain in red), or as a 3D image reconstruction to see its apical location. (Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  for the agnified areas and 500  $\mu\text{m}$  for the BE overview.) See also *Movie S12*. (C) Entire BE of permissive donor C4 at 4 dpi. Staining is as in A. (Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ .) (See *SI Appendix, Fig. S4* for further examples.) (D) Quantification of N-positive cells for the entire BE for three permissive (C1 to C3) and two nonpermissive (C4 and C5) children and one permissive adult (A8). Color code is as indicated. (E) The average size of N-positive signals from D at 3 and 4 dpi classed by size and plotted as min to max box and whisker plots. Statistical analysis was done on the whole time course for each donor (as in D); only days 3 and 4 postinfection are shown. \*\*\* $P < 0.001$  based on one-way ANOVA as indicated. (F) Apical washes for permissive and nonpermissive BE were subjected to RT-qPCR analysis to determine genome copy numbers at days 1, 2, 3, 4, and 7 after infection. Color code as indicated and same as in D.

replication determined by RT-qPCR (Fig. 4F). Taken together, our analysis of SARS-CoV-2 infection and spread in child BE demonstrated the ability of some child BE to restrict SARS-CoV-2 infection, while others remained permissive. This ability was not limited to child BE, as it was found in a very few adult BE (see adult A11 in Fig. 5). Consequently, we did not observe

significant differences between children and adult BE in terms of size and number of infected cells when we compared permissive and nonpermissive BE jointly (*SI Appendix, Fig. S4H*), suggesting that it is not only the age but also the initial susceptibility to SARS-CoV-2 infection that determines BE infection spreading-adult A11 in figure 5.



**An Accelerated Type III IFN Response Protects BE from SARS-CoV-2 Infection.** Our observations suggested that not only child but, in rare cases, also adult BE could present intrinsic factors restricting SARS-CoV-2 infection. Possible explanations could be differences in the IFN response (43, 44), or morphological differences (45). The importance of type III IFN for SARS-CoV-2 control was recently shown (34). Accordingly, we compared the accumulation of IFN- $\lambda$  and measured its concentration in BE medium from adults and children in response to SARS-CoV-2 infection (Fig. 5A). IFN  $\lambda$  was not detected for any of the BE at the beginning of the infection. However, child BE with restricted infection phenotype (C1 to C3) secreted IFN- $\lambda$  starting at 1 dpi, whereas permissive BE from children and adults produced a detectable amount of IFN- $\lambda$  only after 3 and 2 dpi, respectively. The only analyzed nonpermissive adult BE (A10) also produced IFN- $\lambda$  at 1 dpi, similar to the corresponding nonpermissive child BE. IFN  $\lambda$  concentration increased subsequently for all groups and reached a plateau at 4 dpi to 7 dpi (Fig. 5A). The difference in the kinetics for IFN- $\lambda$  secretion in response to SARS-CoV-2 infection could thus provide an explanation of why we observe BE that better resist SARS-CoV-2 infection.

To confirm the role of IFN- $\lambda$  in SARS-CoV-2 spread in our model, we next investigated infected BE from three adult donors (A5 to A7) in the presence of increasing amounts of recombinant IFN- $\lambda$  to mimic an accelerated IFN response. At 4 dpi, whole BE were stained for virus spread with and without IFN treatment for all donors (Fig. 5B and *SI Appendix, Fig. S5A*). We quantified the infection spread as percentage of the BE surface staining positive for N and revealed a strong dose-dependent inhibition of virus spread for two of the three donors, while the third donor showed only a slight reduction in virus spread (Fig. 5C). The protective effect of the IFN- $\lambda$  was confirmed by RT-qPCR quantification of the viral RNA produced in the apical lumen (Fig. 5D). Interestingly, while IFN- $\lambda$  reduced the total number of infected cells, it did not prevent syncytia formation per se, because the ratio of CytK5 positive infected cells (indicative of syncytia formation) was similar between IFN- $\lambda$  treated and nontreated control BE (*SI Appendix, Fig. S5B*). Still, very few actual syncytia-resembling structures were observed at 4 dpi in IFN- $\lambda$  treated BE with reduced infection, which probably reflects a less advanced infection state (*SI Appendix, Fig. S5B*).

To independently assess the role of IFN- $\lambda$  in SARS-CoV-2 infection of BE, we analyzed the infection of BE from two adults (A11 and A12) following IFN- $\lambda$  gene knockout using CRISPR/Cas9 applied to half the epithelia generated from each donor, while keeping unedited BE as a control. Partial gene KO was verified by PCR analysis (Fig. 5E). Interestingly, infection of the nonedited controls revealed that adult A11 was one of the few nonpermissive donors with very low infection rates. Adult A12, in contrast, was permissive, with high infection rates. In comparison, the edited  $\Delta$ IFN- $\lambda$  BE from donor A11 showed a strong increase of SARS-CoV-2-infected cells and progeny production compared to its nondeleted WT control (A11; Fig. 5F), whereas  $\Delta$ IFN- $\lambda$  deletion did not affect virus spread in donor A12 (A12 in Fig. 5G and *SI Appendix, Fig. S5C*). Quantification by RT-qPCR in the apical lumen confirmed the data of virus release (Fig. 5H). The observed difference between both donors suggests that IFN- $\lambda$  control of SARS-CoV-2 infection is most efficient at low initial infection rates.

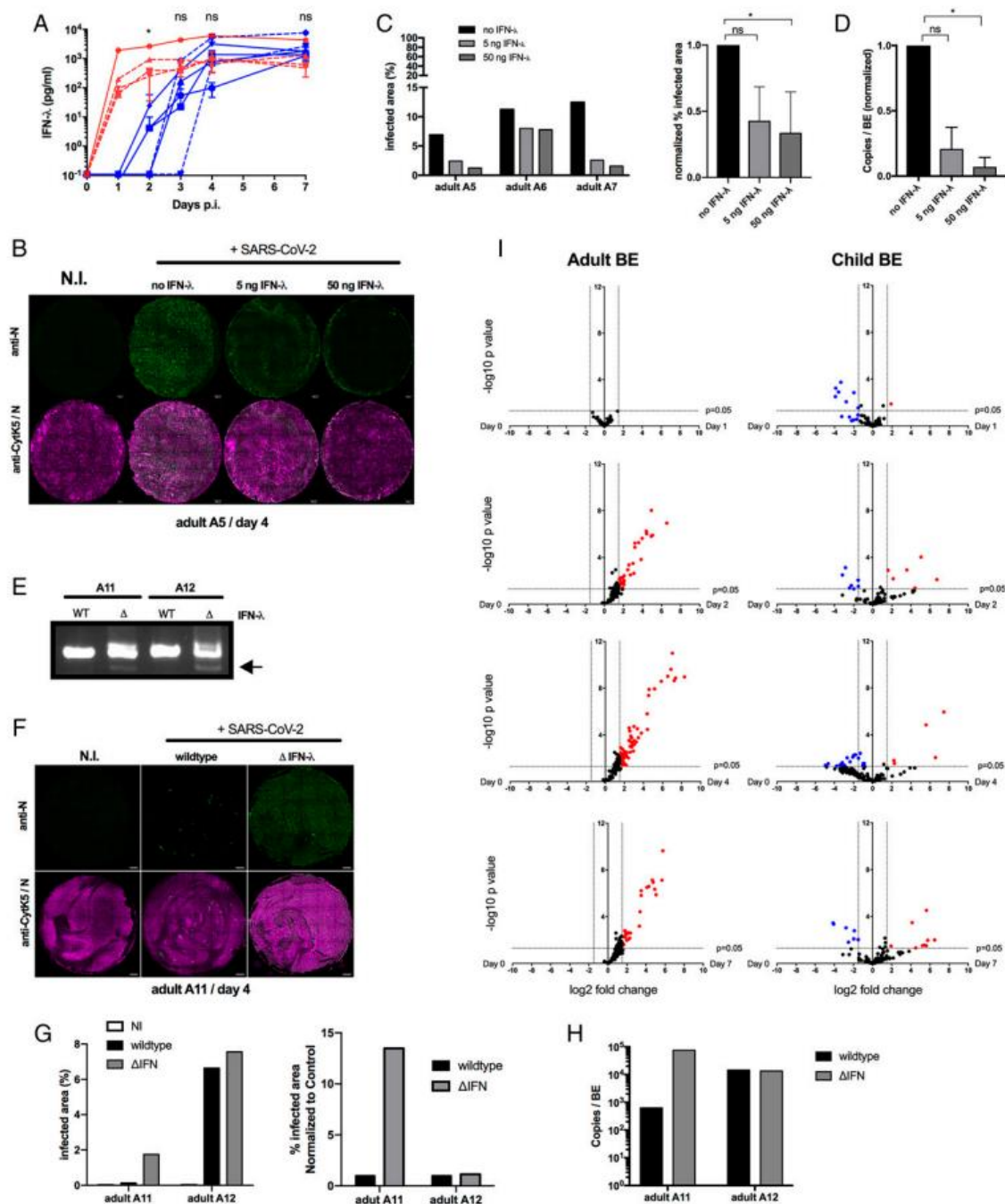
Our BE model revealed a protective role for IFN- $\lambda$ . Severe cases of COVID-19 following SARS-CoV-2 infections are often linked to strong cytokine induction triggering an excessive inflammatory response (9). To further understand the response

of child and adult BE, we performed a transcriptomic analysis using the nanostring technology (see *SI Appendix* for details) at 1, 2, 4, and 7 dpi, applying a panel of 255 genes involved in the inflammatory response. Only permissive samples were available for the experiment. Noninfected controls of adult ( $n = 4$ , A1 to A4) and child ( $n = 4$ , C4 to C7) BE revealed obvious age-dependent differences in the inflammatory response (Fig. 5I). Adult BE showed a strong transcriptional activation of proinflammatory genes starting at 2 dpi, which was maintained even after 7 dpi. In contrast, the response in child BE was much more attenuated compared to the adult BE (Fig. 5I), with very few up-regulated genes throughout the time course. Remarkably, the difference in inflammatory response did not affect virus spread or progeny production (e.g., *SI Appendix, Fig. S3* vs. *Fig. S4*). Taken together, the transcript expression analysis revealed age-intrinsic differences in the epithelial response, revealing an age-adapted inflammatory response to SARS-CoV-2 infection that was elevated in adult compared to child BE.

## Discussion

In this study, we used human reconstituted BE to investigate the onset of infection and replication of SARS-CoV-2. BE are an important tissue because subsequent infection of the bronchial tissue determines whether a SARS-CoV-2 infection results in severe or mild respiratory illness, by controlling the spread into the lower respiratory tract. These features differentiate our approach from similar studies using primary respiratory cells from either upper airway (nasal, tracheal) (3, 26) or commercial sources (25) with undefined donor material. We followed the time course of infection for individual donors with imaging and RT-qPCR, showing that infections are detected as early as 1 dpi. The infection spread throughout the whole BE within 3 dpi to 4 dpi, and viral replication reached a plateau at around 4 dpi. We identified multiciliated cells as primary targets at infection onset, in agreement with previous studies (24, 26). Starting at 3 dpi, we observed large infected multinucleated syncytia forming between ciliated and basal cells. Formation of cell fusions in coronavirus-infected primary airway epithelia was previously reported (26, 46) but not systematically detected (24, 25, 32). Our observations are consistent with previous reports that infection of multiciliated cells with SARS-CoV-2 results in cilia loss and cell dedifferentiation (25, 26). The fusogenic potential of SARS-CoV-2 is now well described and involves the Spike protein and the ACE2 receptor (27, 47). A possible role for cell fusion could be facilitated cell-to-cell virus transmission, a mechanism recently reported for cultured cells (48). Syncytia formation was transient and reached a maximum at 4 dpi to sharply drop toward 7 dpi. The sharp drop in syncytia, but not in the number of overall infected cells, is consistent with our observation that syncytia were extruded into the lumen at the apical side of the epithelia. Those syncytia were anti-N positive, and EM analysis showed that they contained high amounts of virus trapped in a vesicular compartment, suggesting active progeny production. Importantly, we show that released syncytia and infected cells were a significant source of virus to infect target cells. Thus, cell- and syncytia-associated virus may help spread large and compact amounts of viruses into the upper respiratory tract, from which cell-associated viruses could either descend into the lower respiratory tract or be exhaled into the environment. Interestingly, patients who have succumbed to COVID-19 can present abnormal syncytia formed by pneumocytes in the lower respiratory tract, suggesting that our BE model may mimic severe





**Fig. 5.** Secretion of IFN- $\lambda$  from BE. (A) Basolateral supernatant from permissive (blue) and nonpermissive (red), corresponding to children (dashed line,  $n = 5$ ) and adult (solid lines,  $n = 5$ ) donor BEs were subjected to ELISA to determine IFN- $\lambda$  concentration at days 0, 1, 2, 3, 4, and 7 postinfection as indicated. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , unpaired  $t$  test per day permissive vs. nonpermissive. (B) BE infection following IFN- $\lambda$  treatment. Entire BE are shown at 4 dpi stained with anti-N antibodies to detect infected cells (green signal) and anti-CytK5 marking basal cells (magenta signal). (Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ .) (C) Quantification of infected area for three different donors (A5 to A7) following IFN- $\lambda$  treatment as indicated. Data are shown as percentage of total infected BE area (Left) and normalized to nontreated control (Right). \* $P < 0.05$ , based on one-way ANOVA analysis. (D) Apical washes of each donor following IFN- $\lambda$  treatment were subjected to RT-qPCR analysis to determine genome copy numbers. Data are shown normalized to nontreated control. \* $P < 0.05$ , based on one-way ANOVA analysis. (E) Verification of CRISPR/Cas9 gene knockout for donors A11 and A12. PCR amplification is of a region encompassing the deletion in IFN $\lambda$ 2 gene. Gene deletion-specific PCR product is indicated by the arrow. (F) BE infection following IFN- $\lambda$  gene deletion. Entire BE from donor A11 are shown at 4 dpi stained as in B. (G) Quantification of infected area for two different donors (A11 and A12) following IFN- $\lambda$  gene deletion and WT donor control as indicated. Data are shown as percentage of total infected BE area (Left) and normalized to nontreated control (Right). (H) Apical washes of donors A11 and A12 at 4 dpi were subjected to RT-qPCR analysis to determine genome copy numbers. (I) Transcript analysis of adult (Left,  $n = 4$ ) and child (Right,  $n = 4$ ) BE using a panel of inflammation response genes (see *SI Appendix* for details, and see *Dataset S1* for gene list). For adults and children, transcript expression was compared between noninfected control BE and 1, 2, 4 and 7 dpi. The data show gene expression changes for adults (Left) and children (Right) for days 1, 2, 4, and 7 (Top to Bottom). Volcano plots show fold change compared to noninfected control as indicated as log $_2$ . Significant transcriptional activation (red) or transcriptional repression (blue) was defined for target genes with a fold expression  $>1.5$  log $_2$  or  $<-1.5$  log $_2$  (corresponding to a 2.5-fold increase or decrease, respectively) and  $-\log_{10} P$  values  $> 1.35$  (corresponding to  $P$  values  $< 0.05$ ) as indicated (gene ID and measured induction levels are provided in *Dataset S2*).



forms of COVID-19 (13, 49, 50). Cell-associated virus release also relays to high detection of SARS-CoV-2 in sputum and its transmission by droplets in hospitalized patients (18). Massive but transient production of syncytia is reflected in another report showing that virus production in a primary airway epithelium is cyclic, with peaks of virus release every 7 d to 10 d (24). A periodicity or variability in the quantity of virus released from infected tissue thus may affect contagion and could provide an explanation for the phenomenon of “superspreader,” frequently suggested based on epidemiological data (51). Furthermore, we also observed the loss of cilia in many of the syncytia, which could result in poor mucociliary clearance that impedes the evacuation of viral particles and pathogens. Taken together, our findings are in accordance with previous findings but highlight syncytium formation as an important mechanism to understand the spreading of SARS-CoV-2 and the physiopathology of BE infection (13, 27, 49, 50).

Strikingly, we found very different propagation kinetics of SARS-CoV-2 in some BE when we included BE from children in our analysis. While permissive BE from children and adults showed similar infection kinetics, about one-third of all analyzed child BE (3/10) and a few adult BE (3/25) yielded very low overall viral production following BE inoculation. In agreement with the virus quantification, we observed very few infected cells in the BE that were included for time course analysis. Rather than rapidly spreading throughout the entire BE, the infected cells first formed a local cluster or foci of infected cells. From these foci, the infection slowly spread into the surrounding bystander cells. Yet, syncytia formation was also occasionally observed, at least in one restricted BE, suggesting that the fusion of basal cells with multiciliated cells is not inhibited, but infection spread is delayed.

The obvious difference in susceptibility to SARS-CoV-2 infection was mostly observed for BE from children. This correlates with epidemiological studies highlighting their reduced infection rate and lower death rate compared to adults/the elderly (23, 52). A recent study using nasal swab-derived BE also showed differences in the susceptibility to SARS-CoV-2 infection between adults and children (32). The reason for this intrinsic age difference is unknown. We show that, in our model, nonpermissive BE have a quicker release of IFN- $\lambda$  in response to SARS-CoV-2 infection, starting as soon as 1 dpi, preempting virus spread, whereas permissive BE exhibit significant level of IFN- $\lambda$  only at 3 dpi when virus spread has commenced. In contrast, type I IFN (i.e.,  $\alpha$  and  $\beta$ ) were not detected either in the supernatant or in the transcript analysis. Type III IFN is recognized as a main driver of mucosal antiviral immunity (53). We confirm the importance of IFN- $\lambda$  in infection control by showing that exogenous application can protect permissive BE from infection, while removing IFN- $\lambda$  genes can promote infection. Recent studies show that SARS-CoV-2 blocks the IFN response by targeting the RIG-I/MDA-5 pathway (54, 55), suggesting that an initial race between virus replication and epithelial response determines the outcome of the infection. According to our data, the IFN response in nonpermissive BE could be faster, and an antiviral state is probably induced throughout the BE to slow down virus spread. Whether this is the result of better virus sensing by an unknown mechanism or whether SARS-CoV-2 is less able to counteract the IFN response are important questions to be addressed. Age-intrinsic properties of the epithelia might also play a role in the infection dynamics, because infection restriction was more commonly (but not exclusively) observed in child BE. We observed a strong proinflammatory response to SARS-CoV-2 infection in adult BE that was activated from 2 dpi and persisted

for the time course. In contrast, the inflammatory response was much more attenuated in child BE compared to adults. This obvious difference did not affect virus spread or progeny production, but hyperinflammatory response is a hallmark of severe COVID-19 (15, 16). Our observation could thus be of importance to understand why children are less prone to severe COVID-19. Besides, age-related susceptibility to infection for BE has been reported for other respiratory pathogens, including respiratory viruses such as Rhinovirus-C, Adenovirus, and RSV (Respiratory Syncytial Virus) (56–58) but also fungi (*Aspergillus fumigatus*) (59) and bacteria (*Haemophilus influenzae*) (60).

Taken together, our data identify age-intrinsic differences in the inflammatory epithelial response to SARS-CoV-2 infection and identify the type III IFN response as a central contributor to SARS-CoV-2 resistance in BE. Importantly, partial resistance can be conferred to permissive BE when IFN- $\lambda$  is applied in a timely manner.

## Materials and Methods

**Viruses and Cell Lines.** Vero E6 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum and gentamicin (50  $\mu$ g/mL) at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator. The SARS-CoV-2 strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was supplied by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Pasteur Institute through the European Virus Archive goes Global (EVAg platform). Agreement to work with infectious SARS-CoV-2 was obtained, and all work with infectious SARS-CoV-2 was performed in a Class II Biosafety Cabinet under BSL-3 conditions at the UB'L3 facility (TransBioMed core, Bordeaux).

**Viral Production.** The SARS-CoV-2 strain was produced by infecting Vero E6 cells at a multiplicity of infection of 1,200 PFU, then incubating the cells at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator until appearance of a cytopathic effect (around 72 h). The culture supernatant was clarified by centrifugation (5 min at 1,500 rpm), and aliquots were stored at –80 °C. All viral stocks were sequenced to confirm that no mutation was selected during cultures, using Sanger to determine the full-length Spike sequence (61) as well as Oxford nanopore technology for whole genome sequencing. Stock titers were determined by adding serial dilutions to  $2 \times 10^4$  Vero E6 cells in supplemented DMEM in a 96-well plate. Eight replicates were performed. Plates were incubated at 37 °C and examined for cytopathic effect. Quantification of cytopathic effect was determined using the Cell tox green cytotoxicity assay (Promega) according to manufacturer instructions, and a Victor Nivo reader (Perkin-Elmer). The TCID<sub>50</sub> per milliliter was calculated according to the method of Reed and Muench (62). The viral titer expressed in PFU per milliliter was mathematically converted from the TCID<sub>50</sub> per milliliter determination using the Poisson equation as follow: PFU/mL =  $-\ln 0.5 \times \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ .

**Culture of Primary BE and Ethics Statement.** The BE cell culture was established from bronchial brushings or lung resection performed between the third and fifth bronchial generation from patients undergoing elective surgery as previously described (38). BE explants were cultured using PneumaCult Ex medium (Stemcell) for expansion of basal epithelial cells at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Then,  $10^5$  basal cells were grown on cell culture inserts (Corning) within the air-liquid interface for 21 d using PneumaCult ALI medium (Stemcell). Such a culture allows the differentiation into pseudostratified mucociliary airway epithelia composed of ciliated cells, goblet cells, club cells, and basal cells. The complete differentiation was assessed by the capacity of cilia to beat and mucus production under a light microscope. According to the French law and the MR004 regulation, patients or children's parents received an information form, allowing them to refuse the use of their surgical samples for research. TUBE is a collection of human bronchial tissue obtained from surgery and is sponsored by the University Hospital of Bordeaux, which includes its own local ethic committee (CHUBX 2020/54). All samples were deidentified prior to their use in this study.

**Infection of Epithelia.** Prior to infection, BE were washed three times with PBS to remove mucus, and basal ALI medium was exchanged with 500  $\mu$ L of



fresh medium. The inoculum containing 1,200 PFU of virus or medium-only controls was added to the apical surface to a final volume of 100  $\mu$ L. Viral supernatant was removed after 1 h incubation at 37 °C and washed 3 times with PBS, and infection was followed for the indicated time points. Viral production was then quantified by RT-qPCR using three consecutively collected apical washes of 100  $\mu$ L of PBS.

**Quantification of SARS-CoV-2 RNA by RT-qPCR.** For quantification of viral RNA by RT-qPCR, total RNA was isolated using the High Pure Viral RNA kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Viral RNA was quantified using GoTaq 1-Step RT-qPCR kit (Promega). SARS-CoV-2 N gene RNA was amplified using forward (Ngene F cgcaacagttcaagaattc 28844 to 28864) and reverse (Ngene R ccagacatttctctcaagc 28960 to 28981) primers. Copy numbers were calculated from a standard curve produced with serial 10-fold dilutions of SARS-CoV-2-RNA. The amplification program began with the RT step for 15 min at 50 °C, then the denaturation step for 10 min at 95 °C, and 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C (40 cycles). The melting curve was obtained by temperature increment 0.5 °C/s from 60 °C to 95 °C.

**IFN Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and IFN Treatment.** Human IL-29/IL-28B (IFN- $\lambda$  1/3) concentration in SARS-CoV-2-infected epithelium basal media was quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques following the manufacturer's recommendations (R&D systems); 100  $\mu$ L of media was used for each point. Two prior infection BE were treated with either 5 ng or 50 ng of IFN- $\lambda$ 3 (R&D systems ref 5259-IL025) added in the basal medium. Cells were then infected with 1,200 PFU as previously described. Four dpi, viral production was measured by RT-qPCR, and cells were fixed for immunostaining processing.

**Transcriptomic Analysis (NanoString).** Total RNA extracted from BE was used for 255 gene expression inflammation panel assays using NanoString technology. Multiplexed target enrichment was then performed with gene-specific primers from the "nCounter Inflammation panel" by following the manufacturer's recommendations (see *SI Appendix* for details).

**Imaging and Image Analysis.** For antigen detection, BE were processed for IF analysis or EM as detailed in *SI Appendix*. Mounted samples were subsequently examined on an epifluorescence microscope (Leica inverted DMI6000 widefield microscope) at low magnification and at high magnification on a SP8 confocal microscope (Leica Microsystems at the Bordeaux Imagery Center). Image

processing was done using Image J software or with Leica LAS-X software with task-adapted protocols (see *SI Appendix* for details). For EM analysis, grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi) at 80 kV.

**Data Availability.** All study data are made available and included in the article and/or supporting information.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank the staff of the pathology and surgery departments of the Bordeaux University Hospital, and Isabelle Goasdoue, Virginie Niel, and Marine Servat from the clinical investigation center for technical assistance. Light and electron imaging was performed at the Bordeaux Imaging Center (BIC), member of the FranceBioImaging national infrastructure (grant ANR-10-INBS-04). We thank the BIC for relentless support during the lockdown. We thank the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-CE14-0015-01, project ROSAE) and the Fondation de France (project ANACONDA ) for funding support. D.R.R. is funded by the laboratoire d'excellence ParaFrap (grant ANR-11-LABX-0024). M.-L.B. was supported by the Région Nouvelle Aquitaine and UBReact, Bordeaux University. N.P. is supported by the Fondation Recherche Médicale (FRM) grant DEQ20180339229. We thank the Centre national de la recherche scientifique and Bordeaux University for support. We are indebted to the members of our research teams, our families, and several colleagues for their resilience. H.W. is an INSERM fellow.

Author affiliations: <sup>1</sup>UMR 5234, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, CNRS, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>2</sup>U1045, Centre de Recherche Cardiothoracique de Bordeaux, INSERM, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>3</sup>UMS 3420, Bordeaux Imaging Center (BIC), Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>4</sup>Bordeaux INP, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, 33076 Bordeaux, France; <sup>5</sup>Biochemistry Center Regensburg, Universität Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; <sup>6</sup>Service de Pédiatrie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>7</sup>Service de Virologie et l'Unité de Surveillance Biologique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>8</sup>Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Centre d'Investigation Clinique (CIC) 1401, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; <sup>9</sup>UMR 5293, Institute of Neurodegenerative Diseases, Institut Interdisciplinaire de neurosciences (IINS), CNRS, INSERM, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France; and <sup>10</sup>Department for Infectious and Tropical Diseases, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

Author contributions: G.B., M.-L.B., A.C., N.P., P.E., M.-E.L., P.B., M.L., D.M., T.T., M.-L.A., and H.W. designed research; G.B., M.-L.B., A.C., P.R.-P., P.E., M.F., M.M., S.L., T.T., M.-L.A., and H.W. performed research; D.D., D.R.R., G.L., and F.B. contributed new reagents/analytic tools; G.B., M.-L.B., A.C., N.P., P.E., T.T., M.-L.A., and H.W. analyzed data; and M.M., T.T., M.-L.A., and H.W. wrote the paper.

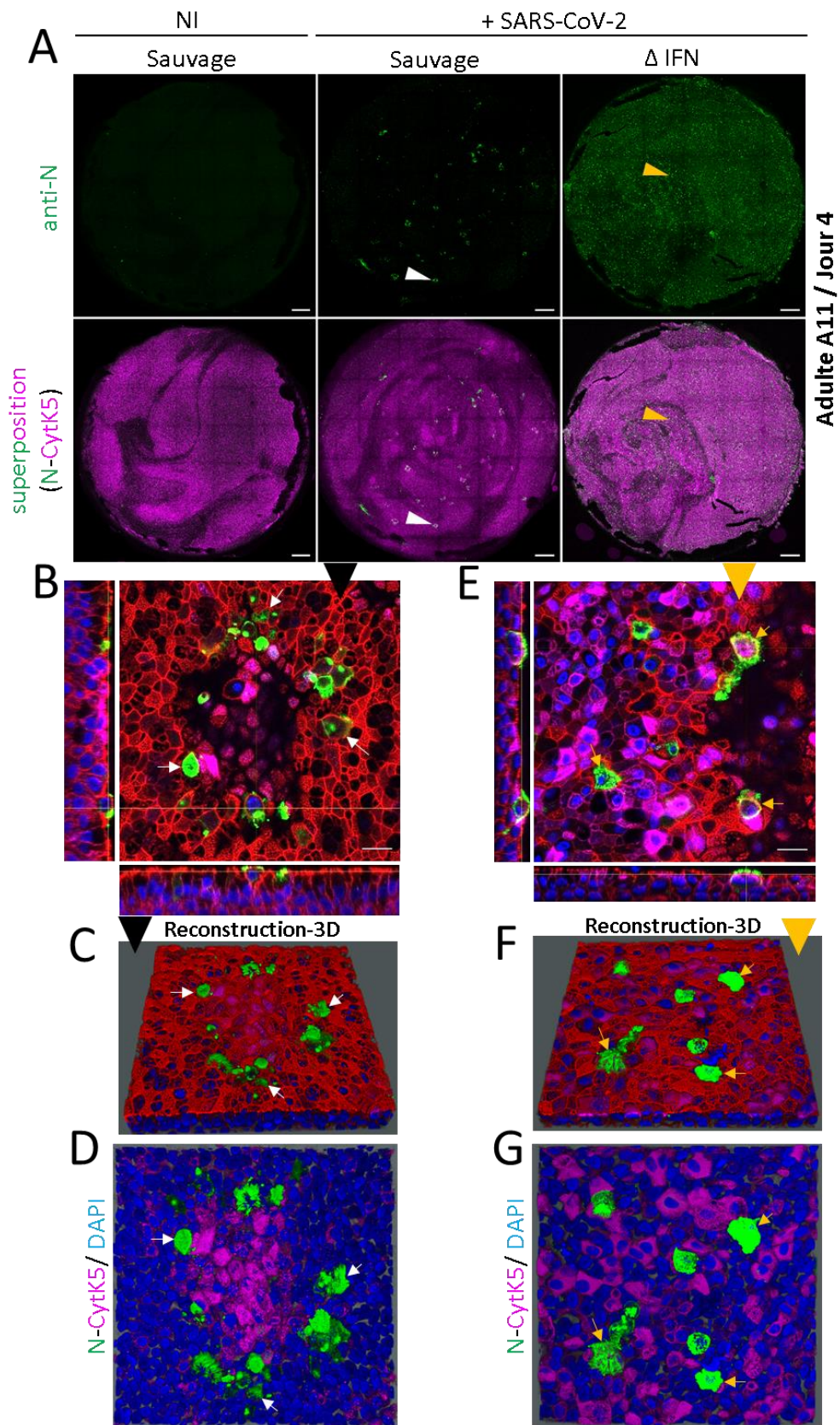
- N. Zhu *et al.*, China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727-733 (2020).
- P. Zhou *et al.*, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270-273 (2020).
- F. Wu *et al.*, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265-269 (2020).
- R. Cannalire, C. Cerchia, A. R. Beccari, F. S. Di Liva, V. Summa, Targeting SARS-CoV-2 proteases and polymerase for COVID-19 treatment: State of the art and future opportunities. *J. Med. Chem.* **65**, 2716-2746 (2022).
- P. V'Kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, V. Thiel, Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 155-170 (2021).
- J. F. Chan *et al.*, Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 221-236 (2020).
- M. Hoffmann *et al.*, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
- N. Clementi *et al.*, Viral respiratory pathogens and lung injury. *Clin. Microbiol. Rev.* **34**, e00103-20 (2021).
- C. Lucas *et al.*, Yale IMPACT Team, Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **584**, 463-469 (2020).
- S. Tian *et al.*, Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **15**, 700-704 (2020).
- S. Tian *et al.*, Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod. Pathol.* **33**, 1007-1014 (2020).
- A. C. Borczuk, Pulmonary pathology of COVID-19: A review of autopsy studies. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **27**, 184-192 (2021).
- R. Bussani *et al.*, Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine* **61**, 103104 (2020).
- M. Liao *et al.*, Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 842-844 (2020).
- C. Huang *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497-506 (2020).
- B. Rockx *et al.*, Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science* **368**, 1012-1015 (2020).
- B. Hu, H. Guo, P. Zhou, Z. L. Shi, Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 141-154 (2021).
- R. Wölfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* **581**, 465-469 (2020).
- H. Kawasuji *et al.*, Transmissibility of COVID-19 depends on the viral load around onset in adult and symptomatic patients. *PLoS One* **15**, e0243597 (2020).
- L. Zou *et al.*, SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1177-1179 (2020).
- J. Wu *et al.*, Identification of RT-PCR-negative asymptomatic COVID-19 patients via serological testing. *Front. Public Health* **8**, 267 (2020).
- X. Lu *et al.*, Chinese Pediatric Novel Coronavirus Study Team, SARS-CoV-2 infection in children. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1663-1665 (2020).
- E. Goldstein, M. Lipsitch, M. Cevik, On the effect of age on the transmission of SARS-CoV-2 in households, schools, and the community. *J. Infect. Dis.* **223**, 362-369 (2021).
- S. Hao *et al.*, Long-term modeling of SARS-CoV-2 infection of *in vitro* cultured polarized human airway epithelium. *MBio* **11**, e02852-20 (2020).
- R. Robinot *et al.*, SARS-CoV-2 infection damages airway motile cilia and impairs mucociliary clearance. *bioRxiv* [Preprint] (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.10.06.328369> [Accessed 22 June 2022].
- N. Zhu *et al.*, Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nat. Commun.* **11**, 3910 (2020).
- J. Buchrieser *et al.*, Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J.* **40**, e107405 (2021).
- M. M. Rajah, A. Bernier, J. Buchrieser, O. Schwartz, The mechanism and consequences of SARS-CoV-2 spike-mediated fusion and syncytia formation. *J. Mol. Biol.* **434**, 167280 (2022).
- D. Blanco-Melo *et al.*, Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9 (2020).
- J. Hadjadj *et al.*, Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718-724 (2020).
- Q. Zhang *et al.*, COVID-STORM Clinicians; COVID Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort; NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4570 (2020).

32. S. L. W. Alexander Capraro *et al.*, Ageing impairs the airway epithelium defence response to SARS-CoV-2. *bioRxiv [Preprint]* (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.04.05.437453> (Accessed 22 June 2022).
33. J. Loske *et al.*, Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. *Nat. Biotechnol.* **40**, 319–324 (2022).
34. A. Rebendenne *et al.*, SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J. Virol.* **90**, e02415-20 (2021).
35. X. Yin *et al.*, MDA5 governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell Rep.* **34**, 108628 (2021).
36. A. Banerjee *et al.*, Experimental and natural evidence of SARS-CoV-2-infection-induced activation of type I interferon responses. *iScience* **24**, 102477 (2021).
37. B. Allard *et al.*, Asthmatic bronchial smooth muscle increases CCL5-dependent monocyte migration in response to rhinovirus-infected epithelium. *Front. Immunol.* **10**, 2998 (2020).
38. T. Trian *et al.*, House dust mites induce proliferation of severe asthmatic smooth muscle cells via an epithelium-dependent pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 538–546 (2015).
39. I. T. Lee *et al.*, ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs. *Nat. Commun.* **11**, 5453 (2020).
40. X. Xie *et al.*, An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* **27**, 841–848.e3 (2020).
41. J. Bullard *et al.*, Infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in children compared with adults. *CMAJ* **193**, E601–E606 (2021).
42. Z. Hyde, Difference in SARS-CoV-2 attack rate between children and adults may reflect bias. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 152–155 (2022).
43. M. L. Stanifer, C. Guo, P. Doldan, S. Boulant, Importance of Type I and III interferons at respiratory and intestinal barrier surfaces. *Front. Immunol.* **11**, 608645 (2020).
44. S. Triana *et al.*, Single-cell analyses reveal SARS-CoV-2 interference with intrinsic immune response in the human gut. *Mol. Syst. Biol.* **17**, e10232 (2021).
45. S. L. Lee, C. O'Callaghan, Y. L. Lau, C. D. Lee, Functional analysis and evaluation of respiratory cilia in healthy Chinese children. *Respir. Res.* **21**, 259 (2020).
46. A. C. Sims *et al.*, Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: Role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol.* **79**, 15511–15524 (2005).
47. G. Papa *et al.*, Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion. *PLoS Pathog.* **17**, e1009246 (2021).
48. C. Zeng *et al.*, SARS-CoV-2 spreads through cell-to-cell transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2111400119 (2022).
49. L. Braga *et al.*, Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature* **594**, 88–93 (2021).
50. Z. Zeng *et al.*, Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion. *Histopathology* **77**, 823–831 (2020).
51. R. A. Stein, Super-spreaders in infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.* **15**, e510–e513 (2011).
52. B. Salzberger *et al.*, Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection* **49**, 233–239 (2021).
53. F. C. Walker, P. R. Sridhar, M. T. Baldrige, Differential roles of interferons in innate responses to mucosal viral infections. *Trends Immunol.* **42**, 1009–1023 (2021).
54. S. J. Oh, O. S. Shin, SARS-CoV-2 nucleocapsid protein targets RIG-I-like receptor pathways to inhibit the induction of interferon response. *Cells* **10**, 530 (2021).
55. Y. Zheng *et al.*, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 299 (2020).
56. D. W. Cox *et al.*, Human rhinovirus species C infection in young children with acute wheeze is associated with increased acute respiratory hospital admissions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 1358–1364 (2013).
57. Y. Mandelia *et al.*, Dynamics and predisposition of respiratory viral co-infections in children and adults. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 631.e1–631.e6 (2021).
58. J. Bizzintino *et al.*, Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir. J.* **37**, 1037–1042 (2011).
59. C. Wojnarowski *et al.*, Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 1902–1907 (1997).
60. X. Fan *et al.*, Epidemiological analysis and rapid detection by one-step multiplex PCR assay of *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infections in Zhejiang Province, China. *BMC Infect. Dis.* **18**, 414 (2018).
61. P. Recordon-Pinson *et al.*, A simple and fast method to sequence the full-length spike gene for SARS-CoV-2 variant identification from patient samples. *COVID* **1**, 337–344 (2021).
62. L. J. Reed, H. Muench, A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493–497 (1938).



V.3 Résultats supplémentaires

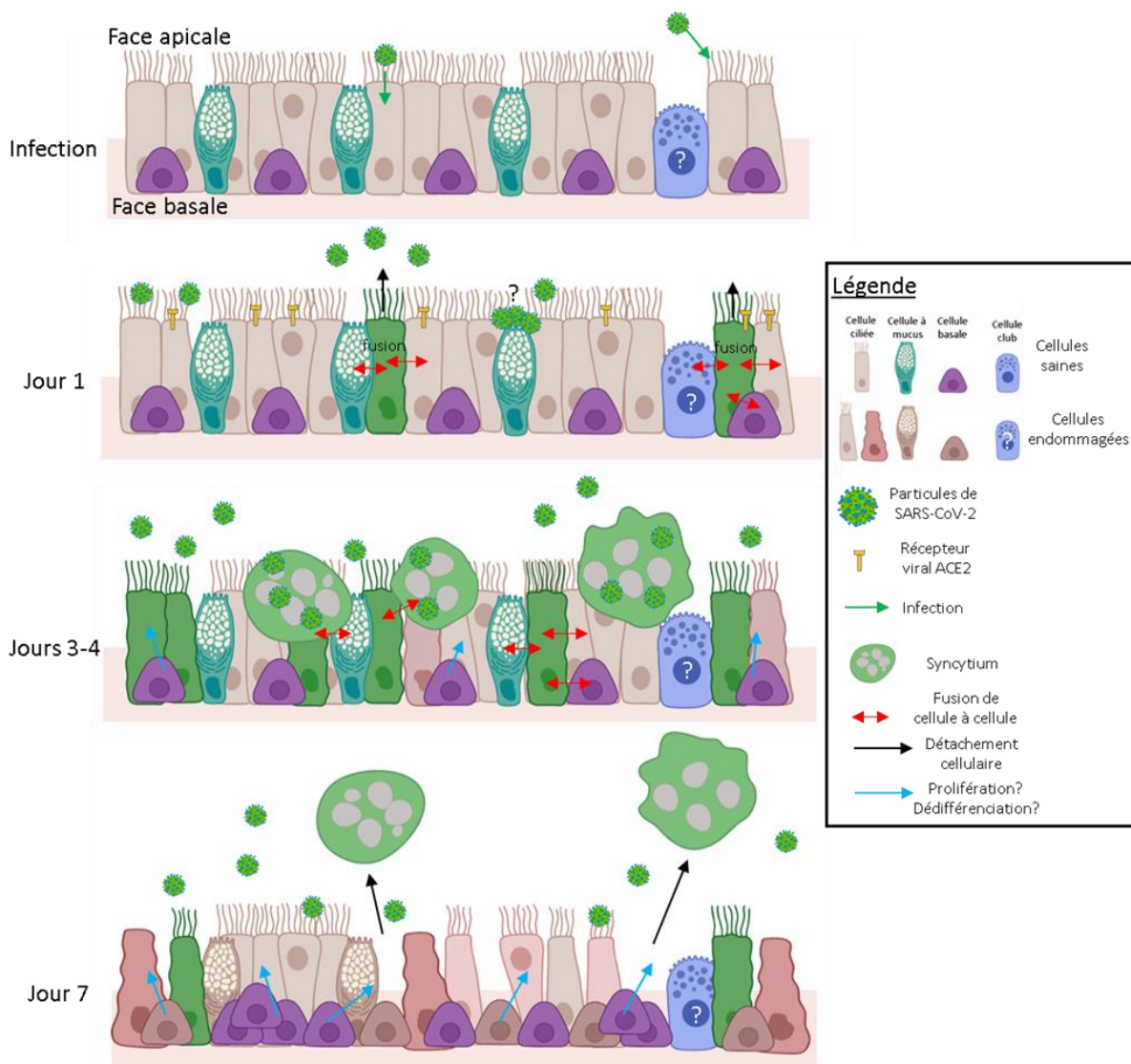
V.3.1 L'IFN de type III restreint l'infection du SARS-CoV-2.



**Figure 55. L'interféron de type III protège les EB de l'infection par le SARS-CoV-2.** Des EB de l'adulte A11 sont édités par CRISPR/Cas9 pour le gène IFN- $\lambda$ 2 ( $\Delta$  IFN) ou non (Sauvage). Les EB sont incubés (+SARS-CoV-2) ou non (NI) avec 1 200 PFU/épithélium puis lavés 1 h après infection. Après fixation (4 j après infection), une IF est réalisée avec les anticorps anti-N (vert) et anti-CytK5 (magenta) pour observer les cellules basales. La phalloïdine (rouge) marque le cortex d'actine. Le DAPI est utilisé pour visualiser les noyaux (bleu). **(A)** Vues globales des EB. Microscopie confocale (X10). Projection en Z (48  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 500  $\mu$ m). **(B)** Vue agrandie et orthogonale d'un foyer d'infection (flèche blanche en (A)) de l'EB infecté (sauvage). (Barre d'échelle, 20  $\mu$ m). **(C)** et **(D)** Reconstructions 3D de la zone imagée en (B), phalloïdine (rouge), DAPI (bleu). **(E)** Vue agrandie et orthogonale de la région de l'EB infecté ( $\Delta$  IFN) (flèche jaune en (A)). (Barre d'échelle, 20  $\mu$ m). **(F)** et **(G)** Reconstructions 3D de la zone imagée en (E), phalloïdine (rouge) et DAPI (bleu).

Comme présenté dans *Beucher et al.* (510), nous avons montré que l'ajout d'IFN de type III exogène sur la face apicale d'EB d'adultes permet de restreindre l'infection du SARS-CoV-2. Pour confirmer ces résultats, des EB d'adultes dont l'adulte A11 ont été édités par CRISPR/Cas9 pour le gène IFN- $\lambda$ 2 ( $\Delta$  IFN) ou non (Sauvage). Les EB ont été infectés avec 1 200 PFU/épithélium puis lavés 1 h après infection. Après fixation (4 j après infection), une IF a été réalisée avec les anticorps anti-N (vert) et anti-CytK5 (magenta). Un marquage du cortex d'actine avec de la phalloïdine (rouge) a été également effectué afin de visualiser l'architecture tissulaire. Le DAPI permet de visualiser les noyaux (bleu). L'adulte A11 est le seul à avoir montré un phénotype d'infection similaire à celui des enfants, c'est-à-dire que l'infection de l'EB du patient A11 est naturellement restreinte (510). L'analyse de la vue globale de l'EB infecté sauvage (Figure 55A) a révélé la présence de petites zones infectées (Figure 55B et 55C) et restreintes à une faible proportion de l'EB. La vue orthogonale (Figure 55B) montre la présence de cellules infectées (vertes) sous la forme d'un cercle en périphérie de ces zones endommagées. Les cellules au centre de ces zones sont également caractérisées par des signaux anti-CytK5 plus élevés que le reste de l'épithélium (Figure 55B, 55C et 55D). A la différence de l'EB sauvage, celui édité est infecté sur toute sa surface (Figures 57A, 57E, 57F et 57G). Les signaux anti-CytK5 sont élevés pour une très large proportion des cellules (Figure 55E et Figure 55G) comme pour celles situées au centre des zones infectées pour l'EB sauvage (Figure 55D). La formation des syncytiums ne semble pas affectée en raison de leur observation sur la face apicale de l'EB édité (flèches jaunes, Figure 55E) ou de l'EB sauvage (flèches blanches, Figure 55B). L'infection par le SARS-CoV-2 et par conséquent restreinte dans nos conditions expérimentales lorsque le gène IFN- $\lambda$ 2 est délété par CRISPR/Cas9.

V.4 Conclusion générale du chapitre.



**Figure 56. Modèle de la progression de l'infection du SARS-CoV-2 avec des EB reconstitués de patients.** Le SARS-CoV-2 cible majoritairement les cellules ciliées. Les premières cellules infectées apparaissent 1 j après l'infection, d'où de nouveau virus sont produits et infectent de nouvelles cellules. Dès 3 j après infection, des syncytiums sont observés au niveau de la face apicale des EB avec un maximum atteint 4 j après infection. Un important endommagement des EB se caractérise par une destruction des cils, par une désolidarisation des jonctions et par la perte des syncytiums qui se retrouvent dans le surnageant apical. (Schéma généré avec Biorender.com).

En étudiant l'infection du SARS-CoV-2 avec des EB reconstitués provenant d'adultes et d'enfants, nous avons pu montrer que les cellules ciliées des EB d'adultes sont les premières à être majoritairement ciblées dès 24 h après infection ((510) et Figure 56). L'infection se propage ensuite dès 48 h à l'intégralité des EB hormis pour quelques enfants et un seul adulte (Figure 55). Celle-ci reste en effet circonscrite au sein de zones circulaires infectées pour ces quelques individus. Cette protection

intrinsèque des EB semble corrélérer avec l'observation d'une réponse IFN de type III accélérée comme observée pour les EB d'enfants (510). Cette protection est également visible lorsque nous avons réalisé un traitement des EB d'adultes permissifs avec de l'IFN de type III exogène (IFN- $\lambda$ 3). De manière similaire aux IFN de type III, un rôle protecteur de l'IL-13 a également été décrit (621). Notre étude a montré une réponse pro-inflammatoire atténuée chez les EB d'enfants (510) comme décrit dans des études cliniques (519) ou *in vitro* ((520) ; (521)).

La formation de syncytiums a également été observée sur la face apicale des EB d'adultes (510) et d'enfants comme pour d'autres travaux ((573) ; (574) ; (575) ; (576) ; (577)). Ces structures sont issues de la fusion de cellules infectées avec des cellules saines environnantes par un mécanisme dépendant de l'interaction entre la protéine S du SARS-CoV-2 et le récepteur cellulaire ACE2. Nous avons observé que les syncytiums sont positifs pour les marqueurs de cellules ciliées (tubuline acétylée) et de cellules basales (cytokératine 5). En raison de ces résultats, nous proposons que les syncytiums soient probablement issus de la fusion entre des cellules ciliées et des cellules basales sans exclure la possibilité que l'expression de la protéine CytK5 soit la conséquence de l'infection ou d'une dédifférenciation des cellules infectées (509).

## Chapitre 6

### VI. Etude de l'infection d'épithéliums bronchiques reconstitués par l'Ad5.

#### VI.1 Introduction générale.

Si l'infection par l'Ad5 est très bien caractérisée dans les lignées cellulaires, très peu d'études ont été menées avec des modèles physiologiques primaires incluant les EB. Des données de l'infection d'EB par des vecteurs adénoviraux en thérapie génique existent, par exemple pour des essais de thérapie génique pour traiter la mucoviscidose (237). Une étude réalisée avec des EB a révélé une production de génomes viraux intracellulaires dès 24 h après infection mais également une production virale au niveau apical et basolatéral dès 4 j pi et se poursuivant à 8 j pi (622). Ces résultats suggèrent une transmission virale apicale probablement en raison de l'effet cytopathique de l'infection par l'Ad, caractérisé par un cycle de réplication lytique où de nombreuses particules virales sont libérées (346). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'Ad14 (groupe B) présente une internalisation du virus 10 fois plus importante (1 h pi) et une production virale 1000 fois plus efficace que l'Ad5 (type C) dans ce modèle d'EB. Ce résultat semble en adéquation avec la présence des récepteurs CD46, DSG2 et des acides sialiques au niveau apical des EB. A la différence de ces récepteurs utilisés par le type B14, le récepteur CAR utilisé par l'Ad5 est présent au niveau des jonctions serrées, au niveau basal mais faiblement au niveau apical. Ceci est également en adéquation par le fait qu'une induction de la rupture des jonctions serrées par un traitement à l'EGTA a montré une meilleure efficacité pour le transfert de gènes avec des épithéliums de souris (623). De plus, la susceptibilité des EB peut être expliquée par le fait que l'Ad5 utilise initialement un variant mineur de CAR présent au niveau apical (296) et qui colocalise plus tardivement avec le corécepteur à la surface des cellules épithéliales (624). Malgré toutes ces observations, aucune étude à ce jour n'a encore été menée par microscopie afin de caractériser la cinétique d'infection de l'Ad5 avec des EB. De même, aucune donnée à haute résolution n'a encore montré quelles cellules sont les premières cibles de l'Ad5 et quelles sont celles infectées au cours de plusieurs cycles d'infection dans ce modèle. De manière similaire aux études précédentes menées pour le SARS-CoV-2, des résultats préliminaires avec une souche standard d'Ad5 et des EB d'adultes sont présentés dans la partie suivante.

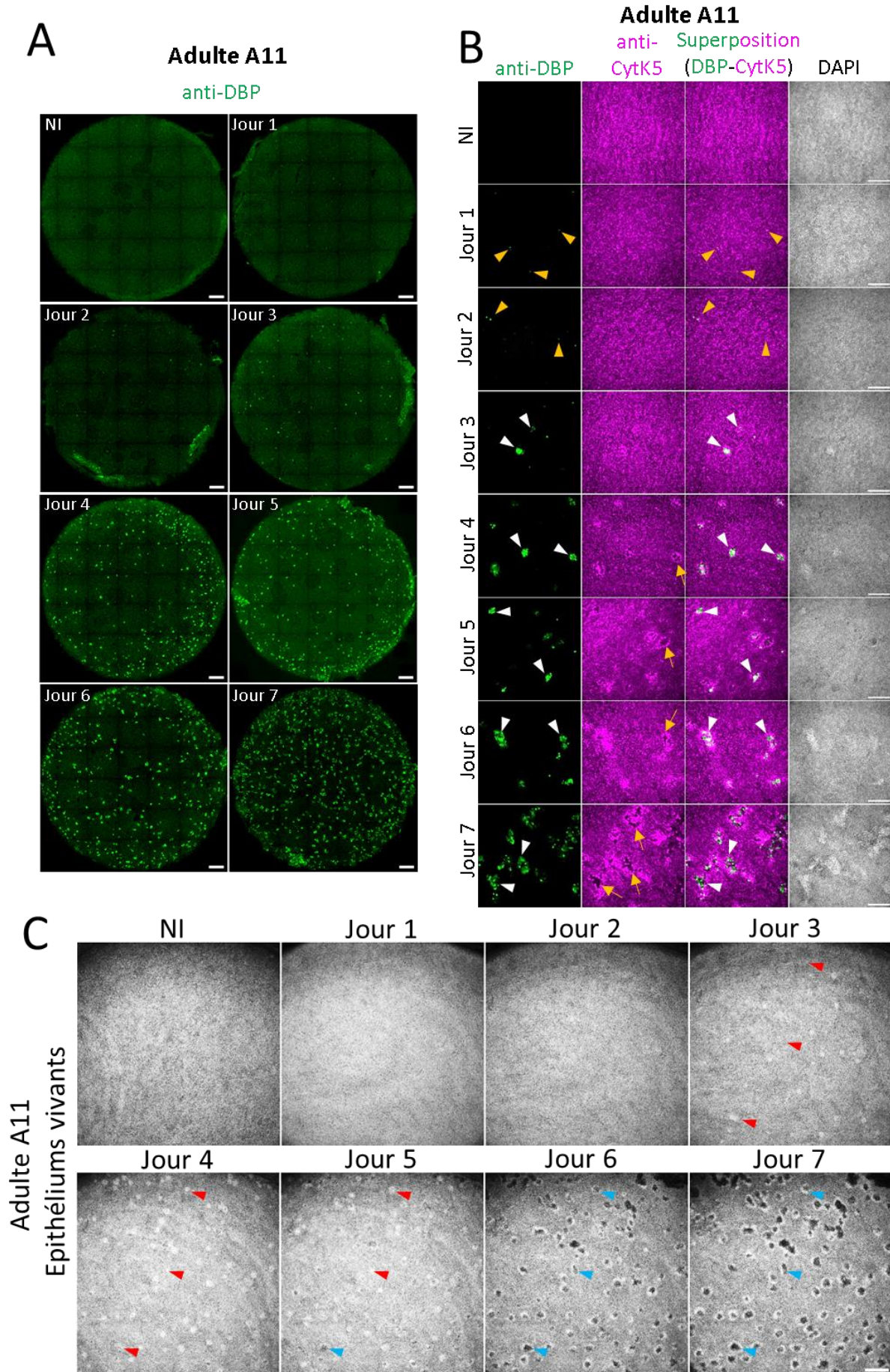
#### VI.2 Résultats préliminaires.

##### VI.2.1 Etude de la cinétique d'infection d'EB d'adultes par une souche standard répliquative d'Ad5.

Afin de caractériser l'infection des EB reconstitués à partir de cellules de patients adultes par l'Ad5, nous avons réalisé une cinétique d'infection. Des EB de l'adulte A11 (voir *Beucher et al., 2022* (510))

ont été infectés en parallèle avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium (23 000 pp/cellule) puis fixés du jour 1 au jour 7 pi.



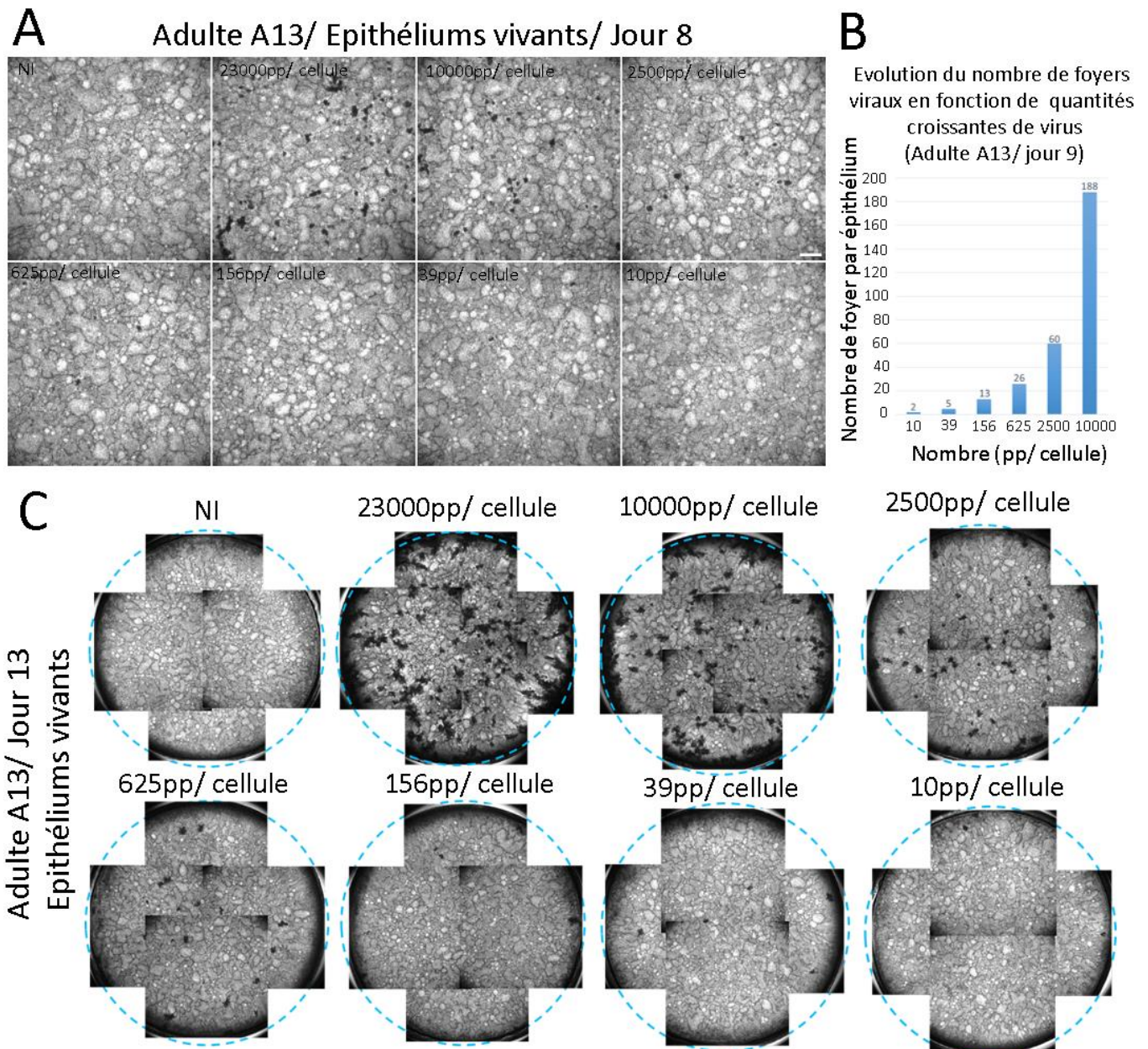


**Figure 57. Etude de la cinétique d'infection d'EB d'adultes par une souche standard répliquative d'Ad5.** Des EB d'adulte (A11) sont incubés avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium (souche standard) soit  $1,3 \times 10^8$  PFU/épithélium puis lavés 1 h après infection. Les EB sont étudiés vivants en (C) ou fixés en (A) et (B). Après fixation (jours 1 à 7 pour les EB infectés et jour 7 pour l'EB non infecté (NI)), une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (vert) et anti-CytK5 (magenta) pour visualiser les cellules basales. Le DAPI (gris) est utilisé pour visualiser les noyaux en (B). (A) Vues globales des EB de la cinétique d'infection. Microscopie confocale (X10). Projections en Z (54  $\mu$ m). (Barre d'échelle, 500  $\mu$ m). (B) Vues des EB de la cinétique d'infection en plus fort grossissement. Microscopie plein champs (x20). (Barre d'échelle, 50  $\mu$ m). (C) Etude de la cinétique d'infection de l'EB fixé 7 j après infection en (A) et (B). La même portion de l'épithélium a été obtenue avant infection (NI) jusqu'à 7 j après infection. Microscopie plein champs en lumière visible (x5). (Barre d'échelle, 100  $\mu$ m).

Une souche virale standard répliquative d'Ad5 (génomme sauvage) a été employée pour cette étude (ATCC). Nous avons choisi d'utiliser pour ces expériences une dose élevée de virus afin de s'assurer de l'établissement de l'infection virale avec ce modèle primaire. Cette dose de 23 000 pp/cellule est en effet 7 fois plus grande que celle utilisée pour infecter des U2OS. Après fixation, un double marquage avec les anticorps anti-DBP (signal vert) pour détecter les cellules infectées et avec l'anti-CytK5 (signal magenta) pour visualiser les cellules basales, a été réalisé par IF. L'analyse des vues globales des EB infectés par microscopie confocale (Figure 57A) et par microscopie plein champs (X20) (Figure 57B) révèle l'apparition de cellules infectées dès le premier jour pi (Figure 57B, triangles jaunes). Toutefois, dès 3 et jusqu'à 7 j pi, de nombreux foyers d'infection sont observés et augmentent en taille à mesure que l'infection progresse. L'apparition et l'augmentation de la taille des foyers infectés ont été étudiées par un suivi de la même région de l'épithélium infecté (jour 1 à 7). Le même suivi mais par microscopie plein champs, en lumière visible et avec un épithélium vivant a permis de mettre en évidence une apparition de zones blanches dès 3 j pi (Figure 57C, flèches rouges). Ce résultat corrèle avec la détection des foyers d'infection par IF (Figure 57B). Ces taches blanches deviennent ensuite sombres, augmentent en taille et sont observées dès 6 j pi (Figure 57C, flèches bleues). Cette transition d'un phénotype clair en phénotype sombre est certainement dû à l'effet cytopathique de l'Ad5. Les cellules infectées sont certainement lysées au sein des foyers d'infection, entraînant la formation de cavités dans lesquelles les signaux CytK5 sont absents (Figure 57B, flèches jaunes). Un endommagement local et une propagation de l'infection virale en périphérie des foyers est de plus visible au jour 7 mais également au jour 13 (Figure 60B). A la différence du SARS-CoV-2 où  $1,2 \times 10^3$  PFU par épithélium sont suffisantes pour l'établissement de l'infection sur l'ensemble de l'épithélium dès 2 j pi, l'infection par l'Ad5 est restreinte à un faible nombre de foyers. Ce nombre est en effet très faible en comparaison avec la dose virale de  $2,3 \times 10^9$  pp par épithélium ( $1,3 \times 10^8$  PFU par épithélium) utilisée durant l'infection.



## VI.2.2 Etude de l'infection des EB d'adultes par différentes quantités de particules d'Ad5.



**Figure 58. Etude de l'infection des EB d'adultes par différentes quantités de particules adénovirales.**

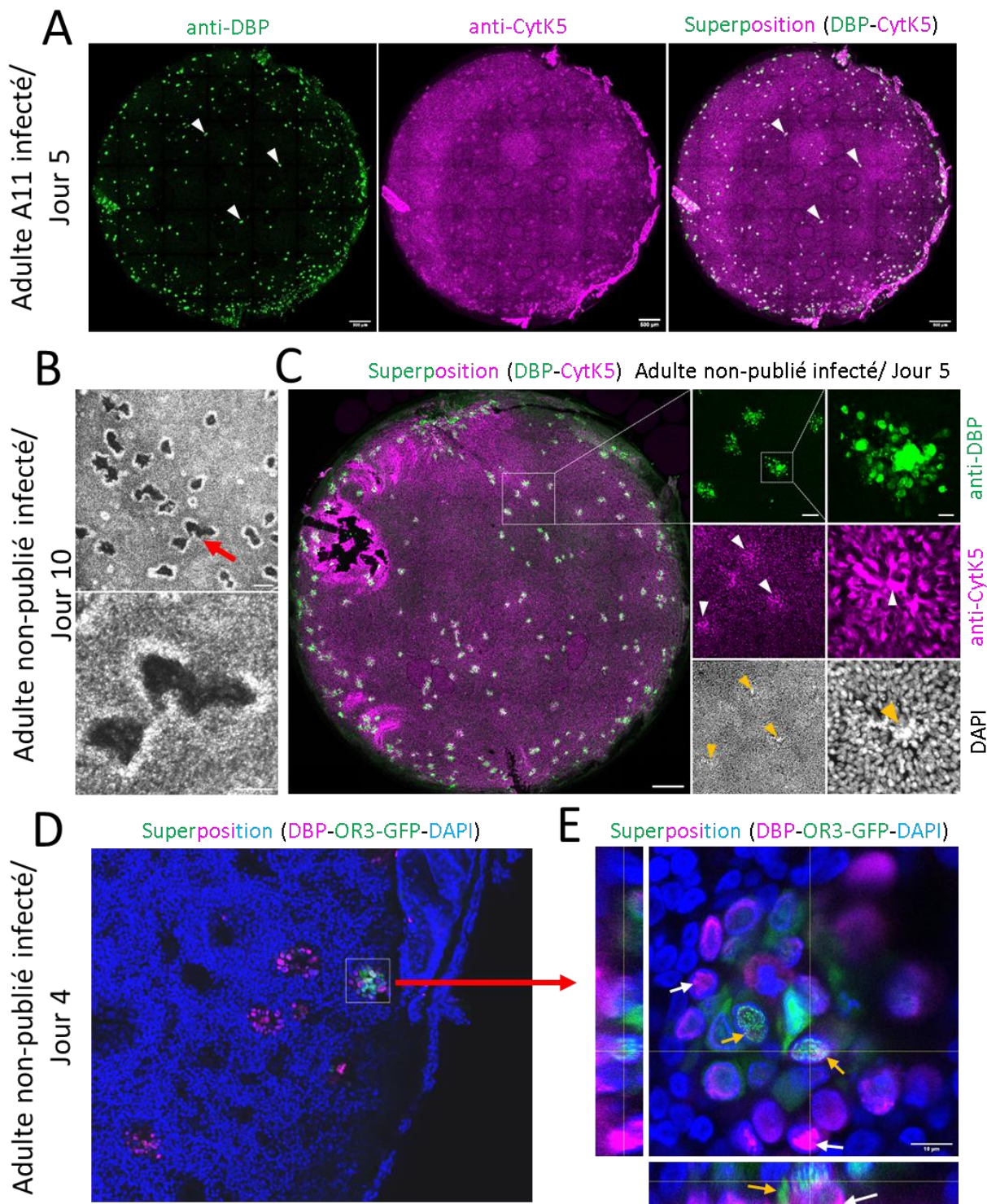
Des EB d'adultes (A13) sont incubés avec des quantités décroissantes de particules virales d'une souche standard d'Ad5 allant de 23 000 pp/cellule (correspondant à  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium) à 10 pp/cellule. Les EB sont lavés (1 h après infection) puis étudiés vivants 8 j après l'infection en (A) et 13 j après infection en (C). (A) Vues grossies d'une portion des EB non infectés (NI) et infectés. Microscopie plein champs (X5) en lumière visible. (Barre d'échelle, 100  $\mu$ m). (B) Quantification du nombre total de foyers sombres d'infection par épithélium en fonction de la quantité de virus utilisée : 10 pp/cellule (n = 2 foyers), 39 pp/cellule (n = 5), 156 pp/cellule (n = 13), 625 pp/cellule (n = 26), 2 500 pp/cellule (n = 60) et 10 000 pp/cellule (n = 188). (C) Vues globales reconstituées manuellement des EB non infectés (NI) et infectés (13 j après l'infection). Microscopie plein champs (X5) en lumière visible. (Diamètre des épithéliums, 6 300  $\mu$ m).

Pour savoir si la permissivité des EB d'adultes dépend de la dose d'Ad5 utilisée, des EB de l'adulte A13 ont été infectés avec la souche d'Ad5 standard à différentes doses, à savoir 23 000, 10 000, 2 500, 625, 156, 39 et 10 pp/cellule. La quantification manuelle du nombre total de foyers d'infection par épithélium (9 j pi) montre que ce nombre est proportionnel à la dose virale utilisée (Figure 58B). En effet le nombre de foyers est diminué d'un facteur d'environ 2,4 entre chaque dose. Cette étude révèle également qu'une dose virale au moins supérieure à 10 000 pp/cellule est nécessaire si nous voulons plus de 180 foyers à étudier. Pour le reste de nos expériences, une dose de 23 000pp/cellule a été choisie afin d'observer la formation d'un maximum de foyers infectés.

### VI.2.3 Caractérisation morphologique des foyers d'infection par l'Ad5.

Pour mieux caractériser les foyers d'infection, une étude par microscopie confocale d'EB d'adultes a été menée 5 j pi et dans les mêmes conditions expérimentales que pour la figure 57B. Des doses identiques pour l'Ad5 (Figure 59A) et pour le virus Ad5 répliatif mais délété ( $\Delta E3$ ) pour la région E3 (Figures 61B et 61C), le même que celui utilisé avec les cellules U2OS ont été incubées avec les EB. Pour les 2 virus, des foyers d'infection sont présents en surface des EB et sont constitués de nombreux noyaux infectés comme indiqué par le marquage DBP (Figure 59C, droite). Comme pour la souche standard, des zones sombres caractérisant des foyers d'infection sont présentes pour la souche  $\Delta E3$  (10 j pi). Des acquisitions à plus fort grossissement révèlent des signaux CytK5 plus élevés (Figure 59C, triangles blancs) et une accumulation de noyaux endommagés au sein des foyers de cellules infectées (Figure 59C, triangles jaunes). Ces observations suggèrent un remaniement possible des cellules basales à la suite de la destruction des cellules dans les foyers. L'infection avec le virus modifié Ad5-*ANCHOR* montre également l'accumulation de génomes viraux répliqués (ponctuations OR3-GFP, flèches jaunes, Figure 59E) et de CR viraux (Figure 59E, flèches blanches). Une propagation virale rayonnant à partir du centre des foyers est également visible par des signaux DBP et OR3-GFP plus faibles en périphérie (Figure 59E). L'ensemble de ces données indique une propagation virale d'une cellule unique initialement infectée vers la périphérie et aboutissant à la formation d'un foyer d'infection. Si une production de génomes viraux peut être visualisée par l'infection du virus modifié Ad5-*ANCHOR*, ces expériences ne permettent pas d'étudier les conséquences de l'infection virale sur la structure de l'épithélium et la production effective de particules virales. Des études par microscopie électronique ont également été menées en parallèle.



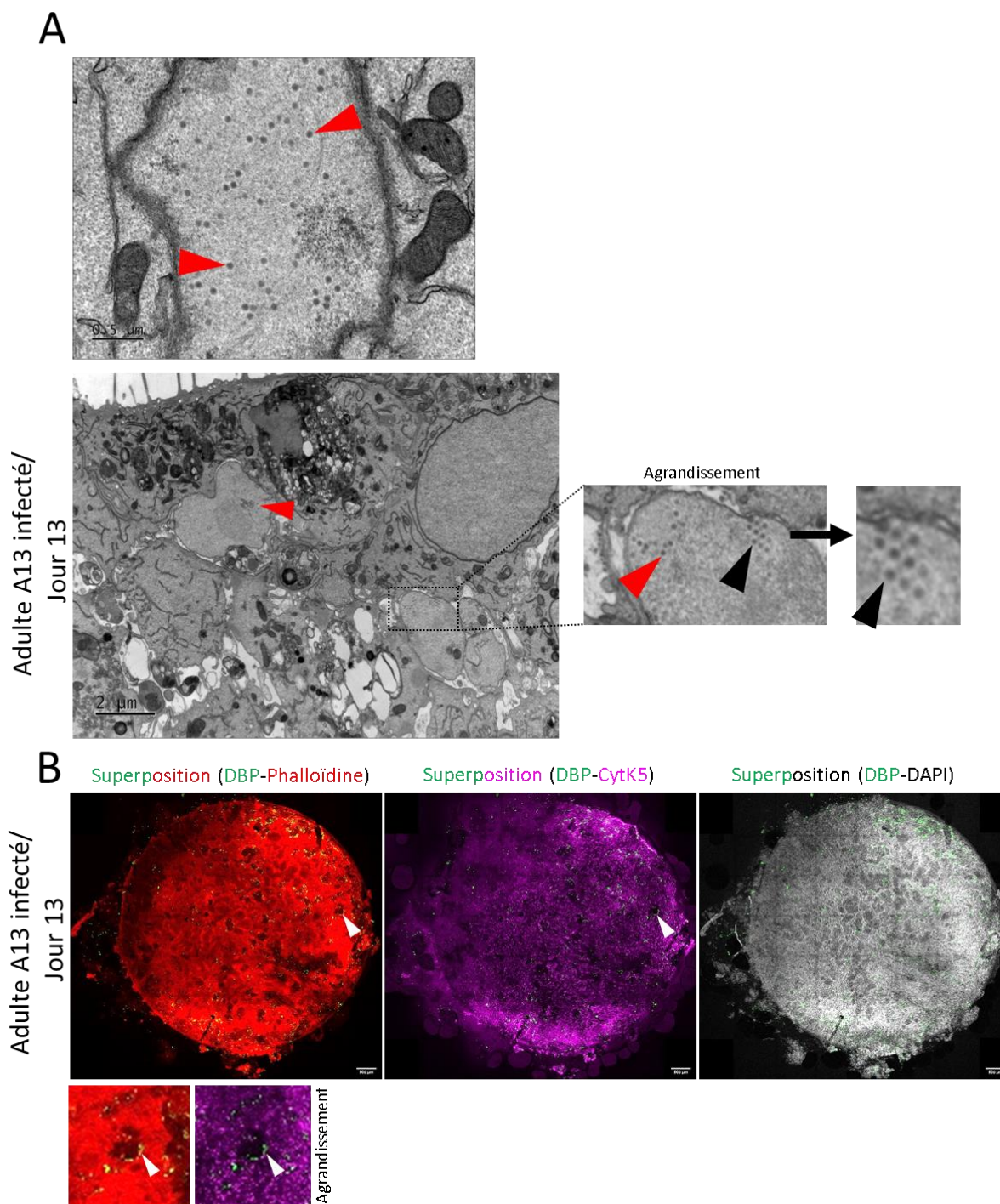


**Figure 59. Caractérisation morphologique des foyers d'infection viraux.** Des EB d'adulte (A11) en (A) et d'un autre adulte non publié en (B), (C), (D) et (E) sont incubés avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium (souche standard d'Ad5) en (A), avec la même quantité de virus d'une souche répliquative déléetée ( $\Delta E3$ ) en (B),

**(C)** et avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium (souche  $\Delta E3$ ) et la même quantité de virus Ad5-*ANCHOR* en **(D)** et **(E)**. Les EB sont lavés 1 h après infection puis étudiés soit vivants **(B)**, soit fixés **(A, C, D et E)**. Après fixation aux jours indiqués, une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (vert) et anti-CytK5 (magenta) pour visualiser les cellules basales en **(A)** et **(C)**. Les anticorps anti-DBP (magenta) et anti-GFP (vert) sont utilisés en **(D)** et **(E)**. Le DAPI est utilisé pour visualiser les noyaux (gris en **(B)** et bleu en **(D)** et **(E)**).

**(A)** Vues globales d'un EB infecté 5 j après l'infection. Microscopie confocale (X10). Projections en Z (54  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 500  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Vues grossies d'une portion d'EB vivant d'adulte infecté, 10 j après l'infection. Microscopie plein champs (X5 (haut) et X20 (bas) en lumière visible. (Barre d'échelle, 100  $\mu\text{m}$  (haut) et 50  $\mu\text{m}$  (bas)). **(C)** Vue globale et vues agrandies d'un EB d'adulte infecté et fixé 5 j après l'infection. Microscopie confocale (vue globale : X10, vue agrandie du milieu et de droite : X20). Projection en Z (X10 : 48  $\mu\text{m}$ , X20 : 20  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 500  $\mu\text{m}$  (gauche), 100  $\mu\text{m}$  (milieu) et 20  $\mu\text{m}$  (droite)). **(D)** Vue grossie d'un EB d'adulte infecté et fixé 4 j après l'infection. Microscopie confocale (x20). Projection en Z (28  $\mu\text{m}$ ) **(E)** Vue orthogonale du foyer encadré en (D). Microscopie confocale (x63). (Barre d'échelle, 10 $\mu\text{m}$ ).





**Figure 60. Etude des foyers d'infection par microscopie électronique.** Des EB d'adulte (A13) sont incubés en **(A)** avec  $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium de souche d'Ad5 standard (soit 23 000 pp/cellule ou  $1,3 \times 10^8$  PFU/épithélium) et 10 000 pp/cellule en **(B)**. Les EB sont lavés 1 h après infection puis fixés 13 j après infection et étudiés par microscopie électronique en **(A)**. En **(B)**, une IF est réalisée avec les anticorps anti-DBP (vert) et anti-CytK5 (magenta) pour observer les cellules basales. La phalloïdine (rouge) marque le cortex d'actine. Le DAPI est utilisé pour visualiser les noyaux (gris). **(A)** Etude par microscopie électronique de cellules infectées d'un EB d'adulte 13 j après infection (coupes transversales ultrafines de 70nm). (Barre d'échelle, 2 µm (gauche) et 0,5 µm (droite)). **(B)** Vues globales d'un EB d'adulte infecté 13 j après infection. Les vues du bas correspondent à des agrandissements du

foyer d'infection indiqué par le triangle blanc. Microscopie confocale (X10). Projections en Z (60  $\mu\text{m}$ ). (Barre d'échelle, 500  $\mu\text{m}$ ).

L'infection par la souche standard répliquative d'Ad5 a également été étudiée par microscopie électronique (EM en anglais). Des EB d'adultes ont été infectés dans les mêmes conditions expérimentales ( $2,3 \times 10^9$  pp /épithélium soit 23 000 pp/cellule) et fixés (13 j), c'est-à-dire, un temps relativement long pour laisser l'infection s'établir. Les observations de sections ultrafines d'EB (70 nm) montrent la présence de particules virales individuelles dans des noyaux (Figure 60A, triangles rouges) mais également sous une forme ordonnée caractéristique pour l'Ad5 (Figure 60A, triangles noirs). L'étude en parallèle d'un EB du même patient par IF avec les anticorps anti-DBP et anti-CytK5 montre de nombreux foyers d'infection visualisés par un signal DBP en périphérie. Le centre des foyers est dépourvu de signaux phalloïdine et CytK5 (Figure 60B, triangle blanc). Ces résultats suggèrent un effet cytopathique viral entraînant un endommagement local de l'EB. Ces observations démontrent que des particules virales sont produites et s'accumulent dans les noyaux de cellules épithéliales infectées d'EB. D'autres observations sont nécessaires pour mettre en évidence les conséquences de l'infection virale sur la morphologie de l'EB et des cellules infectées.

### VI.3 Conclusion générale du chapitre.

L'ensemble de ces données préliminaires révèlent une permissivité très faible des EB d'adulte pour l'Ad5 comme déjà publié (622) par rapport à celle du SARS-CoV-2 (510). En effet,  $1,2 \times 10^3$  PFU de SARS-CoV-2 par épithélium sont suffisants pour un établissement de l'infection sur la totalité des EB et ce, en moins de 48 h. Pour l'Ad5, malgré une dose virale importante ( $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium soit  $1,3 \times 10^8$  PFU/épithélium), entre 3 et 4 j d'infection sont nécessaires à l'apparition de foyers d'infection. Ces foyers sont caractérisés par de nombreuses cellules infectées jointives et visibles par un marquage de la DBP. Malgré une augmentation de la taille de ces foyers, une grande partie de la surface épithéliale reste non infectée et ce, jusqu'à 13 j pi. Les résultats avec le virus modifié Ad5-ANCHOR par microscopie confocale ou avec le virus répliquatif sauvage par microscopie électronique ont révélé respectivement une accumulation de génomes viraux répliqués et de particules virales au sein de noyaux infectés. Par ailleurs, une propagation virale locale et du centre vers la périphérie des foyers d'infection a été démontrée par la présence de cellules infectées en phase précoce situées en périphérie des foyers. Un effet cytopathique par lyse des cellules au sein des foyers d'infection a également été observé avec ce modèle biologique. Ces études préliminaires sont en cours au laboratoire et permettront comme pour notre étude sur le SARS-CoV-2 de mettre en lumière si des différences existent entre adultes et enfants au moyen de ce modèle physiologique et pour différentes souches standards d'Ad.



## DISCUSSION



**Figure 61. Modèle de la chromatinisation réversible du génome viral par les chaperons d'histones au cours de l'infection par l'Ad5.** Dans la particule virale, le génome viral est compacté par l'association de protéines virales VII. Une fois libéré dans le noyau, il est décondensé par TAF-1 $\beta$ . L'ADN viral pourrait être chromatinisé avec des histones cellulaires par HIRA (H3.3-H4) et par FACT (H2A-H2B) afin de permettre l'activation de la transcription des gènes précoces. La synthèse de la protéine virale DBP induit la formation des CR précoces (petites puis grosses ponctuations) et les protéines virales pTP et Pol permettent l'activation de la réplication des génomes viraux. La réplication du génome viral permet la production de nouveaux génomes ADN double brin nus et simple brin associés à des protéines DBP. Le recrutement de FACT dans les CR viraux pourrait permettre de maintenir les génomes viraux nus par l'éviction des histones. Les génomes viraux sont chromatinisés avec des histones afin d'activer la transcription des gènes tardifs. Le dépôt d'histones pourrait être réalisé par HIRA, (CAF1 ?) et FACT en périphérie des CR. FACT pourrait jouer également un rôle de remodelage de la chromatine virale au cours de la transcription. Les génomes viraux sont finalement compactés avec de nouvelles protéines VII par TAF-III dans les ViPR. Ils sont ensuite encapsidés pour former de nouvelles particules virales.

Ces travaux de recherche ont porté sur l'étude des acteurs moléculaires impliqués dans le remodelage de la chromatine de l'Ad5. Ce remodelage est un processus nécessaire tout au long du cycle viral afin de permettre dans un premier temps l'expression des gènes viraux, puis la réplication du génome viral et enfin la production de nouveaux génomes encapsidés dans les particules virales. Une fois le génome viral libéré dans le noyau sous une forme compactée avec les protéines virales VII, celui-ci est premièrement décompacté par TAF-1 $\beta$ . Il va ensuite être remodelé et chromatinisé avec des histones cellulaires afin de mimer la chromatine de la cellule hôte. Cette étape est nécessaire à l'activation de la transcription des gènes viraux précoces puis de la réplication du génome viral. Les acteurs moléculaires ainsi que les mécanismes impliqués dans la chromatinisation du génome adénoviral sont très peu connus. Dans la cellule, la formation réversible des nucléosomes par le dépôt ou l'éviction d'histones est réalisée par les chaperons d'histones. Les chaperons d'histones peuvent être divisés en 2 groupes. Le premier groupe comporte ceux impliqués dans le remodelage de la chromatine durant la réplication (dépendant de la réplication). Le second groupe contient ceux impliqués dans le remodelage de la chromatine de manière non couplée à la réplication (indépendant de la réplication) (Figure 61). Certains chaperons d'histones sont de plus spécialisés dans la manipulation des dimères d'histones H3-H4 et d'autres dans la gestion des dimères d'histones H2A-H2B. Nous nous sommes ainsi demandés si la chromatinisation des génomes viraux est réalisée au cours de la réplication du génome viral ou de manière indépendante.

La réplication du génome viral s'effectue dans les CR, induits au cours de l'infection. Les CR sont des structures très dynamiques pouvant être visualisés par le marquage de la protéine virale DBP, directement impliquée dans la réplication du génome viral ainsi que par celui de la protéine cellulaire USP7 constamment recrutée dans les CR tout au long de la réplication virale. Des travaux récents ont montré que les CR viraux se comportent comme un liquide et se forment par LLPS (495). Les CR



adoptent premièrement une morphologie ponctiforme plus ou moins large (CR précoces) puis une morphologie en anneaux irréguliers d'une taille variable (CR tardifs) ((388) ; (326)). Aux stades les plus tardifs, la protéine Mybbp1a est relocalisée au centre de ces CR, à savoir dans les ViPR (388). Nous avons constaté que cette protéine se relocalise aussi autour des CR précoces lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules U2OS. Les ViPR sont des sites d'accumulation de génomes viraux. Comme la protéine VII y est également présente, il est très probable que les génomes viraux soient remodelés et compactés dans les ViPR avant leur incorporation dans les nouvelles particules virales. Les fonctions de la protéine Mybbp1a au cours de l'infection restent inconnues. Des travaux ont montré que cette protéine est un suppresseur tumoral (625) et qu'elle est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires et ayant un impact sur la physiologie des cellules cancéreuses comme la mitose, la senescence, la biogenèse des ribosomes, les régulations épigénétiques et la régulation du métabolisme. Comme pour Mybbp1a, les fonctions de la protéine USP7 restent également mal connues à ce jour malgré des rôles décrits durant l'infection par de nombreux virus (393). Une étude a par exemple révélé que USP7 est surexprimée au cours de l'infection du VSV, du virus Sendai et du virus Influenza A. La protéine USP7 permet un échappement de la réponse immunitaire innée en inhibant la voie JAK-STAT1 de la voie de l'IFN de type I (626). En ce qui concerne l'Ad, une étude récente a révélé une interaction directe entre la protéine USP7 et la protéine DBP (627). La mutation d'un motif de liaison de la protéine USP7 dans la région C terminale de la protéine DBP suffit à inhiber la formation des CR viraux sans altérer sa liaison avec USP7. Cette mutation suffit également à inhiber la réplication des génomes viraux et l'expression des protéines tardives.

Pour étudier si la chromatinisation des génomes viraux avec des histones cellulaires est réalisée au cours de la réplication du génome viral ou de manière indépendante, nous nous sommes premièrement demandés si les CR viraux sont des compartiments riches ou pauvres en histones cellulaires.

Comme l'étude pour le variant d'histone H3.3 (357), nous avons démontré que les CR viraux et les ViPR sont dépourvus des histones H2A, H2B, H4 ainsi que les 2 variants d'histones H3.1 et H3.3. Nos expériences avec le virus Ad5-ANCHOR ont montré qu'il est possible de détecter des premiers signaux OR3-GFP sous la forme de ponctuations à partir de 8 h après infection. Ces ponctuations correspondent à des zones d'accumulation de génomes viraux qui s'élargissent ensuite et qui excluent la chromatine cellulaire. Nous avons en effet constaté que ces zones sont caractérisées par des signaux faibles pour la protéine H2B-tdiRFP. De manière similaire à la réplication du génome de l'Ad5, celle du génome du parvovirus canin (CPV) (441) et du HSV-1 (628) se réalise également dans des zones intranucléaires qui s'agrandissent et qui excluent la chromatine cellulaire et l'histone H2B. Le rôle de l'exclusion des histones des CR viraux reste encore inconnu. Il est cependant possible que cette compartimentation

soit nécessaire à la réplication virale mais permette également de contrôler la chromatinisation des génomes viraux en périphérie ou à l'extérieur des CR viraux. Ce contrôle pourrait aussi impliquer des chaperons d'histones cellulaires.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une relocalisation sélective de plusieurs chaperons d'histones dans les CR viraux au cours de l'infection par l'Ad5. Les chaperons d'histones HIRA et DAXX sont relocalisés au niveau des CR tardifs et les chaperons d'histones CAF1, NAP1L4 et FACT sont relocalisés et fortement enrichis à la fois dans les CR précoces et les CR tardifs. D'autres chaperons d'histones comme ASF1 et NASP ont également été observés dans les CR sans y être autant enrichis que CAF1, FACT et NAP1L4. La relocalisation des sous-unités p150 et p60 de CAF1 dans les CR précoces est en accord avec des travaux antérieurs (357). Nos analyses ont toutefois révélé pour la première fois que ces 2 sous-unités sont également relocalisées dans les CR tardifs. Ces observations suggèrent de possibles fonctions de CAF1 dans le remodelage de la chromatine virale et dans la chromatinisation des génomes viraux en raison de son rôle décrit dans le dépôt *de novo* de dimères H3-H4 de manière dépendante de la réplication de l'ADN cellulaire (82). En raison d'un rôle de CAF1 et PCNA au cours de la réponse de dommage de l'ADN ((100) ; (101)), il est également possible que CAF1 puisse être impliqué dans le dépôt de dimères d'histones H3.1-H4 durant l'infection par l'Ad5 (629). L'association possible de CAF1 avec des dimères d'histones H3.3-H4 (95) peut laisser supposer son implication dans le dépôt du variant d'histone H3.3. Des études ont cependant constaté aucun impact sur l'association des génomes viraux avec l'histone H3, 12 h après infection de cellules HeLa lorsque la sous-unité p150 est déplétée par ARN interférence (357). Ces résultats suggèrent que le chaperon d'histone CAF1 n'est probablement pas impliqué dans la chromatinisation des génomes viraux dans ces conditions expérimentales. Il est toutefois possible que la déplétion de la sous-unité p150 ne soit pas totale comme proposé par les auteurs. Malgré une relocalisation de DAXX aux CR tardifs dans les cellules U2OS, l'étude de ce chaperon d'histone a été exclue en raison de sa dégradation observée au cours de l'infection par l'Ad5 de cellules humaines hépatocytaires (358). En ce qui concerne HIRA, les travaux de Giberson *et al.*, (353) ont montré que ce candidat n'a pas de rôle dans le dépôt de dimères d'histones H3-H4 pour l'Ad5 sauvage alors que nous avons observé la relocalisation d'HIRA au niveau des CR tardifs dans les cellules U2OS. Un rôle d'HIRA a cependant été montré pour le dépôt du variant d'histone H3.3 avec des vecteurs adénoviraux et non pour le virus sauvage (359). L'étude de ce chaperon d'histone a été exclue en raison de nombreux travaux contradictoires et peu concluants sur son rôle possible au cours de l'infection par l'Ad5. Le chaperon d'histone ASF1 a également été exclu en raison de son rôle de donneur de dimères d'histones et non d'une implication directe dans le dépôt d'histones.

En revanche, la relocalisation et le fort enrichissement des 2 sous-unités SSRP1 et Spt16 du chaperon d'histone FACT dans les CR précoces et les CR tardifs, suggèrent un rôle possible de ce chaperon d'histone au cours de l'infection. Nous avons fait le choix d'étudier FACT au détriment de l'autre candidat prometteur NAP1L4 en raison d'une meilleure caractérisation de FACT dans la littérature et pour ses multiples fonctions dans le remodelage de la chromatine. FACT est en effet impliqué dans la chromatinisation réversible durant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Nos travaux avec des épithéliums bronchiques reconstitués (EB) de patients ont également montré un enrichissement de FACT dans des structures sphériques ou sous la forme d'anneaux semblables à des CR viraux. Ces résultats obtenus avec un modèle plus proche de la physiologie de l'infection de l'Ad5, récapitulent ceux obtenus avec des lignées cellulaires. Nos travaux ont également permis d'observer un recrutement et une association à la fois de la sous-unité SSRP1 de FACT et de la sous-unité p150 de CAF1 avec des génomes viraux. La surexpression de la protéine SSRP1 nous a permis de constater son accumulation au cours de la progression de l'infection sous la forme de très nombreuses ponctuations à l'intérieur de zones dépourvues d'histones. Ces résultats sont en adéquation avec un recrutement de la sous-unité SSRP1 de FACT au niveau des génomes viraux. Nos expériences de surexpression de la protéine SSRP1 ont permis de constater également une association de SSRP1 au niveau des CR viraux. Nous avons également constaté un recrutement des sous-unités p60 et p150 endogènes de CAF1 au niveau des CR viraux qui colocalisent avec la sous-unité SSRP1. Ces résultats suggèrent que les 2 chaperons d'histones CAF1 et FACT puissent être recrutés simultanément au niveau d'un même génome viral et être tous les 2 impliqués dans son remodelage (Figure 61). D'autres études avec le HSV-1 ont également montré un recrutement de la sous-unité SSRP1 sur le génome viral d'une manière dépendante de la protéine virale ICP22 (630). Ces travaux ont en effet montré que l'interaction entre ICP22 et SSRP1 est nécessaire au recrutement de FACT dans les CR viraux. L'absence de la protéine ICP22 entraîne un défaut de l'élongation de la transcription en induisant une diminution globale de la transcription des gènes viraux. Ces travaux montrent par conséquent le rôle de FACT dans la transcription des gènes du HSV-1. Ils suggèrent aussi un rôle possible de FACT dans le remodelage de la chromatine du HSV-1 et un rôle similaire pour l'Ad5. Les mécanismes moléculaires déterminant les changements de la morphologie des CR viraux ainsi que ceux impliqués dans l'exclusion sélective de protéines virales et de protéines cellulaires de ces zones comme les chaperons d'histones et les histones cellulaires restent encore méconnus. Nous nous sommes questionnés sur le rôle possible de la séparation de la LLPS dans l'exclusion et le recrutement sélectif de molécules.

Les travaux de Komatsu *et al.*, ont montré que la protéine DBP, est capable à elle seule de former des MLO (357). Ces travaux ont montré que ces MLO intranucléaires excluent la chromatine cellulaire et sont dépourvus du variant d'histone H3.3. Nos recherches ont montré que, de manière similaire, la

sous-unité de FACT SSRP1 possède la capacité à former des MLO lorsqu'elle est surexprimée. Comme précédemment décrit, les MLO intranucléaires formés par la protéine DBP mais également ceux formés par la protéine SSRP1 ont individuellement la propriété d'exclure la chromatine cellulaire et l'histone H2B. La surexpression de ces 2 protéines permet leur colocalisation à l'intérieur de gouttelettes intranucléaires sphériques plus ou moins grandes conservant la propriété d'exclure la chromatine cellulaire. Ces résultats récapitulent la colocalisation de la protéine DBP et de la protéine SSRP1 au sein des CR viraux. Nos observations suggèrent un modèle dans lequel la protéine SSRP1 peut être recrutée dans les CR viraux de manière indépendante à son association avec une protéine virale ou aux génomes viraux. Seule la protéine SSRP1 entière a été utilisée durant nos recherches. Il serait intéressant de déterminer la ou les portion(s) minimale(s) de cette protéine nécessaire(s) à la formation des MLO. La surexpression de mutants tronqués pour les différents domaines de la protéine SSRP1 permettrait cette identification. Une fois ce(s) domaine(s) identifiés, il serait également intéressant de réaliser des expériences de co-expression entre les mutants tronqués de la protéine SSRP1 et la protéine DBP. Ces études permettraient d'analyser les fragments de la protéines SSRP1 pouvant colocaliser ou non avec les MLO formés par la protéine DBP. Des expériences similaires ont notamment été menées *in vitro* et *in cellulo* pour la nucléoprotéine (N) du SARS-CoV-2. La protéine N purifiée possède la capacité de former *in vitro* des MLO avec le génome viral purifié ((631) ; (632)). Ces études ont par exemple permis de démontrer que tous les domaines de la protéine N dont les domaines IDR sont nécessaires à la formation de MLO (632). Ces expériences ont permis l'élaboration d'un modèle des réseaux d'interactions entre la protéine N et le génome viral (631). De manière similaire à la protéine N, beaucoup de protéines nucléaires et de protéines liant la chromatine sont enrichies en IDR (633). Une des caractéristiques des chaperons d'histones dont les 2 sous-unités de FACT est de comporter également de nombreux domaines IDR. Ces domaines jouent des rôles majeurs dans les fonctions des chaperons d'histones en favorisant leur association aux histones, leur dépôt et leur éviction. Par exemple, la délétion du domaine IDR C terminal de la sous-unité Spt16 de FACT diminue d'un facteur 6 son association aux histones H2A-H2B (634). En étudiant le degré de désordre par l'analyse des séquences en acides aminés des chaperons d'histones avec le logiciel PONDR, nous avons pu mettre en évidence leur enrichissement en IDR (données non montrées) comme d'autres travaux (107). Le rôle de ces domaines IDR dans la formation des MLO reste encore inconnu. Il est possible que ces domaines IDR soient cruciaux pour leur recrutement dans les CR viraux.

Notre étude des MLO formées individuellement par les protéines DBP et SSRP1 a démontré plusieurs caractéristiques en faveur d'une formation par LLPS. La morphologie sphérique de ces MLO excluant la chromatine cellulaire, leur accessibilité partielle à certains anticorps mais surtout leur capacité de fusionner entre elles après un contact sont en effet des arguments en faveur d'une formation par LLPS.

En décomposant les CR viraux et en étudiant leurs constituants individuellement, les résultats de nos travaux comme d'autres (495) sont des arguments forts en faveur d'une formation des CR viraux par LLPS. Il serait intéressant de réaliser des expériences similaires avec les mutants tronquées pour les différents domaines de la protéine SSRP1 pouvant former des MLO. Il serait également intéressant d'étudier la mobilité moléculaire interne de ces MLO par FRAP. Ces travaux permettraient de mieux comprendre quel(s) domaine(s) de la protéine SSRP1 est (sont) nécessaire(s) à la formation des MLO par LLPS et à leurs propriétés dynamiques.

Notre étude du rôle de FACT par une approche pharmacologique avec les curaxines (CBL0100 et CBL0137) a montré un fort effet inhibiteur de CBL0100 et un plus faible effet pour CBL0137 sur la formation des CR viraux (à dose égale). Nous avons en effet montré que l'ajout de 100 nM de CBL0100 en début d'infection suffit à inhiber totalement la formation des CR viraux 16 h après infection et presque totalement 24 h après infection. Nous avons constaté que cet effet est diminué si la drogue est ajoutée plus tardivement au cours de l'infection. Un ajout de celle-ci à 16 h ne permet plus d'observer de changements que ce soit pour la formation des CR viraux mais aussi pour la synthèse de la protéine virale DBP et des protéines structurales fibre, penton et hexon. Comme la curaxine est une drogue, il est également possible qu'elle ait d'autres cibles pouvant inhiber directement ou indirectement la progression du cycle viral. De récents travaux ont montré une forte induction de la réponse IFN et de l'expression d'ISG lorsque FACT est inhibé par l'utilisation du CBL0137 ou par la déplétion de sa sous-unité Spt16 (635). Ces mêmes travaux ont permis de mettre en évidence que les 2 stratégies présentées précédemment pour inhiber le chaperon d'histone FACT permettent d'inhiber l'infection par de nombreux virus dans les virus Zika, l'influenza et le SARS-CoV-2. Il serait par conséquent intéressant d'analyser l'impact de la curaxine sur la réponse IFN au cours de l'infection par l'Ad5. De même, il serait intéressant d'étudier le rôle de FACT dans la réplication de l'Ad5 en utilisant l'ARN interférence pour dépléter individuellement les 2 sous-unités SSRP1 et Spt16 de ce chaperon d'histone. Des analyses par IF et par western blot de cellules infectées 30 h et 52 h permettraient d'évaluer si la déplétion des sous-unités de FACT impacte la formation des CR et l'expression de la protéine DBP et des protéines de structure fibre, penton et hexon. La détermination de la quantité de génomes viraux dans le surnageant des cellules infectées par qPCR permettraient d'évaluer si la déplétion des sous-unités de FACT impacte la production de nouvelles particules virales. Ces résultats seraient complétés par la mesure du titre viral des surnageants des cellules infectées (plages de lyses).

L'ensemble de ces résultats suggère un possible rôle de FACT dans la chromatinisation réversible du génome de l'Ad5. En raison des multiples fonctions de FACT dans le remodelage de la chromatine durant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN cellulaire, nous faisons l'hypothèse d'une intervention de FACT dans la chromatinisation du génome viral à différentes étapes du cycle

viral (Figure 61). Il est ainsi possible que FACT permette le dépôt de dimères d'histones H2A-H2B au début du cycle viral afin d'activer l'expression des gènes précoces. FACT pourrait intervenir dans le dépôt d'histones H2A-H2B au cours de la réplication virale en périphérie de la PRZ des CR viraux en raison de son fort enrichissement dans les CR précoces et tardifs. Il est aussi possible que FACT soit impliqué dans le dépôt d'histones H2A-H2B ou uniquement dans le remodelage de la chromatine pour la transcription des génomes viraux en périphérie des CR précoces. En raison de la capacité de FACT à remodeler et à détacher des dimères d'histones H2A-H2B des nucléosomes, il est possible que FACT ait un rôle dans la déchromatinisation des génomes viraux dans les CR viraux afin de maintenir une population de génomes nus. Il est également possible que cette même fonction de FACT puisse intervenir plus tardivement afin de produire de nouveaux génomes déchromatinisés finalement accumulés dans les VIPR.

Au cours de la pandémie de COVID19, ces travaux de thèse ont également porté sur l'étude de l'infection de l'Ad5 et du SARS-CoV-2 dans des épithéliums bronchiques reconstitués.

### **L'infection par le SARS-CoV-2 se propage rapidement sur l'intégralité des EB d'adultes à la différence de nombreux EB d'enfants en ciblant d'abord les cellules ciliées.**

Des analyses par IF et par microscopie 24 h après infection ont permis d'identifier comme pour d'autres études ((617) ; (509) ; (618)) que les premières cellules majoritairement ciblées par le SARS-CoV-2 sont les cellules ciliées. L'étude de cinétiques d'infections a révélé que pour la majorité des patients analysés (adultes et enfants), l'infection se propage dès 48 h sur l'intégralité des EB hormis pour quelques enfants et pour un seul adulte. Si l'infection reste circonscrite au sein de zones circulaires infectées pour ces quelques individus, une propagation de celle-ci en périphérie de ces zones a également été observée.

### **Une réponse IFN de type III accélérée protège les EB du SARS-CoV-2.**

Ces travaux nous ont cependant permis de faire une corrélation entre la protection intrinsèque des EB et une production accélérée d'IFN de type III comme observée pour les EB d'enfants et par d'autres travaux ((520) ; (519)). Nous avons de plus constaté comme pour d'autres études ((519) ; (520) ; (521)), une réponse pro-inflammatoire plus atténuée pour les EB d'enfants. Cette protection a également été démontrée avec des EB d'adultes permissifs par un traitement avec de l'IFN de type III exogène



(IFN- $\lambda$ 3). Dans ce cas, nous avons constaté une restriction de l'infection qui à la différence d'une réponse déficiente de l'IFN de type III (IFN- $\lambda$ 2), promeut l'infection.

### **Des syncytiums se forment à la surface des EB infectés : un rôle dans la propagation du SARS-CoV-2 ?**

Ces travaux ont permis d'observer de manière similaire à d'autres études ((573) ; (574) ; (575) ; (576) ; (577) ; (510)) la présence de structures sphériques polynucléées (syncytiums) dès 4 jours après infection sur la face apicale d'EB d'adultes et d'enfants. Nous avons observé que les syncytiums sont positifs pour les marqueurs des cellules ciliées et des cellules basales. Comme nous ne pouvons étudier que des échantillons fixés et non suivre la formation des syncytiums, ces syncytiums sont très certainement issus de la fusion entre des cellules ciliées et des cellules basales. Nous n'excluons pas la possibilité que l'expression de la cytokératine 5 soit la conséquence de l'infection ou d'une dédifférenciation cellulaire des cellules infectées (509). L'observation des EB 7 j après infection a révélé une disparition des syncytiums. En étudiant les syncytiums libérés au niveau de la face apicale d'EB d'adultes, nous avons pu montrer que ces structures contenant des particules virales, ont la capacité de transmettre l'infection.

### **Quel lien entre une taille augmentée des syncytiums au cours de l'infection par les variants du SARS-CoV-2 et la transmission/pathogénicité ?**

Seule la souche de SARS-CoV-2 originelle (BetaCoV/IDF0372/2020) a été utilisée pour ces travaux. L'émergence de nouveaux variants du SARS-CoV-2 tout au long de la pandémie (525) nous questionne sur l'impact que les mutations dans la protéine S de ces variants pourraient avoir sur l'infection des EB d'adultes et d'enfants mais également sur la formation des syncytiums (559). Des travaux avec des lignées cellulaires ont montré que les variants Alpha, Beta et Delta forment des syncytiums de taille supérieure à celle des syncytiums de la souche originelle. Le virus Delta possède la protéine S la plus fusogène corrélant avec une production plus élevée de cytokines inflammatoires ((636) ; (637) ; (638)). D'autres travaux ont montré que la substitution D614G dans la protéine S présente pour tous les variants permet d'augmenter la formation des syncytiums (639) en corrélation avec une réplication virale et une transmission augmentée chez le hamster (640). Malgré la présence de cette mutation pour le variant Omicron, d'autres mutations dans la protéine S sont à l'origine d'une formation diminuée des syncytiums ((582) ; (641)). Ceci a été montré par la nécessité pour Omicron de plus de molécules d'ACE2 que les autres variants pour que des cellules exprimant la protéine S fusionnent avec des cellules exprimant la protéine ACE2 (641). Comme les cellules pulmonaires possèdent moins de molécules d'ACE2 que les cellules dans le nasopharynx, ces résultats pourraient expliquer pourquoi le

variant Omicron se réplique très peu dans les tissus pulmonaires *in vitro* avec des modèles d'organoïdes ((642) ; (643)) et *in vivo* ((644) ; (645) ; (646)). D'autres études ont montré une corrélation entre une forte réponse IFN et une faible réplication du variant Omicron à la différence du variant Delta avec des cultures pulmonaires (643). Alfi *et al.*, ont montré que l'inhibition avec de la Ruxolitinib (inhibiteur de JAK1) de la signalisation de l'immunité innée permet de restaurer la réplication de ce variant dans les tissus pulmonaires. La destruction tissulaire par la formation des syncytiums pourrait induire un niveau élevé d'inflammation comme montré par une réponse IFN plus importante par l'activation de cGAS au niveau des syncytiums ((647) ; (648) ; (649)).

Il existe un nombre restreint d'études à ce jour sur les variants avec des EB reconstitués de patients ou commerciaux. Des travaux sur les variants Alpha (650) et au moyen de pseudovirus (651) comportant la protéine S des souches Alpha, Beta, Gamma, Delta et Wuhan-Hu-1, ont toutefois révélé une plus forte infectiosité pour le variant Delta. Une forte infectiosité pour le variant Omicron a également été constatée avec un modèle différent d'organoïdes alvéolaires (652).

#### **Les EB sont faiblement permissifs à l'infection par l'Ad5.**

L'étude préliminaire de l'infection de l'Ad5 avec un faible nombre d'EB d'adultes a révélé une plus faible permissivité des EB à l'infection comme publié par ((653) ; (622) ; (654)) à la différence du SARS-CoV-2 (chapitre 5). L'utilisation de  $1,2 \times 10^3$  PFU de SARS-CoV-2 par épithélium suffit à l'établissement d'une infection sur la totalité des EB en moins de 48 h. La cinétique d'infection pour l'Ad5 est en effet différente malgré une dose virale très importante ( $2,3 \times 10^9$  pp/épithélium correspondant à  $1,3 \times 10^8$  PFU/épithélium).

#### **L'infection par l'Ad5 est circonscrite dans des régions des EB.**

Malgré l'apparition dès 24 h de très rares cellules infectées au niveau de la face apicale des EB, en adéquation avec une production de génomes viraux documentée par (622), 3 et 4 j d'infection sont nécessaires pour observer des foyers d'infection. Nous avons également constaté une accumulation de noyaux endommagés dans ces zones infectées ainsi qu'un élargissement de ces zones au cours de l'infection. Ces observations suggèrent que les cellules infectées sont endommagées puis lysées en raison de l'effet cytopathique induit par l'Ad5 (346). Nos analyses révèlent que l'infection se propage à la périphérie des zones infectées jusqu'à plus de 10 j après infection. Les raisons de cette localisation spécifique restent cependant encore inconnues mais elle pourrait être liée au récepteur CAR.

**L'infection par l'Ad5 peut s'établir depuis les faces apicale et basale des EB.**

A la différence d'anciens travaux ayant rapporté une infection seulement possible depuis la face basolatérale des épithéliums (297), de récentes études ont montré la possibilité d'une infection depuis leur face apicale ((622) ; (655) ; (656)). Pour nos travaux, l'infection par l'Ad5 a en effet été réalisée au niveau de la face apicale des EB.

**La faible susceptibilité des EB pourrait être liée à la localisation du récepteur CAR et sa faible expression.**

Le degré d'expression du récepteur CAR et sa localisation pourrait expliquer la différence de susceptibilité entre les EB et les lignées cellulaires ainsi qu'une infection favorisée au niveau basolatéral des EB (657). La protéine CAR comporte 2 isoformes fonctionnels au niveau membranaire qui diffèrent suivant la présence au niveau C-terminal de l'exon 7 (isoforme CAR<sup>ex7</sup>) ou de l'exon 8 (CAR<sup>ex8</sup>) après épissage (296). En fonction du modèle cellulaire utilisé, les quantités et la localisation de ces isoformes peuvent varier (657). Les travaux de Sharma *et al.*, ont en effet montré de plus faibles quantités de protéines CAR<sup>ex7</sup> et CAR<sup>ex8</sup> exprimées par les épithéliums respiratoires humains (HAE) par rapport à des lignées cellulaires non polarisées. Les HAE ont par exemple des quantités environ 7 fois (CAR<sup>ex7</sup>) et 3 fois (CAR<sup>ex8</sup>) inférieures par rapport aux cellules HEK-293 et des quantités environ 4 fois (CAR<sup>ex7</sup>) et 2 fois (CAR<sup>ex8</sup>) inférieures par rapport aux cellules HeLa. Ces mêmes travaux ont permis d'observer la localisation de l'isoforme CAR<sup>ex7</sup> au niveau des jonctions serrées basolatérales à la différence de l'isoforme CAR<sup>ex8</sup> se situant majoritairement au niveau de la face apicale dans le cytoplasme des cellules. Cette étude ne permet pas de savoir la proportion de protéines CAR<sup>ex8</sup> exposées à la surface des épithéliums et directement accessibles aux virus. Toutefois, la transduction d'Ad5 (exprimant la  $\beta$ -Galactosidase) par la face apicale est diminuée de 3 log en utilisant les épithélium polarisés Calu-3 et les HAE (EB) par rapport à des lignées cellulaires non-polarisées comme les cellules HeLa et HEK-293. Ces résultats sont en adéquations avec la faible susceptibilité/perméabilité des EB d'adultes observée durant nos travaux. Il serait intéressant de déterminer systématiquement les quantités de protéines CAR<sup>ex7</sup> et CAR<sup>ex8</sup> comme pour les analyses de (657) pour chaque nouveau patient analysé afin de voir s'il existe une corrélation entre le niveau d'infection et la quantité de protéines CAR. D'autres études ont également montré une plus faible susceptibilité de l'Ad5 en utilisant des vecteurs adénoviraux à la différence des autres types Ad4 (type E), Ad3 (type B1), Ad21 (type B1) et Ad69 (type D) (654). Ces études sont en cours au laboratoire et permettront de mettre en lumière si l'infection d'EB par l'Ad5 et par différentes souches standards d'Ad est similaire ou non entre les adultes et les enfants. A ce jour, aucune étude n'a encore été menée par microscopie pour caractériser les cinétiques d'infection de l'Ad5 ainsi que d'autres types d'Ad avec des EB de patients.

De même, les premières cellules infectées par l'Ad5 à partir de la phase apicale restent à être caractérisées plus en détails pour confirmer leur identité. Il est difficile d'imaginer que l'Ad5 cible les cellules basales dans un contexte physiologique. Les cellules ciliées sont très probablement ciblées en premier car elles sont exposées sur la surface apicale des EB et accessibles au virus à la différence des cellules basales. D'autres travaux avec des vecteurs adénoviraux suggèrent également que les cellules ciliées sont celles majoritairement ciblées par l'Ad2 (653).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Fyodorov DV, Zhou BR, Skoultchi AI, Bai Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2018;19(3):192-206.
2. Luger K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. 1997;389.
3. Zhou K, Gaullier G, Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat Struct Mol Biol.* janv 2019;26(1):3-13.
4. Smith S, Stillman B. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *The EMBO Journal.* avr 1991;10(4):971-80.
5. Das C, Tyler JK, Churchill MEA. The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance. *Trends in Biochemical Sciences.* sept 2010;35(9):476-89.
6. Li G, Levitus M, Bustamante C, Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol.* janv 2005;12(1):46-53.
7. McGinty RK, Tan S. Nucleosome Structure and Function. *Chem Rev.* 25 mars 2015;115(6):2255-73.
8. Shaytan AK, Landsman D, Panchenko AR. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A–H2B dimers. *Current Opinion in Structural Biology.* juin 2015;32:48-57.
9. Pardal AJ, Fernandes-Duarte F, Bowman AJ. The histone chaperoning pathway: from ribosome to nucleosome. Gilbert N, Allan J, éditeurs. *Essays in Biochemistry.* 23 avr 2019;63(1):29-43.
10. Apta-Smith MJ, Hernandez-Fernaund JR, Bowman AJ. Evidence for the nuclear import of histones H3.1 and H4 as monomers. *EMBO J [Internet].* oct 2018 [cité 6 avr 2023];37(19). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.201798714>
11. Drew HR, Travers AA. DNA bending and its relation to nucleosome positioning. *Journal of Molecular Biology.* 20 déc 1985;186(4):773-90.
12. Chereji RV, Clark DJ. Major Determinants of Nucleosome Positioning. *Biophysical Journal.* mai 2018;114(10):2279-89.
13. Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet.* mars 2009;10(3):161-72.
14. Keene MA, Corces V, Lowenhaupt K, Elgin SC. DNase I hypersensitive sites in *Drosophila* chromatin occur at the 5' ends of regions of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* janv 1981;78(1):143-6.
15. Almer A, Hörz W. Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the PHO5/PHO3 locus in yeast. *EMBO J.* oct 1986;5(10):2681-7.
16. Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, et al. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature.* mai 2008;453(7193):358-62.
17. Eaton ML, Galani K, Kang S, Bell SP, MacAlpine DM. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* 15 avr 2010;24(8):748-53.



18. Berbenetz NM, Nislow C, Brown GW. Diversity of Eukaryotic DNA Replication Origins Revealed by Genome-Wide Analysis of Chromatin Structure. Cohen-Fix O, éditeur. *PLoS Genet.* 2 sept 2010;6(9):e1001092.
19. Hogan GJ, Lee CK, Lieb JD. Cell Cycle–Specified Fluctuation of Nucleosome Occupancy at Gene Promoters. *PLOS Genetics.* 22 sept 2006;2(9):e158.
20. Shivaswamy S, Bhinge A, Zhao Y, Jones S, Hirst M, Iyer VR. Dynamic Remodeling of Individual Nucleosomes Across a Eukaryotic Genome in Response to Transcriptional Perturbation. Rando OJ, éditeur. *PLoS Biol.* 18 mars 2008;6(3):e65.
21. Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet.* août 2004;36(8):900-5.
22. Bernstein BE, Liu CL, Humphrey EL, Perlstein EO, Schreiber SL. Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol.* 2004;5(9):R62.
23. Zanton SJ, Pugh BF. Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes Dev.* 15 août 2006;20(16):2250-65.
24. Zhang H, Roberts DN, Cairns BR. Genome-Wide Dynamics of Htz1, a Histone H2A Variant that Poises Repressed/Basal Promoters for Activation through Histone Loss. *Cell.* oct 2005;123(2):219-31.
25. Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD. Removal of Promoter Nucleosomes by Disassembly Rather Than Sliding In Vivo. *Molecular Cell.* 4 juin 2004;14(5):667-73.
26. Olins AL, Olins DE. Spheroid Chromatin Units (v Bodies). *Science.* 25 janv 1974;183(4122):330-2.
27. Wang S, Vogirala VK, Soman A, Berezhnoy NV, Liu ZB, Wong ASW, et al. Linker histone defines structure and self-association behaviour of the 177 bp human chromatosome. *Sci Rep.* 11 janv 2021;11(1):380.
28. Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *Journal of Cell Biology.* 1 nov 1979;83(2):403-27.
29. Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature.* 7 juill 2005;436(7047):138-41.
30. Scheffer MP, Eltsov M, Frangakis AS. Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11 oct 2011;108(41):16992-7.
31. Saitoh N, Goldberg IG, Wood ER, Earnshaw WC. Scll: An Abundant Chromosome Scaffold Protein Is a Member of a Family of Putative ATPases with an Unusual Predicted Tertiary Structure. *The Journal of Cell Biology.* 1994;127.
32. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2012;13(7):436-47.
33. Antonin W, Neumann H. Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology.* juin 2016;40:15-22.

34. Toselli-Mollereau E, Robellet X, Fauque L, Lemaire S, Schiklenk C, Klein C, et al. Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation. *EMBO J.* 15 juill 2016;35(14):1565-81.
35. Kschonsak M, Haering CH. Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *BioEssays.* juill 2015;37(7):755-66.
36. Shintomi K, Hirano T. The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* 15 juill 2011;25(14):1464-9.
37. Green LC, Kalitsis P, Chang TM, Cipetic M, Kim JH, Marshall O, et al. Contrasting roles of condensin I and II in mitotic chromosome formation. *Journal of Cell Science.* 1 janv 2012;jcs.097790.
38. Ishihara S, Sasagawa Y, Kameda T, Yamashita H, Umeda M, Kotomura N, et al. Local states of chromatin compaction at transcription start sites control transcription levels. *Nucleic Acids Research.* 20 août 2021;49(14):8007-23.
39. Grabowska A, Sas-Nowosielska H, Wojtas B, Holm-Kaczmarek D, Januszewicz E, Yushkevich Y, et al. Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity. *Cell Reports.* févr 2022;38(7):110352.
40. Hu Y, Kireev I, Plutz M, Ashourian N, Belmont AS. Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template. *Journal of Cell Biology.* 6 avr 2009;185(1):87-100.
41. Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin J, Maltais LJ. The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics.* 1 nov 2002;80(5):487-98.
42. Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet.* nov 2008;9(11):843-54.
43. El Kennani S, Adrait A, Shaytan AK, Khochbin S, Bruley C, Panchenko AR, et al. MS\_HistoneDB, a manually curated resource for proteomic analysis of human and mouse histones. *Epigenetics & Chromatin.* déc 2017;10(1):2.
44. Long M, Sun X, Shi W, Yanru A, Leung STC, Ding D, et al. A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Research.* 19 sept 2019;47(16):8399-409.
45. Yuan J, Adamski R, Chen J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. *FEBS Letters.* 10 sept 2010;584(17):3717-24.
46. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* 13 oct 2012;7(10):1098-108.
47. Costanzi C, Pehrson JR. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature.* juin 1998;393(6685):599-601.
48. Hirano R, Arimura Y, Kujirai T, Shibata M, Okuda A, Morishima K, et al. Histone variant H2A.B-H2B dimers are spontaneously exchanged with canonical H2A-H2B in the nucleosome. *Commun Biol.* 12 févr 2021;4(1):191.

49. Okuwaki M, Kato K, Shimahara H, Tate S ichi, Nagata K. Assembly and Disassembly of Nucleosome Core Particles Containing Histone Variants by Human Nucleosome Assembly Protein I. *Molecular and Cellular Biology*. 1 déc 2005;25(23):10639-51.
50. McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10 févr 2004;101(6):1525-30.
51. Ahmad K, Henikoff S. The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly. *Molecular Cell*. juin 2002;9(6):1191-200.
52. Wirbelauer C, Bell O, Schübeler D. Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev*. 1 août 2005;19(15):1761-6.
53. Zhao F, Zhang H, Zhao T, Li Z, Jiang D. The histone variant H3.3 promotes the active chromatin state to repress flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 3 août 2021;186(4):2051-63.
54. Delaney K, Almouzni G. Transcription-coupled H3.3 recycling: A link with chromatin states. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. févr 2023;135:13-23.
55. Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet*. oct 2005;37(10):1090-7.
56. Adam S, Polo SE, Almouzni G. Transcription Recovery after DNA Damage Requires Chromatin Priming by the H3.3 Histone Chaperone HIRA. *Cell*. sept 2013;155(1):94-106.
57. Padeganeh A, De Rop V, Maddox PS. Nucleosomal composition at the centromere: a numbers game. *Chromosome Res*. mars 2013;21(1):27-36.
58. Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis: Chromatin code and spermatogenesis. *European Journal of Biochemistry*. 16 août 2004;271(17):3459-69.
59. Meistrich ML, Bucci LR, Trostle-Weige PK, Brock WA. Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Developmental Biology*. 1 nov 1985;112(1):230-40.
60. Rao BJ, Brahmachari SK, Rao MR. Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *Journal of Biological Chemistry*. nov 1983;258(22):13478-85.
61. Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, et al. Human Testis/Sperm-specific Histone H2B (hTSH2B). *Journal of Biological Chemistry*. nov 2002;277(45):43474-80.
62. Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene*. 13 juin 2001;271(1):1-12.
63. Bartell JG, Davis T, Kremer EJ, Dewey MJ, Kistler WS. Expression of the Rat Testis-specific Histone H1t Gene in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*. févr 1996;271(8):4046-54.
64. Iguchi N, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells: **Spermatids-specific histone H1 like protein**. *International Journal of Andrology*. déc 2003;26(6):354-65.

65. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to Chromatin through Histone Modifications. *Cell*. oct 2000;103(2):263-71.
66. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. mars 2011;21(3):381-95.
67. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 10 août 2001;293(5532):1074-80.
68. Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, David Allis C. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2007;8(12):983-94.
69. Javaid N, Choi S. Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes*. 7 août 2017;8(8):196.
70. Ernst J, Kellis M. Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol*. août 2010;28(8):817-25.
71. Paço A, de Bessa Garcia SA, Freitas R. Methylation in HOX Clusters and Its Applications in Cancer Therapy. *Cells*. 3 juill 2020;9(7):1613.
72. Sawicka A, Seiser C. Sensing core histone phosphorylation — A matter of perfect timing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. août 2014;1839(8):711-8.
73. Li J, Mahata B, Escobar M, Goell J, Wang K, Khemka P, et al. Programmable human histone phosphorylation and gene activation using a CRISPR/Cas9-based chromatin kinase. *Nat Commun*. 9 févr 2021;12(1):896.
74. Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW. Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol*. févr 2011;7(2):113-9.
75. Cao J, Yan Q. Histone Ubiquitination and Deubiquitination in Transcription, DNA Damage Response, and Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2012 [cité 6 avr 2023];2. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00026/abstract>
76. Komatsu T, Haruki H, Nagata K. Cellular and viral chromatin proteins are positive factors in the regulation of adenovirus gene expression. *Nucleic Acids Research*. févr 2011;39(3):889-901.
77. Balakrishnan L, Milavetz B. Epigenetic Regulation of Viral Biological Processes. *Viruses*. 17 nov 2017;9(11):346.
78. Lynch KL, Gooding LR, Garnett-Benson C, Ornelles DA, Avgousti DC. Epigenetics and the dynamics of chromatin during adenovirus infections. *FEBS Lett*. déc 2019;593(24):3551-70.
79. Gurard-Levin ZA, Quivy JP, Almouzni G. Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics. *Annu Rev Biochem*. 2 juin 2014;83(1):487-517.
80. Stein A, Whitlock JP, Bina M. Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin in vitro at physiological ionic strength. *Proc Natl Acad Sci USA*. oct 1979;76(10):5000-4.
81. Stein A. [28] Reconstitution of chromatin from purified components. In: Wassarman PM, Kornberg RD, éditeurs. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1989 [cité 21 mai

- 2023]. p. 585-603. (Nucleosomes; vol. 170). Disponible sur:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687989700665>
82. Hammond CM, Strømme CB, Huang H, Patel DJ, Groth A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2017;18(3):141-58.
  83. Wu JI. Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer. *ABBS.* 1 janv 2012;44(1):54-69.
  84. Alver BH, Kim KH, Lu P, Wang X, Manchester HE, Wang W, et al. The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat Commun.* 6 mars 2017;8(1):14648.
  85. Soniat M, Cağatay T, Chook YM. Recognition Elements in the Histone H3 and H4 Tails for Seven Different Importins. *Journal of Biological Chemistry.* sept 2016;291(40):21171-83.
  86. Pardal AJ, Bowman AJ. A specific role for importin-5 and NASP in the import and nuclear hand-off of monomeric H3. *eLife.* 6 sept 2022;11:e81755.
  87. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Cell.* janv 2004;116(1):51-61.
  88. Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EMD, Lipinski M, Almouzni G. HIRA Is Critical for a Nucleosome Assembly Pathway Independent of DNA Synthesis. *Molecular Cell.* mai 2002;9(5):1091-100.
  89. Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I, Pellentz C, Lacoste N, Puri A, et al. Dynamics of Histone H3 Deposition In Vivo Reveal a Nucleosome Gap-Filling Mechanism for H3.3 to Maintain Chromatin Integrity. *Molecular Cell.* déc 2011;44(6):928-41.
  90. Zhang H, Gan H, Wang Z, Lee JH, Zhou H, Ordog T, et al. RPA Interacts with HIRA and Regulates H3.3 Deposition at Gene Regulatory Elements in Mammalian Cells. *Molecular Cell.* janv 2017;65(2):272-84.
  91. Daniel Ricketts M, Frederick B, Hoff H, Tang Y, Schultz DC, Singh Rai T, et al. Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. *Nat Commun.* 10 juill 2015;6(1):7711.
  92. Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA.* 10 août 2010;107(32):14075-80.
  93. Elsaesser SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD, Patel DJ. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature.* nov 2012;491(7425):560-5.
  94. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, et al. Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell.* mars 2010;140(5):678-91.
  95. Drané P, Ouarrhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 15 juin 2010;24(12):1253-65.

96. Voon HPJ, Wong LH. New players in heterochromatin silencing: histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Res.* 29 févr 2016;44(4):1496-501.
97. Wasylishen AR, Sun C, Moyer SM, Qi Y, Chau GP, Aryal NK, et al. Daxx maintains endogenous retroviral silencing and restricts cellular plasticity in vivo. *Sci Adv.* 7 août 2020;6(32):eaba8415.
98. Smith S, Stillman B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell.* 14 juill 1989;58(1):15-25.
99. Sauer PV, Gu Y, Liu WH, Mattioli F, Panne D, Luger K, et al. Mechanistic insights into histone deposition and nucleosome assembly by the chromatin assembly factor-1. *Nucleic Acids Research.* 2 nov 2018;46(19):9907-17.
100. Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jónsson ZO, Hübscher U, Becker PB, et al. A CAF-1–PCNA-Mediated Chromatin Assembly Pathway Triggered by Sensing DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology.* 1 févr 2000;20(4):1206-18.
101. Polo SE, Roche D, Almouzni G. New Histone Incorporation Marks Sites of UV Repair in Human Cells. *Cell.* nov 2006;127(3):481-93.
102. Sauer PV, Timm J, Liu D, Sitbon D, Boeri-Erba E, Velours C, et al. Insights into the molecular architecture and histone H3-H4 deposition mechanism of yeast Chromatin assembly factor 1. *eLife.* 18 mars 2017;6:e23474.
103. Aguilar-Gurrieri C, Larabi A, Vinayachandran V, Patel NA, Yen K, Reja R, et al. Structural evidence for Nap1-dependent H2A–H2B deposition and nucleosome assembly. *EMBO J.* juill 2016;35(13):1465-82.
104. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, et al. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Research.* 1 juin 2012;40(11):4861-78.
105. Park YJ, Luger K. Structure and function of nucleosome assembly proteins This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem Cell Biol.* août 2006;84(4):549-549.
106. Chang L, Loranger SS, Mizzen C, Ernst SG, Allis CD, Annunziato AT. Histones in Transit: Cytosolic Histone Complexes and Diacetylation of H4 During Nucleosome Assembly in Human Cells. *Biochemistry.* 1 janv 1997;36(3):469-80.
107. Warren C, Shechter D. Fly Fishing for Histones: Catch and Release by Histone Chaperone Intrinsically Disordered Regions and Acidic Stretches. *Journal of Molecular Biology.* août 2017;429(16):2401-26.
108. Platonova O, Akey IV, Head JF, Akey CW. Crystal Structure and Function of Human Nucleoplasmin (Npm2): A Histone Chaperone in Oocytes and Embryos. *Biochemistry.* 20 sept 2011;50(37):8078-89.
109. Inoue A, Ogushi S, Saitou M, Suzuki MG, Aoki F. Involvement of Mouse Nucleoplasmin 2 in the Decondensation of Sperm Chromatin after Fertilization1. *Biology of Reproduction.* 1 juill 2011;85(1):70-7.



110. Siddaway R, Milos S, Coyaud É, Yun HY, Morcos SM, Pajovic S, et al. The in vivo Interaction Landscape of Histones H3.1 and H3.3. *Molecular & Cellular Proteomics*. oct 2022;21(10):100411.
111. Daganzo SM, Erzberger JP, Lam WM, Skordalakes E, Zhang R, Franco AA, et al. Structure and Function of the Conserved Core of Histone Deposition Protein Asf1. *Current Biology*. déc 2003;13(24):2148-58.
112. Abascal F, Corpet A, Gurard-Levin ZA, Juan D, Ochsenbein F, Rico D, et al. Subfunctionalization via Adaptive Evolution Influenced by Genomic Context: The Case of Histone Chaperones ASF1a and ASF1b. *Molecular Biology and Evolution*. août 2013;30(8):1853-66.
113. Tang Y, Poustovoitov MV, Zhao K, Garfinkel M, Canutescu A, Dunbrack R, et al. Structure of a human ASF1a–HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol*. oct 2006;13(10):921-9.
114. Bowman A, Koide A, Goodman JS, Colling ME, Zinne D, Koide S, et al. sNASP and ASF1A function through both competitive and compatible modes of histone binding. *Nucleic Acids Res*. 25 janv 2017;45(2):643-56.
115. Bowman A, Lercher L, Singh HR, Zinne D, Timinszky G, Carlomagno T, et al. The histone chaperone sNASP binds a conserved peptide motif within the globular core of histone H3 through its TPR repeats. *Nucleic Acids Res*. 20 avr 2016;44(7):3105-17.
116. Cook AJL, Gurard-Levin ZA, Vassias I, Almouzni G. A Specific Function for the Histone Chaperone NASP to Fine-Tune a Reservoir of Soluble H3-H4 in the Histone Supply Chain. *Molecular Cell*. déc 2011;44(6):918-27.
117. Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WHW, et al. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol*. nov 2010;17(11):1343-51.
118. Earnshaw WC, Honda BM, Laskey RA, Thomas JO. Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin. *Cell*. 1 sept 1980;21(2):373-83.
119. Burgess RJ, Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2013;20(1):14-22.
120. English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill MEA, Tyler JK. Structural Basis for the Histone Chaperone Activity of Asf1. *Cell*. nov 2006;127(3):495-508.
121. Stillman B. Chromatin assembly during SV40 DNA replication in vitro. *Cell*. 23 mai 1986;45(4):555-65.
122. Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B. Nucleosome Assembly by a Complex of CAF-1 and Acetylated Histones H3/H4. *Cell*. oct 1996;87(1):95-104.
123. Finn RM, Ellard K, Eirín-López JM, Ausió J. Vertebrate nucleoplasmin and NASP: egg histone storage proteins with multiple chaperone activities. *FASEB j*. déc 2012;26(12):4788-804.
124. Chen P, Dong L, Hu M, Wang YZ, Xiao X, Zhao Z, et al. Functions of FACT in Breaking the Nucleosome and Maintaining Its Integrity at the Single-Nucleosome Level. *Molecular Cell*. juill 2018;71(2):284-293.e4.

125. Wang GZ, Wang Y, Goff SP. Histones Are Rapidly Loaded onto Unintegrated Retroviral DNAs Soon after Nuclear Entry. *Cell Host & Microbe*. déc 2016;20(6):798-809.
126. Wang T, Liu Y, Edwards G, Krzizike D, Scherman H, Luger K. The histone chaperone FACT modulates nucleosome structure by tethering its components. *Life Sci Alliance*. août 2018;1(4):e201800107.
127. Piquet S, Le Parc F, Bai SK, Chevallier O, Adam S, Polo SE. The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage. *Molecular Cell*. déc 2018;72(5):888-901.e7.
128. Mosammaparast N. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *The EMBO Journal*. 1 déc 2002;21(23):6527-38.
129. Andrews AJ, Chen X, Zevin A, Stargell LA, Luger K. The Histone Chaperone Nap1 Promotes Nucleosome Assembly by Eliminating Nonnucleosomal Histone DNA Interactions. *Molecular Cell*. mars 2010;37(6):834-42.
130. Okuwaki M, Kato K, Nagata K. Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones. *Genes to Cells*. janv 2010;15(1):13-27.
131. Gurova K, Chang HW, Valieva ME, Sandlesh P, Studitsky VM. Structure and function of the histone chaperone FACT – Resolving FACTual issues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. sept 2018;1861(9):892-904.
132. Liu Y, Zhou K, Zhang N, Wei H, Tan YZ, Zhang Z, et al. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome. *Nature*. 16 janv 2020;577(7790):426-31.
133. VanDemark AP, Blanksma M, Ferris E, Heroux A, Hill CP, Formosa T. The Structure of the  $\gamma$ FACT Pcb3-M Domain, Its Interaction with the DNA Replication Factor RPA, and a Potential Role in Nucleosome Deposition. *Molecular Cell*. mai 2006;22(3):363-74.
134. Kemble DJ, Whitby FG, Robinson H, McCullough LL, Formosa T, Hill CP. Structure of the Spt16 Middle Domain Reveals Functional Features of the Histone Chaperone FACT. *Journal of Biological Chemistry*. avr 2013;288(15):10188-94.
135. Yang J, Zhang X, Feng J, Leng H, Li S, Xiao J, et al. The Histone Chaperone FACT Contributes to DNA Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Cell Reports*. févr 2016;14(5):1128-41.
136. Shen Z, Formosa T, Tantin D. FACT Inhibition Blocks Induction But Not Maintenance of Pluripotency. *Stem Cells and Development*. 15 déc 2018;27(24):1693-701.
137. Dermawan JKT, Gurova K, Pink J, Dowlati A, De S, Narla G, et al. Quinacrine Overcomes Resistance to Erlotinib by Inhibiting FACT, NF- $\kappa$ B, and Cell-Cycle Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 sept 2014;13(9):2203-14.
138. Ding Q, He K, Luo T, Deng Y, Wang H, Liu H, et al. SSRP1 Contributes to the Malignancy of Hepatocellular Carcinoma and Is Negatively Regulated by miR-497. *Molecular Therapy*. mai 2016;24(5):903-14.
139. Liao J, Tao X, Ding Q, Liu J, Yang X, Yuan FE, et al. SSRP1 silencing inhibits the proliferation and malignancy of human glioma cells via the MAPK signaling pathway. *Oncology Reports*. nov 2017;38(5):2667-76.

140. Wu W, He K, Guo Q, Chen J, Zhang M, Huang K, et al. SSRP1 promotes colorectal cancer progression and is negatively regulated by miR-28-5p. *J Cell Mol Med.* mai 2019;23(5):3118-29.
141. Garcia H, Miecznikowski JC, Safina A, Commane M, Ruusulehto A, Kilpinen S, et al. Facilitates Chromatin Transcription Complex Is an “Accelerator” of Tumor Transformation and Potential Marker and Target of Aggressive Cancers. *Cell Reports.* juill 2013;4(1):159-73.
142. Formosa T. Changing the DNA Landscape: Putting a SPN on Chromatin. In: Workman JL, éditeur. *Protein Complexes that Modify Chromatin* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2003 [cité 22 mai 2023]. p. 171-201. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55747-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55747-7_7)
143. Stuwe T, Hothorn M, Lejeune E, Rybin V, Bortfeld M, Scheffzek K, et al. The FACT Spt16 “peptidase” domain is a histone H3–H4 binding module. *Proc Natl Acad Sci USA.* juill 2008;105(26):8884-9.
144. Hondele M, Stuwe T, Hassler M, Halbach F, Bowman A, Zhang ET, et al. Structural basis of histone H2A–H2B recognition by the essential chaperone FACT. *Nature.* juill 2013;499(7456):111-4.
145. Kemble DJ, McCullough LL, Whitby FG, Formosa T, Hill CP. FACT Disrupts Nucleosome Structure by Binding H2A-H2B with Conserved Peptide Motifs. *Molecular Cell.* oct 2015;60(2):294-306.
146. Valieva ME, Armeev GA, Kudryashova KS, Gerasimova NS, Shaytan AK, Kulaeva OI, et al. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2016;23(12):1111-6.
147. Zhang W, Zeng F, Liu Y, Shao C, Li S, Lv H, et al. Crystal Structure of Human SSRP1 Middle Domain Reveals a Role in DNA Binding. *Sci Rep.* 21 déc 2015;5(1):18688.
148. Malarkey CS, Churchill MEA. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell. *Trends in Biochemical Sciences.* déc 2012;37(12):553-62.
149. Safina A, Cheney P, Pal M, Brodsky L, Ivanov A, Kirsanov K, et al. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 12 janv 2017;gkw1366.
150. Heinrichs A. A passage through chromatin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* oct 2003;4(10):750-1.
151. Heo K, Kim H, Choi SH, Choi J, Kim K, Gu J, et al. FACT-Mediated Exchange of Histone Variant H2AX Regulated by Phosphorylation of H2AX and ADP-Ribosylation of Spt16. *Molecular Cell.* avr 2008;30(1):86-97.
152. Li Y, Keller DM, Scott JD, Lu H. CK2 Phosphorylates SSRP1 and Inhibits Its DNA-binding Activity. *Journal of Biological Chemistry.* mars 2005;280(12):11869-75.
153. Franchin C, Borgo C, Zaramella S, Cesaro L, Arrigoni G, Salvi M, et al. Exploring the CK2 Paradox: Restless, Dangerous, Dispensable. *Pharmaceuticals.* 20 janv 2017;10(4):11.
154. Tsunaka Y, Toga J, Yamaguchi H, Tate S ichi, Hirose S, Morikawa K. Phosphorylated Intrinsically Disordered Region of FACT Masks Its Nucleosomal DNA Binding Elements. *Journal of Biological Chemistry.* sept 2009;284(36):24610-21.

155. Krohn NM, Stemmer C, Fojan P, Grimm R, Grasser KD. Protein Kinase CK2 Phosphorylates the High Mobility Group Domain Protein SSRP1, Inducing the Recognition of UV-damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry*. avr 2003;278(15):12710-5.
156. Fleyshman D, Prendergast L, Safina A, Paszkiewicz G, Commane M, Morgan K, et al. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells. *Oncotarget*. 28 mars 2017;8(13):20525-42.
157. Malone EA. Mutations in SPT16/CDC68 Suppress cis- and trans-Acting Mutations That Affect Promoter Function. *MOL CELL BIOL*.
158. Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. FACT, a Factor that Facilitates Transcript Elongation through Nucleosomes. *Cell*. janv 1998;92(1):105-16.
159. Prendergast JA, Murray LE, Rowley A, Carruthers DR, Singer RA, Johnston GC. Size Selection Identifies New Genes That Regulate *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Proliferation. *Genetics*. janv 1990;124(1):81-90.
160. Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration. *Science*. 22 août 2003;301(5636):1090-3.
161. Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*. juill 1999;400(6741):284-8.
162. Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, et al. Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II. *Cell*. mai 2006;125(4):703-17.
163. True JD, Muldoon JJ, Carver MN, Poorey K, Shetty SJ, Bekiranov S, et al. The Modifier of Transcription 1 (Mot1) ATPase and Spt16 Histone Chaperone Co-regulate Transcription through Preinitiation Complex Assembly and Nucleosome Organization. *Journal of Biological Chemistry*. juill 2016;291(29):15307-19.
164. Saunders A, Werner J, Andrulis ED, Nakayama T, Hirose S, Reinberg D, et al. Tracking FACT and the RNA Polymerase II Elongation Complex Through Chromatin in Vivo. *Science*. 22 août 2003;301(5636):1094-6.
165. Mylonas C, Tessarz P. Transcriptional repression by FACT is linked to regulation of chromatin accessibility at the promoter of ES cells. *Life Sci Alliance*. juin 2018;1(3):e201800085.
166. Takahata S, Yu Y, Stillman DJ. The E2F functional analogue SBF recruits the Rpd3(L) HDAC, via Whi5 and Stb1, and the FACT chromatin reorganizer, to yeast G1 cyclin promoters. *EMBO J*. 4 nov 2009;28(21):3378-89.
167. Müller F, Tora L. Chromatin and DNA sequences in defining promoters for transcription initiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 1 mars 2014;1839(3):118-28.
168. Formosa T, Ruone S, Adams MD, Olsen AE, Eriksson P, Yu Y, et al. Defects in *SPT16* or *POB3* (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* Cause Dependence on the Hir/Hpc Pathway: Polymerase Passage May Degrade Chromatin Structure. *Genetics*. 1 déc 2002;162(4):1557-71.

169. Ransom M, Williams SK, Dechassa ML, Das C, Linger J, Adkins M, et al. FACT and the Proteasome Promote Promoter Chromatin Disassembly and Transcriptional Initiation. *Journal of Biological Chemistry*. août 2009;284(35):23461-71.
170. Mylonas C, Tessarz P. NET-prism enables RNA polymerase-dedicated transcriptional interrogation at nucleotide resolution. *RNA Biology*. 2 sept 2019;16(9):1156-65.
171. Birch JL, Tan BCM, Panov KI, Panova TB, Andersen JS, Owen-Hughes TA, et al. FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. *EMBO J*. 8 avr 2009;28(7):854-65.
172. Koltowska K, Aplitz H, Stamatakis D, Hirst EMA, Verkade H, Salecker I, et al. Ssrp1a controls organogenesis by promoting cell cycle progression and RNA synthesis. *Development*. 1 mai 2013;140(9):1912-8.
173. Sen R, Ferdoush J, Kaja A, Bhaumik SR. Fine-Tuning of FACT by the Ubiquitin Proteasome System in Regulation of Transcriptional Elongation. *Molecular and Cellular Biology*. 1 juin 2016;36(11):1691-703.
174. Biswas D, Dutta-Biswas R, Mitra D, Shibata Y, Strahl BD, Formosa T, et al. Opposing roles for Set2 and yFACT in regulating TBP binding at promoters. *EMBO J*. 4 oct 2006;25(19):4479-89.
175. Li Y, Zeng SX, Landais I, Lu H. Human SSRP1 Has Spt16-dependent and -independent Roles in Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. mars 2007;282(10):6936-45.
176. Duroux M, Houben A, Růžička K, Friml J, Grasser KD. The chromatin remodelling complex FACT associates with actively transcribed regions of the Arabidopsis genome: Arabidopsis FACT chromatin remodelling complex. *The Plant Journal*. 17 nov 2004;40(5):660-71.
177. Hsieh FK, Kulaeva OI, Patel SS, Dyer PN, Luger K, Reinberg D, et al. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7 mai 2013;110(19):7654-9.
178. Kulaeva OI, Hsieh FK, Chang HW, Luse DS, Studitsky VM. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. janv 2013;1829(1):76-83.
179. Tan BCM, Chien CT, Hirose S, Lee SC. Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication. *EMBO J*. 6 sept 2006;25(17):3975-85.
180. Wittmeyer J, Formosa T. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase  $\alpha$  Catalytic Subunit Interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a Protein Similar to an HMG1-Like Protein. *MOL CELL BIOL*. 1997;17.
181. Wittmeyer J, Joss L, Formosa T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* Form an Essential, Abundant Heterodimer That Is Nuclear, Chromatin-Associated, and Copurifies with DNA Polymerase  $\alpha$ . *Biochemistry*. 1 juill 1999;38(28):8961-71.
182. Haring SJ, Mason AC, Binz SK, Wold MS. Cellular Functions of Human RPA1. *J Biol Chem*. 4 juill 2008;283(27):19095-111.
183. Chang HW, Pandey M, Kulaeva OI, Patel SS, Studitsky VM. Overcoming a nucleosomal barrier to replication. *Sci Adv*. 4 nov 2016;2(11):e1601865.

184. Yeeles JTP, Janska A, Early A, Diffley JFX. How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Molecular Cell*. janv 2017;65(1):105-16.
185. Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, et al. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol*. 1 avr 2006;8(4):358-66.
186. Foltman M, Evrin C, De Piccoli G, Jones RC, Edmondson RD, Katou Y, et al. Eukaryotic Replisome Components Cooperate to Process Histones During Chromosome Replication. *Cell Reports*. mars 2013;3(3):892-904.
187. Huang H, Strømme CB, Saredi G, Hödl M, Strandsby A, González-Aguilera C, et al. A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3–H4 at replication forks. *Nat Struct Mol Biol*. août 2015;22(8):618-26.
188. Gao Y, Li C, Wei L, Teng Y, Nakajima S, Chen X, et al. SSRP1 Cooperates with PARP and XRCC1 to Facilitate Single-Strand DNA Break Repair by Chromatin Priming. *Cancer Research*. 15 mai 2017;77(10):2674-85.
189. Kari V, Shchebet A, Neumann H, Johnsen SA. The H2B ubiquitin ligase RNF40 cooperates with SUPT16H to induce dynamic changes in chromatin structure during DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*. 15 oct 2011;10(20):3495-504.
190. Dinant C, Ampatziadis-Michailidis G, Lans H, Tresini M, Lagarou A, Grosbart M, et al. Enhanced Chromatin Dynamics by FACT Promotes Transcriptional Restart after UV-Induced DNA Damage. *Molecular Cell*. août 2013;51(4):469-79.
191. Keller DM, Lu H. p53 Serine 392 Phosphorylation Increases after UV through Induction of the Assembly of the CK2-hSPT16-SSRP1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*. déc 2002;277(51):50206-13.
192. Dejmek J, Iglehart JD, Lazaro JB. DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-PK)–Dependent Cisplatin-Induced Loss of Nucleolar Facilitator of Chromatin Transcription (FACT) and Regulation of Cisplatin Sensitivity by DNA-PK and FACT. *Molecular Cancer Research*. 1 avr 2009;7(4):581-91.
193. Sand-Dejmek J, Adelmant G, Sobhian B, Calkins AS, Marto J, Iglehart DJ, et al. Concordant and opposite roles of DNA-PK and the « facilitator of chromatin transcription » (FACT) in DNA repair, apoptosis and necrosis after cisplatin. *Mol Cancer*. déc 2011;10(1):74.
194. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. mars 1998;273(10):5858-68.
195. Avvakumov N, Nourani A, Côté J. Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks. *Molecular Cell*. mars 2011;41(5):502-14.
196. Du YC, Gu S, Zhou J, Wang T, Cai H, MacInnes MA, et al. The Dynamic Alterations of H2AX Complex during DNA Repair Detected by a Proteomic Approach Reveal the Critical Roles of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin in the Ionizing Radiation-induced Cell Cycle Arrest. *Molecular & Cellular Proteomics*. juin 2006;5(6):1033-44.
197. Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current Opinion in Cell Biology*. juin 2008;20(3):294-302.



198. Chang HW, Valieva ME, Safina A, Chereji RV, Wang J, Kulaeva OI, et al. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins. *Sci Adv.* 2 nov 2018;4(11):eaav2131.
199. Gasparian AV, Burkhart CA, Purmal AA, Brodsky L, Pal M, Saranadasa M, et al. Curaxins: Anticancer Compounds That Simultaneously Suppress NF- $\kappa$ B and Activate p53 by Targeting FACT. *Sci Transl Med [Internet]*. 10 août 2011 [cité 6 avr 2023];3(95). Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3002530>
200. Nesher E, Safina A, Aljahdali I, Portwood S, Wang ES, Koman I, et al. Role of Chromatin Damage and Chromatin Trapping of FACT in Mediating the Anticancer Cytotoxicity of DNA-Binding Small-Molecule Drugs. *Cancer Research.* 15 mars 2018;78(6):1431-43.
201. Safina A, Garcia H, Commane M, Guryanova O, Degan S, Kolesnikova K, et al. Complex mutual regulation of facilitates chromatin transcription (FACT) subunits on both mRNA and protein levels in human cells. *Cell Cycle.* août 2013;12(15):2423-34.
202. Garcia H, Fleyshman D, Kolesnikova K, Safina A, Commane M, Paszkiewicz G, et al. Expression of FACT in mammalian tissues suggests its role in maintaining of undifferentiated state of cells. *Oncotarget.* 31 oct 2011;2(10):783-96.
203. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* déc 1953;84(3):570-3.
204. Hilleman MR, Werner JH. Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1 janv 1954;85(1):183-8.
205. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T, Hilleman MR, Huebner RJ, et al. « Adenoviruses »: Group Name Proposed for New Respiratory-Tract Viruses. *Science.* 20 juill 1956;124(3212):119-20.
206. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* août 1977;74(8):3171-5.
207. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.* 1 sept 1977;12(1):1-8.
208. Crenshaw BJ, Jones LB, Bell CR, Kumar S, Matthews QL. Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy. *Biomedicines.* 19 août 2019;7(3):61.
209. Lynch J, Kajon A. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 3 août 2016;37(04):586-602.
210. Berciaud S, Rayne F, Kassab S, Jubert C, Faure-Della Corte M, Salin F, et al. Adenovirus infections in Bordeaux University Hospital 2008–2010: Clinical and virological features. *Journal of Clinical Virology.* 1 août 2012;54(4):302-7.
211. Hang J, Kajon AE, Graf PCF, Berry IM, Yang Y, Sanborn MA, et al. Human Adenovirus Type 55 Distribution, Regional Persistence, and Genetic Variability. *Emerg Infect Dis.* juill 2020;26(7):1497-505.

212. Bair CR, Zhang W, Gonzalez G, Kamali A, Stylos D, Blanco JCG, et al. Human Adenovirus Type 4 Comprises Two Major Phylogroups with Distinct Replicative Fitness and Virulence Phenotypes. *Journal of Virology*. 2022;96(5).
213. Baker JM, Buchfellner M, Britt W, Sanchez V, Potter JL, Ingram LA, et al. Acute Hepatitis and Adenovirus Infection Among Children — Alabama, October 2021–February 2022. 2022;71(18).
214. Lenman A, Liaci AM, Liu Y, Årdahl C, Rajan A, Nilsson E, et al. Human Adenovirus 52 Uses Sialic Acid-containing Glycoproteins and the Coxsackie and Adenovirus Receptor for Binding to Target Cells. *PLoS Pathog*. 12 févr 2015;11(2):e1004657.
215. Radke JR, Cook JL. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Current Opinion in Infectious Diseases*. juin 2018;31(3):251-6.
216. Nunes-Silva C, Vilares AT, Schweitzer V, Castanhinha S, Martins A, Lopes MJ, et al. Non-COVID-19 respiratory viral infection. *Breathe*. mars 2022;18(1):210151.
217. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in Medical Virology*. 2003;13(3):155-71.
218. Bordigoni P, Carret AS, Venard V, Witz F, Le Faou A. Treatment of Adenovirus Infections in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 1 mai 2001;32(9):1290-7.
219. Venard V, Bordigoni P, Faou AL. Les infections à adénovirus en milieu hospitalier. *Virologie*. 14 sept 2001;5(4):245-53.
220. Top FH. Control of adenovirus acute respiratory disease in U.S. Army trainees. *Yale J Biol Med*. juill 1975;48(3):185-95.
221. McNeill KM, Hendrix RM, Lindner JL, Benton FR, Monteith SC, Tuchscherer MA, et al. Large, Persistent Epidemic of Adenovirus Type 4-Associated Acute Respiratory Disease in U.S. Army Trainees. *Emerg Infect Dis*. déc 1999;5(6):798-801.
222. Ganapathi L, Arnold A, Jones S, Patterson A, Graham D, Harper M, et al. Use of cidofovir in pediatric patients with adenovirus infection. *F1000Res*. 16 déc 2016;5:758.
223. Wilkens H, Sester M. Treatment of Cytomegalovirus Infection with Cidofovir and CMV Immune Globulin in a Lung Transplant Recipient. *Case Reports in Transplantation*. 2016;2016:1-4.
224. Momper JD, Zhao Y, Shapiro R, Schonder KS, Gao Y, Randhawa PS, et al. Pharmacokinetics of low-dose cidofovir in kidney transplant recipients with BK virus infection. *Transpl Infect Dis*. févr 2013;15(1):34-41.
225. Sudhindra P, Knoll B, Nog R, Singh N, Dhand A. Brincidofovir (CMX001) for the Treatment of Severe Adenoviral Pneumonia in Kidney Transplant Recipient. *Cureus*. 11(8):e5296.
226. Russell KL, Hawksworth AW, Ryan MAK, Strickler J, Irvine M, Hansen CJ, et al. Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999–2004☆. *Vaccine*. 5 avr 2006;24(15):2835-42.

227. Kajon AE, Hang J, Hawksworth A, Metzgar D, Hage E, Hansen CJ, et al. Molecular Epidemiology of Adenovirus Type 21 Respiratory Strains Isolated From US Military Trainees (1996–2014). *J Infect Dis.* 15 sept 2015;212(6):871-80.
228. Gray GC. Adenovirus 4 and 7 Vaccine: New Body Armor for U.S. Marine Corps Officer Trainees. *The Journal of Infectious Diseases.* 18 févr 2020;221(5):685-6.
229. Binn LN, Sanchez JL, Gaydos JC. Emergence of Adenovirus Type 14 in US Military Recruits—A New Challenge. *J INFECT DIS.* 15 nov 2007;196(10):1436-7.
230. Trei JS, Johns NM, Garner JL, Noel LB, Ortman BV, Ensz KL, et al. Spread of Adenovirus to Geographically Dispersed Military Installations, May–October 2007. *Emerg Infect Dis.* mai 2010;16(5):769-75.
231. Tritel M, Stoddard AM, Flynn BJ, Darrah PA, Wu C you, Wille U, et al. Prime-Boost Vaccination with HIV-1 Gag Protein and Cytosine Phosphate Guanosine Oligodeoxynucleotide, Followed by Adenovirus, Induces Sustained and Robust Humoral and Cellular Immune Responses. *The Journal of Immunology.* 1 sept 2003;171(5):2538-47.
232. Vujadinovic M, Vellinga J. Progress in Adenoviral Capsid-Display Vaccines. *Biomedicines.* 26 juill 2018;6(3):81.
233. Mendonça SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT. Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *npj Vaccines.* 5 août 2021;6(1):97.
234. Deng S, Liang H, Chen P, Li Y, Li Z, Fan S, et al. Viral Vector Vaccine Development and Application during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms.* 18 juill 2022;10(7):1450.
235. Ehrhardt A, Xu H, Kay MA. Episomal Persistence of Recombinant Adenoviral Vector Genomes during the Cell Cycle In Vivo. *J Virol.* juill 2003;77(13):7689-95.
236. Crystal RG. Adenovirus: The First Effective *In Vivo* Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy.* janv 2014;25(1):3-11.
237. Cooney A, McCray P, Sinn P. Cystic Fibrosis Gene Therapy: Looking Back, Looking Forward. *Genes.* 7 nov 2018;9(11):538.
238. Mantwill K, Klein FG, Wang D, Hindupur SV, Ehrenfeld M, Holm PS, et al. Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *IJMS.* 29 sept 2021;22(19):10522.
239. Garber K. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 1 mars 2006;98(5):298-300.
240. Lu W. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: A pilot phase II clinical trial. *WJG.* 2004;10(24):3634.
241. Oronsky B, Gastman B, Conley AP, Reid C, Caroen S, Reid T. Oncolytic Adenoviruses: The Cold War against Cancer Finally Turns Hot. *Cancers.* 27 sept 2022;14(19):4701.
242. Wang Y, Hallden G, Hill R, Anand A, Liu TC, Francis J, et al. E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models. *Nat Biotechnol.* nov 2003;21(11):1328-35.

243. PDB101: Molecule of the Month: Adenovirus [Internet]. RCSB: PDB-101. [cité 22 mai 2023]. Disponible sur: <http://pdb101.rcsb.org/motm/132>
244. Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. févr 2009;384(2):380-8.
245. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*. 1 janv 2009;90(1):1-20.
246. San Martín C, Glasgow JN, Borovjagin A, Beatty MS, Kashentseva EA, Curiel DT, et al. Localization of the N-Terminus of Minor Coat Protein IIIa in the Adenovirus Capsid. *Journal of Molecular Biology*. nov 2008;383(4):923-34.
247. Reddy VS, Nemerow GR. Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 août 2014;111(32):11715-20.
248. Cusack S. Adenovirus complex structures. *Current Opinion in Structural Biology*. 1 avr 2005;15(2):237-43.
249. Stewart PL, Burnett RM, Cyrklaff M, Fuller SD. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*. 4 oct 1991;67(1):145-54.
250. Reddy VS, Natchiar SK, Stewart PL, Nemerow GR. Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. *Science*. 27 août 2010;329(5995):1071-5.
251. Liu H, Jin L, Koh SBS, Atanasov I, Schein S, Wu L, et al. Atomic Structure of Human Adenovirus by Cryo-EM Reveals Interactions Among Protein Networks. *Science*. 27 août 2010;329(5995):1038-43.
252. San Martín C. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses*. 21 mai 2012;4(5):847-77.
253. Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, et al. The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*. oct 1998;72(10):7909-15.
254. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 23 avr 1993;73(2):309-19.
255. Furcinitti PS, van Oostrum J, Burnett RM. Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *The EMBO Journal*. déc 1989;8(12):3563-70.
256. Martinez R, Schellenberger P, Vasishtan D, Akin C, Austin S, Dacheux D, et al. The Amphipathic Helix of Adenovirus Capsid Protein VI Contributes to Penton Release and Postentry Sorting. *Imperiale MJ, éditeur. J Virol*. 15 févr 2015;89(4):2121-35.
257. Wodrich H, Henaff D, Jammart B, Segura-Morales C, Seelmeir S, Coux O, et al. A Capsid-Encoded PPxY-Motif Facilitates Adenovirus Entry. *Harty RN, éditeur. PLoS Pathog*. 19 mars 2010;6(3):e1000808.

258. Kulanayake S, Tikoo S. Adenovirus Core Proteins: Structure and Function. *Viruses*. 28 févr 2021;13(3):388.
259. Christensen JB, Byrd SA, Walker AK, Strahler JR, Andrews PC, Imperiale MJ. Presence of the Adenovirus IVa2 Protein at a Single Vertex of the Mature Virion. *J Virol*. 15 sept 2008;82(18):9086-93.
260. Ostapchuk P, Yang J, Auffarth E, Hearing P. Functional Interaction of the Adenovirus IVa2 Protein with Adenovirus Type 5 Packaging Sequences. *J Virol*. mars 2005;79(5):2831-8.
261. Zhang W, Arcos R. Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery. *Virology*. avr 2005;334(2):194-202.
262. Zhang W, Imperiale MJ. Requirement of the Adenovirus IVa2 Protein for Virus Assembly. *J Virol*. 15 mars 2003;77(6):3586-94.
263. Pérez-Berná AJ, Marabini R, Scheres SHW, Menéndez-Conejero R, Dmitriev IP, Curiel DT, et al. Structure and Uncoating of Immature Adenovirus. *Journal of Molecular Biology*. sept 2009;392(2):547-57.
264. Sharma G, Moria N, Williams M, Krishnarjuna B, Pouton CW. Purification and characterization of adenovirus core protein VII: a histone-like protein that is critical for adenovirus core formation. *Journal of General Virology*. 1 juill 2017;98(7):1785-94.
265. Ostapchuk P, Suomalainen M, Zheng Y, Boucke K, Greber UF, Hearing P. The adenovirus major core protein VII is dispensable for virion assembly but is essential for lytic infection. Imperiale MJ, éditeur. *PLoS Pathog*. 19 juin 2017;13(6):e1006455.
266. Avgousti DC, Herrmann C, Kulej K, Pancholi NJ, Sekulic N, Petrescu J, et al. A core viral protein binds host nucleosomes to sequester immune danger signals. *Nature*. 7 juill 2016;535(7610):173-7.
267. Johnson JS, Osheim YN, Xue Y, Emanuel MR, Lewis PW, Bankovich A, et al. Adenovirus Protein VII Condenses DNA, Represses Transcription, and Associates with Transcriptional Activator E1A. *J Virol*. 15 juin 2004;78(12):6459-68.
268. Vayda ME, Rogers AE, Flint SJ. The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions. *Nucleic Acids Res*. 25 janv 1983;11(2):441-60.
269. Burg JL, Schweitzer J, Daniell E. Introduction of superhelical turns into DNA by adenoviral core proteins and chromatin assembly factors. *J Virol*. juin 1983;46(3):749-55.
270. Mirza MA, Weber J. Structure of adenovirus chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 26 janv 1982;696(1):76-86.
271. Lischwe MA, Sung MT. A histone-like protein from adenovirus chromatin. *Nature*. 9 juin 1977;267(5611):552-4.
272. Sung MT, Cao TM, Coleman RT, Budelier KA. Gene and protein sequences of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. mai 1983;80(10):2902-6.

273. Imperiale MJ, Akusjnärvi G, Leppard KN. Post-transcriptional Control of Adenovirus Gene Expression. In: Doerfler W, Böhm P, éditeurs. *The Molecular Repertoire of Adenoviruses II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1995 [cité 22 mai 2023]. p. 139-71. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 199/2). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-79499-5\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-79499-5_6)
274. Haruki H, Gyurcsik B, Okuwaki M, Nagata K. Ternary complex formation between DNA-adenovirus core protein VII and TAF-I $\beta$ /SET, an acidic molecular chaperone. *FEBS Letters*. 18 déc 2003;555(3):521-7.
275. Chen J, Morral N, Engel DA. Transcription releases protein VII from adenovirus chromatin. *Virology*. déc 2007;369(2):411-22.
276. Wodrich H, Cassany A, D'Angelo MA, Guan T, Nemerow G, Gerace L. Adenovirus Core Protein pVII Is Translocated into the Nucleus by Multiple Import Receptor Pathways. *J Virol*. oct 2006;80(19):9608-18.
277. de Jong RN, van der Vliet PC, Brenkman AB. Adenovirus DNA Replication: Protein Priming, Jumping Back and the Role of the DNA Binding Protein DBP. In: Doerfler W, Böhm P, éditeurs. *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003 [cité 6 avr 2023]. p. 187-211. (Compans RW, Cooper MD, Ito Y, Koprowski H, Melchers F, Oldstone MBA, et al. Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 272). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-05597-7\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-05597-7_7)
278. Charman M, Herrmann C, Weitzman MD. Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication. *FEBS Lett*. déc 2019;593(24):3531-50.
279. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*. juin 2017;4(2):43-63.
280. Principles of Virology, Multi-Volume, 5th Edition | Wiley [Internet]. Wiley.com. [cité 22 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.wiley.com/en-us/Principles+of+Virology%2C+Multi+Volume%2C+5th+Edition-p-9781683673583>
281. Harrach B. Adenoviruses: General Features. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, éditeurs. *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2008 [cité 22 mai 2023]. p. 1-9. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744104006804>
282. Puntener D, Engelke MF, Ruzsics Z, Strunze S, Wilhelm C, Greber UF. Stepwise Loss of Fluorescent Core Protein V from Human Adenovirus during Entry into Cells. *J Virol*. janv 2011;85(1):481-96.
283. Radke JR, Grigera F, Ucker DS, Cook JL. Adenovirus E1B 19-Kilodalton Protein Modulates Innate Immunity through Apoptotic Mimicry. Imperiale MJ, éditeur. *J Virol*. mars 2014;88(5):2658-69.
284. Saha B, Parks RJ. Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells. Nevels M, éditeur. *PLoS ONE*. 10 juill 2017;12(7):e0181012.



285. Windheim M, Hilgendorf A, Burgert HG. Immune Evasion by Adenovirus E3 Proteins: Exploitation of Intracellular Trafficking Pathways. In: Doerfler W, Böhm P, éditeurs. *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions: Immune System, Oncogenesis, Gene Therapy* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004 [cité 22 mai 2023]. p. 29-85. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-05599-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-05599-1_2)
286. Weitzman MD. Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front Biosci.* 1 mai 2005;10:1106-17.
287. Ma Y, Mathews MB. Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *J Virol.* août 1996;70(8):5083-99.
288. Zhao H, Chen M, Pettersson U. Identification of adenovirus-encoded small RNAs by deep RNA sequencing. *Virology.* août 2013;442(2):148-55.
289. Molinier-Frenkel V, Boulanger P. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. *Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. Virologie.* 1 juill 2003;7(4):267-79.
290. Georgi F, Greber UF. The Adenovirus Death Protein – a small membrane protein controls cell lysis and disease. *FEBS Lett.* juin 2020;594(12):1861-78.
291. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science.* 28 févr 1997;275(5304):1320-3.
292. Cupelli K, Stehle T. Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Current Opinion in Virology.* 1 août 2011;1(2):84-91.
293. Reeh M, Bockhorn M, Görgens D, Vieth M, Hoffmann T, Simon R, et al. Presence of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) in human neoplasms: a multitumour array analysis. *Br J Cancer.* oct 2013;109(7):1848-58.
294. Lonberg-Holm K, Crowell RL, Philipson L. Unrelated animal viruses share receptors. *Nature.* févr 1976;259(5545):679-81.
295. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: A virus receptor within the tight junction. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 25 avr 2005;57(6):869-82.
296. Excoffon KJDA. The coxsackievirus and adenovirus receptor: virological and biological beauty. *FEBS Lett.* juin 2020;594(12):1828-37.
297. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus Fiber Disrupts CAR-Mediated Intercellular Adhesion Allowing Virus Escape. *Cell.* sept 2002;110(6):789-99.
298. Stewart PL, Nemerow GR. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends in Microbiology.* 1 nov 2007;15(11):500-7.
299. Lindert S, Silvestry M, Mullen TM, Nemerow GR, Stewart PL. Cryo-Electron Microscopy Structure of an Adenovirus-Integrin Complex Indicates Conformational Changes in both Penton Base and Integrin. *J Virol.* 15 nov 2009;83(22):11491-501.

300. Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF. The First Step of Adenovirus Type 2 Disassembly Occurs at the Cell Surface, Independently of Endocytosis and Escape to the Cytosol. *J Virol.* août 2000;74(15):7085-95.
301. Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR. Adenovirus Endocytosis Requires Actin Cytoskeleton Reorganization Mediated by Rho Family GTPases. *J Virol.* 1 nov 1998;72(11):8806-12.
302. Chardonnet Y, Dales S. Early events in the interaction of adenoviruses with Hela cells: I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology.* 1 mars 1970;40(3):462-77.
303. Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G. Adenovirus Internalization and Infection Require Dynamin. *J Virol.* avr 1998;72(4):3455-8.
304. Montespan C, Marvin SA, Austin S, Burrage AM, Roger B, Rayne F, et al. Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *Hearing P, éditeur. PLoS Pathog.* 13 févr 2017;13(2):e1006217.
305. Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J Virol.* 15 févr 2005;79(4):1992-2000.
306. Maier O, Galan DL, Wodrich H, Wiethoff CM. An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature. *Virology.* juin 2010;402(1):11-9.
307. Scherer J, Yi J, Vallee RB. Role of cytoplasmic dynein and kinesins in adenovirus transport. *FEBS Lett.* juin 2020;594(12):1838-47.
308. Roberts AJ, Goodman BS, Reck-Peterson SL. Reconstitution of dynein transport to the microtubule plus end by kinesin. *eLife.* 10 juin 2014;3:e02641.
309. Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF. Microtubule-dependent Plus- and Minus End-directed Motilities Are Competing Processes for Nuclear Targeting of Adenovirus. *Journal of Cell Biology.* 22 févr 1999;144(4):657-72.
310. Bremner KH, Scherer J, Yi J, Vershinin M, Gross SP, Vallee RB. Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit. *Cell Host & Microbe.* déc 2009;6(6):523-35.
311. Smith JG, Cassany A, Gerace L, Ralston R, Nemerow GR. Neutralizing Antibody Blocks Adenovirus Infection by Arresting Microtubule-Dependent Cytoplasmic Transport. *J Virol.* juill 2008;82(13):6492-500.
312. Zhou J, Scherer J, Yi J, Vallee RB. Role of kinesins in directed adenovirus transport and cytoplasmic exploration. *Münger K, éditeur. PLoS Pathog.* 21 mai 2018;14(5):e1007055.
313. Strunze S, Engelke MF, Wang IH, Puntener D, Boucke K, Schleich S, et al. Kinesin-1-Mediated Capsid Disassembly and Disruption of the Nuclear Pore Complex Promote Virus Infection. *Cell Host & Microbe.* sept 2011;10(3):210-23.
314. Strunze S, Trotman LC, Boucke K, Greber UF. Nuclear Targeting of Adenovirus Type 2 Requires CRM1-mediated Nuclear Export. *Molecular Biology of the Cell.* 2005;16.

315. Lagadec F, Carlon-Andres I, Ragues J, Port S, Wodrich H, Kehlenbach RH. CRM1 Promotes Capsid Disassembly and Nuclear Envelope Translocation of Adenovirus Independently of Its Export Function. Banks L, éditeur. *J Virol.* 9 févr 2022;96(3):e01273-21.
316. Zila V, Margiotta E, Turoňová B, Müller TG, Zimmerli CE, Mattei S, et al. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell.* févr 2021;184(4):1032-1046.e18.
317. Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, Stidwill RP, Greber UF. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol.* déc 2001;3(12):1092-100.
318. Cassany A, Ragues J, Guan T, Bégu D, Wodrich H, Kann M, et al. Nuclear Import of Adenovirus DNA Involves Direct Interaction of Hexon with an N-Terminal Domain of the Nucleoporin Nup214. Imperiale MJ, éditeur. *J Virol.* févr 2015;89(3):1719-30.
319. Carlon-Andres I, Lagadec F, Pied N, Rayne F, Lafon ME, Kehlenbach RH, et al. Nup358 and Transportin 1 Cooperate in Adenoviral Genome Import. Banks L, éditeur. *J Virol.* 4 mai 2020;94(10):e00164-20.
320. Hindley CE, Lawrence FJ, Matthews DA. A Role for Transportin in the Nuclear Import of Adenovirus Core Proteins and DNA. *Traffic.* oct 2007;8(10):1313-22.
321. Crisostomo L, Soriano AM, Mendez M, Graves D, Pelka P. Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells. Nevels M, éditeur. *PLoS ONE.* 24 janv 2019;14(1):e0211192.
322. Akusjarvi G. Temporal regulation of adenovirus major late alternative RNA splicing. *Front Biosci.* 1 mai 2008;13:5006-15.
323. Shaw AR, Ziff EB. Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families. *Cell.* 1 déc 1980;22(3):905-16.
324. Alemán MV, Bertzbach LD, Speiseder T, Ip WH, González RA, Dobner T. Global Transcriptome Analyses of Cellular and Viral mRNAs during HAdV-C5 Infection Highlight New Aspects of Viral mRNA Biogenesis and Cytoplasmic Viral mRNA Accumulations. *Viruses.* 1 nov 2022;14(11):2428.
325. Ali H, LeRoy G, Bridge G, Flint SJ. The Adenovirus L4 33-Kilodalton Protein Binds to Intragenic Sequences of the Major Late Promoter Required for Late Phase-Specific Stimulation of Transcription. *J Virol.* févr 2007;81(3):1327-38.
326. Komatsu T, Quentin-Froignant C, Carlon-Andres I, Lagadec F, Rayne F, Ragues J, et al. *In Vivo* Labelling of Adenovirus DNA Identifies Chromatin Anchoring and Biphasic Genome Replication. Banks L, éditeur. *J Virol.* 15 sept 2018;92(18):e00795-18.
327. Glenn GM, Ricciardi RP. Detailed kinetics of adenovirus type-5 steady-state transcripts during early infection. *Virus Research.* 1 janv 1988;9(1):73-91.
328. Binger MH, Flint SJ. Accumulation of early and intermediate mRNA species during subgroup C adenovirus productive infections. *Virology.* 30 juill 1984;136(2):387-403.
329. Söderlund H, Pettersson U, Vennström B, Philipson L, Mathews MB. A new species of virus-coded low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus type 2. *Cell.* 1 avr 1976;7(4):585-93.

330. Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1 mars 2013;5(3):a013003-a013003.
331. Challberg MD, Kelly TJ. Processing of the adenovirus terminal protein. *J Virol*. avr 1981;38(1):272-7.
332. Weber JM, Déry CV, Mirza MA, Horvath J. Adenovirus DNA synthesis is coupled to virus assembly. *Virology*. 30 janv 1985;140(2):351-9.
333. Condezo GN, San Martín C. Localization of adenovirus morphogenesis players, together with visualization of assembly intermediates and failed products, favor a model where assembly and packaging occur concurrently at the periphery of the replication center. *Kalejta RF, éditeur. PLoS Pathog*. 27 avr 2017;13(4):e1006320.
334. Hammarskjöld ML, Winberg G. Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. *Cell*. 1 juill 1980;20(3):787-95.
335. Crosby CM, Barry MA. Illa deleted adenovirus as a single-cycle genome replicating vector. *Virology*. août 2014;462-463:158-65.
336. Ostapchuk P, Almond M, Hearing P. Characterization of Empty Adenovirus Particles Assembled in the Absence of a Functional Adenovirus IVa2 Protein. *J Virol*. juin 2011;85(11):5524-31.
337. Wu K, Orozco D, Hearing P. The Adenovirus L4-22K Protein Is Multifunctional and Is an Integral Component of Crucial Aspects of Infection. *J Virol*. oct 2012;86(19):10474-83.
338. Gustin KE, Imperiale MJ. Encapsidation of Viral DNA Requires the Adenovirus L1 52/55-Kilodalton Protein. *J Virol*. oct 1998;72(10):7860-70.
339. Wu K, Guimet D, Hearing P. The Adenovirus L4-33K Protein Regulates both Late Gene Expression Patterns and Viral DNA Packaging. *J Virol*. 15 juin 2013;87(12):6739-47.
340. Chatterjee PK, Vayda ME, Flint SJ. Adenoviral protein VII packages intracellular viral DNA throughout the early phase of infection. *The EMBO Journal*. juill 1986;5(7):1633-44.
341. Matthews DA. Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm. *J Virol*. 15 janv 2001;75(2):1031-8.
342. Hong SS, Szolajská E, Schoehn G, Franqueville L, Myhre S, Lindholm L, et al. The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *J Mol Biol*. 9 sept 2005;352(1):125-38.
343. Wodrich H. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *The EMBO Journal*. 1 déc 2003;22(23):6245-55.
344. Weber J. Genetic Analysis of Adenovirus Type 2. 1976;17.
345. Anderson CW, Young ME, Flint SJ. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, Mu. *Virology*. 1 oct 1989;172(2):506-12.

346. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol.* avr 1996;70(4):2296-306.
347. Jiang H, White EJ, Ríos-Vicil CI, Xu J, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Human Adenovirus Type 5 Induces Cell Lysis through Autophagy and Autophagy-Triggered Caspase Activity. *J Virol.* 15 mai 2011;85(10):4720-9.
348. Schwartz U, Komatsu T, Huber C, Lagadec F, Silberhorn E, Bertrand E, et al. A pVII positioning code determines the dynamics of Adenoviral nucleoprotein structure and primes it for early gene activation [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cité 22 mai 2023]. p. 2020.07.07.190926. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.07.190926v1>
349. Sergeant A, Tigges MA, Raskas HJ. Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA. *J Virol.* mars 1979;29(3):888-98.
350. Keller M, Tagawa T, Preuss M, Miller AD. Biophysical Characterization of the DNA Binding and Condensing Properties of Adenoviral Core Peptide  $\mu$  ( $\mu$ ). *Biochemistry.* 1 janv 2002;41(2):652-9.
351. Xue Y, Johnson JS, Ornelles DA, Lieberman J, Engel DA. Adenovirus Protein VII Functions throughout Early Phase and Interacts with Cellular Proteins SET and pp32. *J Virol.* 15 févr 2005;79(4):2474-83.
352. Komatsu T, Dacheux D, Kreppel F, Nagata K, Wodrich H. A Method for Visualization of Incoming Adenovirus Chromatin Complexes in Fixed and Living Cells. Masucci MG, éditeur. *PLoS ONE.* 2 sept 2015;10(9):e0137102.
353. Giberson AN, Saha B, Campbell K, Christou C, Poulin KL, Parks RJ. Human adenoviral DNA association with nucleosomes containing histone variant H3.3 during the early phase of infection is not dependent on viral transcription or replication. *Biochem Cell Biol.* déc 2018;96(6):797-807.
354. Matsumoto K, Nagata K, Miyaji-Yamaguchi M, Kikuchi A, Tsujimoto M. Sperm Chromatin Decondensation by Template Activating Factor I through Direct Interaction with Basic Proteins. *Molecular and Cellular Biology.* 1 oct 1999;19(10):6940-52.
355. Gyurcsik B, Haruki H, Takahashi T, Mihara H, Nagata K. Binding Modes of the Precursor of Adenovirus Major Core Protein VII to DNA and Template Activating Factor I: Implication for the Mechanism of Remodeling of the Adenovirus Chromatin. *Biochemistry.* 1 janv 2006;45(1):303-13.
356. Haruki H, Okuwaki M, Miyagishi M, Taira K, Nagata K. Involvement of Template-Activating Factor I/SET in Transcription of Adenovirus Early Genes as a Positive-Acting Factor. *J Virol.* 15 janv 2006;80(2):794-801.
357. Komatsu T, Nagata K. Replication-Uncoupled Histone Deposition during Adenovirus DNA Replication. *J Virol.* 15 juin 2012;86(12):6701-11.
358. Schreiner S, Wimmer P, Sirma H, Everett RD, Blanchette P, Groitl P, et al. Proteasome-Dependent Degradation of Daxx by the Viral E1B-55K Protein in Human Adenovirus-Infected Cells. *J Virol.* 15 juill 2010;84(14):7029-38.

359. Ross PJ, Kennedy MA, Christou C, Risco Quiroz M, Poulin KL, Parks RJ. Assembly of Helper-Dependent Adenovirus DNA into Chromatin Promotes Efficient Gene Expression. *J Virol.* 15 avr 2011;85(8):3950-8.
360. Samad MA, Komatsu T, Okuwaki M, Nagata K. B23/nucleophosmin is involved in regulation of adenovirus chromatin structure at late infection stages, but not in virus replication and transcription. *Journal of General Virology.* 1 juin 2012;93(6):1328-38.
361. Sekiya T, Hu Y, Kato K, Okuwaki M, Kawaguchi A, Nagata K. Assembly and remodeling of viral DNA and RNA replicons regulated by cellular molecular chaperones. *Biophys Rev.* avr 2018;10(2):445-52.
362. Jennings MR, Parks RJ. Human Adenovirus Gene Expression and Replication Is Regulated through Dynamic Changes in Nucleoprotein Structure throughout Infection. *Viruses.* 5 janv 2023;15(1):161.
363. Genoveso MJ, Hisaoka M, Komatsu T, Wodrich H, Nagata K, Okuwaki M. Formation of adenovirus DNA replication compartments and viral DNA accumulation sites by host chromatin regulatory proteins including NPM1. *FEBS J.* janv 2020;287(1):205-17.
364. Ugai H, Dobbins GC, Wang M, Le LP, Matthews DA, Curiel DT. Adenoviral protein V promotes a process of viral assembly through nucleophosmin 1. *Virology.* oct 2012;432(2):283-95.
365. Meyers ML, Keating KM, Roberts WJ, Williams KR, Chase JW, Horwitz MS. Purification and functional characterization of adenovirus ts111A DNA-binding protein. Fluorescence studies of protein-nucleic acid binding. *Journal of Biological Chemistry.* avr 1990;265(10):5875-82.
366. Tsuji M, van der Vliet PC, Kitchingman GR. Temperature-sensitive mutants of adenovirus single-stranded DNA-binding protein. Inability to support DNA replication is associated with an altered DNA-binding activity of the protein. *Journal of Biological Chemistry.* août 1991;266(24):16178-87.
367. Mul YM, Verrijzer CP, van der Vliet PC. Transcription factors NFI and NFIII/oct-1 function independently, employing different mechanisms to enhance adenovirus DNA replication. *J Virol.* nov 1990;64(11):5510-8.
368. Mul YM, Van der Vliet PC. Nuclear factor I enhances adenovirus DNA replication by increasing the stability of a preinitiation complex. *The EMBO Journal.* févr 1992;11(2):751-60.
369. Coenjaerts FE, van Oosterhout JA, van der Vliet PC. The Oct-1 POU domain stimulates adenovirus DNA replication by a direct interaction between the viral precursor terminal protein-DNA polymerase complex and the POU homeodomain. *The EMBO Journal.* nov 1994;13(22):5401-9.
370. Vliet PC, Keegstra W, Jansz HS. Complex Formation between the Adenovirus Type 5 DNA-Binding Protein and Single-Stranded DNA. *Eur J Biochem.* mai 1978;86(2):389-98.
371. Van Amerongen H, Van Grondelle R, Van der Vliet PC. Interaction between adenovirus DNA-binding protein and single-stranded polynucleotides studied by circular dichroism and ultraviolet absorption. *Biochemistry.* 28 juill 1987;26(15):4646-52.



372. Fowlkes DM, Lord ST, Linné T, Pettersson U, Philipson L. Interaction between the adenovirus DNA-binding protein and double-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology*. 5 août 1979;132(2):163-80.
373. Cleghon VG, Klessig DF. Association of the adenovirus DNA-binding protein with RNA both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. déc 1986;83(23):8947-51.
374. Adam SA, Dreyfuss G. Adenovirus proteins associated with mRNA and hnRNA in infected HeLa cells. *J Virol*. oct 1987;61(10):3276-83.
375. Tucker PA, Tsernoglou D, Tucker AD, Coenjaerts FE, Leenders H, van der Vliet PC. Crystal structure of the adenovirus DNA binding protein reveals a hook-on model for cooperative DNA binding. *The EMBO Journal*. juill 1994;13(13):2994-3002.
376. Kanellopoulos PN, van der Zandt H, Tsernoglou D, van der Vliet PC, Tucker PA. Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Studies on the Adenovirus ssDNA Binding Protein in Complex with ssDNA. *Journal of Structural Biology*. 1 juill 1995;115(1):113-6.
377. van Breukelen B, Brenkman AB, Holthuisen PE, van der Vliet PC. Adenovirus Type 5 DNA Binding Protein Stimulates Binding of DNA Polymerase to the Replication Origin. *J Virol*. 15 janv 2003;77(2):915-22.
378. Mul YM, van der Vliet PC. The adenovirus DNA binding protein effects the kinetics of DNA replication by a mechanism distinct from NFI or Oct-1. *Nucl Acids Res*. 1993;21(3):641-7.
379. Zijderveld DC, van der Vliet PC. Helix-destabilizing properties of the adenovirus DNA-binding protein. *J Virol*. févr 1994;68(2):1158-64.
380. Chang LS, Shenk T. The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J Virol*. mai 1990;64(5):2103-9.
381. Babich A, Nevins JR. The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 kd DNA-binding protein. *Cell*. 1 nov 1981;26(3):371-9.
382. Nicolas JC, Sarnow P, Girard M, Levine AJ. Host range temperature-conditional mutants in the adenovirus DNA binding protein are defective in the assembly of infectious virus. *Virology*. 15 avr 1983;126(1):228-39.
383. Méndez J, Blanco L, Salas M. Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *The EMBO Journal*. 1 mai 1997;16(9):2519-27.
384. Dufour E, Méndez J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M. An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein1 1Edited by A Fersht. *Journal of Molecular Biology*. 1 déc 2000;304(3):289-300.
385. Steitz TA. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. juin 1999;274(25):17395-8.
386. Webster A, Leith IR, Nicholson J, Hounsell J, Hay RT. Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *J Virol*. sept 1997;71(9):6381-9.

387. van Leeuwen HC, Rensen M, van der Vliet PC. The Oct-1 POU Homeodomain Stabilizes the Adenovirus Preinitiation Complex via a Direct Interaction with the Priming Protein and Is Displaced when the Replication Fork Passes. *Journal of Biological Chemistry*. févr 1997;272(6):3398-404.
388. Komatsu T, Robinson DR, Hisaoka M, Ueshima S, Okuwaki M, Nagata K, et al. Tracking adenovirus genomes identifies morphologically distinct late DNA replication compartments. *Traffic*. nov 2016;17(11):1168-80.
389. Hidalgo P, Anzures L, Hernández-Mendoza A, Guerrero A, Wood CD, Valdés M, et al. Morphological, Biochemical, and Functional Study of Viral Replication Compartments Isolated from Adenovirus-Infected Cells. Sandri-Goldin RM, éditeur. *J Virol*. avr 2016;90(7):3411-27.
390. Hidalgo P, Gonzalez RA. Formation of adenovirus DNA replication compartments. *FEBS Lett*. déc 2019;593(24):3518-30.
391. Murti KG, Davis DS, Kitchingman GR. Localization of Adenovirus-encoded DNA Replication Proteins in the Nucleus by Immunogold Electron Microscopy. *Journal of General Virology*. 1 déc 1990;71(12):2847-57.
392. Pombo A, Ferreira J, Bridge E, Carmo-Fonseca M. Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. *The EMBO Journal*. nov 1994;13(21):5075-85.
393. Bojagora A, Saridakis V. USP7 manipulation by viral proteins. *Virus Research*. 1 sept 2020;286:198076.
394. Randall SK, Kelly TJ. The fate of parental nucleosomes during SV40 DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*. juill 1992;267(20):14259-65.
395. Kumar MA, Kasti K, Balakrishnan L, Milavetz B. Directed Nucleosome Sliding in SV40 Minichromosomes During the Formation of the Virus Particle Exposes DNA Sequences Required for Early Transcription [Internet]. *Molecular Biology*; 2018 sept [cité 6 avr 2023]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/426452>
396. Favre M, Breitburd F, Croissant O, Orth G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol*. mars 1977;21(3):1205-9.
397. Burley M, Roberts S, Parish JL. Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle. *Semin Immunopathol*. avr 2020;42(2):159-71.
398. Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, et al. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 déc 2009;106(51):21848-53.
399. Erives AJ. Phylogenetic analysis of the core histone doublet and DNA topo II genes of Marseilleviridae: evidence of proto-eukaryotic provenance. *Epigenetics & Chromatin*. déc 2017;10(1):55.
400. Bryson TD, De Ioannes P, Valencia-Sánchez MI, Henikoff JG, Talbert PB, Lee R, et al. A giant virus genome is densely packaged by stable nucleosomes within virions. *Molecular Cell*. déc 2022;82(23):4458-4470.e5.

401. Zhu FX, Chong JM, Wu L, Yuan Y. Virion Proteins of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol.* 15 janv 2005;79(2):800-11.
402. Bechtel JT, Winant RC, Ganem D. Host and Viral Proteins in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol.* 15 avr 2005;79(8):4952-64.
403. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weickel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 16 nov 2004;101(46):16286-91.
404. Maxwell KL, Frappier L. Viral Proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2007;71(2):398-411.
405. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol.* oct 2004;78(20):10960-6.
406. Cliffe AR, Knipe DM. Herpes Simplex Virus ICP0 Promotes both Histone Removal and Acetylation on Viral DNA during Lytic Infection. *J Virol.* 15 déc 2008;82(24):12030-8.
407. Locatelli M, Quivy JP, Chapus F, Michelet M, Fresquet J, Maadadi S, et al. HIRA Supports Hepatitis B Virus Minichromosome Establishment and Transcriptional Activity in Infected Hepatocytes. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2022;14(3):527-51.
408. Albright ER, Kalejta RF. Canonical and Variant Forms of Histone H3 Are Deposited onto the Human Cytomegalovirus Genome during Lytic and Latent Infections. Frueh K, éditeur. *J Virol.* 15 nov 2016;90(22):10309-20.
409. Cohen C, Corpet A, Roubille S, Maroui MA, Poccardi N, Rousseau A, et al. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. Kalejta RF, éditeur. *PLoS Pathog.* 20 sept 2018;14(9):e1007313.
410. Placek BJ, Huang J, Kent JR, Dorsey J, Rice L, Fraser NW, et al. The Histone Variant H3.3 Regulates Gene Expression during Lytic Infection with Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol.* févr 2009;83(3):1416-21.
411. Rai TS, Glass M, Cole JJ, Rather MI, Marsden M, Neilson M, et al. Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Research.* 16 nov 2017;45(20):11673-83.
412. Garcia-Ramirez M, Rocchini C, Ausio J. Modulation of Chromatin Folding by Histone Acetylation. *Journal of Biological Chemistry.* juill 1995;270(30):17923-8.
413. Chandy M, Gutiérrez JL, Prochasson P, Workman JL. SWI/SNF Displaces SAGA-Acetylated Nucleosomes. *Eukaryot Cell.* oct 2006;5(10):1738-47.
414. Ito T, Ikehara T, Nakagawa T, Kraus WL, Muramatsu M. p300-Mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A–H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev.* 1 août 2000;14(15):1899-907.
415. Chatel-Chaix L, Bartenschlager R. Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside—Caught in the Web. Tsai B, éditeur. *J Virol.* juin 2014;88(11):5907-11.

416. Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. Complex Dynamic Development of Poliovirus Membranous Replication Complexes. *J Virol.* janv 2012;86(1):302-12.
417. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports.* févr 2017;18(9):2113-23.
418. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, et al. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe.* 9 déc 2020;28(6):853-866.e5.
419. Jin X, Cao X, Wang X, Jiang J, Wan J, Laliberté JF, et al. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Plant Virus Replication. *Front Plant Sci.* 30 janv 2018;9:57.
420. Zhang Z, He G, Filipowicz NA, Randall G, Belov GA, Kopek BG, et al. Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Front Microbiol.* 26 févr 2019;10:286.
421. Reid C, Airo A, Hobman T. The Virus-Host Interplay: Biogenesis of +RNA Replication Complexes. *Viruses.* 6 août 2015;7(8):4385-413.
422. Ci Y, Shi L. Compartmentalized replication organelle of flavivirus at the ER and the factors involved. *Cell Mol Life Sci.* juin 2021;78(11):4939-54.
423. Martín-Acebes MA, Merino-Ramos T, Blázquez AB, Casas J, Escribano-Romero E, Sobrino F, et al. The Composition of West Nile Virus Lipid Envelope Unveils a Role of Sphingolipid Metabolism in Flavivirus Biogenesis. *Dermody TS, éditeur. J Virol.* 15 oct 2014;88(20):12041-54.
424. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun.* 18 nov 2020;11(1):5885.
425. Jobe F, Simpson J, Hawes P, Guzman E, Bailey D. Respiratory Syncytial Virus Sequesters NF- $\kappa$ B Subunit p65 to Cytoplasmic Inclusion Bodies To Inhibit Innate Immune Signaling. López S, éditeur. *J Virol.* 27 oct 2020;94(22):e01380-20.
426. Galloux M, Risso-Ballester J, Richard CA, Fix J, Rameix-Welti MA, Eléouët JF. Minimal Elements Required for the Formation of Respiratory Syncytial Virus Cytoplasmic Inclusion Bodies *In Vivo* and *In Vitro*. *Moscona A, éditeur. mBio.* 27 oct 2020;11(5):e01202-20.
427. Nikolic J, Le Bars R, Lama Z, Scrima N, Lagaudrière-Gesbert C, Gaudin Y, et al. Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat Commun.* 5 juill 2017;8(1):58.
428. Zhou Y, Su JM, Samuel CE, Ma D. Measles Virus Forms Inclusion Bodies with Properties of Liquid Organelles. *Dutch RE, éditeur. J Virol.* nov 2019;93(21):e00948-19.
429. Guseva S, Milles S, Jensen MR, Salvi N, Kleman JP, Maurin D, et al. Measles virus nucleo- and phosphoproteins form liquid-like phase-separated compartments that promote nucleocapsid assembly. *Sci Adv.* 3 avr 2020;6(14):eaaz7095.
430. Hoenen T, Shabman RS, Groseth A, Herwig A, Weber M, Schudt G, et al. Inclusion Bodies Are a Site of Ebolavirus Replication. *J Virol.* nov 2012;86(21):11779-88.

431. Ringel M, Heiner A, Behner L, Halwe S, Sauerhering L, Becker N, et al. Nipah virus induces two inclusion body populations: Identification of novel inclusions at the plasma membrane. Dutch RE, éditeur. *PLoS Pathog.* 29 avr 2019;15(4):e1007733.
432. Chang L, Godinez WJ, Kim IH, Tektonidis M, de Lanerolle P, Eils R, et al. Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of viral late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 24 mai 2011 [cité 6 avr 2023];108(21). Disponible sur: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1103411108>
433. Darwish AS, Grady LM, Bai P, Weller SK. ICP8 Filament Formation Is Essential for Replication Compartment Formation during Herpes Simplex Virus Infection. Sandri-Goldin RM, éditeur. *J Virol.* mars 2016;90(5):2561-70.
434. Maroui MA, Callé A, Cohen C, Streichenberger N, Texier P, Takissian J, et al. Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment. *PLoS Pathog.* sept 2016;12(9):e1005834.
435. Peng Q, Wang L, Qin Z, Wang J, Zheng X, Wei L, et al. Phase Separation of Epstein-Barr Virus EBNA2 and Its Coactivator EBNA1 Controls Gene Expression. Jung JU, éditeur. *J Virol.* 17 mars 2020;94(7):e01771-19.
436. Yang Y, Ye X, Dai R, Li Z, Zhang Y, Xue W, et al. Phase separation of Epstein-Barr virus EBNA2 protein reorganizes chromatin topology for epigenetic regulation. *Commun Biol.* 16 août 2021;4(1):967.
437. Caragliano E, Brune W, Bosse JB. Herpesvirus Replication Compartments: Dynamic Biomolecular Condensates? *Viruses.* 4 mai 2022;14(5):960.
438. Cziepluch C, Lampel S, Grewenig A, Grund C, Lichter P, Rommelaere J. H-1 Parvovirus-Associated Replication Bodies: a Distinct Virus-Induced Nuclear Structure. *J Virol.* 15 mai 2000;74(10):4807-15.
439. Young PJ, Newman A, Jensen KT, Burger LR, Pintel DJ, Lorson CL. Minute virus of mice small non-structural protein NS2 localizes within, but is not required for the formation of, Smn-associated autonomous parvovirus-associated replication bodies. *Journal of General Virology.* 1 avr 2005;86(4):1009-14.
440. Ihalainen TO, Niskanen EA, Jylhävä J, Turpeinen T, Rinne J, Timonen J, et al. Dynamics and interactions of parvoviral NS1 protein in the nucleus. *Cell Microbiol.* août 2007;9(8):1946-59.
441. Ihalainen TO, Niskanen EA, Jylhävä J, Paloheimo O, Dross N, Smolander H, et al. Parvovirus Induced Alterations in Nuclear Architecture and Dynamics. Bridger JM, éditeur. *PLoS ONE.* 17 juin 2009;4(6):e5948.
442. Scoca V, Di Nunzio F. Membraneless organelles restructured and built by pandemic viruses: HIV-1 and SARS-CoV-2. Yao X, éditeur. *Journal of Molecular Cell Biology.* 4 août 2021;13(4):259-68.
443. Rensen E, Mueller F, Scoca V, Parmar JJ, Souque P, Zimmer C, et al. Clustering and reverse transcription of HIV-1 genomes in nuclear niches of macrophages. *EMBO J* [Internet]. 4 janv 2021 [cité 6 avr 2023];40(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2020105247>

444. Hyman AA, Weber CA, Jülicher F. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11 oct 2014;30(1):39-58.
445. Gao Z, Zhang W, Chang R, Zhang S, Yang G, Zhao G. Liquid-Liquid Phase Separation: Unraveling the Enigma of Biomolecular Condensates in Microbial Cells. *Front Microbiol.* 25 oct 2021;12:751880.
446. Nandana V, Schrader JM. Roles of liquid–liquid phase separation in bacterial RNA metabolism. *Current Opinion in Microbiology.* juin 2021;61:91-8.
447. Wang B, Zhang L, Dai T, Qin Z, Lu H, Zhang L, et al. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases. *Sig Transduct Target Ther.* 2 août 2021;6(1):290.
448. Van Lindt J, Bratek-Skicki A, Nguyen PN, Pakravan D, Durán-Armenta LF, Tantos A, et al. A generic approach to study the kinetics of liquid–liquid phase separation under near-native conditions. *Commun Biol.* 19 janv 2021;4(1):77.
449. Sabari BR, Dall’Agnese A, Young RA. Biomolecular Condensates in the Nucleus. *Trends in Biochemical Sciences.* nov 2020;45(11):961-77.
450. Ng WS, Sielaff H, Zhao ZW. Phase Separation-Mediated Chromatin Organization and Dynamics: From Imaging-Based Quantitative Characterizations to Functional Implications. *IJMS.* 21 juill 2022;23(14):8039.
451. Gibson BA, Doolittle LK, Schneider MWG, Jensen LE, Gamarra N, Henry L, et al. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell.* oct 2019;179(2):470-484.e21.
452. Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, Mittag T, Polymenidou M, Rousseau F, et al. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends in Cell Biology.* juin 2018;28(6):420-35.
453. Söding J, Zwicker D, Sohrabi-Jahromi S, Boehning M, Kirschbaum J. Mechanisms for Active Regulation of Biomolecular Condensates. *Trends in Cell Biology.* janv 2020;30(1):4-14.
454. Brocca S, Grandori R, Longhi S, Uversky V. Liquid–Liquid Phase Separation by Intrinsically Disordered Protein Regions of Viruses: Roles in Viral Life Cycle and Control of Virus–Host Interactions. *IJMS.* 28 nov 2020;21(23):9045.
455. Lyon AS, Peeples WB, Rosen MK. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2021;22(3):215-35.
456. White MR, Mitrea DM, Zhang P, Stanley CB, Cassidy DE, Nourse A, et al. C9orf72 Poly(PR) Dipeptide Repeats Disturb Biomolecular Phase Separation and Disrupt Nucleolar Function. *Molecular Cell.* mai 2019;74(4):713-728.e6.
457. Patel A, Malinowska L, Saha S, Wang J, Alberti S, Krishnan Y, et al. ATP as a biological hydrotrope. *Science.* 19 mai 2017;356(6339):753-6.
458. Kroschwald S, Maharana S, Simon A. Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters [Internet].* 22 mai 2017 [cité 6 avr 2023]; Disponible sur: <https://sciencematters.io/articles/10.19185/matters.201702000010>
459. Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell.* janv 2019;176(3):419-34.

460. Wang Z, Zhang G, Zhang H. Protocol for analyzing protein liquid–liquid phase separation. *Biophys Rep.* févr 2019;5(1):1-9.
461. Mitrea DM, Chandra B, Ferrolino MC, Gibbs EB, Tolbert M, White MR, et al. Methods for Physical Characterization of Phase-Separated Bodies and Membrane-less Organelles. *Journal of Molecular Biology.* nov 2018;430(23):4773-805.
462. Tonnemacher S, Eltsov M, Jakob B. Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) Analysis of Nuclear Reorganization Induced by Clustered DNA Damage Upon Charged Particle Irradiation. *IJMS.* 11 mars 2020;21(6):1911.
463. Jain S, Wheeler JR, Walters RW, Agrawal A, Barsic A, Parker R. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell.* janv 2016;164(3):487-98.
464. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation. 2010;
465. Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends in Immunology.* sept 2014;35(9):420-8.
466. McCormick C, Khapersky DA. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nat Rev Immunol.* oct 2017;17(10):647-60.
467. Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mai 2019;11(5):a032813.
468. Panas MD, Ivanov P, Anderson P. Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *Journal of Cell Biology.* 7 nov 2016;215(3):313-23.
469. Khong A, Matheny T, Jain S, Mitchell SF, Wheeler JR, Parker R. The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Molecular Cell.* nov 2017;68(4):808-820.e5.
470. Markmiller S, Soltanieh S, Server KL, Mak R, Jin W, Fang MY, et al. Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell.* janv 2018;172(3):590-604.e13.
471. Youn JY, Dunham WH, Hong SJ, Knight JDR, Bashkurov M, Chen GI, et al. High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Molecular Cell.* févr 2018;69(3):517-532.e11.
472. Van Treeck B, Protter DSW, Matheny T, Khong A, Link CD, Parker R. RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 mars 2018;115(11):2734-9.
473. Zhao M, Xia T, Xing J, Yin L, Li X, Pan J, et al. The stress granule protein G3BP1 promotes pre-condensation of cGAS to allow rapid responses to DNA. *EMBO Reports [Internet].* 5 janv 2022 [cité 6 avr 2023];23(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.202153166>
474. Yang P, Mathieu C, Kolaitis RM, Zhang P, Messing J, Yurtsever U, et al. G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules. *Cell.* avr 2020;181(2):325-345.e28.



475. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*. 15 févr 2013;339(6121):786-91.
476. Gao P, Ascano M, Zillinger T, Wang W, Dai P, Serganov AA, et al. Structure-Function Analysis of STING Activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and Targeting by Antiviral DMXAA. *Cell*. août 2013;154(4):748-62.
477. Du M, Chen ZJ. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science*. 17 août 2018;361(6403):704-9.
478. Xu G, Liu C, Zhou S, Li Q, Feng Y, Sun P, et al. Viral tegument proteins restrict cGAS-DNA phase separation to mediate immune evasion. *Molecular Cell*. juill 2021;81(13):2823-2837.e9.
479. Wu J jun, Li W, Shao Y, Avey D, Fu B, Gillen J, et al. Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host & Microbe*. sept 2015;18(3):333-44.
480. Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2021;22(3):165-82.
481. Neugebauer KM. Special focus on the Cajal Body. *RNA Biology*. 3 juin 2017;14(6):669-70.
482. Sleeman JE, Trinkle-Mulcahy L, Prescott AR, Ogg SC, Lamond AI. Cajal body proteins SMN and Coilin show differential dynamic behaviour in vivo. *Journal of Cell Science*. 15 mai 2003;116(10):2039-50.
483. Corpet A, Kleijwegt C, Roubille S, Juillard F, Jacquet K, Texier P, et al. PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can! *Nucleic Acids Research*. 2 déc 2020;48(21):11890-912.
484. Van Damme E, Laukens K, Dang TH, Van Ostade X. A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci*. 2010;51-67.
485. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP. The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation. *Molecular Cell*. nov 2006;24(3):331-9.
486. Prasanth KV, Sacco-Bubulya PA, Prasanth SG, Spector DL. Sequential Entry of Components of Gene Expression Machinery into Daughter Nuclei. *Molecular Biology of the Cell*. 2003;14.
487. Galganski L, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Research*. 13 oct 2017;45(18):10350-68.
488. Ilik İA, Aktaş T. Nuclear speckles: dynamic hubs of gene expression regulation. *The FEBS Journal*. nov 2022;289(22):7234-45.
489. Brown JM, Green J, das Neves RP, Wallace HAC, Smith AJH, Hughes J, et al. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *Journal of Cell Biology*. 22 sept 2008;182(6):1083-97.
490. Chen Y, Zhang Y, Wang Y, Zhang L, Brinkman EK, Adam SA, et al. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *Journal of Cell Biology*. 5 nov 2018;217(11):4025-48.

491. Ilik ĀA, Malszycki M, Lübke AK, Schade C, Meierhofer D, Aktaş T. SON and SRRM2 are essential for nuclear speckle formation. *eLife*. 23 oct 2020;9:e60579.
492. Pisani G, Baron B. Nuclear paraspeckles function in mediating gene regulatory and apoptotic pathways. *Non-coding RNA Research*. déc 2019;4(4):128-34.
493. Hirose T, Nakagawa S. Paraspeckles: possible nuclear hubs by the RNA for the RNA. *BioMolecular Concepts*. 1 oct 2012;3(5):415-28.
494. Li H, Ernst C, Kolonko-Adamska M, Greb-Markiewicz B, Man J, Parissi V, et al. Phase separation in viral infections. *Trends Microbiol*. déc 2022;30(12):1217-31.
495. Hidalgo P, Pimentel A, Mojica-Santamaría D, von Stromberg K, Hofmann-Sieber H, Lona-Arrona C, et al. Evidence That the Adenovirus Single-Stranded DNA Binding Protein Mediates the Assembly of Biomolecular Condensates to Form Viral Replication Compartments. *Viruses*. 6 sept 2021;13(9):1778.
496. Seyffert M, Georgi F, Tobler K, Bourqui L, Anfossi M, Michaelsen K, et al. The HSV-1 Transcription Factor ICP4 Confers Liquid-Like Properties to Viral Replication Compartments. *IJMS*. 24 avr 2021;22(9):4447.
497. Caragliano E, Bonazza S, Frascaroli G, Tang J, Soh TK, Grünewald K, et al. Human cytomegalovirus forms phase-separated compartments at viral genomes to facilitate viral replication. *Cell Reports*. mars 2022;38(10):110469.
498. Francis AC, Marin M, Singh PK, Achuthan V, Prellberg MJ, Palermino-Rowland K, et al. HIV-1 replication complexes accumulate in nuclear speckles and integrate into speckle-associated genomic domains. *Nat Commun*. 14 juill 2020;11(1):3505.
499. Scoca V, Louveaux M, Morin R, Ershov D, Tinevez JY, Nunzio FD. Direct tracking of single proviruses reveals HIV-1/LEDGF complexes excluded from virus-induced membraneless organelles [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cité 22 mai 2023]. p. 2020.11.17.385567. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.17.385567v1>
500. Viner RM, Mytton OT, Bonell C, Melendez-Torres GJ, Ward J, Hudson L, et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr*. 1 févr 2021;175(2):143.
501. Trian T, Allard B, Dupin I, Carvalho G, Ousova O, Maurat E, et al. House Dust Mites Induce Proliferation of Severe Asthmatic Smooth Muscle Cells via an Epithelium-Dependent Pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mars 2015;191(5):538-46.
502. Matysiak J, Lesbats P, Mauro E, Lapaillerie D, Dupuy JW, Lopez AP, et al. Modulation of chromatin structure by the FACT histone chaperone complex regulates HIV-1 integration. *Retrovirology*. déc 2017;14(1):39.
503. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. mai 2022;20(5):270-84.
504. Park M, Thwaites RS, Openshaw PJM. COVID-19: Lessons from SARS and MERS. *Eur J Immunol*. mars 2020;50(3):308-11.

505. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 12 mars 2020;579(7798):270-3.
506. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. févr 2020;395(10224):565-74.
507. Kung S, Doppen M, Black M, Braithwaite I, Kearns C, Weatherall M, et al. Underestimation of COVID-19 mortality during the pandemic. *ERJ Open Res*. janv 2021;7(1):00766-2020.
508. Port JR, Yinda CK, Avanzato VA, Schulz JE, Holbrook MG, van Doremalen N, et al. Increased small particle aerosol transmission of B.1.1.7 compared with SARS-CoV-2 lineage A in vivo. *Nat Microbiol*. 11 janv 2022;7(2):213-23.
509. Robinot R, Hubert M, de Melo GD, Lazarini F, Bruel T, Smith N, et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun*. 16 juill 2021;12(1):4354.
510. Beucher G, Blondot ML, Celle A, Pied N, Recordon-Pinson P, Esteves P, et al. Bronchial epithelia from adults and children: SARS-CoV-2 spread via syncytia formation and type III interferon infectivity restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 juill 2022;119(28):e2202370119.
511. Yin W, Cao W, Zhou G, Wang L, Sun J, Zhu A, et al. Analysis of pathological changes in the epithelium in COVID-19 patient airways. *ERJ Open Res*. avr 2021;7(2):00690-2020.
512. Karagiannidis C, Mostert C, Hentschker C, Voshaar T, Malzahn J, Schillinger G, et al. Case characteristics, resource use, and outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*. sept 2020;8(9):853-62.
513. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*. 28 avr 2020;323(16):1574.
514. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*. 20 août 2020;584(7821):430-6.
515. O'Driscoll M, Ribeiro Dos Santos G, Wang L, Cummings DAT, Azman AS, Paireau J, et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature*. 4 févr 2021;590(7844):140-5.
516. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med*. 23 avr 2020;382(17):1663-5.
517. Vasichkina E, Alekseeva D, Kudryavtsev I, Glushkova A, Starshinova AY, Malkova A, et al. COVID-19 Heart Lesions in Children: Clinical, Diagnostic and Immunological Changes. *IJMS*. 6 janv 2023;24(2):1147.
518. Graff K, Smith C, Silveira L, Jung S, Curran-Hays S, Jarjour J, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. avr 2021;40(4):e137-45.
519. Yoshida M, Worlock KB, Huang N, Lindeboom RGH, Butler CR, Kumasaka N, et al. Local and systemic responses to SARS-CoV-2 infection in children and adults. *Nature*. 10 févr 2022;602(7896):321-7.

520. Pierangeli A, Gentile M, Oliveto G, Frasca F, Sorrentino L, Matera L, et al. Comparison by Age of the Local Interferon Response to SARS-CoV-2 Suggests a Role for IFN- $\epsilon$  and - $\omega$ . *Front Immunol*. 12 juill 2022;13:873232.
521. Loske J, Röhmel J, Lukassen S, Stricker S, Magalhães VG, Liebig J, et al. Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. *Nat Biotechnol*. mars 2022;40(3):319-24.
522. Steinman JB, Lum FM, Ho PPK, Kaminski N, Steinman L. Reduced development of COVID-19 in children reveals molecular checkpoints gating pathogenesis illuminating potential therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6 oct 2020;117(40):24620-6.
523. Decker ML, Grobusch MP, Ritz N. Influence of Age and Other Factors on Cytokine Expression Profiles in Healthy Children—A Systematic Review. *Front Pediatr*. 14 déc 2017;5:255.
524. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 20 févr 2020;382(8):727-33.
525. Tran BM, Deliyannis G, Hachani A, Earnest L, Torresi J, Vincan E. Organoid Models of SARS-CoV-2 Infection: What Have We Learned about COVID-19? *Organoids*. 2 mars 2022;1(1):2-27.
526. Yao H, Song Y, Chen Y, Wu N, Xu J, Sun C, et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*. oct 2020;183(3):730-738.e13.
527. Kung YA, Lee KM, Chiang HJ, Huang SY, Wu CJ, Shih SR. Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. *Microbiol Mol Biol Rev*. 15 juin 2022;86(2):e00026-21.
528. Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, et al. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. Baric RS, éditeur. *PLoS Pathog*. 10 juill 2009;5(7):e1000511.
529. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*. avr 2011;174(1):11-22.
530. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun*. 5 août 2022;13(1):4399.
531. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 14 mai 2020;581(7807):221-4.
532. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*. 2 avr 2020;9:e57309.
533. Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol*. oct 2020;27(10):959-66.
534. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. 2020;

535. Yuan S, Peng L, Park JJ, Hu Y, Devarkar SC, Dong MB, et al. Nonstructural Protein 1 of SARS-CoV-2 Is a Potent Pathogenicity Factor Redirecting Host Protein Synthesis Machinery toward Viral RNA. *Molecular Cell*. déc 2020;80(6):1055-1066.e6.
536. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*. déc 2021;11(1):136.
537. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol*. janv 2022;23(1):21-39.
538. Merigo F, Lotti V, Bernardi P, Conti A, Clemente AD, Ligozzi M, et al. Ultrastructural Characterization of Human Bronchial Epithelial Cells during SARS-CoV-2 Infection: Morphological Comparison of Wild-Type and CFTR-Modified Cells. *IJMS*. 27 août 2022;23(17):9724.
539. Roingeard P, Eymieux S, Burlaud-Gaillard J, Hourieux C, Patient R, Blanchard E. The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. *Cell Mol Life Sci*. août 2022;79(8):425.
540. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol*. 7 juill 2021;12:708264.
541. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 12 mars 2020;579(7798):265-9.
542. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, COVID-19 Genomics UK Consortium, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 18 janv 2023 [cité 6 avr 2023]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00841-7>
543. Wu H, Xing N, Meng K, Fu B, Xue W, Dong P, et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe*. déc 2021;29(12):1788-1801.e6.
544. Johnson BA, Zhou Y, Lokugamage KG, Vu MN, Bopp N, Crocquet-Valdes PA, et al. Nucleocapsid mutations in SARS-CoV-2 augment replication and pathogenesis. *Shih SR, éditeur. PLoS Pathog*. 21 juin 2022;18(6):e1010627.
545. Ricciardi S, Guarino AM, Giaquinto L, Polishchuk EV, Santoro M, Di Tullio G, et al. The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle. *Nature*. 23 juin 2022;606(7915):761-8.
546. Ou J, Zhou Z, Dai R, Zhang J, Zhao S, Wu X, et al. V367F Mutation in SARS-CoV-2 Spike RBD Emerging during the Early Transmission Phase Enhances Viral Infectivity through Increased Human ACE2 Receptor Binding Affinity. *Journal of Virology*. 2021;95(16).
547. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. août 2020;182(4):812-827.e19.
548. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*. 28 oct 2020;9:e61312.

549. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 9 avr 2021;372(6538):eabg3055.
550. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. 15 avr 2021;592(7854):438-43.
551. Edara VV, Pinsky BA, Suthar MS, Lai L, Davis-Gardner ME, Floyd K, et al. Infection and Vaccine-Induced Neutralizing-Antibody Responses to the SARS-CoV-2 B.1.617 Variants. *New England Journal of Medicine*. 12 août 2021;385(7):664-6.
552. McCallum M, Bassi J, De Marco A, Chen A, Walls AC, Di Iulio J, et al. SARS-CoV-2 immune evasion by the B.1.427/B.1.429 variant of concern. *Science*. 6 août 2021;373(6555):648-54.
553. Viana R, Moyo S, Amoako DG, Tegally H, Scheepers C, Althaus CL, et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*. 24 mars 2022;603(7902):679-86.
554. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rickeard T, Gallagher E, et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. *N Engl J Med*. 21 avr 2022;386(16):1532-46.
555. Doria-Rose NA, Shen X, Schmidt SD, O'Dell S, McDanal C, Feng W, et al. Booster of mRNA-1273 Strengthens SARS-CoV-2 Omicron Neutralization. *medRxiv*. 20 déc 2021;2021.12.15.21267805.
556. Ferguson N. Report 49: Growth and immune escape of the Omicron SARS-CoV-2 variant of concern in England [Internet]. Imperial College London; 2021 déc [cité 6 avr 2023]. Disponible sur: <http://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/93038>
557. Velavan TP, Ntoumi F, Kremsner PG, Lee SS, Meyer CG. Emergence and geographic dominance of Omicron subvariants XBB/XBB.1.5 and BF.7 – the public health challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. mars 2023;128:307-9.
558. Vogel L. What to know about Omicron XBB.1.5. *CMAJ*. 23 janv 2023;195(3):E127-8.
559. Rajah MM, Bernier A, Buchrieser J, Schwartz O. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. *Journal of Molecular Biology*. mars 2022;434(6):167280.
560. Hindi SM, Tajrishi MM, Kumar A. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Sci Signal* [Internet]. 23 avr 2013 [cité 6 avr 2023];6(272). Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2003832>
561. Nakashima A, Shima T, Aoki A, Kawaguchi M, Yasuda I, Tsuda S, et al. Molecular and immunological developments in placentas. *Human Immunology*. mai 2021;82(5):317-24.
562. Huerta L, López-Balderas N, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Gómez-Icazbalceta G, Villarreal C, et al. HIV-Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies. *The Scientific World JOURNAL*. 2009;9:746-63.
563. Compton AA, Schwartz O. They Might Be Giants: Does Syncytium Formation Sink or Spread HIV Infection? Dutch RE, éditeur. *PLoS Pathog*. 2 févr 2017;13(2):e1006099.

564. Guo-Parke H, Canning P, Douglas I, Villenave R, Heaney LG, Coyle PV, et al. Relative Respiratory Syncytial Virus Cytopathogenesis in Upper and Lower Respiratory Tract Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 oct 2013;188(7):842-51.
565. Neilson KA, Yunis EJ. Demonstration of Respiratory Syncytial Virus in an Autopsy Series. *Pediatric Pathology.* janv 1990;10(4):491-502.
566. Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of Additional Acylation Site(s) of Influenza B Virus Hemagglutinin on Syncytium Formation. *Microbiology and Immunology.* avr 2005;49(4):355-9.
567. Sun X, Belser JA, Pappas C, Pulit-Penalzo JA, Brock N, Zeng H, et al. Risk Assessment of Fifth-Wave H7N9 Influenza A Viruses in Mammalian Models. Schultz-Cherry S, éditeur. *J Virol.* janv 2019;93(1):e01740-18.
568. Sinzger C, Bissinger AL, Viebahn R, Oettle H, Radke C, Schmidt CA, et al. Hepatocytes are Permissive for Human Cytomegalovirus Infection in Human Liver Cell Culture and In Vivo. *J INFECT DIS.* oct 1999;180(4):976-86.
569. Booth JC, Beesley JE, Stern H. Syncytium formation caused by human cytomegalovirus in human embryonic lung fibroblasts. *Archives of Virology.* juin 1978;57(2):143-52.
570. Bayliss GJ, Wolf H. An Epstein--Barr virus early protein induces cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* nov 1981;78(11):7162-5.
571. Nicholls JM, Poon LL, Lee KC, Ng WF, Lai ST, Leung CY, et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *The Lancet.* mai 2003;361(9371):1773-8.
572. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med.* 15 mai 2003;348(20):1953-66.
573. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine.* avr 2020;8(4):420-2.
574. Rockx B, Kuiken T, Herfst S, Bestebroer T, Lamers MM, Oude Munnink BB, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 29 mai 2020;368(6494):1012-5.
575. Santana MF, Pinto RA de A, Marcon BH, Medeiros LCAS de, Morais TB do N de, Dias LC, et al. Pathological findings and morphologic correlation of the lungs of autopsied patients with SARS-CoV-2 infection in the Brazilian Amazon using transmission electron microscopy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021;54:e0850-2020.
576. Bussani R, Schneider E, Zentilin L, Collesi C, Ali H, Braga L, et al. Persistence of viral RNA, pneumocyte syncytia and thrombosis are hallmarks of advanced COVID-19 pathology. *EBioMedicine.* nov 2020;61:103104.
577. Ekanger CT, Zhou F, Bohan D, Lotsberg ML, Ramnefjell M, Hoareau L, et al. Human Organotypic Airway and Lung Organoid Cells of Bronchiolar and Alveolar Differentiation Are Permissive to Infection by Influenza and SARS-CoV-2 Respiratory Virus. *Front Cell Infect Microbiol.* 14 mars 2022;12:841447.



578. Buchrieser J, Dufloo J, Hubert M, Monel B, Planas D, Rajah MM, et al. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *The EMBO Journal* [Internet]. déc 2020 [cité 6 avr 2023];39(23). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2020106267>
579. Miorin L, Mire CE, Ranjbar S, Hume AJ, Huang J, Crossland NA, et al. The oral drug nitazoxanide restricts SARS-CoV-2 infection and attenuates disease pathogenesis in Syrian hamsters. *bioRxiv*. 9 févr 2022;2022.02.08.479634.
580. Zhang Z, Zheng Y, Niu Z, Zhang B, Wang C, Yao X, et al. SARS-CoV-2 spike protein dictates syncytium-mediated lymphocyte elimination. *Cell Death Differ*. sept 2021;28(9):2765-77.
581. Lin L, Li Q, Wang Y, Shi Y. Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: a disastrous unity to eliminate lymphocytes. *Cell Death Differ*. juin 2021;28(6):2019-21.
582. Rubio-Casillas A, Redwan EM, Uversky VN. SARS-CoV-2: A Master of Immune Evasion. *Biomedicines*. 7 juin 2022;10(6):1339.
583. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 12 sept 1957;147(927):258-67.
584. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet*. févr 2013;45(2):164-71.
585. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. avr 2019;50(4):907-23.
586. Wack A, Terczyńska-Dyla E, Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat Immunol*. août 2015;16(8):802-9.
587. Kotenko SV, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *Journal of Biological Chemistry*. mars 2017;292(18):7295-303.
588. Shaw AE, Hughes J, Gu Q, Behdenna A, Singer JB, Dennis T, et al. Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by multispecies comparison of type I interferon responses. Malik H, éditeur. *PLoS Biol*. 18 déc 2017;15(12):e2004086.
589. Schoggins JW. Recent advances in antiviral interferon-stimulated gene biology. *F1000Res*. 12 mars 2018;7:309.
590. Danziger O, Patel RS, DeGrace EJ, Rosen MR, Rosenberg BR. Inducible CRISPR activation screen for interferon-stimulated genes identifies OAS1 as a SARS-CoV-2 restriction factor. Boon AC, éditeur. *PLoS Pathog*. 14 avr 2022;18(4):e1010464.
591. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol*. 21 mars 2014;32(1):513-45.
592. Mao S, Ren J, Xu Y, Lin J, Pan C, Meng Y, et al. Studies in the antiviral molecular mechanisms of 25-hydroxycholesterol: Disturbing cholesterol homeostasis and post-translational modification of proteins. *European Journal of Pharmacology*. juill 2022;926:175033.

593. Odendall C, Voak AA, Kagan JC. Type III IFNs Are Commonly Induced by Bacteria-Sensing TLRs and Reinforce Epithelial Barriers during Infection. *The Journal of Immunology*. 1 nov 2017;199(9):3270-9.
594. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nat Immunol*. avr 2008;9(4):361-8.
595. Chiale C, Greene TT, Zuniga EI. Interferon induction, evasion, and paradoxical roles during SARS-CoV-2 infection\*. *Immunological Reviews*. août 2022;309(1):12-24.
596. Kim YM, Shin EC. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med*. mai 2021;53(5):750-60.
597. Boechat JL, Chora I, Morais A, Delgado L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. *Pulmonology*. sept 2021;27(5):423-37.
598. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *IJMS*. 2 févr 2022;23(3):1716.
599. van der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, van den Heuvel G, Mantere T, Kersten S, et al. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*. 18 août 2020;324(7):663.
600. Fallerini C, Daga S, Mantovani S, Benetti E, Picchiotti N, Francisci D, et al. Association of Toll-like receptor 7 variants with life-threatening COVID-19 disease in males: findings from a nested case-control study. *eLife*. 2 mars 2021;10:e67569.
601. Asano T, Boisson B, Onodi F, Matuozzo D, Moncada-Velez M, Maglorius Renkilaraj MRL, et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol*. 10 août 2021;6(62):eabl4348.
602. Soveg FW, Schwerk J, Gokhale NS, Cerosaletti K, Smith JR, Pairo-Castineira E, et al. Endomembrane targeting of human OAS1 p46 augments antiviral activity. *eLife*. 3 août 2021;10:e71047.
603. Znaidia M, Demeret C, van der Werf S, Komarova AV. Characterization of SARS-CoV-2 Evasion: Interferon Pathway and Therapeutic Options. *Viruses*. 8 juin 2022;14(6):1247.
604. Freitas RS, Crum TF, Parvatiyar K. SARS-CoV-2 Spike Antagonizes Innate Antiviral Immunity by Targeting Interferon Regulatory Factor 3. *Front Cell Infect Microbiol*. 10 janv 2022;11:789462.
605. Beyer DK, Forero A. Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Biology*. mars 2022;434(6):167265.
606. Jhuti D, Rawat A, Guo CM, Wilson LA, Mills EJ, Forrest JI. Interferon Treatments for SARS-CoV-2: Challenges and Opportunities. *Infect Dis Ther*. juin 2022;11(3):953-72.
607. Hsia CCW, Hyde DM, Weibel ER. Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange. In: Terjung R, éditeur. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1<sup>re</sup> éd. Wiley; 2016 [cité 6 avr 2023]. p. 827-95. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c150028>
608. Weibel ER. Lung morphometry: the link between structure and function. *Cell Tissue Res*. mars 2017;367(3):413-26.

609. Bukowy-Bieryłło Z. Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we? *Cell Commun Signal*. déc 2021;19(1):63.
610. Davis JD, Wypych TP. Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal Immunology*. sept 2021;14(5):978-90.
611. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *Journal of Cell Science*. 1 sept 1990;97(1):39-50.
612. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*. 2001;27(5):401-15.
613. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 1 nov 2006;3(8):726-33.
614. Tata PR, Mou H, Pardo-Saganta A, Zhao R, Prabhu M, Law BM, et al. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 14 nov 2013;503(7475):218-23.
615. Sims AC, Burkett SE, Yount B, Pickles RJ. SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. *Virus Research*. avr 2008;133(1):33-44.
616. Broadbent L, Manzoor S, Zarccone MC, Barabas J, Shields MD, Saglani S, et al. Comparative primary paediatric nasal epithelial cell culture differentiation and RSV-induced cytopathogenesis following culture in two commercial media. Tripp RA, éditeur. *PLoS ONE*. 26 mars 2020;15(3):e0228229.
617. Hao S, Ning K, Kuz CA, Vorhies K, Yan Z, Qiu J. Long-Term Modeling of SARS-CoV-2 Infection of *In Vitro* Cultured Polarized Human Airway Epithelium. Meng XJ, éditeur. *mBio*. 22 déc 2020;11(6):e02852-20.
618. Stölting H, Baillon L, Frise R, Bonner K, Hewitt RJ, Molyneaux PL, et al. Distinct airway epithelial immune responses after infection with SARS-CoV-2 compared to H1N1. *Mucosal Immunology*. août 2022;15(5):952-63.
619. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*. juill 2020;182(2):429-446.e14.
620. Rajan A, Weaver AM, Aloisio GM, Jelinski J, Johnson HL, Venable SF, et al. The Human Nose Organoid Respiratory Virus Model: an *Ex Vivo* Human Challenge Model To Study Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Pathogenesis and Evaluate Therapeutics. Ackerman ME, éditeur. *mBio*. 22 févr 2022;13(1):e03511-21.
621. Morrison CB, Edwards CE, Shaffer KM, Araba KC, Wykoff JA, Williams DR, et al. SARS-CoV-2 infection of airway cells causes intense viral and cell shedding, two spreading mechanisms affected by IL-13. *Proc Natl Acad Sci USA*. 19 avr 2022;119(16):e2119680119.
622. Lam E, Ramke M, Warnecke G, Schrepfer S, Kopfnagel V, Dobner T, et al. Effective Apical Infection of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cells and Induction of Proinflammatory Chemokines by the Highly Pneumotropic Human Adenovirus Type 14p1. Nevels M, éditeur. *PLoS ONE*. 13 juill 2015;10(7):e0131201.

623. Cmielewski P, Donnelley M, Parsons DW. Long-term therapeutic and reporter gene expression in lentiviral vector treated cystic fibrosis mice: Long term gene expression in lentivirus treated CF mice. *J Gene Med.* sept 2014;16(9-10):291-9.
624. Lütschg V, Boucke K, Hemmi S, Greber UF. Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithelial cells. *Nat Commun.* 12 juill 2011;2(1):391.
625. Felipe-Abrio B, Carnero A. The Tumor Suppressor Roles of MYBBP1A, a Major Contributor to Metabolism Plasticity and Stemness. *Cancers.* 20 janv 2020;12(1):254.
626. Yuan Y, Miao Y, Zeng C, Liu J, Chen X, Qian L, et al. Small-molecule inhibitors of ubiquitin-specific protease 7 enhance type-I interferon antiviral efficacy by destabilizing SOCS1. *Immunology.* mars 2020;159(3):309-21.
627. Boddin J, Ip WH, Wilkens B, von Stromberg K, Ching W, Koyuncu E, et al. A Single Amino Acid Switch in the Adenoviral DNA Binding Protein Abrogates Replication Center Formation and Productive Viral Infection. *Shenk T, éditeur. mBio.* 26 avr 2022;13(2):e00144-22.
628. Aho, Mäntylä, Ekman, Hakanen, Mattola, Chen, et al. Quantitative Microscopy Reveals Stepwise Alteration of Chromatin Structure during Herpesvirus Infection. *Viruses.* 11 oct 2019;11(10):935.
629. Carson CT, Orazio NI, Lee DV, Suh J, Bekker-Jensen S, Araujo FD, et al. Mislocalization of the MRN complex prevents ATR signaling during adenovirus infection. *EMBO J.* 18 mars 2009;28(6):652-62.
630. Fox HL, Dembowski JA, DeLuca NA. A Herpesviral Immediate Early Protein Promotes Transcription Elongation of Viral Transcripts. *Imperiale MJ, éditeur. mBio.* 5 juill 2017;8(3):e00745-17.
631. Iserman C, Roden CA, Boerneke MA, Sealfon RSG, McLaughlin GA, Jungreis I, et al. Genomic RNA Elements Drive Phase Separation of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid. *Molecular Cell.* déc 2020;80(6):1078-1091.e6.
632. Zhao M, Yu Y, Sun LM, Xing JQ, Li T, Zhu Y, et al. GCG inhibits SARS-CoV-2 replication by disrupting the liquid phase condensation of its nucleocapsid protein. *Nat Commun.* 9 avr 2021;12(1):2114.
633. Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology.* mars 2004;337(3):635-45.
634. Winkler DD, Muthurajan UM, Hieb AR, Luger K. Histone Chaperone FACT Coordinates Nucleosome Interaction through Multiple Synergistic Binding Events. *Journal of Biological Chemistry.* déc 2011;286(48):41883-92.
635. Zhou D, Wu Z, Park JG, Fiches GN, Li TW, Ma Q, et al. FACT subunit SUPT16H associates with BRD4 and contributes to silencing of interferon signaling. *Nucleic Acids Research.* 26 août 2022;50(15):8700-18.
636. Rajah MM, Hubert M, Bishop E, Saunders N, Robinot R, Grzelak L, et al. SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation. *The EMBO Journal*

- [Internet]. 15 déc 2021 [cité 6 avr 2023];40(24). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2021108944>
637. Ao Z, Ouyang MJ, Olukitibi TA, Yao X. SARS-CoV-2 Delta spike protein enhances the viral fusogenicity and inflammatory cytokine production. *iScience*. août 2022;25(8):104759.
638. Koch J, Uckelely ZM, Lozach P. SARS-CoV-2 variants as super cell fusers: cause or consequence of COVID-19 severity? *The EMBO Journal* [Internet]. 15 déc 2021 [cité 6 avr 2023];40(24). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2021110041>
639. Cheng YW, Chao TL, Li CL, Wang SH, Kao HC, Tsai YM, et al. D614G Substitution of SARS-CoV-2 Spike Protein Increases Syncytium Formation and Virus Titer via Enhanced Furin-Mediated Spike Cleavage. Meng XJ, éditeur. *mBio*. 31 août 2021;12(4):e00587-21.
640. Hou YJ, Chiba S, Halfmann P, Ehre C, Kuroda M, Dinnon KH, et al. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. *Science*. 18 déc 2020;370(6523):1464-8.
641. Zhang J, Cai Y, Lavine CL, Peng H, Zhu H, Anand K, et al. Structural and functional impact by SARS-CoV-2 Omicron spike mutations. *Cell Reports*. avr 2022;39(4):110729.
642. Hui KPY, Ho JCW, Cheung M chun, Ng K chun, Ching RHH, Lai K ling, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature*. 24 mars 2022;603(7902):715-20.
643. Alfi O, Hamdan M, Wald O, Yakirevitch A, Wandel O, Oiknine-Djian E, et al. SARS-CoV-2 Omicron Induces Enhanced Mucosal Interferon Response Compared to other Variants of Concern, Associated with Restricted Replication in Human Lung Tissues. *Viruses*. 21 juill 2022;14(7):1583.
644. McMahan K, Giffin V, Tostanoski LH, Chung B, Siamatu M, Suthar MS, et al. Reduced pathogenicity of the SARS-CoV-2 omicron variant in hamsters. *Med*. avr 2022;3(4):262-268.e4.
645. Trunfio M, Portesani F, Vicinanza S, Nespoli P, Traverso F, Cortese G, et al. Real-life Evidence of Lower Lung Virulence in COVID-19 Inpatients Infected with SARS-CoV-2 Omicron Variant Compared to Wild-Type and Delta SARS-CoV-2 Pneumonia. *Lung*. oct 2022;200(5):573-7.
646. Banai A, Lupu L, Shetrit A, Hochstadt A, Lichter Y, Levi E, et al. Systematic lung ultrasound in Omicron-type vs. wild-type COVID-19. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*. 19 déc 2022;24(1):59-67.
647. Ren H, Ma C, Peng H, Zhang B, Zhou L, Su Y, et al. Micronucleus production, activation of DNA damage response and cGAS-STING signaling in syncytia induced by SARS-CoV-2 infection. *Biol Direct*. déc 2021;16(1):20.
648. Zhou Z, Zhang X, Lei X, Xiao X, Jiao T, Ma R, et al. Sensing of cytoplasmic chromatin by cGAS activates innate immune response in SARS-CoV-2 infection. *Sig Transduct Target Ther*. 3 nov 2021;6(1):382.
649. Liu X, Wei L, Xu F, Zhao F, Huang Y, Fan Z, et al. SARS-CoV-2 spike protein-induced cell fusion activates the cGAS-STING pathway and the interferon response. *Sci Signal*. 12 avr 2022;15(729):eabg8744.

- 
650. Touret F, Luciani L, Baronti C, Cochin M, Driouich JS, Gilles M, et al. Replicative Fitness of a SARS-CoV-2 20I/501Y.V1 Variant from Lineage B.1.1.7 in Human Reconstituted Bronchial Epithelium. Palese P, éditeur. *mBio*. 31 août 2021;12(4):e00850-21.
651. Li H, Liu T, Wang L, Wang M, Wang S. SARS-CoV-2 Delta variant infects ACE2<sup>low</sup> primary human bronchial epithelial cells more efficiently than other variants. *Journal of Medical Virology*. mars 2022;94(3):821-2.
652. Chiu MC, Li C, Liu X, Yu Y, Huang J, Wan Z, et al. A bipotential organoid model of respiratory epithelium recapitulates high infectivity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell Discov*. 17 juin 2022;8(1):57.
653. Zabner J, Zeiher BG, Friedman E, Welsh MJ. Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time. *J Virol*. oct 1996;70(10):6994-7003.
654. Li N, Cooney AL, Zhang W, Ehrhardt A, Sinn PL. Enhanced Tropism of Species B1 Adenoviral-Based Vectors for Primary Human Airway Epithelial Cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. sept 2019;14:228-36.
655. Kotha PLN, Sharma P, Kolawole AO, Yan R, Alghamri MS, Brockman TL, et al. Adenovirus Entry From the Apical Surface of Polarized Epithelia Is Facilitated by the Host Innate Immune Response. *Kalejta RF, éditeur. PLoS Pathog*. 13 mars 2015;11(3):e1004696.
656. Readler JM, AlKahlout AS, Sharma P, Excoffon KJDA. Isoform specific editing of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Virology*. oct 2019;536:20-6.
657. Sharma P, Martis PC, Excoffon KJDA. Adenovirus transduction: More complicated than receptor expression. *Virology*. févr 2017;502:144-51.

---

### Unité de recherche

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité

CNRS, UMR 5234

Equipe « Spatial and temporal control of virus-host interactions »

146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

France