

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT
UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à l'UFR Santé

École doctorale n°554

Environnements-Santé

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement à Besançon

Le 20 Mai 2019

par

Jérôme PERRARD

Régulation de l'expression des oncogènes du papillomavirus humain de type 16.
Étude dans des lignées cellulaires de cancers du col de l'utérus traitées avec un agent déméthylant

Directeur de thèse : **Pr. Jean-Luc PRÉTET**

EA3181 : Carcinogénèse associée aux HPV

Composition du jury :

Pr. Cécile BADOUAL	PU-PH, Université Paris Descartes	Présidente du Jury
Pr. Antoine TOUZÉ	PU, Université de Tours	Rapporteur
Dr. Alain JUNG	CR, Centre Paul Strauss, Strasbourg	Rapporteur
Dr. Hélène PÉRÉ	MCU-PH, Université Paris Descartes	Examineur
Pr. Régis DELAGE-MOURROUX	PU, Université Bourgogne Franche-Comté	Examineur
Pr. Jean-Luc PRÉTET	PU-PH, Université Bourgogne Franche-Comté	Directeur de Thèse

Remerciements

Cette histoire commence officiellement en Octobre 2015. Le premier de ce mois, j'ai commencé mon travail de doctorat au sein de l'équipe d'accueil 3181, dans les bâtiments de l'UFR Santé situés dans le quartier Hauts de Chazal à Besançon. Le voyage s'achève plus de trois ans plus tard avec beaucoup plus de bagages qu'au départ et de nombreuses rencontres. Je souhaite remercier chaleureusement les personnes qui m'ont accompagné et soutenu durant toutes ces années de périples émotionnels.

Je remercie tout particulièrement les membres du jury de thèse :

Pr. Antoine Touzé,

Dr. Alain Jung,

Pr. Cécile Badoual,

Dr. Hélène Péré,

Pr. Régis Delage-Mourroux,

d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture, l'analyse et la critique du manuscrit de thèse afin de juger mes travaux de recherche. J'espère que vous avez été aussi passionné de lire mon manuscrit que moi à l'écrire.

Je remercie chaleureusement monsieur le professeur Jean-Luc Prétet, mon directeur de Thèse. Je me souviendrai des moments consacrés au projet de thèse mais aussi ceux que vous avez passé à m'écouter parler de moi. Nous sommes maintenant liés par les années partagées durant le doctorat. Vous m'avez beaucoup appris, et je sais maintenant que Docteur ne veut pas uniquement dire chercheur, mais plutôt personne multifonctionnelle. Entre chercheur, philosophe et psychologue, merci pour vos conseils, vos soutiens et votre épaulement.

Je remercie également madame la professeur Christiane Mougin, ancienne directrice du laboratoire et actuellement professeur émérite, aussi active qu'avant. Je vous remercie d'avoir spontanément bien voulu relire mon manuscrit de thèse et de l'avoir enrichi par vos suggestions.

Je remercie mes collègues de travail. Merci d'abord aux anciens thésards pour les bons moments et la bonne humeur, François, que j'ai peu connu mais très avenant, Adeline, spécialiste WB, Adrien, mentor et initiateur du projet, et Koceila, collègue de bureau et philosophe. Merci aux nouveaux venus, Philippe, stagiaire longue durée et Alice. Merci à ceux que j'ai encadré, avec qui j'ai autant appris que formé, Philippe et Fanny, jamais vraiment partis, et Sabrina. Merci aux "permanents titulaires" (j'ai pas dit seniors !) Anne et Julie pour leurs aides techniques et variées, Aurélie pour sa porte toujours

Remerciements

ouverte et les conseils rapides, Sylvie et Isabelle. Merci à tous les stagiaires que j'ai croisé dans le laboratoire au cours de la thèse et à tous les collègues de travail des autres équipes de recherche, notamment les co-organisateurs du FJC : Paulo, Leïla, Alice, Adeline, Omayra, Sindy, Jérémy, Quentin, Marie, Stéphane, Thibault, Thanh Nath. Merci aussi aux membres du bureau de l'A'Doc, qui m'a fait découvrir la vie associative : Jé, Alex, Marie, François ; et aux repreneurs.

Je remercie toutes les structures empilées comme des poupées russes qui m'ont accueilli, à savoir l'équipe d'accueil 3181 : Carcinogénèse associée aux HPV, de l'Unité de Formation et de Recherche Science Médicales et Pharmaceutiques, renommée Santé depuis peu, de l'Université de Franche-Comté, et de la Communauté d'Universités et Établissements de l'Université Bourgogne Franche Comté, autrement dit l'EA3181 de l'UFR SMP de l'UFC de l'UBFC. Durant ce doctorat j'ai pu m'immiscer dans les rouages d'UBFC en tant que membre de son conseil académique. Je suis fier d'appartenir à cette structure internationale et d'avoir participé à son fonctionnement.

Bichons, impossible de vous oublier maintenant. Après tous ces moments de pur plaisir qui m'ont accompagné durant mon parcours universitaire, nous nous sommes éloignés géographiquement. Mais la distance qui nous sépare n'est qu'illusoire, tellement vous être présents dans mes pensées. Chaque retrouvaille ravive la flamme. Il paraît qu'après sept ans d'existence, une amitié reste pour la vie. J'en suis convaincu. Ma porte restera ouverte à tout moment pour vous accueillir. Pour ce que vous représentez, pour ce que vous m'avez offerts, pour les moments futurs que j'ai hâte de vivre, merci. Merci sincèrement.

Motion spéciale à Théo. Primaire, collègue, lycée, faculté et maintenant vie active. Merci mec pour tous ces bons moments, des traquenards aux évasions en passant par les soirées jeux et les lits en cathédrale. Schnez ;)

Je tiens aussi à remercier ma famille. Je ne vous dis sûrement pas assez que je vous aime. C'est pourquoi je profite de ce manuscrit pour graver éternellement la preuve de mon affection pour vous. Toutes mes réussites sont les fruits doux et sucrés qui proviennent des graines que vous avez plantés pour moi tout au long de ma vie. La récolte est facile et abondante grâce à votre investissement. Pour l'éducation que j'ai reçue, et j'en suis particulièrement fier, pour tous ces moments à vos côtés, merci.

Marie, notre histoire commence trois mois avant le début de la thèse, mais j'espère qu'elle se poursuivra bien au-delà de sa fin. Nous avons réussi à traverser une thèse ensemble, le reste sera facile. Merci pour ce que tu représentes.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
PREAMBULE	15
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	17
1 LES PAPILLOMAVIRUS HUMAINS	19
1.1 <i>Caractérisation des papillomavirus</i>	<i>19</i>
1.2 <i>L'infection des épithéliums</i>	<i>23</i>
1.3 <i>Lésions et cancers associés aux HPV</i>	<i>33</i>
1.4 <i>Les oncoprotéines virales, des acteurs clefs de la carcinogenèse.....</i>	<i>43</i>
1.5 <i>Régulation de l'expression des protéines virales</i>	<i>58</i>
2 REGULATION EPIGENETIQUE.....	62
2.1 <i>Méthylation de l'ADN.....</i>	<i>63</i>
2.2 <i>Modification post-traductionnelle des histones</i>	<i>68</i>
2.3 <i>ARN non codants.....</i>	<i>69</i>
3 HPV ET REGULATION EPIGENETIQUE.....	69
3.1 <i>Méthylation de l'ADN.....</i>	<i>69</i>
3.2 <i>Modifications post-traductionnelles des histones</i>	<i>72</i>
3.3 <i>Oncoprotéines virales et ARN non codants</i>	<i>74</i>
4 LA FAMILLE DES T-BOX ET TBX2.....	77
4.1 <i>Les T-Box.....</i>	<i>77</i>
4.2 <i>TBX2</i>	<i>77</i>
4.3 <i>Implication de TBX2 dans la régulation de l'expression des oncogènes viraux</i>	<i>82</i>
RATIONNEL DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....	85
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	89
1 ROLE DU MIR-375 DANS LA REPRESSION DE E6 AU COURS D'UN TRAITEMENT AU 5AZADC.....	91
1.1 <i>Première publication de Morel et collaborateurs.....</i>	<i>91</i>
1.2 <i>Travaux complémentaires non publiés.....</i>	<i>108</i>
2 ROLE DE TBX2 DANS LA REPRESSION DE E6 AU COURS D'UN TRAITEMENT AU 5AZADC	114
2.1 <i>Deuxième publication de Perrard et collaborateurs.....</i>	<i>114</i>
2.2 <i>Travaux complémentaires non publiés.....</i>	<i>142</i>

Table des matières

TROISIEME PARTIE : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	147
1 REGULATION DE E6 LORS DU TRAITEMENT PAR UN AGENT DEMETHYLANT	149
1.1 Effet d'un DNMTi sur l'expression de E6.....	149
1.2 Sensibilité des cellules infectées par HPV après traitement	153
2 ROLE DU MIR-375 DANS LA REGULATION DES ONCOGENES VIRAUX	157
2.1 Variation de l'expression du miR-375 au cours du traitement au 5azadC.....	157
2.2 Rétrocontrôle entre les oncogènes viraux et le miR-375	158
3 ROLE DE TBX2 DANS LA REGULATION DES ONCOGENES VIRAUX.....	161
3.1 Variation de l'expression de TBX2 au cours du traitement au 5azadC.....	161
3.2 Répression de E6 par TBX2 au cours du traitement ?.....	163
4 AUTRES HYPOTHESES CONCERNANT LA REPRESSION DES ONCOGENES VIRAUX.....	165
4.1 Hypothèse d'une interférence à l'ARN.....	165
4.2 Hypothèse d'une modification de l'activité du promoteur viral	166
5 CONCLUSION GENERALE	167
BIBLIOGRAPHIE.....	169
ANNEXES	207
1 COMMUNICATIONS ORALES	207
2 COMMUNICATIONS AFFICHEES	207
3 ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	208
ABSTRACT.....	257
RÉSUMÉ.....	258

Table des figures

FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES PAPILLOMAVIRUS.	20
FIGURE 2 : GENOME VIRAL D'HPV16.	21
FIGURE 3 : HISTOLOGIE DU COL DE L'UTERUS ET POSSIBLES ZONES D'INFECTION DES HPV.	23
FIGURE 4 : DEROULEMENT DU CYCLE VIRAL DES HPV APRES INFECTION D'UN EPITHELIUM MALPIGHIEN.	25
FIGURE 5 : PERSISTANCE DES INFECTIONS HPV AU COURS DU TEMPS.	26
FIGURE 6 : CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DES LESIONS DU COL DE L'UTERUS SUIVANT LES DIFFERENTS SYSTEMES.	34
FIGURE 7 : PREVALENCE DES HPV DANS DES ECHANTILLONS DU COL DE L'UTERUS NORMAL OU LESIONNEL.	35
FIGURE 8 : HISTOIRE NATURELLE DES LESIONS DU COL DE L'UTERUS.	36
FIGURE 9 : ESTIMATION MONDIALE DE L'INCIDENCE DES CANCERS ATTRIBUABLES AUX HPV.	37
FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA PROTEINE E6 D'HPV16.	44
FIGURE 11 : PRINCIPALES FONCTIONS DE E6.	50
FIGURE 12 : STRUCTURE DE LA PROTEINE E7 D'HPV16.	51
FIGURE 13 : PRINCIPALES FONCTIONS DE E7.	53
FIGURE 14 : EFFETS DE E6 ET E7 SUR LA STABILITE GENOMIQUE.	56
FIGURE 15 : STRUCTURE DE LA PROTEINE E5 D'HPV16.	57
FIGURE 16 : STRUCTURE DU GENOME D'HPV16 LINEARISE ET SCHEMA D'EPISSAGE DES TRANSCRITS.	61
FIGURE 17 : VOIES DE DEMETHYLATION DE LA METHYLCYTOSINE.	65
FIGURE 18 : MECANISME DE REGULATION DE L'ACTIVITE DE DNMT1 PAR LES ONCOPROTEINES VIRALES.	71
FIGURE 19 : HPV DEREGULE LES MECANISMES EPIGENETIQUES.	73
FIGURE 20 : CINETIQUE D'EXPRESSION DU MIR-375 ET METHYLATION DE SON PROMOTEUR APRES TRAITEMENT AU 5AZADC.	110
FIGURE 21 : EXPRESSION DU MIR-375 LORS DE LA SUREXPRESSION ET DE L'INHIBITION DE E6.	112
FIGURE 22 : CINETIQUE D'EXPRESSION DE SP1 AU COURS DU TRAITEMENT AU 5AZADC.	113
FIGURE 23 : INHIBITION DE TBX2 LORS DU TRAITEMENT AU 5AZADC DANS LES CELLULES SiHa.	143
FIGURE 24 : EFFET DU TRAITEMENT AU 5AZADC DANS LES CELLULES UPCI-SCC090.	145
FIGURE 25 : BOUCLE DE RETROACTION ENTRE LE MIR-375 ET E6.	159
FIGURE 26 : SCHEMA DU GENE TBX2 HUMAIN.	163
FIGURE 27 : HYPOTHESE SUR LA REGULATION DE LA LCR PAR TBX2.	165

Table des tableaux

TABEAU I : HISTOIRE NATURELLE DES CIN.	36
TABEAU II : FACTEURS DE TRANSCRIPTION SE FIXANT A LA LCR.	59

Liste des abréviations

11q24.1 : région q24.1 du chromosome 11
 1q23.2 : région q23.2 du chromosome 1
 4vHPV : quadrivalent protégeant des infections à HPV
 5azaC : azacytidine
 5azadC : 5-aza-2'-déoxycytidine ou décitabine
 5caC : 5carboxycytosine
 5fC : 5formylcytosine
 5hmC : hydroxyméthylcytosine
 5hmU : 5hydroxymethyluracil
 5mC : 5méthylcytosine
 60S : sous-unité du ribosome (masse en Svedbergs)
 9vHPV : nonavalent protégeant des infections à HPV

A

A2t : annexine A2 hétérotétramère
 aa : acide aminé
 AA : variant asiatique-américain d'HPV16
 AAD : aminoactinomycine
 ADC : adénocarcinomes
 ADN : acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 AdV : adénovirus
 Af1/2 : variants africains 1/2 d'HPV16
 AGC : *atypical glandular cells*
 AGR2 : *anterior gradient 2*
 AID/APOBEC : *activation-induced cytidine deaminase/apolipo-protein B mRNA-editing enzyme complex*
 AIF1 : *allograft inflammatory factor 1*
 AIS : adénocarcinome *in situ*
 ANRIL : codé par *CDKN2B-AS1*, *antisens noncoding RNA in the INK4 locus*
 AP1 : *activating factor 1* (dimère c-fos/c-jun)
 APC : *adenomatosis polyposis coli*
 APOBEC3B : *apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B*
 ARE : *A/U rich element*
 ARN : acide ribonucléique
 ARNInc : ARN long non codant
 ARNm : ARN messager
 ARNnc : ARN non codant
 ARNr : ARN ribosomique
 ARNt : ARN de transfert
 AS : variant asiatique d'HPV16

ASC-H/US : *atypical squamous cell evocating high grade lesion/ of undetermined significance*
 ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

B

B42AD : *B42 transcription activation domain*
 Bak : *BCL2 antagonist/killer 1*
 Bap31 : *B-cell receptor associated protein 31*
 BARD1 : *BRCA1 associated RING domain 1*
 BAX : *BCL2 associated X*
 Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*
 BER : *base excision repair*
 bHPV : bivalent protégeant des infections à HPV
 Bid : *BH3 interacting domain*
 BMI1 : *B lymphoma mo-MLV insertion region 1*
 BMI1^{-/-} : déficience homozygote pour *BMI1*
 BMP2 : *bone morphogenetic protein 2*
 BMP2^{-/-} : déficience homozygote pour *BMP2*
 BMPR1A^{-/-} : déficience homozygote pour *BMPR1A*
 BPV : *bovine papillomavirus*
 BR : bas risque
 BRCA1/2 : *breast cancer 1/2*
 Brd4 : *bromodomain containing 4*
 BRG1 : *brahma-related gene-1*
 BRIP1 : *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*, codant FANCI

C

c-IAP2 : *cellular inhibitor of apoptosis 2*
 C-ter : extrémité carboxyterminale
 C/EBP : *CCAAT-enhancer-binding proteins*
 CADM1 : *cell adhesion molecule 1*
 CARM1 : *coactivator associated arginine methyltransferase 1*
 CAT : catalase
 CCEPR : *cervical carcinoma expressed PCNA regulatory lncRNA*
 CCHE1 : gène *CCEPR*, *cervical carcinoma high-expressed lncRNA 1*
 CCL2/20 : *C-C motif chemokine ligand 2/20*
 CCNA1 : gène codant la cycline A1
 CD : *cluster of differentiation*
 CDC25A : *cell division cycle 25A*
 CDH1 : gène codant la cadhérine E
 CDK2 : *cyclin dependent kinase 2*
 CDKN1A : *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

CDKN2A : *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*
 CDP : gène *CUX1*, *CCAAT displacement protein*
 CDYL : *chromodomain Y like*
 cGAS : *cyclic GMP-AMP synthase*
 ChIP : *chromatin immunoprecipitation*
 CHK2 : *checkpoint kinase 2*
 CIN : *cervical intraepithelial neoplasia*
 CIP2A : *cell proliferation regulating inhibitor of protein phosphatase 2a*
 CKII : *casein kinase II*
 CKIs : *CDK inhibitors*
 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
 CmPV1 : *chelonina mydas PV type 1*
 CO₂ : dioxyde de carbone
 CPV1 : *canine PV type 1*
 CR1/2/3 : régions conservées 1/2/3
 CTCF : *CCCTC-binding factor*
 CTRL : contrôle
 CUL2 : *cullin 2*
 CUX1 : *cut like homeobox 1*
 CXCL8/10 : *C-X-C motif chemokine ligand 8/10*

D

DAPK1 : *death associated protein kinase 1*
 DDR : *DNA damage response*
 DISC : *death-inducing signaling complex*
 DLG : *discs large homolog 1*
 DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
 DNMT1/3a/3b : ADN méthyltransférase 1/3a/3b
 DNMTi : inhibiteurs de DNMT
 DR-4/5 : *death receptor 4/5*
 DREAM : *dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B*
 DYRK1A : *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*

E

E : variant européen d'HPV16
 E-350G : variant européen 350G d'HPV16
 E-350T : variant européen 350T d'HPV16
 E-Box : *enhancer box*, élément de réponse ADN
 E1-8 : *early protein 1-8*
 E1A : *adenovirus early region 1A*
 E2BS : *E2 binding site*
 E2F : *E2F transcription factor*
 E6AP : gène *UBE3A*, *E6 associated protein*
 EBIC : gène *TMPOP2*, *EZH2-binding lncRNA in cervical cancer*
 EBV : virus d'Epstein-Barr
 EGCG : gallate d'épigallocatechine
 EGF : *epidermal growth factor*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*
 Era : *estrogen receptors alpha*
 eUTR : régions non traduites des ARNm précoces
 EV : épidermodysplasie verruciforme
 EVER1/2 : *epidermodysplasia verruciformis 1/2*
 EZH2 : *enhancer of zeste homolog 2*

F

FADD : *fas-associated protein with death domain*
 FAS : *fas cell surface death receptor*
 FAS-L : *FAS-ligand*
 FCU : frottis cervico-utérin
 FDA : *food and drug administration*
 FHIT : *fragile histidine triad*
 FIPV1 : *francolinus leucoscepus papillomavirus 1*
 FNBP1L : *formin binding protein 1 like*
 FOXA1 : *forkhead box A1*
 FOXM1 : *forkhead box M1*
 FOXP1 : *forkhead box P1*
 FPV : *fringilla coelebs papillomavirus*
 FT : facteur de transcription

G

GAS5 : *growth arrest specific 5*
 GJA1/5 : *gap junction protein alpha 1/5*, codant la connexine 43/40
 Gy : Gray

H

H-1PV : parvovirus H1
 H3/H4/H2A/H2B : histone 3/4/2A/2B
 H3K27me3 : triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3
 H3K4me3 : triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3
 H4ac : acétylation de l'histone 4
 HaCaT : *cultured human keratinocyte*
 hADA3 : gène *TADA3*, *alteration/deficiency in activation 3*
 HAT : histone acétyltransférases
 HBV : virus de l'hépatite B
 HDAC1 : histone désacétylase 1
 HDACi : inhibiteur des HDAC
 HDM : histone déméthylases
 HFK : *human forskin keratinocyte*
 HLA-I : *human leukocyte antigen I*
 HMT : histone méthyltransférases
 hnRNP : *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*
 HOTAIR : *HOX transcript antisense RNA*

Liste des abréviations

HPV : papillomavirus humain
HPV négatif : sans HPV, sans copie du virus
HPV positif : positif à HPV, avec des copies du génome viral
HR : haut risque
HRM : *high resolution melting*
HSIL : *high-grade squamous intraepithelial lesion*
hTERT : *telomerase reverse transcriptase*

I

IAP : *inhibitors of apoptosis proteins*
IARC : *international agency for research on cancer*
ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1*
ICC : *invasive cervical cancer*
IFN : interféron
IFNB1 : gène *interféron bêta 1*
IGF1R : *insulin like growth factor 1 receptor*
IL-1/4/8/13 : interleukine 1/4/8/13
IRF1/3/7 : *interferon regulatory factor 1/3/7*
IRFRE : *IRF response element*
ISG : *interferon-stimulated genes*

J

JARID1B : gène *KDM5B, jumonji, AT rich interactive domain 1B*
JSC : jonction squamo-cylindrique

K

KDM6A/B : *lysine demethylase 6A/B*
KGF : *keratinocyte growth factor*
Ki-67 : codé par *MKI67, marker of proliferation ki-67*
KMT : lysine méthyltransférase
Krt 7 : kératine 7

L

L1/2 : *late protein 1/2*
LAM : leucémie aigüe myéloïde
LAST : *lower anogenital squamous terminology*
LC : cellules de Langerhans
LCR : *long control region*
LET : gène *NPTN-IT1, low expression in tumor*
LMC : leucémie myéloïde chronique
LSIL : *low-grade squamous intraepithelial lesion*
LT : lymphocytes T
IUTR : régions non traduites des ARNm tardifs

M

MAGI1 : *membrane-associated guanylate kinase inverted 1*
MALAT1 : *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*
Max : *myc-associated factor X*
Maz : *myc-associated zinc finger protein*
MBD : *methyl-CpG binding domain*
MCF-7/10A : *michigan cancer foundation-7/10A*
MCM7 : *minichromosome maintenance complex component 7*
MDA-MB-157/435 : *MD anderson-metastatic breast-157/435*
MDM2 : *mouse double minute 2*
MeCP2 : *methyl-CpG binding protein 2*
MEF : *mouse embryonic fibroblasts*
MEG3 : *maternally expressed 3*
MGMT : *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*
Mi2β : gène *CHD4, chromodomain helicase DNA binding protein 4*
miR-375 : gène *MIR375, microARN-375*
MIR375^{-/-} : déficience homozygote pour *MIR375*
miRNA : microARN
MLL5β : gène *KMT2E, mixed lineage leukemia 5 isoform 6*
MMP7 : matrice métalloprotéinase 7
MmuPV1 : *Mus musculus PV 1*
MPT : modification post-traductionnelle
MSP : *methyl specific primer*
MTDH : Métadhérine
MUPP1 : gène *MPDZ, multi-PDZ domain protein 1*
MYCN : codant N-myc, *neuroblastoma myc*

N

N-ter : extrémité aminoterminal
NADP⁺/H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydée /forme réduite
NCOA1 : *nuclear receptor coactivator 1*
ND10 : *nuclear domain 10*
NES : *nuclear export sequence*
NF-κB : *nuclear factor-kappa B*
NF-κBp50-p65 : dimère p50/p65 de NF-κB
NF-κBp65 : sous-unité p65 de NF-κB
NFI : *nuclear factor 1*
NFX1-91/123 : *nuclear transcription factor, X-box binding 1* isoforme 91/123
NHEK : *normal human epidermal keratinocytes*
NILM : *negative for intraepithelial lesion and malignancy*
NK : *natural killer*

NLS : *nuclear localization signal*
 NMD : *non-sense mRNA decay*
 NOX2 : *NADPH oxydase 2*
 Nppa : *natriuretic peptide A*
 NPTN-IT1 : *NPTN intronic transcript 1*
 NS1 : *nonstructural protein 1*
 NuMa : *nuclear mitotic apparatus protein 1*
 NuRD : *nucleosome remodeling deacetylase*

O

Oct1 : gène *POU2F1*, *octamer-binding transcription factor 1*
 Omi : protéine codée par le gène *HTRA2*
 OMS : organisation mondiale de la santé

P

p107 : protéine codée par le gène *RBL1*
 p130 : protéine codée par le gène *RBL2*
 p14^{ARF} : protéine codée par le gène *CDKN2A*, *alternative reading frame*
 p16^{INK4A} : protéine codée par le gène *CDKN2A*, *inhibitors of CDK4*
 p19^{ARF} : homologue murin de p14^{ARF}
 p21/p21^{CIP1} : codée par *CDKN1A*, *CDK-interacting protein 1*
 p27^{KIP1} : codée par *CDKN1B*, *cyclin-dependent kinase inhibitor p27*
 p300/CBP : codée par *EP300*, *E1A binding protein p300*
 p38^{MAPK} : codée par *MAPK14*, *mitogen-activated protein kinases*
 p53 : codée par *TP53*
 p53^{-/-} : déficience homozygote pour *TP53*
 p670 : promoteur tardif d'HPV16
 p97 : promoteur précoce d'HPV16
 pA : poly adénylation
 PABPC : *cytoplasmic poly(a) binding proteins*
 pAE/L : site de polyadénylation précoce/tardif
 PALB2 : *partner and localizer of BRCA2*
 PAMP : *pathogen-associated molecular patterns*
 Pap : Papanicolaou
 Par3 : codée par *PARD3*, *partitioning defective 3*
 PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
 PATJ : *PALS1-associated tight junction protein*
 pb : paire de bases
 PBM : *PDZ binding motif*
 PCAF : codée par *KAT2B*, *p300/CBP-associated factor*
 PcG : *polycomb group*
 PCM : matériel péri-centriolaire
 PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*

PCR : *polymerase chain reaction*
 PDE2A : *phosphodiesterase 2A*
 PDK1 : *pyruvate dehydrogenase kinase 1*
 PDZ : PSD-95, DLG et ZO-1
 PE : phosphatidyléthanolamine
 pE8 : promoteur alternatif d'HPV16 (p1127)
 PEF1 : *penta-EF-hand domain containing 1*
 pH : potentiel hydrogène
 piARN : *piwi-interacting ARN*
 PIK3CA : *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
 PLK4 : *polo like kinase 4*
 POL : phase ouverte de lecture
 Pol II : ARN polymérase II
 POU2F3 : *POU class 2 homeobox 3*
 pRb : codée par le gène *RB1*, *retinoblastoma*
 PRC1/2 : *polycomb repressive complex 1/2*
 PRMT1 : *protein arginine methyltransferase 1*
 PRR : *pattern recognition receptors*
 PSD-95 codée par *DLG4*, *post-synaptic density protein 95*
 PTEN : *phosphatase and tensin homolog*
 PTPN3 : *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3*
 PV : papillomavirus
 PVT1 : *plasmacytoma variant translocation 1*

Q

qHPV : quadrivalent protégeant des infections à HPV
 qPCR : PCR quantitative

R

RARB : *retinoic acid receptor beta*
 RASSF1 : *ras association domain family member 1*
 RISC : *RNA-induced silencing complex*
 RLR : *RIG-I-like receptors*
 ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène
 RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase

S

SA : sites accepteurs
 SA-β-GAL : *senescence-associated beta-galactosidase*
 SAM : S-adenosylméthionine
 SCRIB : *scribbled planar cell polarity protein*
 SD : sites donneurs

Liste des abréviations

SET7 : codée par *SETD7*, *SET domain containing lysine methyltransferase 7*
SGI-110 : *guadecitabine*
shARN : *small hairpin* ARN
SHH : *sonic hedgehog*
SI : système immunitaire
siARN : *small interfering* ARN
SLUG : codée par *SNAI2*
SMAD4 : *MAD homolog 4*
SMD : syndromes myélodysplasiques
SOX2 : *sex determining region Y-box 2*
SP1 : *specificity protein 1*
SP1BS : *SP1 binding site*
SR : *serin arginin rich proteins*
SRC1 : gène *NCOA1*, *steroid receptor coactivator-1*
STAT : *signal transducer and activator of transcription*
STING : *stimulator of interferon genes*
SV40 : virus simien 40
SWI/SNF : *switch mutants/sucrose non-fermenting*

T

TAD, *topologically associated domains*
TAp63 β : isoforme de p63, gène *TP63*, *N-terminal transactivation domain*
tBid : *truncated Bid*, protéine Bid tronquée
TBP : *TATA box binding protein*
TBX2^{-/-} : déficience homozygote pour *TBX2*
TBX2/3 : *T-Box 2/3*
TCF : *T-cell factor*
TDG : *thymine DNA glycosylase*
TDR : domaine de répression transcriptionnelle
TEF1 : gène *TEAD1*, *transcriptional enhancer factor1*
TEM : transition épithélio mésenchymateuse
TERC : *telomerase RNA component*
Tet : *ten-eleven translocation*
TGFB2 : *transforming growth factor beta 2*
TGFB2 : *transforming growth factor beta receptor 2*
TGF β : *transforming growth factor beta*
Th1 : *T helper cell 1*
Thy : thymine
TIG3 : *tokyo institute of gerontology-3*
TIP60 : gène *KAT5*, *tat interacting protein*, 60kDa
TLR9 : *toll like receptor 9*
TMC6 : *transmembrane channel like 6/8*

TNFR1 : gène *TNFRSF1A*, *tumor necrosis factor receptor 1*
TNF α : *tumor necrosis factor alpha*
TP53/63 : *tumor protein p53/63*
TRADD : *TNFRSF1A associated via death domain*
TRAIL : gène *TNFSF10*, *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*
TSA : trichostatine A
TSS : *transcription start site*
TUSC8 : *tumor suppressor candidate 8*
TWIST : *twist family BHLH transcription factor 1*
Tyk2 : *tyrosine kinase 2*

U

U2-OS : *human bone osteosarcoma epithelial*
UHRF : *ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*
USF1/2 : *upstream transcription factor 1*
UTR : régions non traduites des ARNm
UV : ultraviolet
UVB : ultraviolets B
UVB/C : ultraviolets B/C

V

V-ATPase : *V-type adenosine triphosphatase*
VADS : voies aérodigestives supérieures
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VLP : *virus-like particle*

W

Wnt : *wingless-type MMTV integration site*

X

XRCC1 : *X-Ray repair cross complementing 1*

Y

YAP1 : *yes associated protein 1*
YY1 : *yin yang 1*

Z

ZBTB4/38 : *zinc finger and BTB domain containing 4/38*
ZEB1/2 : *zinc finger E-box binding homeobox 1/2*
ZO-1 : gène *TJP1*, *zonula occludens 1*

Préambule

Les papillomavirus humains (HPV) sont des petits virus non enveloppés à ADN double brin, qui infectent les épithéliums cutanés et muqueux. Ils sont très largement répandus dans la population humaine et provoquent parfois des verrues cutanées, des condylomes acuminés et des carcinomes, ces derniers étant principalement localisés au niveau anogénital. Le risque de développer un cancer est cependant très faible : en effet, seule une quinzaine de types d'HPV sont classés comme carcinogènes, et la large majorité des infections sont éliminées par le système immunitaire. Avec approximativement 300 millions de femmes porteuses d'ADN d'HPV au niveau génital (en 2007), l'incidence mondiale des cancers du col de l'utérus est estimée à 570 000 cas (en 2018).

Au niveau moléculaire, le pouvoir carcinogène des HPV est étroitement lié à l'expression accrue de deux oncoprotéines virales, E6 et E7, qui sont nécessaires à l'initiation, la promotion et la progression du phénotype cancéreux. Avec plus de 150 partenaires protéiques, les deux oncoprotéines virales dérèglent de nombreuses voies de signalisation et induisent par exemple une prolifération non contrôlée et accrue des cellules infectées, ainsi que leur immortalisation. E6 et E7 favorisent aussi une instabilité génétique et une modification du profil épigénétique dans les cellules en modulant l'activité d'enzymes impliquées dans l'établissement des marques épigénétiques. La surexpression des deux oncoprotéines peut être liée à l'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte mais aussi à la méthylation de l'ADN du génome viral. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement anticancéreux en clinique ciblant spécifiquement les fonctions des oncoprotéines E6 et E7, malgré leur rôle vital au sein des cellules cancéreuses. L'utilisation d'un inhibiteur des DNMT (DNA méthyltransférases, enzymes catalysant la méthylation de l'ADN) dans le but de modifier le profil de méthylation aberrant du génome viral, mais aussi du génome cellulaire, semble être une piste prometteuse pour traiter les cancers induits par HPV.

L'objectif du travail de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires régulant l'expression des oncoprotéines E6 et E7 dans des lignées cellulaires HPV positives traitées par un agent déméthylant, le 5-aza-2'-déoxycytidine (5azadC). Au laboratoire, nous avons constaté que le traitement des cellules par cet inhibiteur des DNMT induit une diminution de l'expression de E6 et de E7, ainsi qu'une déméthylation d'une partie du génome d'HPV. Nous avons aussi démontré que la répression des oncoprotéines virales était indépendante de cette déméthylation du génome viral, signifiant qu'un ou plusieurs autres mécanismes moléculaires étaient impliqués dans cette répression.

Dans un premier temps, nous avons observé qu'un traitement déméthylant induisait une déstabilisation des ARN E6, suggérant l'implication d'un miARN. Parmi les miARN ciblant les ARN E6, le

Préambule

miR-375 était le plus susceptible d'être impliqué dans la déstabilisation des transcrits car (i) la méthylation de son promoteur augmente avec la gravité des lésions du col de l'utérus, (ii) il cible les transcrits E6 au niveau de cinq régions différentes, et (iii) son expression est augmentée lors du traitement des cellules du cancer du col de l'utérus avec le 5azadC. Il s'est avéré que le miR-375 était effectivement impliqué dans la répression partielle des transcrits viraux lors du traitement. Les résultats de cette étude suggèrent en outre qu'un autre mécanisme moléculaire pourrait être impliqué dans cette répression.

C'est pourquoi, dans un deuxième temps, nous avons étudié la possible implication d'un facteur de transcription, TBX2, dans la répression des transcrits viraux. Bien que le taux transcriptionnel de TBX2 soit augmenté lors du traitement des cellules avec des fortes concentrations de 5azadC, nos résultats suggèrent que la protéine n'est pas exprimée dans les cellules, même après traitement, et que TBX2 ne régule pas l'activité du promoteur viral intégré au génome cellulaire.

Afin de permettre au lecteur de comprendre de façon détaillée les données présentées dans ce manuscrit de thèse, la première partie du manuscrit est une revue de la littérature abordant les thèmes suivants : la biologie des papillomavirus humains et les pathologies associées, la régulation épigénétique, la relation qui existe entre ces deux premiers thèmes et enfin la famille des T-Box, dont fait partie TBX2. Dans la deuxième partie, les résultats des travaux personnels seront présentés :

- D'abord l'article publié sur l'implication du miR-375 dans la répression des transcrits E6 après traitement des cellules avec le 5azadC et les données complémentaires non publiées,

- Ensuite l'article soumis sur l'implication de TBX2 dans cette répression et les données complémentaires non publiées.

Finalement, une troisième et dernière partie aborde les discussions soulevées et les perspectives apportées par ces travaux de thèse, ainsi que leur importance dans la recherche d'un traitement efficace des cancers induits par HPV.

Première partie : Revue de la littérature

1 Les papillomavirus humains

1.1 Caractérisation des papillomavirus

Les papillomavirus (PV) sont des petits virus nus à ADN circulaire double brin appartenant à la famille des *papillomaviridae*. Ils infectent la plupart des espèces amniotiques, comme les rongeurs, les félins, les canidés et le bétail, mais aussi certains oiseaux et reptiles. La longueur de leur génome varie de 6953 paires de bases (pb) (*Chelonia mydas* PV type 1, CmPV1), à 8607 pb (*Canine*, CPV1). De plus, chaque PV infecte spécifiquement une seule espèce hôte (avec de très rares exceptions). La co-évolution des PV en l'absence d'infection inter-espèce suggère une origine commune datant de 200 à 300 millions d'années (Bernard, 2013a). Cependant, la détection d'un PV infectant un poisson, *Actinopterygii*, a repoussé cette origine commune jusqu'à 420 millions d'années (McBride, 2017).

Au niveau phylogénétique, la protéine E1 des PV possède des points communs avec l'antigène T des polyomavirus ainsi qu'avec la protéine NS1 des parvovirus. Les polyomavirus et les PV étaient d'ailleurs classés dans la même famille de virus avant que de trop fortes différences ne les séparent (Bernard, 2013a).

Les PV sont classés d'après leurs homologues de séquences en genres, espèces, types, sous-types et variants, et numérotés par ordre de découverte. La caractérisation d'un nouveau genre ou type est établie lorsque le gène L1 présente respectivement 45% et 10% de différences avec tous les autres genres ou types connus (de Villiers, 2013; Bernard, 2013a). Un sous-type est défini comme possédant un génome avec un gène L1 différent de 2 à 10% par rapport à un type original, et deux variants différent l'un de l'autre s'ils possèdent jusqu'à 2% de séquences différentes (Calleja-Macias *et al*, 2005). Par exemple, six PV composent les alphapapillomavirus 9 (genre alpha et espèce 9), dont le type humain 16 (HPV16), lui-même regroupant plusieurs variants, comme les variants européen (E), asiatique (AS), asiatique-américain (AA) ou encore africains (Af1 et Af2) (Shah *et al*, 2010).

Depuis la découverte du premier PV en 1933 (Shope & Hurst, 1933), plus de 200 types de PV infectant *Homo sapiens* (HPV, *human papillomavirus*) et au moins 160 infectant des animaux sont à ce jour décrits (Schiffman *et al*, 2016; Doorbar, 2018), répartis en 70 espèces et 30 genres, dont 5 genres contenant des HPV (Figure 1).

Les PV sont tous caractérisés par la présence dans le génome d'une région de contrôle, nommée LCR (*long control region*) et des phases ouvertes de lecture (POL) suivantes : E1, E2, E4, L1 et L2 (Figure 2). Ils possèdent en outre au moins un oncogène parmi E5, E6 et/ou E7 (García-Vallvé *et al*, 2005). Toutes les POL sont sur le même brin ADN. La capside icosédrique du virion est composée de 360 protéines L1, assemblées en 72 capsomères (Doorbar *et al*, 2012; Schiffman *et al*, 2016), ainsi que d'un nombre variable de protéines L2 (jusqu'à 72) permettant la liaison de la capside au génome viral (Buck

Première partie : Revue de la littérature

et al, 2008). Les PV infectent uniquement les tissus épithéliaux muqueux et/ou cutanés, et leur cycle viral dépend de la migration de la cellule infectée à travers le tissu épithélial ainsi que du programme de différenciation de la cellule (Van Doorslaer, 2013). Les papillomavirus les plus étudiés à ce jour sont les PV humains, dont certains peuvent provoquer des verrues, des lésions précancéreuses et des cancers.

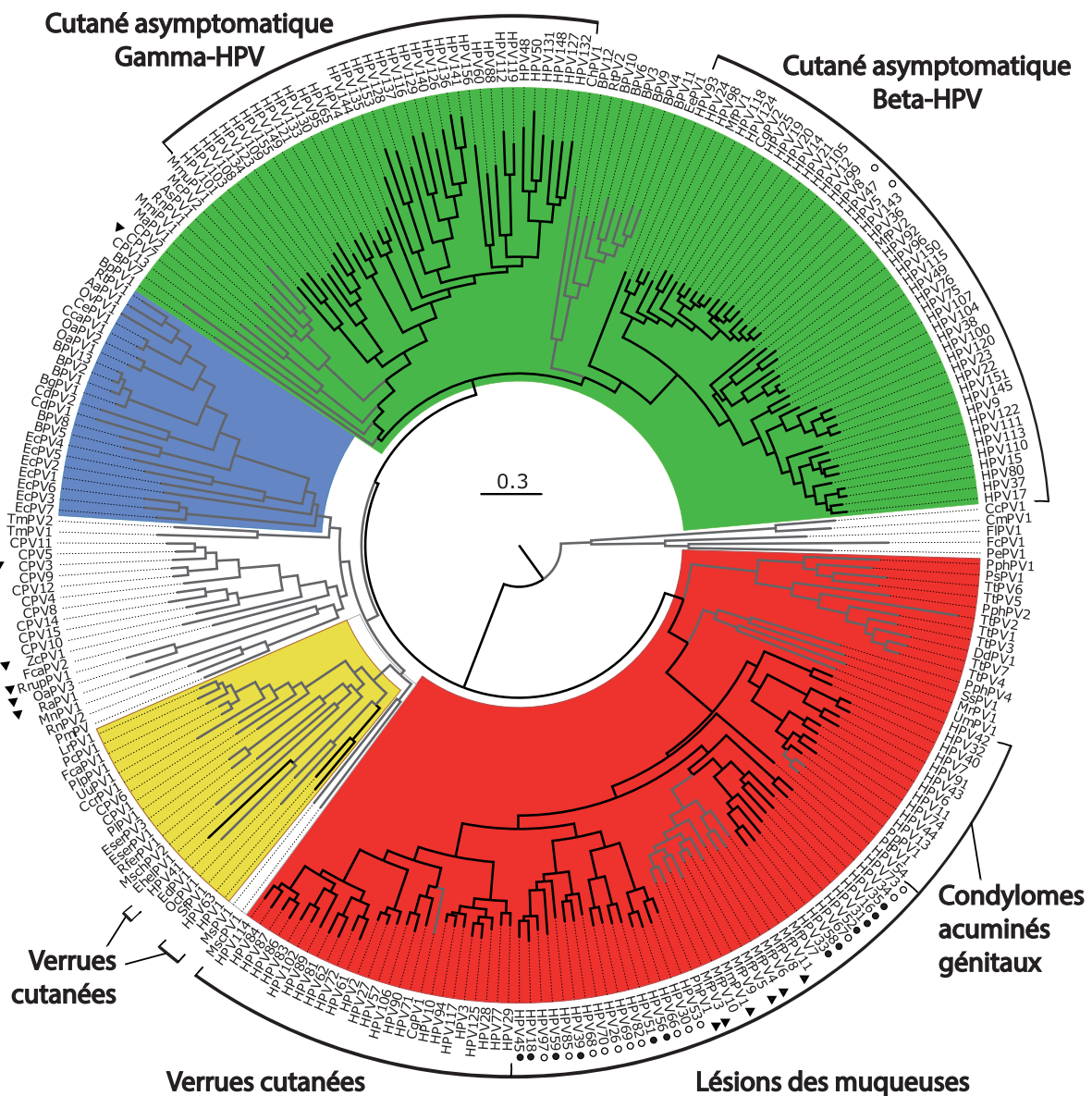


Figure 1 : Arbre phylogénétique des papillomavirus.

L'arbre a été inféré au niveau nucléotidique. Les couleurs représentent quatre super-taxons : en rouge, Alpha et Omikron PV ; en vert, Beta et Xi PV ; en jaune, Lambda et Zeta PV et en Bleu, Delta et Zeta PV. Les branches noires représentent les PV Humains, les branches grises représentent les autres espèces. Les HPV carcinogéniques sont marqués d'un point noir pour le groupe 1 et blanc pour 2A ou 2B selon le classement établi par l'IARC. Les autres PV à potentiel carcinogène sont marqués d'un triangle noir. L'échelle représente le nombre de substitutions par site. La liste des PV n'est pas exhaustive (adapté de (Bravo & Félez-Sánchez, 2015)).

Par exemple, pour HPV16, le génome de 7906 pb contient trois régions : la région précoce, contenant 6 POL principales, la région tardive, contenant 2 POL, et la LCR (*long control region*), qui contient le promoteur viral précoce (p97). Celui-ci permet l'expression de E1, E2, E4, E5, E6 et E7. Un promoteur viral tardif (p670) est localisé à l'intérieur de la POL de E7 et permet l'expression de E1, E2, E4, E5 ainsi que L1 et L2, les deux protéines de capside. Un troisième promoteur (pE8) et une autre POL précoce (E8) ont été décrits (Graham, 2017). Certaines POL se chevauchent, comme E2 et E4. Les transcrits d'HPV sont polycistroniques et le schéma d'épissage des pré-ARNm fait intervenir 4 sites donneurs et 7 sites accepteurs (voir 1.5.2.1 : "Épissage").

La LCR est une région de 850 pb chez HPV16. Elle est subdivisée en trois régions (Bernard, 2013b). La région 5' contient le signal de terminaison de la transcription des transcrits tardifs, la région centrale contient les éléments activateur et inhibiteur de la transcription et la région 3' l'origine de réplication et le promoteur précoce p97.

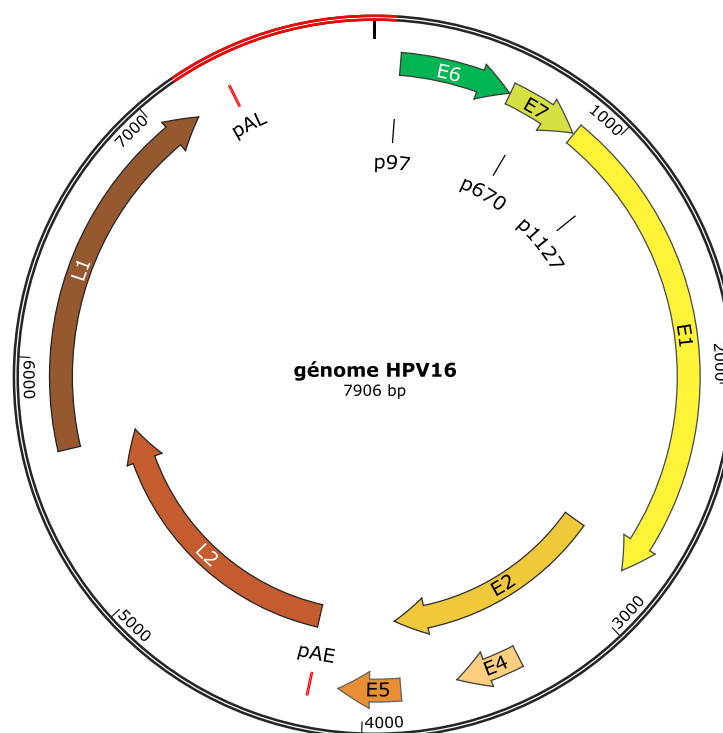


Figure 2 : Génome viral d'HPV16.

Le génome de 7906 pb est composé de 8 phases ouvertes de lecture (POL) toutes codées par le même brin ADN, d'une région de contrôle (LCR, en rouge) et de deux sites de polyadénylation, précoce (pAL) et tardif (pAE). La protéine E4 est traduite à partir du codon ATG de E1 et d'un épissage du transcrit. Une POL E8 a été décrite récemment (voir Figure 16).

1.1.1 HPV cutanés

Les types d'HPV cutanés sont principalement représentés par les genres bêta et gamma, bien que tous les genres d'HPV contiennent des HPV à tropisme cutané (Doorbar *et al*, 2012). Les HPV

Première partie : Revue de la littérature

cutanés du genre bêta comprennent au moins une cinquantaine de type d'HPV, qui ont des caractéristiques propres à leur genre, avec une LCR plus petite que les α -HPV haut risque (HR) et une absence de gène E5 dans la région précoce (Tommasino, 2017). Par exemple, la longueur de la LCR d'HPV5 est de 478 pb alors qu'elle dépasse 800 pb chez les α -HPV, et la région contenant E5 chez les α -HPV est comprise entre 300 et 500 pb, alors que cette région est de 80 pb chez HPV5 (Sankovski *et al*, 2014). Un des réservoirs des β -HPV est le follicule pileux, notamment ceux des sourcils (Boxman *et al*, 1997). Les β -HPV sont en outre détectés dans des lésions cutanées des patients avec une épidermodysplasie verruciforme (EV) (Orth, 2008). Les patients atteints d'EV présentent une susceptibilité accrue aux infections par les HPV5 et 8 notamment, et sont souvent porteurs de mutations dans les gènes *TMC6* et *TMC8* (*EVER1* et *EVER2*), deux gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Tommasino, 2017). Les β -HPV sont de plus suspectés de provoquer des cancers cutanés non mélaniques (Ghittoni *et al*, 2015). En effet, ils participeraient aux stades précoces de la carcinogenèse, mais ne seraient pas indispensables pour le maintien du phénotype cancéreux (Tommasino, 2017). Finalement, les HPV cutanés sont en plus susceptibles de causer des verrues vulgaires, notamment les HPV 2, 27 et 57 du genre alpha, HPV4 du genre gamma et HPV1 du genre mu qui sont les plus fréquemment détectés (Bruggink *et al*, 2012). L'HPV7 est quant à lui responsable des verrues du boucher (Keefe *et al*, 1994).

1.1.2 HPV muqueux

Parmi tous les genres connus, seul le genre alpha possède plus d'une trentaine d'HPV à tropisme muqueux en plus des HPV à tropisme cutané (Doorbar *et al*, 2012). Les HPV muqueux sont classés en plusieurs catégories suivant leur pouvoir carcinogène : les HPV bas risque (BR), dont les types 6 et 11, ne provoquent (quasiment) pas de cancers mais des condylomes acuminés (verrues génitales), ainsi que des papillomatoses respiratoires (Egawa & Doorbar, 2017), alors que les HPV HR sont les types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (Groves & Coleman, 2015), nécessaires mais pas suffisants pour induire un cancer (Klingelhutz & Roman, 2012). Les HPV HR sont responsables de certains cancers ano-génitaux (dont des cancers du col de l'utérus et de l'anus) ainsi que des voies aérodigestives supérieures (VADS), dont l'oropharynx (voir 1.3.3 : "Épidémiologie des cancers associés aux HPV"). Au niveau de la sphère ano-génitale, l'apparition du cancer est précédée par le développement de lésions précancéreuses, susceptibles d'être détectées puis traitées, évitant ainsi l'apparition du cancer.

1.2 L'infection des épithéliums

1.2.1 Le cycle viral

1.2.1.1 Anatomie du col de l'utérus

Le col de l'utérus est une portion conique basse de l'utérus permettant la communication avec le vagin. Il est composé d'un exocol exposé dans le vagin, d'une partie interne nommée endocol, d'une zone de jonction pavimento-cylindrique et parfois d'une zone de transformation (Figure 3). L'exocol est revêtu d'un épithélium de type malpighien non kératinisé composé de cellules basales, parabasales, de cellules intermédiaires et de cellules de la couche superficielle. L'endocol est quant à lui composé d'une monocouche de cellules glandulaires cylindriques. Cet épithélium s'invagine et forme des glandes sécrétant du mucus (www.iarc.fr, *anatomy of the uterine cervix and the transformation zone*).

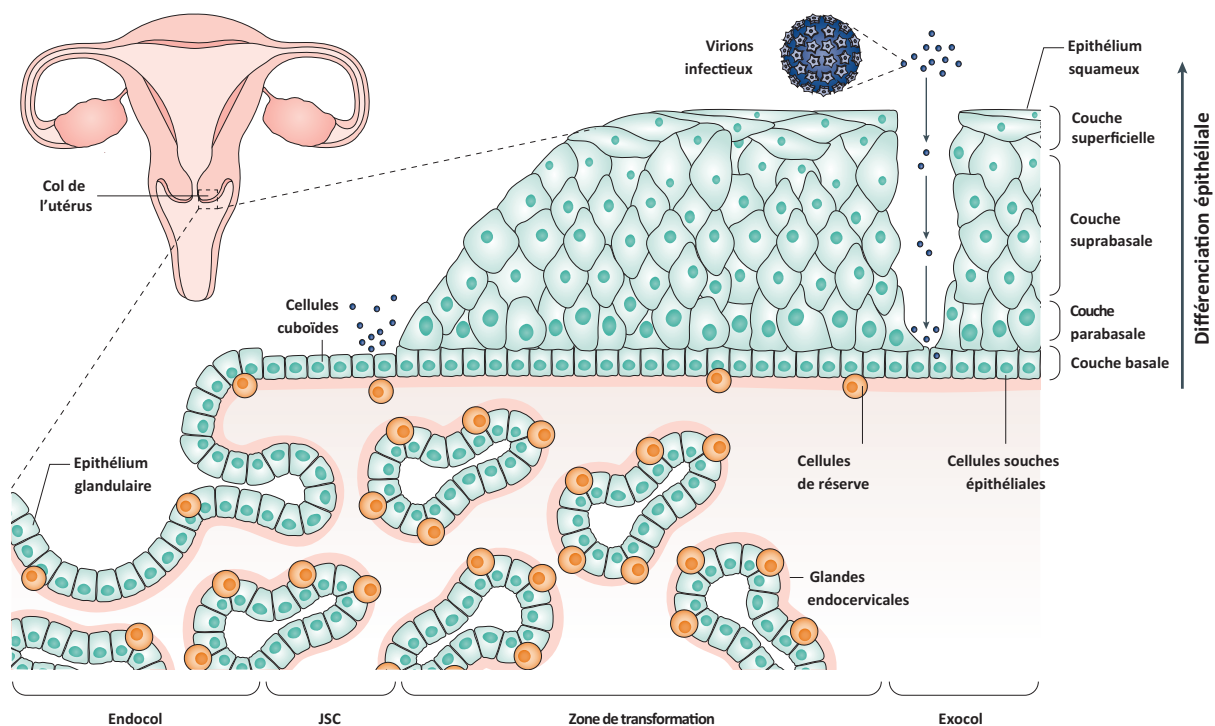


Figure 3 : Histologie du col de l'utérus et possibles zones d'infection des HPV.

Coupe frontale de l'appareil reproducteur féminin (en haut à gauche) et vue schématique du col de l'utérus. L'endocol (à gauche) est composé d'une monocouche de cellules glandulaires, relié par une zone de transition, la jonction squamo-cylindrique (JSC) à l'exocol (à droite) revêtu d'un épithélium malpighien non kératinisé. Les possibles cellules infectées par HPV (ronds bleus) sont les cellules de la JSC, et les cellules basales de l'épithélium malpighien, lorsqu'une brèche dans cet épithélium pluristratifié expose ces cellules au virus. Les infections de l'endocol ne sont pas montrées. Modifié de (Schiffman *et al*, 2016)

La zone de transformation n'est pas présente chez toutes les femmes. Elle est composée d'un ancien tissu de l'endocol exposé à l'acidité présente dans le vagin. Cette exposition provoque une

Première partie : Revue de la littérature

transformation de l'épithélium glandulaire simple en épithélium malpighien et métaplasique. La jonction squamo-cylindrique (JSC) est revêtue d'un épithélium unistratifié comportant en son sein une population discrète de cellules cuboïdes, présentant un profil moléculaire unique par rapport aux tissus de l'endocol et de l'exocol avec une expression spécifique de KRT7 (kératine 7), AGR2 (*anterior gradient 2*) et MMP7 (*matrix metalloproteinase 7*) par exemple. Ces cellules sont considérées comme embryonnaires et seraient les cibles privilégiées des HPV (Herfs *et al*, 2015).

1.2.1.2 De l'entrée du virus à la production de virions

Les HPV sont transmis par contact direct entre deux muqueuses et infectent les tissus de plusieurs manières : soit en infectant les cellules basales de l'épithélium malpighien pluristratifié de l'exocol, en profitant d'une brèche dans l'épithélium (microfissures et blessures), soit en infectant l'endocol ou des cellules cuboïdes de la jonction squamo-cylindrique (Herfs *et al*, 2012; Schiffman *et al*, 2016). De nombreuses protéines sont impliquées dans l'entrée du virus, à savoir les protéoglycanes à héparane-sulfate, les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 4$ et les récepteurs à l'EGF/KGF, mais les HPV peuvent aussi infecter les cellules après s'être associées aux tétraspanines CD (*cluster of differentiation*) 63 et CD151 exprimées à la surface des cellules (Aksoy *et al*, 2017). Plusieurs hypothèses sont avancées sur l'entrée du virus dans la cellule, par exemple par endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline (Bousarghin *et al*, 2003; Laniosz *et al*, 2009), ou par un type particulier de macropinocytose (Schelhaas *et al*, 2012). Après l'endocytose dépendante de la clathrine par exemple, la vésicule perd son manteau de clathrine et fusionne avec des endosomes précoces, puis tardifs, puis des lysosomes (Aksoy *et al*, 2017), contenant des enzymes responsables de la dégradation de L1 (Bienkowska-Haba *et al*, 2012). Cette voie a été décrite pour HPV16, 31 et 58 qui sont alors libérés dans le cytoplasme (Bousarghin *et al*, 2003). Le génome viral, toujours lié à L2, migre ensuite à travers le réseau trans-golgien (Day *et al*, 2013) et le réticulum endoplasmique (Zhang *et al*, 2014) jusqu'au noyau de la cellule (Bronnimann *et al*, 2013). Dans l'endocytose dépendante des cavéoles, les vésicules fusionnent avec des cavéosomes à pH neutre, ce qui permet au virus d'échapper à la dégradation par les endosomes. La cavéoline se lie au cytosquelette d'actine et permet au virus d'être véhiculé jusqu'au réticulum endoplasmique. Cette voie a été décrite pour l'endocytose des HPV31 et 33 (Smith *et al*, 2007). Au niveau basal de l'épithélium, le génome viral est maintenu sous forme épisomale à un faible nombre de copies par cellule, jusqu'à 100 copies/cellule (Groves & Coleman, 2015), et les protéines virales précoces E1 et E2 jouent un rôle clef dans ce processus (Wilson *et al*, 2002). Lorsque les cellules épithéliales prolifèrent et migrent dans la couche parabasale de l'épithélium, elles subissent un programme d'expression génique lié à la différenciation cellulaire (Schiffman *et al*, 2016). Lorsque les cellules migrent au niveau de la couche supra-basale, le génome viral est amplifié, à plus de 1000 copies/cellule (Graham, 2017).

La dernière phase du cycle viral consiste en l'assemblage des virions au niveau des couches les plus superficielles et les plus différenciées de l'épithélium suite à l'expression des protéines de capside L1 et L2 (Doorbar *et al*, 1997). La libération des virions avec les cellules desquamantes reflète une infection productive très contagieuse (Figure 4). Le cycle viral est complexe puisqu'il nécessite un processus de différenciation cellulaire, qui implique des changements d'expression génique et d'épissage des transcrits (Middleton *et al*, 2003).

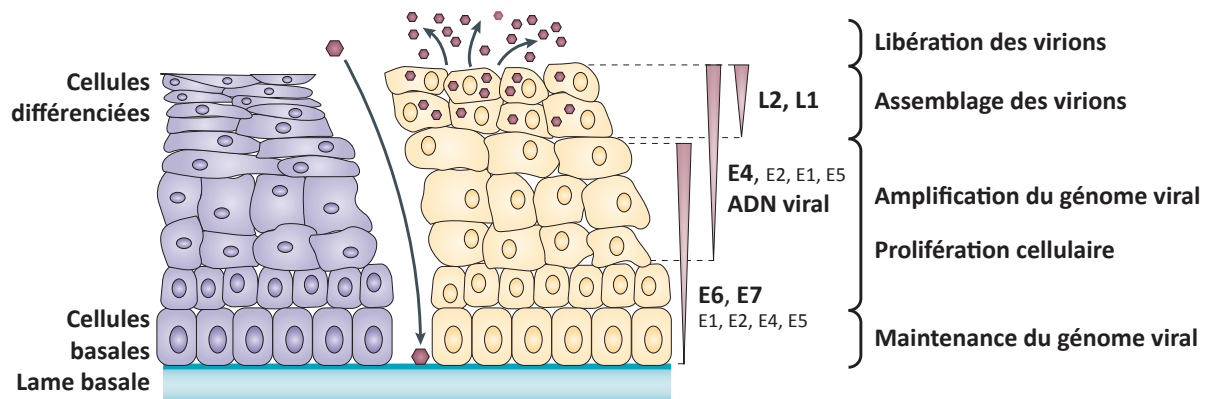


Figure 4 : Déroulement du cycle viral des HPV après infection d'un épithélium malpighien.

Les virions infectent les cellules basales de l'épithélium exposées lors d'une microlésion du tissu. A gauche de la microlésion, un épithélium non-infecté (violet) ; à droite, un épithélium infecté (jaune). Après l'entrée du virus dans les cellules, le génome est maintenu à un faible nombre de copies épisomales dans les cellules et les gènes précoces sont exprimés. Après la division cellulaire, une cellule fille s'éloigne de la lame basale (en bleu), migre à travers l'épithélium et se différencie. Les oncoprotéines virales E6 et E7 maintiennent une prolifération accrue des cellules malgré l'état différencié, ce qui conduit à l'amplification du génome viral. Les protéines de capsides sont exprimées dans la couche superficielle de l'épithélium et permettent l'encapsidation du génome viral pour former de nouveaux virions (hexagones rouges), qui sont libérés des couches les plus hautes de l'épithélium. Schéma modifié d'après (Middleton *et al*, 2003; Moody & Laimins, 2010)

1.2.2 Les différents types d'infection

1.2.2.1 Infections productives, latentes, persistantes

Suite à une infection, un état de non équilibre apparaît durant lequel le virus prolifère et infecte de plus en plus de cellules. La charge virale augmente donc fortement, rendant l'infection productive, puis diminue lorsque la réponse immunitaire se met en place pour éliminer le virus. L'infection est alors qualifiée d'aigüe. Dans 80 à 90% des cas, l'infection par HPV est éliminée dans les deux ans (Moscicki *et al*, 2006). L'hôte et le virus entrent en compétition jusqu'à ce que l'infection soit résolue (on parle alors de clairance), que l'hôte soit tué ou qu'un état d'équilibre perdure : l'infection est alors chronique (Virgin *et al*, 2009; Alizon *et al*, 2017).

Lorsque le génome viral est présent sans expression détectée des gènes viraux, l'infection chronique est latente. Deux hypothèses pour expliquer l'établissement de la latence ont été

Première partie : Revue de la littérature

proposées : soit l'infection aiguë est maîtrisée par le système immunitaire et la charge virale régresse, soit l'infection entre directement en latence sans phase productive ou infection aiguë (Doorbar, 2013). Après un temps variable, la réactivation d'une infection latente est possible, lors d'une immunosuppression qui serait causée par une infection par HIV, ou chez des personnes transplantées et sous immunosuppresseurs par exemple (Maglennon *et al*, 2014), ou souvent sans raison évidente (Alizon *et al*, 2017).

Enfin, une infection chronique est qualifiée de persistante lorsqu'elle n'est pas éliminée et se maintient avec une charge virale ou une expression génique détectable pendant au moins un an. Calculée par une méta-analyse de 2013 regroupant 16 études, la durée médiane de l'infection à HPV16, qui est le type d'HPV le plus persistant (Alizon *et al*, 2017), serait de 12,4 mois (Figure 5) (Rositch *et al*, 2013). La persistance moyenne des infections par HPV16 serait donc de 75% à 6 mois, 55% à 12 mois, 40% à 18 mois, 30% à 24 mois et environ 10% à 36 mois (Rositch *et al*, 2013). Cette diminution de la persistance au cours du temps est beaucoup plus rapide lorsque tous les HPV HR sont pris en compte, avec une durée médiane d'infection de 9,3 mois (15 études) (Rositch *et al*, 2013).

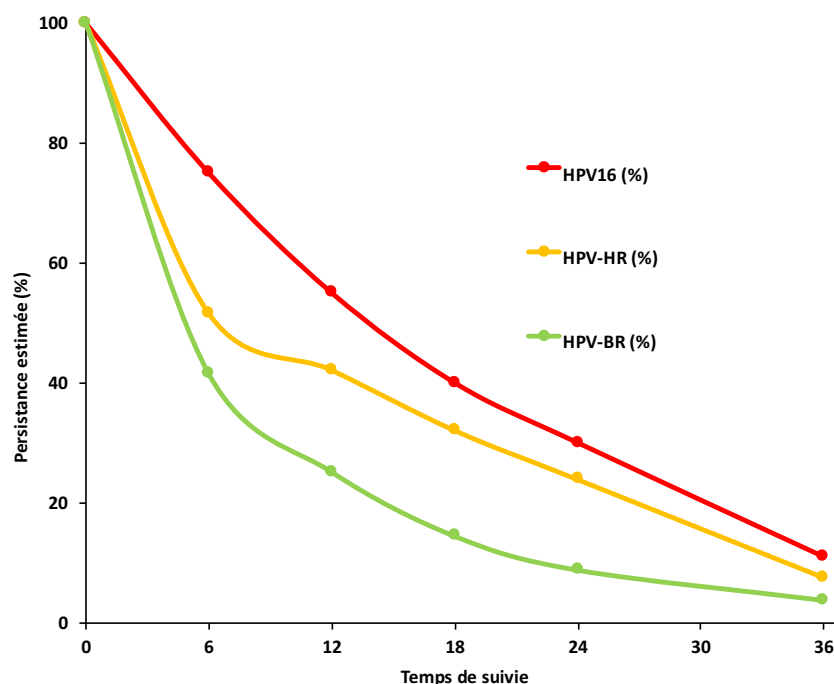


Figure 5 : Persistance des infections HPV au cours du temps.

Estimation de la proportion des infections persistantes au cours du temps pour les infections HPV16 (rouge), HPV HR (jaune) et HPV BR (vert) (Rositch *et al*, 2013)

1.2.2.2 Infections transformantes

Les infections par HPV sont essentielles à toutes les étapes du développement tumoral (initiation, promotion, progression) mais aussi à la maintenance du phénotype cancéreux (Steenbergen *et al*, 2014). Les patients avec une infection persistante à HPV ont une probabilité accrue de développer des lésions précancéreuses et par la suite un cancer au site de l'infection (Shanmugasundaram & You, 2017). Différencier les infections aiguës des infections persistantes permettrait donc d'éviter le surdiagnostic et le traitement excessif des lésions précurseurs du cancer du col de l'utérus (Steenbergen *et al*, 2014), sachant que CIN2 (*cervical intraepithelial neoplasia 2*) productives et CIN2 transformantes ne sont pas distinguables morphologiquement. Les événements clefs permettant la progression des lésions précancéreuses comprennent la persistance de l'infection, la dérégulation de l'expression des oncogènes viraux (E6 et E7) et l'instabilité génomique.

La persistance d'une infection et la progression d'une lésion peuvent être influencées par plusieurs cofacteurs, répartis en trois classes (Schiffman *et al*, 2016) : cofacteurs viraux, liés à l'hôte, et à l'environnement.

Dans la première classe sont inclus le type d'HPV, le variant d'HPV, la charge virale ainsi que la présence de co-infection, qui influencent le risque de développement du cancer. En effet, la majorité des types d'HPV ne permettent pas le développement du cancer (HPV BR), seuls une douzaine d'HPV sont carcinogènes, parmi lesquels HPV16 est le plus carcinogène (Bouvard *et al*, 2009; Kjør *et al*, 2010). Y compris au sein du type HPV16, le variant influence le risque de persistance (Schiffman *et al*, 2010; Gheit *et al*, 2011) (par exemple le variant E-350T persiste plus longtemps que le variant E-350G), ainsi que le risque de cancer, puisque le variant AA d'HPV16 est plus carcinogène que le variant prototype (Richard *et al*, 2010; Niccoli *et al*, 2012). Il a été montré au laboratoire que la charge virale est prédictive du développement d'une CIN2/3 ou d'un cancer (Dalstein *et al*, 2003) et qu'elle est corrélée au grade des lésions du col de l'utérus (Saunier *et al*, 2008).

La deuxième classe de cofacteurs est liée à l'hôte et comprend l'efficacité de la réponse immunitaire, par exemple influencée par les facteurs génétiques de l'hôte comme le type HLA (mutations et polymorphismes) ou par l'infection par le VIH (Schiffman *et al*, 2016; de Martel *et al*, 2015).

Enfin, certains facteurs comportementaux influencent aussi la persistance d'une infection par HPV comme l'âge au premier rapport sexuel, le nombre de partenaires sexuels, la multiparité, l'usage de contraceptifs hormonaux, les infections intercurrentes (i.e. *Chlamydiae trachomatis*), la non-vaccination et la consommation de tabac (Alizon *et al*, 2017; Ferenczy & Franco, 2002; Schiffman *et al*, 2016). Deux études récentes suggèrent en plus que la consommation d'alcool accroît la persistance des infections à HPV HR au niveau du col de l'utérus (Oh *et al*, 2015) et au niveau anal (Moscicki *et al*,

Première partie : Revue de la littérature

2014). L'influence de la plupart de ces cofacteurs comportementaux, avec une augmentation entre 1,5 et 2 du risque relatif de développer des lésions précancéreuses, est toutefois à relativiser comparé aux cofacteurs viraux et à ceux liés à l'hôte (Gargano *et al*, 2012; Schiffman *et al*, 2016).

Un autre événement important dans la progression des lésions associées à HPV est la surexpression anormale des oncogènes viraux (Gray *et al*, 2010). Plusieurs mécanismes moléculaires ont été décrits pour expliquer la dérégulation de E6 et E7, comme la mutation et l'intégration du génome viral, la modification des marques épigénétiques contrôlant l'expression du génome viral, mais aussi l'entrée du virus dans un type de cellule non-permissive à la réplication virale (Steenbergen *et al*, 2014; Groves & Coleman, 2015; Schiffman *et al*, 2016). Cette dernière hypothèse a été proposée à partir d'études récentes signalant que les cellules de la JSC représentent les précurseurs cellulaires probables de la plupart des cancers du col de l'utérus, et qu'au contraire les infections productives ne proviendraient que des infections des cellules de l'exocol ou de la zone de transformation (Herfs *et al*, 2012, 2013; Steenbergen *et al*, 2014; Schiffman *et al*, 2016). Le profil d'expression des protéines bien particulier de ces cellules pourrait créer un environnement propice à la surexpression des oncoprotéines virales, profil qui ne serait pas présent dans les autres types cellulaires infectés. Cette hypothèse est renforcée par le fait que toutes les CIN2/3 étudiées (n=48) présentaient un profil d'expression propre au type JSC (Herfs *et al*, 2012).

La surexpression des oncogènes pourrait être causée par des mutations ponctuelles du génome viral, plus particulièrement au niveau des sites de liaison de facteurs de transcription (FT). Bien que reportées dans des cancers, des mutations et des délétions de la LCR au niveau du site de liaison de YY1, un FT inhibiteur, et de E2, accroissent l'expression des deux oncogènes E6/E7 (Dong *et al*, 1994; May *et al*, 1994; Veress *et al*, 1999). Dans des lésions précancéreuses, des mutations ponctuelles ont été détectées, dont une dans le site de liaison de E2 n°3 (E2BS3, *E2 binding site 3*) (Pientong *et al*, 2013) et dans des sites de liaison aux FT (Sun *et al*, 2013), prouvant que ces mutations ponctuelles peuvent précéder l'apparition du cancer.

Deuxièmement, l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, généralement au niveau de "points chauds" (Schmitz *et al*, 2012), permettrait dans environ 40% des cas la surexpression des oncogènes viraux dans le modèle cellulaire W12 (dérivées de CIN1 avec des copies épisomales, pouvant s'intégrer après stimulation) (Scarpini *et al*, 2014). Le fait que la surexpression des transcrits survienne ou non dépendrait du lieu d'intégration dans le génome cellulaire et de la régulation épigénétique locale (Groves *et al*, 2016). Les intégrations peuvent être de type I, avec une seule copie intégrée, ou de type II, avec plusieurs copies intégrées en concatémères. Lors d'une intégration de type I, le site d'intégration dans le génome viral est généralement situé au niveau de la POL de E2 et il en résulte une perte de fonctionnalité de la protéine ainsi qu'une délétion du site de polyadénylation

précoce (pAE) et des transcrits viraux tardifs (Pett & Coleman, 2007). En conséquence, le site de pAE viral est remplacé par le site de pA cellulaire le plus proche, créant ainsi un transcrit de fusion plus stable et donc une expression accrue des oncogènes et un avantage sélectif pour la cellule (Jeon *et al*, 1995; Jeon & Lambert, 1995). L'intégration de type II maintient certains génomes complets, les concatémères pouvant contenir des centaines de copies. Cependant, très peu sont transcriptionnellement actives, les autres copies étant inhibées par des mécanismes épigénétiques afin d'empêcher à la fois l'expression de E2 et une trop forte expression des oncogènes, délétère pour la survie de la cellule (Van Tine *et al*, 2004; Chaiwongkot *et al*, 2013; Gray *et al*, 2010; Groves & Coleman, 2015).

Troisièmement, des modifications épigénétiques peuvent survenir sur le génome viral, intégré ou non, et provoquer une surexpression de E6 et E7. Ces modifications comprennent la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Alors que la méthylation de l'ADN est considérée comme une marque répressive, une des hypothèses formulées serait que la méthylation surviendrait sur les séquences de liaison à E2, les E2BS, diminuant ainsi l'affinité de E2 pour sa séquence et inhibant la fixation du répresseur transcriptionnel. Cependant, des études contradictoires ont été publiées, certaines décrivant une diminution de la méthylation des E2BS en fonction de la sévérité des lésions, tandis que d'autres signalent l'inverse (Jacquin *et al*, 2014). La fréquence de méthylation des E2BS1 et 2 est en revanche deux fois plus élevée dans les formes épisomales de cancers que dans les formes intégrées (Sun *et al*, 2011; Snellenberg *et al*, 2012; Jacquin *et al*, 2013, 2014), suggérant un réel avantage sélectif de la méthylation des E2BS pour les formes épisomales. Finalement, la modification post-traductionnelle des histones contrôle l'expression des oncogènes. En effet, les marques activatrices ainsi que les enzymes établissant ces marques sont plus présentes au niveau des génomes viraux possédant une forte activité transcriptionnelle, que ceux avec une faible activité, observé par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (Groves *et al*, 2016). Inversement, les marques inhibitrices et leurs enzymes associées sont moins présentes sur des génomes viraux à forte activité transcriptionnelle que ceux avec une faible activité.

Ces différents mécanismes, mutations du génome, intégration du génome, modifications épigénétiques mais aussi entrée du virus dans un type de cellule non-permissive à la réplication virale sont autant de mécanismes favorisant le développement et la progression des lésions en augmentant l'expression des oncogènes E6 et E7. En effet, au sein du transcriptome d'HPV16, la part des transcrits codant E6 augmente de 0% à 4,5% entre les CIN2 et les cancers et celle de E7 augmente de 5,3% à 54,5% (Chen *et al*, 2014a). Mesri et collaborateurs indiquent par ailleurs que ces deux oncoprotéines sont responsables de l'activation de neuf des dix voies favorisant l'oncogenèse (Mesri *et al*, 2014), qui sont considérées comme des marques du cancer par Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Parmi ces neuf caractéristiques sont retrouvées la prolifération accrue, l'immortalisation,

Première partie : Revue de la littérature

l'échappement au système immunitaire, induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion, la dérégulation énergétique, la résistance à la mort, l'élimination des suppresseurs de croissance mais aussi l'instabilité génétique. Comme l'action des oncoprotéines virales est nécessaire mais pas suffisante pour provoquer un cancer, prouvé par le fait qu'une fraction seulement des lésions CIN3 progresse effectivement vers un cancer invasif après des années (Ostör, 1993; McCredie *et al*, 2008; Steenbergen *et al*, 2014), l'activation des voies conduisant à l'instabilité génétique est sans doute un des facteurs principaux de la progression des lésions vers un phénotype cancéreux (voir 1.4.3 : "E6 et E7 favorisent une instabilité génétique").

1.2.3 Réponse immunitaire à l'infection aux HPV

Les HPV sont des virus qui se répliquent plutôt lentement, comparé à la plupart des autres virus (Steinbach & Riemer, 2018). En effet, dans des modèles animaux, la production de protéines de capsid est détectée au bout de trois semaines et le développement des lésions épithéliales est visible en un mois après le début de l'infection (Doorbar, 2018). Ainsi, bien que l'organisme possède de nombreuses défenses contre les infections, les HPV ont développé des stratégies pour éviter leur détection par le système immunitaire (SI) et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (Doorbar, 2018; Steinbach & Riemer, 2018). L'infection par HPV peut donc persister plusieurs mois voire années avant d'être éliminée par le SI.

1.2.3.1 Réponse immunitaire

La première ligne de défense contre l'infection est la réponse immunitaire innée, qui comprend des mécanismes physiques et des cellules immunitaires (Moerman-Herzog & Nakagawa, 2015). Par exemple, la barrière épithéliale et le mécanisme de desquamation de l'épithélium font partie du SI inné puisqu'ils empêchent la pénétration des agents pathogènes et les éloignent de l'épithélium, évitant ainsi l'infection des kératinocytes. Dans les épithéliums muqueux, la sécrétion d'un fluide visqueux contenant des peptides antimicrobiens protège aussi des infections (Westrich *et al*, 2017).

Parmi les cellules du SI inné, sont retrouvées les cellules permettant une réponse immédiate au pathogène, comme les cellules dendritiques, LC (cellules de Langerhans), NK (*natural killer*) et les kératinocytes eux-mêmes. Ces derniers expriment des protéines du PRR (*pattern recognition receptors*) permettant la détection de l'infection (Moerman-Herzog & Nakagawa, 2015), dont TLR9 (*toll like receptor 9*), localisé au niveau des endosomes et qui reconnaît l'ADN double brin non méthylé, un PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) (Hopcraft & Damania, 2017). La reconnaissance d'un PAMP par un PRR active la cascade de signalisation liée à NF- κ B et IRF3/7, la première induisant la production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme TNF α , TGF β , IL-1, -4, -8, -13, CCL2 et 20

et CXCL10 (Moerman-Herzog & Nakagawa, 2015), la deuxième induisant l'expression et la sécrétion d'IFN β et donc un état antiviral grâce à l'activation de la réponse interféron (IFN) de type I (Hopcraft & Damania, 2017).

De plus, il a été suggéré que l'infection par HPV activait une autre famille de récepteurs PRR que les TLR, comme les RLR (*RIG-I-like receptors*), qui détectent l'ADN double brin cytosolique étranger (Doorbar, 2018). L'activation du RLR cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*) induit indirectement l'activation de STING (*stimulator of interferon genes*), une protéine régulatrice qui une fois activée stimule la voie IFN type I (Moerman-Herzog & Nakagawa, 2015; Hopcraft & Damania, 2017; Doorbar, 2018; Steinbach & Riemer, 2018). Par effet autocrine et paracrine, cet état antiviral permet à la cellule infectée et aux cellules environnantes d'augmenter l'activation de gènes dits ISG (*interferon-stimulated genes*) comme des PRR, cytokines et chimiokines amplifiant la réponse inflammatoire, permettant le recrutement des cellules immunitaires professionnelles, comme les neutrophiles, LC, LT, et cellules Th1 (*T helper 1*), et initiant une réponse adaptative (Moerman-Herzog & Nakagawa, 2015; Hopcraft & Damania, 2017).

Des kératinocytes au repos n'expriment pas les protéines nécessaires à l'activation complète des cellules T, à savoir CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), CD80 et CD86. Cependant, les kératinocytes stimulés par IFN- γ , produit par les cellules NK ou T activées, augmentent l'expression du CMH II et de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), et sont ensuite capables d'apprêter des peptides viraux et d'amorcer une réponse LT mémoire spécifique (Black *et al*, 2007).

Par ailleurs, la réponse immunitaire adaptative semble requise pour éliminer les cellules infectées par HPV (Westrich *et al*, 2017). En effet, le taux de régression des lésions précancéreuses du col de l'utérus est corrélé à la présence de LT cytotoxiques exprimant la granzyme B (Woo *et al*, 2008). En plus, la suppression systémique du SI par exposition aux UVB (ultraviolets B) rend les souris hautement susceptibles aux infections par le MmuPV1 (*Mus musculus* PV 1) (Uberoi *et al*, 2016). En outre, les patients avec un SI défaillant, que ce soit de manière iatrogénique, viral avec le VIH ou génétique, ont un risque accru de développer des cancers associés aux HPV (Denny *et al*, 2012; Wieland *et al*, 2014; Dotta *et al*, 2011). Ces observations suggèrent une implication de l'immunité adaptative dans le contrôle de l'infection par HPV.

1.2.3.2 Échappement au système immunitaire

Le cycle viral étant de plusieurs semaines, les HPV ont développé des stratégies pour échapper à la détection de l'infection et à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (Doorbar, 2018; Steinbach & Riemer, 2018) :

- L'infection et le cycle viral génèrent un environnement anti-inflammatoire et n'induisent ni inflammation, ni virémie, ni lyse cellulaire (le cycle viral n'est pas lytique) (Stanley & Sterling, 2014).

Première partie : Revue de la littérature

- Les papillomavirus infectent les cellules épithéliales et ne franchissent pas la lame basale, où les cellules immunitaires sont plus abondantes (Steinbach & Riemer, 2018).
- Les protéines virales sont très faiblement exprimées au début de l'infection (dans les couches basales et parabasales de l'épithélium) et le génome viral est maintenu à un faible nombre de copies par cellule (<100) (Hoffmann *et al*, 2006; Doorbar, 2018).
- Aucune des protéines virales n'est sécrétée.
- L'expression accrue des gènes viraux et l'augmentation du nombre de copies virales sont localisées dans les couches supérieures de l'épithélium, où les cellules immunitaires (cellules T et dendritiques) sont moins abondantes (Stanley & Sterling, 2014).
- Les particules virales ne sont libérées de la cellule infectée qu'au niveau de la surface de l'épithélium (Stanley & Sterling, 2014).
- Les HPV retardent la réponse immunitaire adaptative en inhibant la rétention des cellules de Langerhans au niveau du site de l'infection (Guess & McCance, 2005; Matthews *et al*, 2003).

Au niveau moléculaire, la protéine E5 contribue à l'échappement à la réponse immunitaire (voir 1.4.4 : "L'oncoprotéine E5"), par exemple en inhibant la présentation des peptides viraux par le CMH I (Campo *et al*, 2010). L'expression du CMH I est aussi diminuée par la protéine E7 (Georgopoulos *et al*, 2000).

- La protéine E5 diminue des signaux requis pour l'activation des cellules NK, comme la protéine CD1d, ce qui inhibe la réponse immunitaire (Miura *et al*, 2010; Doorbar, 2018).
- La protéine E6 interagit avec p300/CBP et E7 avec PCAF, ce qui inhibe l'expression du gène *CXCL8*, codant l'IL-8. En effet, après stimulation au TNF α , *CXCL8* est régulé par NF- κ Bp65 et requiert des coactivateurs comme p300/CBP et PCAF (Huang & McCance, 2002; Durzynska *et al*, 2017). E6 et E7 perturbent donc le complexe activateur et inhibent la production d'IL-8, ce qui réduirait l'importance de la réponse immunitaire.
- L'expression des protéines E6 et E7 provoque une inhibition de la réponse interféron de type I, par le biais de l'inhibition de la phosphorylation de STAT (E6 et E7), l'inhibition de la fonction de Tyk2 (E6) ainsi que l'inhibition des effets d'IRF1 (E7) (Li *et al*, 1999; Kanodia *et al*, 2007; Doorbar, 2018). En effet, E7 forme un complexe IRF1-E7-Mi2 β -HDAC qui reconnaît l'élément IRFRE du promoteur de *IFNB1* (codant IFN β) et induit l'inhibition de l'expression du gène par la désacétylation des histones (Park *et al*, 2000).
- La production d'IFN β est aussi inhibée par l'interaction de E6 avec IRF3. Cette interaction ne provoque pas la dégradation de IRF3 mais empêche la transactivation du gène *IFNB1* (Ronco *et al*, 1998).
- La protéine E7 inhibe l'expression de *TLR9*, ce qui inhibe la réponse interféron de type I. En effet, E7 favorise la formation du complexe contenant NF- κ Bp50-p65, E α , JARID1B et HDAC1, qui

se lie au promoteur de *TLR9* et induit sa répression par déméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) et désacétylation de l'histone 4 (H4ac) (Hasan *et al*, 2013).

- Enfin, la protéine E7, qui interagit avec la protéine STING, est un inhibiteur de la voie de signalisation cGAS/STING, empêchant la réponse IFN type I (Lau *et al*, 2015; Doorbar, 2018).

En conclusion, le devenir d'une infection est conditionné par la balance entre l'efficacité des réponses antivirales et l'échappement aux SI inné et adaptatif.

1.3 Lésions et cancers associés aux HPV

1.3.1 Nomenclature et classifications des lésions

L'expression des protéines oncogènes du virus à l'intérieur de la cellule induit une prolifération non contrôlée et accrue des cellules, conduisant au final à des lésions de l'épithélium le plus souvent bénignes, mais parfois précancéreuses et cancéreuses (voir 1.4 : "Les oncoprotéines virales"). Entre 1908 et 1912 a été développée l'idée que le cancer du col de l'utérus était précédé d'une phase de croissance intraépithéliale (Shaw, 2000). Schiller a même été le premier à proposer le terme de cancer pré-invasif qui est défini comme une atypie cytologique sans invasion à travers la lame basale (Schiller, 1928), avant que cette terminologie ne soit remplacée par carcinome *in situ*. Dans les années 1940, il a été constaté que ces anomalies pré-invasives du col de l'utérus précèdent de plusieurs années le carcinome invasif, Younger qualifiant même la maladie d'évitable (Shaw, 2000). L'introduction de tests de dépistage a demandé en contrepartie un besoin de classer les lésions en fonction de leur sévérité afin de prédire le risque de futurs cancers. Plusieurs nomenclatures histologiques et cytologiques ont été proposées (Figure 6), suivant le type d'analyses effectuées (Schiffman *et al*, 2016).

Le système histologique pour le diagnostic comprend deux classifications, celle de Richart et celle de LAST.

- La classification de Richart, classant les CIN (*cervical intraepithelial neoplasia*), distingue les dysplasies légères ou CIN1, des dysplasies modérées ou CIN2 et des dysplasies sévères ou CIN3. La distinction entre CIN1, 2 et 3 est réalisée à partir de la fraction de l'épithélium remplacée par des cellules indifférenciées, soit un tiers, deux tiers ou la totalité pour les CIN1, CIN2 et CIN3, respectivement.

- Aux Etats-Unis, le système LAST (*lower anogenital squamous terminology*) est utilisé et ne comprend que deux niveaux pour classer les lésions précancéreuses : LSIL (*low-grade squamous intraepithelial lesions*), et HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) qui regroupe en fait les CIN2 et les CIN3.

Première partie : Revue de la littérature

Le système cytologique utilisé pour le dépistage comprend la classification de l'OMS, "Pap" (pour Papanicolaou) et Bethesda.

- Avant les classifications actuelles, les lésions étaient décrites sous des termes divers comme condylome plan, condylome atypique, verrue atypique, infection subclinique à papillomavirus, atypie koïlocytaire, condylomatose atypique, ce qui entraînait une confusion. L'OMS proposa donc au début des années 1960 la classification sous les termes dysplasie légère, moyenne/modérée et sévère et carcinome *in situ*.
- La classification Pap mesure la sévérité des lésions sur une échelle de I à V, basée sur le degré de différenciation cellulaire et les atypies cytologiques, comme des anomalies mitotiques et des modifications dans la taille et la forme des noyaux. Elle est encore utilisée à ce jour en Allemagne.
- Enfin, le système Bethesda classe les échantillons cytologiques en NILM (*negative for intraepithelial lesion and malignancy*), en atypie des cellules malpighiennes (ASC) de signification indéterminée (ASC-US, *atypical squamous cells of undetermined significance*), ou ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (ASC-H) LSIL, HSIL et carcinome malpighien. En plus des anomalies des cellules malpighiennes, des anomalies des cellules glandulaires sont observables, comme les atypies (AGC, *atypical glandular cells*), les adénocarcinomes *in situ* (AIS), et les adénocarcinomes (ADC).

Histologie		Cytologie			Moléculaire
Richart	LAST	Pap	OMS	Bethesda	
Normal	Normal	I	Négative	NILM	Normal
		II	Atypie Malpighienne	ASC-US/-H	
CIN1	LSIL	III	Légère	LSIL	infection HPV
		IIID			
CIN2			Moyenne		
CIN3	HSIL	IV	Sévère	HSIL	Pré-cancer
Cancer	Cancer	V	Cancer	Cancer	Cancer

Figure 6 : Classification histologique et cytologique des lésions du col de l'utérus suivant les différents systèmes.

D'après (Schiffman *et al*, 2016)

1.3.2 Prévalence et histoire naturelle des infections par HPV

En 2008, la prévalence mondiale des HPV HR et BR au niveau du col de l'utérus était de 11% à 12% chez les femmes, estimée par une méta-analyse sur plus d'un million d'analyses cytologiques sans anomalie (Bruni *et al*, 2010; Forman *et al*, 2012). Il existe cependant une grande disparité

géographique, puisque cette prévalence est de 35,4% aux Caraïbes et de 1,7% en Asie de l'ouest. Il existe aussi une différence de prévalence en fonction de l'âge, qui est de l'ordre de 20% chez les jeunes femmes de 18 à 25 ans puis qui diminue jusqu'à 10% pour les adultes de plus de 65 ans. Il existe aussi une variabilité géographique importante : la diminution de la prévalence en Amérique du Nord est continue et décroît de plus de 20% (moins de 25 ans) à moins de 5% (plus de 65 ans), alors que la prévalence en Afrique diminue de plus de 30% à 20% entre les moins de 25 ans et les plus de 65 ans. (Forman *et al*, 2012). En France, il a été montré une prévalence globale des HPV de 23%, avec un pic d'infection de 32% chez les jeunes femmes âgées de moins de 20 ans (Heard *et al*, 2011).

La détection d'ADN d'HPV augmente parallèlement à la sévérité des lésions du col de l'utérus : 12% dans une cytologie normale, 73% dans une CIN1, 86% dans une CIN2, 93% dans une CIN3 et 89% dans un cancer du col de l'utérus (Figure 7) d'après une méta-analyse de Forman et collaborateurs (Forman *et al*, 2012). La prévalence serait même potentiellement de 100% pour les carcinomes du col de l'utérus invasifs comme le montre le taux de 99,7% de détection d'HPV dans une étude de Walboomers et collaborateurs (Walboomers *et al*, 1999). Le type 16 est le plus fréquemment retrouvé dans les cancers, suivi du type 18, et sont à eux deux responsables d'environ 70% des cancers du col de l'utérus.

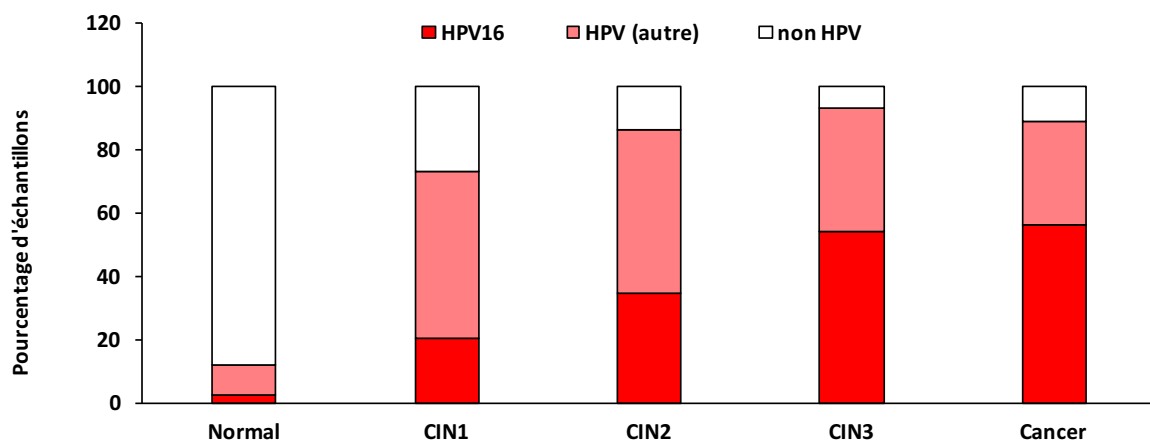


Figure 7 : Prévalence des HPV dans des échantillons du col de l'utérus normal ou lésionnel.
Graphique représentant les résultats d'une méta-analyse sur la prévalence d'HPV16 et des autres HPV en fonction de la sévérité des lésions. (Forman *et al*, 2012)

L'infection par HPV est dans la majorité des cas asymptomatique et éliminée par le système immunitaire (voir 1.2.3 : "Réponse immunitaire à l'infection aux HPV") mais conduit dans de très rares cas à l'apparition d'un cancer (Tableau I). Généralement, le développement d'un cancer est précédé par des lésions précancéreuses, et le processus dure normalement plusieurs dizaines d'années (Richart & Barron, 1969). Les femmes avec une infection persistante sont les plus susceptibles de développer des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus selon un continuum CIN1, CIN2, CIN3 et

Première partie : Revue de la littérature

cancer invasif. Mais les lésions précancéreuses sont aussi susceptibles de régresser. La probabilité de régression est fonction de la gravité de la lésion (de 32% pour une CIN3 à 57% pour une CIN1) (Figure 8). La progression vers un cancer invasif a été estimée à 1% pour les CIN1, 5% pour les CIN2 et 12% pour les CIN3 (Ostör, 1993; Syrjänen, 1996; Melnikow *et al*, 1998).

Tableau I : Histoire naturelle des CIN.

Résultats obtenus à partir d'une méta-analyse montrant le potentiel évolutif des CIN, d'après (Ostör, 1993)

Lésion	Régresse (%)	Persiste (%)	Progresse (CIN3) (%)	Progresse (ICC) (%)
CIN1	57	32	10	1
CIN2	43	35	17	5
CIN3	32	56		12

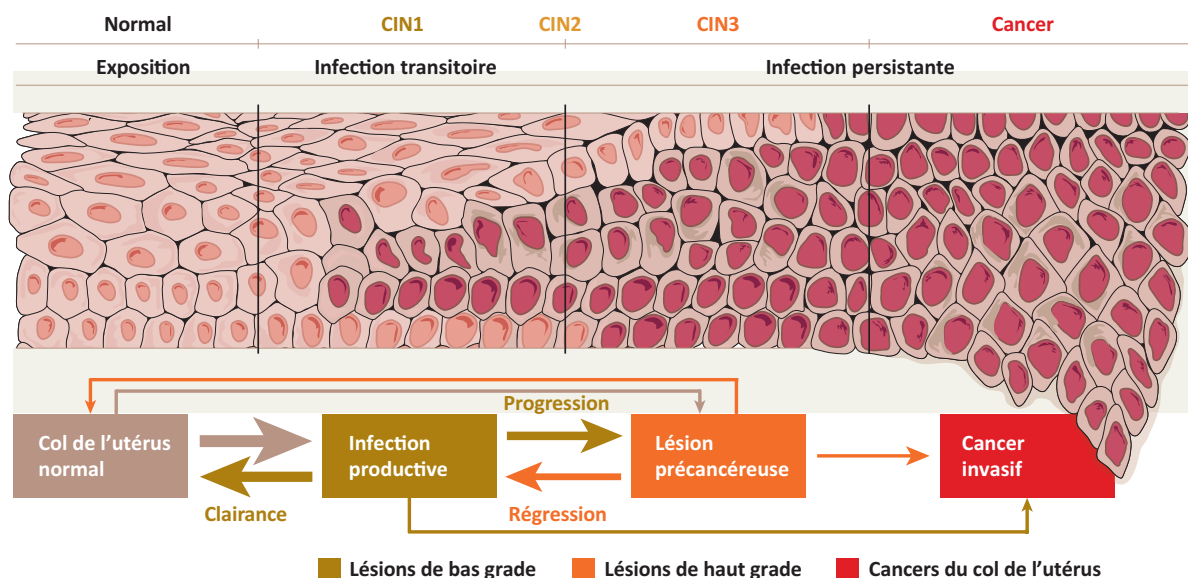


Figure 8 : Histoire naturelle des lésions du col de l'utérus.

Représentation de l'évolution des lésions de l'épithélium malpighien du col de l'utérus (en haut) normal (à gauche) jusqu'à une tumeur invasive (à droite). Représentation schématisée du potentiel évolutif des lésions (en bas). La probabilité pour une lésion d'évoluer est représentée par l'épaisseur arbitraire des flèches. (Crow, 2012)

1.3.3 Épidémiologie des cancers associés aux HPV

Les HPV sont responsables de la quasi-totalité des cancers du col de l'utérus, 90% des cancers de l'anus, 50% de cancers du pénis, 70% des cancers du vagin, 40% des cancers de la vulve et de 13% à 56% (suivant la zone géographique) des cancers de l'oropharynx (Figure 9), principalement au niveau des amygdales et de la base de la langue (Forman *et al*, 2012). L'incidence de tous les cancers induits par HPV était de 610 000 cancers en 2008 (de Martel *et al*, 2012) et de 634 000 à 640 000 en 2012 (Plummer *et al*, 2016; Schiffman *et al*, 2016). Pour le col de l'utérus uniquement, le nombre de cancers

était de 528 000 en 2012, 570 000 estimé en 2018 (Bray *et al*, 2018) et devrait même atteindre 770 000 en 2030, avec une large hausse portée par les régions du monde les moins développées à cause de l'accroissement démographique (Forman *et al*, 2012). Les nouveaux cas de cancers en 2012 étaient majoritairement localisés au niveau du col de l'utérus avec 528 000 cas, alors que la somme des cinq autres sites représentait seulement 106 000 cas (Figure 9).

En conclusion, alors qu'environ 15% des cancers dans le monde sont d'origine infectieuse avérée (Plummer *et al*, 2016), les HPV contribuent de manière importante aux nouveaux cas de cancers attribuables à un agent infectieux avec 29% des nouveaux cas, derrière *Helicobacter Pylori* mais devant le virus de l'hépatite B (HBV).

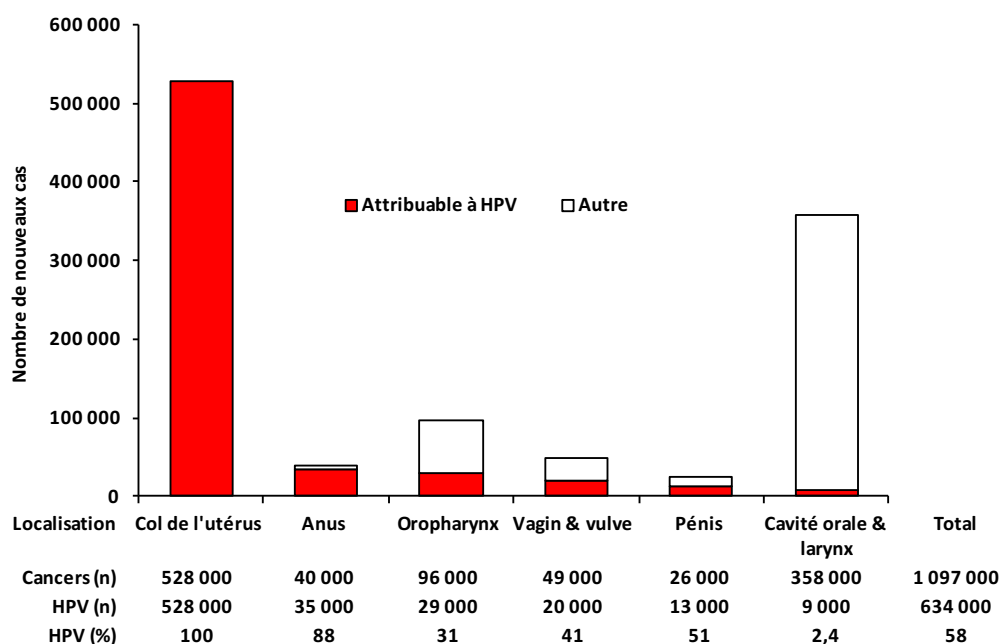


Figure 9 : Estimation mondiale de l'incidence des cancers attribuables aux HPV.

Cancers attribuables à HPV en 2012 (en rouge) par rapport au nombre total de cancers par site. Cancers (n) : cancer total par site ; HPV (n) : nombre de cancers attribuables à HPV ; HPV (%) : pourcentage de cancers attribuables à HPV par site

1.3.4 Prévention et traitements des lésions et des cancers

Dans les années 1940, le cancer du col de l'utérus était le plus meurtrier aux États-Unis (Safaeian & Solomon, 2007). Cependant, l'incidence de ce cancer ainsi que la mortalité associée ont décru de plus de 70% depuis les années 1950, en particulier dans les pays développés, grâce à l'introduction du dépistage des lésions précancéreuses, aussi appelé prévention secondaire. En plus de ce dépistage, une prévention primaire efficace est accessible depuis 2008 avec la commercialisation de trois vaccins contre les HPV les plus carcinogènes. Enfin, depuis le début du XXème siècle, de nouveaux traitements

Première partie : Revue de la littérature

sont apparus contre le cancer du col de l'utérus, permettant une meilleure survie à 5 ans après diagnostic.

1.3.5 Prévention secondaire

En 1928, George Nicolas Papanicolaou explique dans une communication que le frottis cervico-utérin permet de distinguer les cellules saines des cellules cancéreuses. Il faut attendre 1939 pour qu'il identifie en collaboration avec Herbert Traut des cellules anormales dans des frottis de femmes asymptomatiques. Grâce à ces résultats, les deux collaborateurs publient en 1943 un article scientifique ainsi que le livre fondateur sur la pathologie du col utérin, *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear*, et la technique du "Pap test" se développe alors en quelques années dans de nombreux pays au monde (Traut & Papanicolaou, 1943; Shaw, 2000; Dachez, 2008).

Aujourd'hui, le dépistage à grande échelle des lésions précancéreuses est encore réalisé par récolte d'échantillons cellulaires grâce au frottis cervico-utérin (FCU) puis par analyse cytologique, soit en cytologie conventionnelle, soit en milieu liquide. Finalement, le FCU ne permet pas l'établissement d'un diagnostic mais débouche sur d'autres tests pour poser un diagnostic final, comme l'inspection visuelle du col, l'histologie des lésions et le test HPV.

L'analyse cytologique repose sur le transfert de l'échantillon cellulaire prélevé lors du frottis sur une lame de verre permettant l'analyse microscopique. La méthode conventionnelle applique les cellules directement sur la lame par frottement de la spatule de prélèvement, puis les cellules sont fixées et l'échantillon est analysé. Cette méthode a été directement développée par George Nicolas Papanicolaou. La cytologie en milieu liquide a été développée dans les années 1990 avec pour objectif un meilleur étalement des cellules. Le transfert du prélèvement sur la lame n'est plus manuel. Le prélèvement est transféré dans un liquide conservateur, centrifugé, puis les cellules sont appliquées en un spot cellulaire sur la lame de verre. Cette technique est avantageuse car :

- Le préleveur de l'échantillon n'applique pas lui-même le prélèvement sur la lame de verre.
- Le dépôt est automatisé, alors que le dépôt manuel nécessite du personnel qualifié et formé.
- La totalité de l'échantillon est récupéré contre environ 25% de manière conventionnelle.
- Les cellules sont disposées régulièrement et sans superposition sur la lame, pour une lecture optimale.

L'amélioration de la sensibilité et de la spécificité par la cytologie en milieu liquide est en revanche controversée, avec une méta-analyse montrant un gain de sensibilité de 68% à 76% et un gain de spécificité de 79 à 86% pour la méthode en milieu liquide comparé à la cytologie conventionnelle (Abulafia *et al*, 2003). Cependant, d'autres études ne rapportent pas de tels gains (Siebers *et al*, 2008; Arbyn *et al*, 2008).

La colposcopie a été développée à partir de 1925 dans le but de détecter des lésions précancéreuses à partir d'une inspection visuelle du col. Dans les années 1970, cette technique est couplée au dépistage cytologique et devient le deuxième temps du dépistage (Dachez, 2008). L'examen se déroule en trois temps, avec un examen du col sans préparation, puis avec ajout d'acide acétique, permettant la coagulation des protéines et donc de distinguer les dysplasies viro-induites riches en nucléoprotéines, et enfin ajout de Lugol qui colore en brun le glycogène et donc les cellules normales. En effet, les cellules différenciées sont plus riches en glycogène que les cellules moins différenciées présentes au sein des métaplasies et lésions précancéreuses. La sensibilité de la colposcopie est de 95% pour une lésion de haut grade et de 85% pour une lésion de bas grade, alors que la spécificité est de l'ordre de 50%, conduisant à des surdiagnostics (Dachez, 2008). L'inspection visuelle est alors complétée par un examen histologique réalisé sur des biopsies des zones les plus suspectes.

L'examen histologique est l'analyse morphologique d'une biopsie prélevée au niveau du col de l'utérus en vue d'établir un diagnostic et de déterminer la nature des anomalies détectées en colposcopie. L'examen permet de discerner les simples métaplasies des CIN1, 2, 3 ou carcinomes invasifs.

Le diagnostic est posé en tenant compte des 3 examens, cytologique, visuel et histologique, et de leur concordance, afin de déterminer si des lésions précancéreuses ou cancéreuses du col sont présentes et de choisir le traitement le plus adapté. Le fait que les examens cytologique et visuel soient subjectifs, et que l'examen histologique soit très localisé et donc pas toujours représentatif de l'ensemble de l'état du col de l'utérus, révèlent les limites des approches morphologiques. C'est pourquoi le test HPV a été introduit pour améliorer le dépistage des lésions.

A partir du postulat selon lequel HPV est une cause nécessaire à l'apparition de tous les cancers du col de l'utérus (Walboomers *et al*, 1999), la détection d'HPV a été ajoutée au dépistage des lésions précancéreuses. Ce test peut être réalisé seul, ou en combinaison avec l'examen cytologique (Schiffman *et al*, 2016). En effet, après obtention d'échantillons à partir de frottis cervico-utérin déposés dans un liquide conservateur, une fraction de l'échantillon est utilisée pour la cytologie et une autre fraction est testée pour la présence d'acides nucléiques d'HPV grâce à des techniques de biologie moléculaire. Le test HPV permet une détection plus précoce des lésions précancéreuses et une réduction du nombre de cancers chez les personnes dépistées (Arbyn *et al*, 2012; Ronco *et al*, 2014). Cependant, la combinaison de ces quatre examens ne permet toujours pas de distinguer les lésions qui vont régresser spontanément de celles qui vont évoluer vers un cancer, c'est pourquoi la recherche de nouveaux marqueurs moléculaires afin de discriminer les infections productives des infections transformantes est toujours d'actualité.

1.3.6 Traitements

1.3.6.1 Traitement des lésions précancéreuses

Les lésions précancéreuses ont un taux important de régression spontanée. Ces lésions ne sont généralement responsables d'aucun signe clinique, elles ne sont pas douloureuses et ne provoquent pas de saignements. Les choix thérapeutiques sont pris en fonction du risque évolutif propre à chaque type de lésions. En effet, pour la prise en charge d'une CIN1, les deux options envisageables sont la surveillance de la lésion sans traitement dans la plupart des cas, au vu de la forte probabilité de régression de la lésion, ou dans une moindre mesure le traitement par la vaporisation des cellules de la zone ciblée avec un laser CO₂, qui permet de détruire la lésion (Dachez, 2008).

Une lésion CIN2/CIN3 est systématiquement prise en charge afin qu'elle n'évolue pas vers un cancer. Le traitement de la lésion de haut grade consiste le plus souvent en une exérèse totale de la lésion au bistouri ou à l'anse diathermique ; l'analyse de la pièce prélevée dans un laboratoire d'anatomo-pathologie permet de s'assurer qu'il n'existe pas de signe d'invasion. Si le taux de guérison d'une CIN2/3 est de 95 à 98% (Dachez, 2008), les patientes traitées doivent toutefois être suivies attentivement car le risque ultérieur de développer un cancer invasif est 2 à 5 fois plus élevé chez ces femmes par rapport à la population générale (Mergui *et al*, 2008).

1.3.6.2 Traitement des cancers du col de l'utérus

Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, le seul traitement disponible était la chirurgie (Hellman *et al*, 2014). Cependant, pour la première fois en 1912, le chirurgien américain Robert Abbe utilise du radium pour traiter un carcinome du col de l'utérus, annonçant les débuts de la radiothérapie (Hellman *et al*, 2014). Finalement, des études cliniques ont été réalisées en 1981 pour traiter par chimiothérapie des cancers du col de l'utérus avancés ou récurrents. Le premier traitement de chimiothérapie était à base de cisplatine, encore utilisée actuellement (Thigpen *et al*, 1981; Tsuda *et al*, 2016). La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont toujours les trois méthodes prépondérantes utilisées pour traiter les cancers du col de l'utérus, même si plus récemment des immunothérapies sont en cours de test.

La chirurgie a pour but l'ablation de tout le volume tumoral et de ses prolongements infracliniques éventuels (Dachez, 2008), et consiste en l'exérèse localisée, c'est à dire la conisation ou l'amputation intravaginale du col, en l'hystérectomie, avec ou sans ablation des trompes utérines et des ovaires, ou encore en la lymphadénectomie qui est l'ablation des ganglions locorégionaux en cas de métastases ganglionnaires.

La radiothérapie est systématiquement utilisée, avec la radiothérapie externe et la curiethérapie. La radiothérapie externe utilise un accélérateur de particules pour produire des photons de haute énergie et délivrer de 40 à 60 Gy de manière homogène au niveau de la tumeur. La curiethérapie est l'utilisation de sources radioactives placées dans le vagin directement en contact ou proche de la tumeur afin de la détruire. Elle est pratiquée soit en quelques jours à l'hôpital si une source radioactive à bas débit de dose est utilisée (www.cancer.org), soit en ambulatoire lorsque des sources radioactives à haut débit de dose, c'est à dire 10 000 fois plus actives, sont utilisées (Dachez, 2008).

Enfin, la chimiothérapie est administrée en association avec la radiothérapie, afin de rendre les cellules cancéreuses radiosensibles et ainsi augmenter la réponse au traitement. Elle est composée de cisplatine avec ou sans 5-fluorouracile. Si la tumeur est métastatique, les traitements le plus souvent utilisés sont le cisplatine, le carboplatine, le paclitaxel, le topotécan ou encore la gemcitabine.

La survie à un cancer du col de l'utérus est fonction du stade, de la taille de la tumeur et de l'envahissement ganglionnaire. La survie à cinq ans est de 85 à 99% au stade Ia ou Ib, 60 à 80% au stade II, 30 à 60% au stade III et 10 à 20% au stade IV.

Des thérapeutiques ciblées ont été développées récemment. Alors qu'elles n'étaient pas encore disponibles en 2016 (Schiffman *et al*, 2016), une étude clinique de phase III en 2017 a montré l'efficacité d'un traitement combinant cisplatine, paclitaxel et bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant et inactivant le VEGF, en augmentant la survie globale de 13,3 (bras contrôle sans bevacizumab) à 16,8 mois pour des patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus métastatique récurrent ou persistant (Tewari *et al*, 2017; Marquina *et al*, 2018).

Finalement, le développement de nouveaux traitements est toujours d'actualité, et une partie des études se concentre sur la médecine personnalisée et l'utilisation d'inhibiteurs des DNMT (DNA méthyltransférases, voir 2.1.1 : "Inhibiteurs de DNMTs").

1.3.6.3 Traitement des cancers aux autres localisations

Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement spécifique des cancers induits par HPV, qu'ils soient localisés au niveau anogénital ou au niveau des VADS (voies aérodigestives supérieures). En effet, les traitements sont classiques et consistent en une chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Pourtant, il existe des différences entre les tumeurs des VADS induites ou non par HPV, avec par exemple une meilleure survie globale du patient si la tumeur est HPV positive par rapport à des tumeurs HPV négatives, ce qui suggère un profil moléculaire et des mécanismes biologiques de carcinogenèse distincts entre ces deux types de tumeurs (Jung *et al*, 2010).

Première partie : Revue de la littérature

Alors qu'une sous-population de tumeurs est présentée comme de mauvais pronostic même au sein des tumeurs présentant le génome d'HPV, Jung et collaborateurs précisent en plus que la distinction entre présence et absence d'ARN E6/E7 d'HPV, c'est à dire entre copies transcriptionnellement actives ou non, au sein de la tumeur pourrait être indicatif d'une implication causale d'HPV dans la carcinogenèse (Jung *et al*, 2010). Cette distinction des tumeurs contenant des ARN d'HPV par rapport à celles n'en présentant pas permettrait d'améliorer la stratification des patients et donc leur pronostic, ce qui au final aiderait à ajuster les doses des traitements de radio-chimiothérapies pour en limiter les effets secondaires. Les essais cliniques menés dans ce but présentent d'ailleurs des résultats encourageants, avec quatre stratégies différentes : le remplacement du cisplatine par un anticorps ciblant l'EGFR, le cetuximab ; la réduction des doses ou volumes de radiothérapie pour les patients répondant à la chimiothérapie ; la radiothérapie seule et enfin l'utilisation de la chirurgie robotique par voie transorale (Mirghani & Blanchard, 2018)

1.3.7 Prévention primaire

Actuellement, le vaccin Cervarix® bivalent (bHPV) qui protège des infections à HPV16 et 18, et les vaccins Gardasil® quadrivalent (4vHPV) et nonavalent (9vHPV) qui protègent des infections à HPV6, 11, 16, 18 ainsi que 31, 33, 45, 52 et 58 pour le vaccin 9vHPV ont été approuvés par l'Union Européenne pour protéger des infections à HPV depuis 2006 pour les deux premiers vaccins et 2015 pour le 9vHPV. Tous les vaccins sont composés d'adjuvants et de VLP (*virus-like particle*) qui sont un assemblage de protéines L1 mimant les virions HPV non infectieux puisque ne possédant pas de génome viral (De Vincenzo *et al*, 2014). En France, la vaccination est recommandée avec deux doses à 6 à 13 mois d'intervalle pour les filles de 11 à 14 ans révolu, avec un rattrapage à trois doses chez les jeunes filles âgées de 15 à 19 ans révolu. A l'exception des jeunes homosexuels et des hommes présentant un déficit immunitaire, le vaccin n'est pour l'instant pas recommandé chez les garçons en France, contrairement à d'autres pays comme l'Australie, la Suisse ou l'Autriche.

Les vaccins bHPV et 4vHPV protègent potentiellement contre les HPV responsables de 70% des cancers du col de l'utérus, alors que le vaccin 9vHPV protège contre ceux responsables de 90% des cancers du col de l'utérus. A titre d'exemple, en Australie, pendant les six ans suivant l'introduction du vaccin, la prévalence des infections à HPV6, 11, 16 et 18 a décru de 86% chez les femmes vaccinées avec trois doses de vaccins 4vHPV par rapport aux femmes non vaccinées, et cette diminution était même de 89% aux États-Unis (Garland *et al*, 2016). Le vaccin 9vHPV possède la même immunogénicité et la même efficacité que le vaccin qHPV pour les types en commun, mais prévient en plus les infections et les lésions induites par HPV31, 33, 45, 52 et 58 avec par exemple une efficacité de 97,4% sur les lésions de haut grade du col de l'utérus, de la vulve et du vagin (Huh *et al*, 2017).

Tous les essais cliniques randomisés avec les vaccins bHPV et 4vHPV apportent la preuve de leur excellent profil d'innocuité (De Vincenzo *et al*, 2014). L'incidence des effets indésirables est similaire par rapport au groupe témoin et aucun risque accru de maladie auto-immune n'a été observé dans la population vaccinée sur le long terme (De Vincenzo *et al*, 2014). Le vaccin 9vHPV possède un profil d'innocuité similaire au 4vHPV, avec cependant un nombre plus important de réactions au site d'injection (Huh *et al*, 2017).

La couverture vaccinale varie grandement suivant les pays, avec par exemple 87% de couverture au Portugal, contre moins de 20% en France (Garland *et al*, 2016). Lors d'une méta-analyse, Drolet et collaborateurs ont montré qu'une couverture vaccinale chez les femmes supérieure à 50% offrait une immunité de groupe car la prévalence des verrues anogénitales diminue aussi chez les hommes non vaccinés (Drolet *et al*, 2015), alors qu'une couverture vaccinale chez les femmes inférieure à 50% n'apportait pas d'immunité de groupe. Une couverture vaccinale contre HPV16 et 18 supérieure à 50% permet aussi une protection croisée contre les types HPV31, 33 et 45 (Drolet *et al*, 2015). La durée d'une telle protection croisée reste toutefois discutée.

Finalement, la prévention primaire du cancer du col de l'utérus se fait par la prévention de l'infection par HPV grâce à la vaccination. La circoncision masculine (Albero *et al*, 2012) et l'utilisation de préservatifs (Lam *et al*, 2014) font aussi partie de la prévention primaire puisqu'elles ont montré des effets protecteurs significatifs pour prévenir la transmission d'HPV.

1.4 Les oncoprotéines virales, des acteurs clefs de la carcinogenèse

Parmi les huit POL d'HPV16, trois (E5, E6 et E7) possèdent des propriétés oncogéniques. Il est généralement admis que l'expression continue des oncoprotéines E6 et E7 est nécessaire, bien que non suffisante, à la transformation des cellules et au maintien du phénotype transformé (Klingelutz & Roman, 2012). Pourtant, ces petites protéines (<160 acides aminés) ne possèdent pas d'activité catalytique. Leurs propriétés biologiques résident dans l'interaction protéine-protéine et la perturbation de voies de signalisation cellulaire.

1.4.1 L'oncoprotéine E6

1.4.1.1 Structure

E6 est une petite oncoprotéine d'environ 150 acides aminés (151 pour HPV16) qui n'est pas présente chez tous les types de papillomavirus (BPV3, 4, 6 et HPV101, 103 par exemple). Chez les HPV HR, elle est constituée de séquences NLS, de deux domaines à doigts de zinc (mais d'un seul chez FIPV1 et FPV (Van Doorslaer *et al*, 2009; Vande Pol & Klingelutz, 2013)), et d'un motif PBM (*PDZ Binding*

Première partie : Revue de la littérature

Motif), qui est absent des HPV BR (Figure 10) (Ganti *et al*, 2015). Les domaines à doigts de zinc sont composés du motif CxxC-x₂₉-CxxC et sont séparés par un interdomaine de 36 acides aminés formant une hélice de liaison (Howie *et al*, 2009). Ils forment à eux trois une poche hydrophobe et basique (Zanier *et al*, 2013), qui permet l'interaction avec des motifs LxxLL d'autres protéines cellulaires. Le motif PBM contient une séquence caractéristique S/TxL/V qui permet une interaction avec des domaines PDZ (Ganti *et al*, 2015) nommés ainsi de par la description de ce domaine de 80 à 90 acides aminés dans les protéines PSD-95, DLG et ZO-1. La phosphorylation du PBM de E6 régule négativement cette interaction (Ganti *et al*, 2015). La plupart des protéines à domaine PDZ en contiennent plusieurs, ainsi que d'autres domaines d'interaction protéine-protéine, ce qui les engage dans une profusion d'activités différentes et des rôles pléiotropiques. Ces protéines à domaine PDZ facilitent l'assemblage de complexes multiprotéiques (Ganti *et al*, 2015). E6 est donc une protéine multifonctionnelle de par sa capacité à interagir avec plus d'une cinquantaine de partenaires protéiques, et ses principales fonctions sont résumées Figure 11.

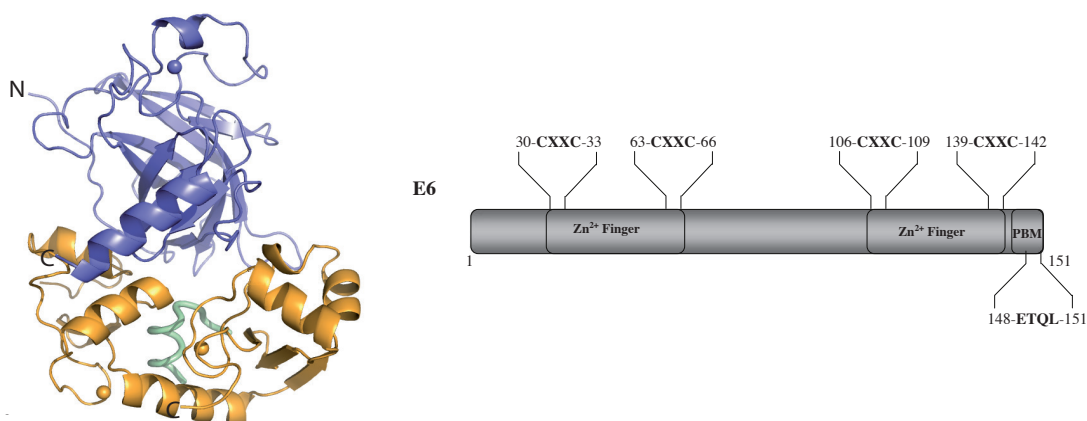


Figure 10 : Structure de la protéine E6 d'HPV16.

Structure tridimensionnelle (à gauche) de la protéine E6 (en doré) liée à protéine p53 (en bleu) et à un fragment de E6AP (en vert). Les ions zinc sont symbolisés par des sphères. N : extrémité N-terminale de la protéine, C : extrémité C-terminale de la protéine d'après (Martinez-Zapien *et al*, 2016). Schéma (à droite) de la structure de E6 d'HPV16 avec les deux domaines à doigts de zinc (de 30 à 66 aa et de 106 à 142 aa) et du domaine PBM, au niveau de l'extrémité C-terminale de E6. Les nombres donnent la position des acides aminés. Zn²⁺ Finger : doigt de zinc. D'après (Ghittoni *et al*, 2010)

1.4.1.2 E6 et p53

L'interaction de E6 avec la protéine p53 est probablement la plus étudiée. Elle a été décrite en 1990 par Scheffner et collaborateurs (Scheffner *et al*, 1990). La protéine p53 est une protéine suppresseur de tumeur, activée lors de dommages génotoxiques ou cytotoxiques par modifications post-traductionnelles (Murray-Zmijewski *et al*, 2008). Elle initie des voies de signalisation telle que la réparation de l'ADN, le stress oxydatif, l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose, suivant le type et l'importance des dommages (Howie *et al*, 2009). La protéine p53 est aussi activée lors d'une infection

par HPV, à cause d'une stimulation inadéquate de la synthèse de l'ADN. En effet, au cours d'un cycle viral, la réplication du génome viral est réalisée dans des cellules différenciées, ayant normalement quitté le cycle cellulaire (Sannigrahi *et al*, 2017). La protéine E6 d'HPV HR inhibe la fonction de p53 par de nombreux mécanismes, directs ou indirects.

Premièrement, E6 est capable d'interagir avec p53 et d'en inhiber certaines fonctions (Scheffner *et al*, 1990), comme la liaison à l'ADN (Lechner & Laimins, 1994; Thomas *et al*, 1995), empêchant ainsi l'activation des voies de signalisation. De plus, cette interaction pourrait hypothétiquement masquer la séquence NLS de p53, conduisant à une localisation cytoplasmique de p53 (Mantovani & Banks, 1999, 2001). La mauvaise localisation de la protéine l'empêcherait alors de fonctionner correctement. Ensuite, dans le cas des HPV HR, cette interaction p53/E6 est d'autant plus importante qu'elle permet le rapprochement physique de p53 avec un autre partenaire de E6, E6AP (Huibregtse *et al*, 1991, 1993; Scheffner *et al*, 1993). Alors que cette ubiquitine ligase n'est pas capable de lier p53, le complexe p53/E6/E6AP provoque une ubiquitinylation de p53, son adressage au protéasome et *in fine* sa dégradation.

Deuxièmement, E6 inhibe indirectement les fonctions de p53, en perturbant soit les modifications post-traductionnelles, soit d'autres cibles. Par exemple, les fonctions de p53 sont inhibées par l'interaction de E6 avec l'acétyltransférase p300 (Patel *et al*, 1999; Zimmermann *et al*, 2000). Après des dommages à l'ADN, l'acétylation de p53 par p300/CBP augmente sa capacité de liaison à l'ADN sur des séquences spécifiques (Gu & Roeder, 1997), ce qui augmente la transcription de gènes cibles (Barlev *et al*, 2001), comme *CDKN1A* (codant p21, un inhibiteur de CDK4 et CDK2) ou encore *BAX* (codant une protéine pro-apoptotique). Cependant, l'interaction de E6 avec p300 empêche cette acétylation, réduisant ainsi la réponse transcriptionnelle de p53. De la même manière, E6 inhibe l'activité enzymatique de SET7, une méthyltransférase, et empêche ainsi la mono-méthylation de la lysine 372 de p53, réduisant sa stabilité (Hsu *et al*, 2012; Soto *et al*, 2017a). En plus, E6 inhibe l'activité enzymatique de CARM1 et PRMT1, deux méthyltransférases, empêchant la méthylation des promoteurs dépendante de p53 (Hsu *et al*, 2012; Soto *et al*, 2017a). De manière indirecte toujours, E6 est capable d'inhiber l'activation de p53 en bloquant la voie p14^{ARF} *via* la dégradation de la protéine hADA3 (Kumar *et al*, 2002; Shamanin & Androphy, 2004; Sekaric *et al*, 2007; Shamanin *et al*, 2008). En effet, p14^{ARF} s'associe avec MDM2 (un répresseur de p53) et inhibe sa fonction d'ubiquitine ligase, ce qui permet de prévenir la dégradation de p53.

La protéine p53 joue un rôle central dans la prévention de l'apparition de mutations génétiques et est considérée comme "le gardien du génome". Ce rôle est extrêmement important afin d'empêcher la transformation des cellules, c'est pourquoi le gène *TP53* est fréquemment muté (environ 50%) dans les cancers en général (Howie *et al*, 2009). Cependant, les cancers associés aux HPV présentent une

Première partie : Revue de la littérature

fréquence de mutation de *TP53* beaucoup plus faible : de l'ordre de 5% seulement dans les cancers du col de l'utérus (Ojesina *et al*, 2014), du fait de l'inactivation de la protéine par E6.

1.4.1.3 E6 et effecteurs de l'apoptose

Il existe deux voies différentes permettant l'induction de l'apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, mais qui sont étroitement liées et qui convergent vers une réponse finale commune. La voie extrinsèque découle de signaux de mort provenant de récepteurs cellulaires localisés à la surface de la membrane plasmique. La voie intrinsèque est au contraire induite à partir de signaux propres à la cellule et à son intégrité. Elle peut être activée suite à des dommages à l'ADN, stress oxydatifs, privation en nutriments, hypoxie, radiations ou infections virales par exemple (Elmore, 2007).

Brièvement, la voie extrinsèque de l'apoptose débute par l'activation de récepteurs de mort à la surface cellulaire, TNFR1, FAS, DR-4 et/ou DR-5, par la liaison de leur ligand, TNF α , FAS-L et TRAIL. Il en découle un recrutement de molécules adaptatrices (FADD, TRADD), puis de caspases initiatrices, les caspase 8 et caspase 10, le tout formant un complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Le DISC active finalement les caspases effectrices 3 et 7 (Elmore, 2007). En outre, la caspase 8 activée clive Bid (Li *et al*, 1998), et la forme tronquée tBid agit de concert avec Bax et Bak pour créer des pores à la mitochondrie (Grinberg *et al*, 2002) et par conséquent activer la voie intrinsèque.

L'activation de la voie intrinsèque provoque une modification de l'équilibre entre protéines pro- et anti-apoptotiques, en surexprimant Bax et Bak et en inhibant Bcl-2. Ce changement de ratio favorise le relargage de composants de la mitochondrie dans le cytoplasme (comme cytochrome c, AIF1 et Omi) à travers des pores formés par Bax et Bak. Cette libération de facteurs proapoptotiques permet la formation d'un complexe protéique appelé apoptosome, contenant notamment la caspase 9, qui active les caspases effectrices 3 et 7 (Elmore, 2007; Green *et al*, 2014).

Une des conséquences de l'inactivation de p53 par E6 est l'inhibition de l'apoptose provoquée par des dommages à l'ADN ou l'infection de la cellule par HPV (Howie *et al*, 2009). Mais E6 possède aussi d'autres fonctions anti-apoptotiques indépendantes de p53. En effet, l'expression de E7 dans des cellules de souris induit l'apoptose des cellules, et cette apoptose n'est que partiellement réduite lorsque E7 est exprimée dans des cellules p53^{-/-} (déficientes en p53). En revanche, l'expression de E6 en plus de E7 induit la formation de tumeurs, démontrant que E6 possède des fonctions anti-apoptotiques indépendantes de p53 (Pan & Griep, 1995). Une autre preuve vient du fait qu'E6 est capable de bloquer l'apoptose de cellules p53^{-/-}. E6 inhibe les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose en amont, l'interconnexion de ces deux voies ainsi que le signal apoptotique effecteur en aval.

E6 interagit avec TNFR1 et empêche la liaison à son adaptateur, TRADD (Filippova *et al*, 2002). De plus, E6 se lie à FADD et à la caspase 8 et accroît leur dégradation, ce qui empêche la réponse à des signaux proapoptotiques (Garnett *et al*, 2006). L'inhibition de la caspase 8 empêche l'activation à la fois de la voie extrinsèque et de la voie intrinsèque.

E6 déplace l'équilibre entre protéines pro- et anti-apoptotiques en interagissant avec la protéine Bak et en causant sa dégradation, en inhibant l'expression de *BAX* et déstabilisant la protéine Bax (Magal *et al*, 2005; Vogt *et al*, 2006; Asadurian *et al*, 2007), ainsi qu'en augmentant l'expression de Bcl-2 (Du *et al*, 2004). Il en résulte une inhibition de l'activation de la voie intrinsèque.

Enfin, E6 est capable d'inhiber indirectement les caspases effectrices 3 et 7, qui sont au carrefour où se rejoignent les voies intrinsèque et extrinsèque. En effet, E6 augmente l'expression de deux inhibiteurs de l'apoptose (IAP), c-IAP2 (Yuan *et al*, 2005; James *et al*, 2006) et la survivine (Borbély *et al*, 2006), et ces deux protéines anti-apoptotiques peuvent se lier aux caspases effectrices et inhiber leur activité.

1.4.1.4 E6 et télomérase

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique comprenant une sous-unité catalytique, hTERT, un composant ARN qui sert de matrice, TERC, un ARN non codant servant de matrice, et d'autres protéines, comme la dyskérine (Cohen *et al*, 2007). La longueur des chromosomes diminue de 150 à 200 pb lors de chaque division cellulaire, jusqu'à une taille critique provoquant la sénescence répliquative des cellules. Non présent dans les cellules somatiques, ce complexe enzymatique permet de réparer dans les cellules souches l'extrémité des chromosomes dégradée lors des divisions successives. La réactivation de la télomérase est un événement important pour l'immortalisation des cellules et lors du processus de carcinogenèse (Hanahan & Weinberg, 2011), cette réactivation étant principalement contrôlée par E6 lors de la carcinogenèse induite par HPV. Cette réactivation est accrue de manière proportionnelle à la sévérité des lésions du col de l'utérus. En effet, une étude sur 274 patientes estime que l'expression de hTERT est détectée dans 0, 15, 30, 74 et 85% des échantillons de tissus normaux, CIN-1, -2, -3 et cancers du col de l'utérus respectivement (Branca *et al*, 2006). La protéine hTERT étant le facteur limitant, l'activité de la télomérase est proportionnelle à son taux. C'est pourquoi la réactivation de la télomérase déclenchée par E6 passe par de nombreux mécanismes ciblant *hTERT*. En effet, E6 dérégule des marques épigénétiques et l'activité du promoteur d'*hTERT*, active son expression en stabilisant l'ARNm. E6 interagit même directement avec hTERT (Howie *et al*, 2009).

Au niveau épigénétique, il existe une régulation de l'activité du promoteur d'*hTERT* par méthylation de l'ADN et acétylation des histones. Plusieurs études ont rapporté que la présence d'E6

Première partie : Revue de la littérature

favorisait à la fois la méthylation de l'ADN de séquences nécessaires à la liaison de répresseurs (par exemple CTCF) (de Wilde *et al*, 2010; Schütze *et al*, 2015), et la déméthylation des séquences proches du TSS (*transcription start site*) contenant les E-Box (Jiang *et al*, 2012; Molano *et al*, 2016), critiques à l'activation du promoteur (Zinn *et al*, 2007). E6 favorise aussi l'acétylation des histones du promoteur d'*hTERT*, marque considérée comme activatrice de la transcription. L'association de E6 avec E6AP semble nécessaire au changement des taux des isoformes du FT NFX1, réprimant la forme NFX1-91 (inhibitrice) par polyubiquitinylation et activant la forme NFX1-123 activatrice (Katzenellenbogen *et al*, 2009). Ces deux isoformes interagissent d'ailleurs avec E6 d'HPV16 (Katzenellenbogen *et al*, 2007). NFX1-91 interagit avec la protéine Sin3A, une HDAC (Histone Désacétylase), et la recrute au niveau du promoteur d'*hTERT*, provoquant la désacétylation du promoteur (Xu *et al*, 2008). A l'inverse, NFX1-123 interagit avec les PABPC (*cytoplasmic poly(a) binding proteins*), protéines qui augmentent la stabilité et la traduction des ARNm *hTERT* (Kühn & Wahle, 2004; Katzenellenbogen *et al*, 2009). Ce changement favorise une expression accrue d'*hTERT* en favorisant l'activation du gène et en augmentant la stabilité et la traduction des ARNm.

Au niveau des E-Box, plusieurs complexes se lient et limitent la transcription, comme USF1 et USF2 (McMurray & McCance, 2003) ou l'activent, comme c-Myc/Max (Wang *et al*, 1998; Wu *et al*, 1999). Dans les cellules infectées par HPV, le complexe E6/E6AP recrute c-Myc au niveau des séquences E-Box du promoteur d'*hTERT*, et réduit le taux d'USF lié au promoteur (McMurray & McCance, 2003). L'activation du gène par c-Myc serait d'autant plus importante qu'E6 réprime le recrutement du répresseur Maz (*Myc-associated zinc finger protein*) sur le promoteur d'*hTERT* (Xu *et al*, 2013a).

Enfin, la protéine E6 interagit physiquement avec *hTERT* et ainsi avec le complexe actif de la télomérase sans induire la dégradation de la protéine (Liu *et al*, 2009). D'après Liu et collaborateurs, la surexpression de E6 triple ainsi l'activité télomérase du complexe indépendamment de la régulation transcriptionnelle d'*hTERT*.

1.4.1.5 E6, adhérence, prolifération et différenciation cellulaires

Le cycle viral d'HPV est intimement lié au programme de différenciation des cellules infectées survenant lors de leur migration à travers le tissu épithélial (Wallace & Galloway, 2015). E6 d'HPV HR maintient un état prolifératif et limite la différenciation terminale des cellules en interagissant avec des régulateurs cellulaires de la prolifération, l'adhérence, la polarité et la différenciation.

L'expression de la cadhérine E, qui est impliquée dans l'adhérence entre cellules épithéliales, est inhibée par E6 (D'Costa *et al*, 2012), promouvant une perte d'adhérence des cellules. L'oncoprotéine E6 se lie aussi grâce à son domaine PBM aux domaines PDZ des protéines SCRIB (Nakagawa &

Huibregtse, 2000; Thomas *et al*, 2005; Takizawa *et al*, 2006), Dlg1 (Lee *et al*, 1997; Kiyono *et al*, 1997), MUPP1 (Lee *et al*, 2000; Massimi *et al*, 2004), PATJ (Storrs & Silverstein, 2007) et MAGI1 (Glaunsinger *et al*, 2000), 2 et 3 (Thomas *et al*, 2002) et perturbent leurs fonctions. Toutes ces protéines sont impliquées dans les jonctions intercellulaires (jonctions serrées) et la polarité mais aussi dans la répression de la croissance (Ganti *et al*, 2015). E6 se lie et altère aussi la localisation de Par3, un régulateur de la polarité cellulaire, et provoque un retard dans la formation des jonctions serrées (Facciuto *et al*, 2014). De plus, E6 d'HPV16 interagit avec la paxilline (Tong & Howley, 1997), une protéine faisant partie des points de contact focaux, un système d'ancrage entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire. Cette interaction provoque la réorganisation des filaments d'actine et donc de la structure cellulaire.

Le complexe E6/E6AP dégrade aussi PTPN3, une tyrosine phosphatase inhibant l'activité des RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase). L'inhibition de PTPN3 permet une meilleure réponse aux facteurs de croissance (Jing *et al*, 2007).

Ensuite, E6 dérégule des voies de signalisation impliquées dans la différenciation et la prolifération. Par exemple, E6 accroît l'expression de Notch1 en interagissant avec la protéine NFX1-123 (Vliet-Gregg *et al*, 2013). Dans ce cas particulier, la voie Notch est activée et favorise la différenciation des cellules sans arrêt du cycle cellulaire (Vliet-Gregg *et al*, 2015). Enfin, de nombreuses études montrent que le complexe E6/E6AP activerait la voie Wnt/ β -caténine/TCF (Lichtig *et al*, 2010; Bello *et al*, 2015; Sominsky *et al*, 2017). Cette voie de signalisation régule la prolifération, la différenciation, l'adhérence et la polarité. Une possible explication est que l'activation de la voie par E6 serait due à la surexpression de FOXM1 (Chen *et al*, 2014b), qui favorise la translocation vers le noyau de la β -caténine et par conséquent l'activation transcriptionnelle de TCF.

1.4.1.6 E6 et transition épithélio-mésenchymateuse et phénotype invasif

La transition épithélio mésenchymateuse (TEM) est un phénomène plastique correspondant à un changement du phénotype cellulaire, caractérisé notamment par un changement dans l'expression des cadhérines (surexpression de la cadhérine N aux dépens de la cadhérine E). Cette transition confère généralement à la cellule des propriétés migratoires accrues voire invasives, et elle est nécessaire à la formation de métastases (Lamouille *et al*, 2014). La perturbation de l'adhérence cellulaire par E6, expliquée ci-dessus, contribue au phénotype mésenchymateux.

Comme décrit précédemment, E6 inhibe l'expression du gène *CDH1*, codant la cadhérine E (D'Costa *et al*, 2012). Cette inhibition favorise la dédifférenciation des cellules, vers un phénotype moins épithélial. De plus, les kératinocytes exprimant E6 d'HPV18 produisent d'avantage de vimentine, un marqueur mésenchymateux (Watson *et al*, 2003). Les cellules conservent cependant l'expression

Première partie : Revue de la littérature

de la cytokératine 8, un marqueur épithélial, indiquant une TEM partielle. Ces travaux sont en accord avec ceux de Jung et collaborateurs, qui mettent en évidence un changement entre marqueurs épithéliaux (cadhérine E) et mésenchymateux (cadhérine N, fibronectine, vimentine) lorsque E6 d'HPV16 est surexprimé dans des cellules épithéliales de chien (Jung *et al*, 2013). Ce changement est probablement dû aux facteurs de transcription activant la TEM comme Slug, TWIST, ZEB1 et ZEB2, dont l'expression est augmentée. De plus, la protéine E6 favoriserait la TEM en inhibant TAp63 β (Lu *et al*, 2016).

Enfin, E6 contribuerait à l'angiogenèse tumorale en induisant la transcription du gène *VEGF* (López-Ocejo *et al*, 2000; Clere *et al*, 2007) et favoriserait non seulement la croissance tumorale, mais aussi la formation de métastases.

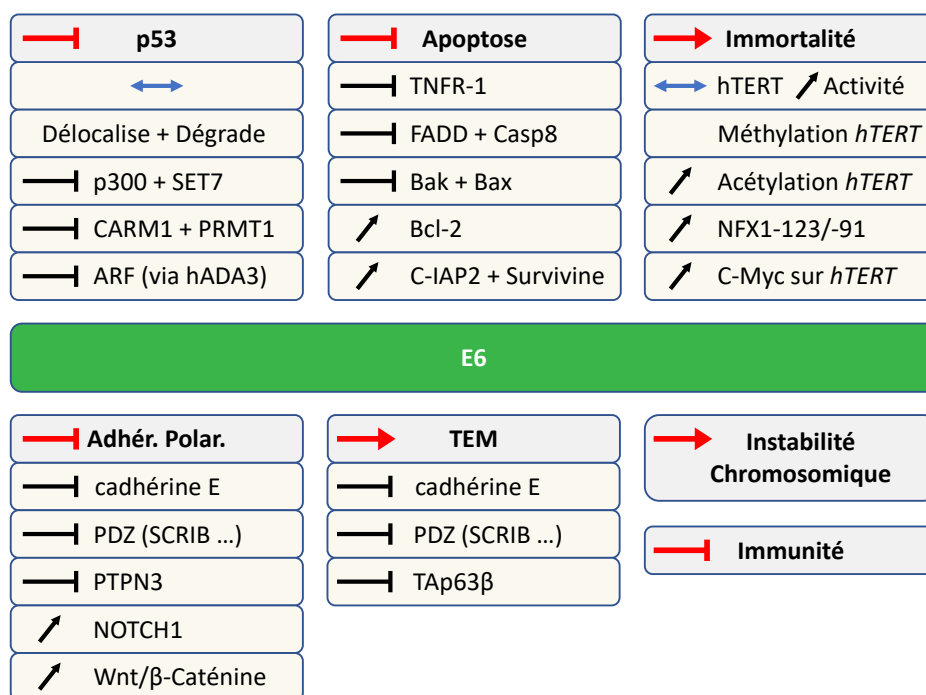


Figure 11 : Principales fonctions de E6.

E6 perturbe les voies de signalisation et mécanismes généraux (en vert) en perturbant des protéines et mécanismes sous-jacents (en rouge pâle). A l'intérieur des formes rouges : flèche bleu : interagit avec E6 ; flèche vers le haut : augmente l'expression, le niveau ou l'activité de ; trait avec une base : inhibe l'expression de ; PDZ : protéines à domaine PDZ. A l'intérieur des formes vertes : flèches rouges : active la voie de signalisation ou le mécanisme ; trait rouge avec une base : inhibe la protéine ou le mécanisme. E6 perturbe aussi les mécanismes épigénétiques (non montré, Figure 19). La liste des fonctions de E6 n'est pas exhaustive.

1.4.2 L'oncoprotéine E7

1.4.2.1 Structure

E7 est une petite oncoprotéine d'environ 100 acides aminés, 98 pour HPV16 (Rawls *et al*, 1990), qui n'est pas présente chez tous les papillomavirus (Stevens *et al*, 2008). Elle contient des NLS et une séquence d'export nucléaire (NES, *nuclear export sequence*), des séquences N-terminales similaires

aux régions conservées (CR) 1 et CR2 de la protéine E1A des adénovirus, ainsi qu'un domaine en doigt de zinc à son extrémité C-terminal (CR3) similaire aux domaines en doigt de zinc d'E6 (Figure 12) (Roman & Munger, 2013). Il a d'ailleurs été suggéré qu'E6 et E7 ont évolué à partir d'un gène ancestral commun (Van Doorslaer *et al*, 2009). Structuellement, la partie N-ter de E7 est désordonnée et flexible, alors que le coté C-ter forme un repliement compact liant le zinc. La protéine peut subir des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et l'ubiquitinylation, qui modulent ses fonctions et sa régulation. En effet, le domaine CR2 contient un site de phosphorylation reconnu par la CKII (*casein kinase II*) et conservé chez les adénovirus, sa mutation réduisant l'activité transformante de E7 (Barbosa *et al*, 1990). La phosphorylation des thréonines 5 et 7 par DYRK1A est aussi liée à un accroissement de la stabilité et de l'activité transformante de E7 (Liang *et al*, 2008).

La protéine E7 n'a ni activité enzymatique ni domaine de liaison à l'ADN. En revanche, elle établit des interactions protéine-protéine avec plus d'une centaine de partenaires cellulaires, et son interaction la plus étudiée est sans doute celle avec la protéine de susceptibilité au rétinoblastome, pRb. Ses principales fonctions sont résumées Figure 13.

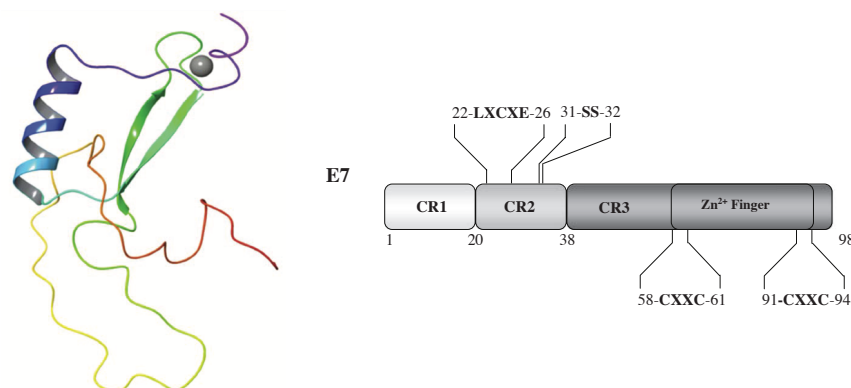


Figure 12 : Structure de la protéine E7 d'HPV16.

Structure tridimensionnelle modélisée (à gauche) de la protéine E7. L'ion zinc est symbolisé par une sphère. Extrémité N-terminale de la protéine en rouge, extrémité C-terminale de la protéine en bleu-violet d'après (Aarthy *et al*, 2018). Schéma (à droite) de la structure de E7 d'HPV16 avec les trois régions homologues de l'adénovirus E1A (CR1 à 3). CR2 contient le motif LXCXE liant pRb et le motif SS (deux sérines) phosphorylable par CK II. Le domaine à doigts de zinc (de 58 à 94 aa) est localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de E7. Les nombres donnent la position des acides aminés. Zn²⁺ Finger : doigt de zinc. D'après (Ghittoni *et al*, 2010)

1.4.2.2 E7 et prolifération cellulaire

Les effets de E7 d'HPV HR sur la prolifération cellulaire sont multiples. Les protéines E7 des HPV HR s'associent avec pRb, et d'autres protéines à poche p107 et p130, grâce à son motif LXCXE contenu dans le domaine CR2 (Munger *et al*, 1989; Dyson *et al*, 1992). Contrairement à l'antigène T du SV40, qui inactive pRb uniquement par association stœchiométrique, le domaine CR1 de E7 permet le recrutement de CUL2 (*cullin 2*), une ubiquitine ligase, qui provoque la déstabilisation et la dégradation

Première partie : Revue de la littérature

de pRb (Huh *et al*, 2007). E7 inhibe aussi pRb en favorisant son acétylation par interaction avec CBP/p300 (Jansma *et al*, 2014). La fonction la mieux étudiée de ces protéines à poche est leur capacité à réguler la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire en modulant l'activité des facteurs E2F. La famille E2F comprend à la fois des facteurs de transcription activateurs (E2F1-3) et répresseurs (E2F4-8) (Macaluso *et al*, 2006). Cependant, l'activité des FT E2F activateurs est inhibée par l'association avec pRb. Normalement, pRb est phosphorylée par l'activité mitogène des CDK (*cyclin dependant kinase*) provoquant un relargage des facteurs E2F et l'activation des gènes nécessaires à l'entrée en phase S. La répression de pRB par E7 facilite l'entrée en cycle des cellules et leur progression dans le cycle que ce soit en absence de signaux mitogènes, ou dans des kératinocytes différenciés (Münger *et al*, 2004; Moody & Laimins, 2010).

Concernant les facteurs E2F, E7 s'associe directement à E2F1 (Hwang *et al*, 2002). Il en résulte une activation transcriptionnelle des gènes contrôlés par E2F1, comme les gènes codant les cyclines E et A (Caldeira *et al*, 2000), promouvant la transition G1/S, mais aussi une expression accrue de E2F6. Ce dernier possède des fonctions opposées à E2F1, causant une sortie du cycle cellulaire, une différenciation de cellules et leur maintien en phase de quiescence. Pour contrer ces effets, E7 s'associe à E2F6 et inhibe son activité de répresseur transcriptionnel (McLaughlin-Drubin *et al*, 2008). De plus, E7 favorise l'expression de *E2F1* par acétylation de son promoteur (Zhang *et al*, 2004).

Le cycle cellulaire est aussi contrôlé par la régulation des complexes cyclines/CDK par les CKI (*CDK inhibitors*). Comme expliqué précédemment, l'expression des cyclines E et A est augmentée en présence d'E7. Cette dernière inhibe aussi l'activité antiproliférative des CKI p21^{CIP1} (Funk *et al*, 1997; Jones *et al*, 1997a) et p27^{KIP1} (Zerfass-Thome *et al*, 1996), et enfin s'associe aux complexes CDK2/cycline E ou A pour accroître leur activité (He *et al*, 2003). De plus, en activant le promoteur de *CDC25A* (Katich *et al*, 2001; Nguyen *et al*, 2002), E7 permet la déphosphorylation de CDK2 au niveau des résidus Thr14 et Tyr15 et donc son activation (Solomon & Kaldis, 1998).

1.4.2.3 E7 et p53

Lors d'infections transformantes, la synthèse d'ADN non contrôlée provoquée par la prolifération accrue et des dommages à l'ADN causés par E7 devrait entraîner une accumulation de p53 grâce à la stabilisation de la protéine. De nombreux mécanismes permettent de contourner cette réponse antiproliférative, en particulier l'expression de l'oncoprotéine E6, inhibant l'activité de p53 par de nombreux moyens (voir 1.4.1.2 : "E6 et p53"). Mais E7 est aussi capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 en l'absence de E6.

Malgré la présence d'une expression forte de p53 dans les cellules exprimant E7, l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur est amoindrie (Massimi & Banks, 1997). Cette capacité

de E7 est partagée avec la protéine E1A d'adénovirus et l'antigène T de SV40 (Steegenga *et al*, 1996; Mietz *et al*, 1992), mais le mécanisme d'inhibition exact n'est pas clair. Récemment, il a été proposé qu'E7 pouvait inhiber la voie p53-p21-DREAM (Fischer *et al*, 2017), qui serait le principal mécanisme de répression transcriptionnel dépendant de p53 induisant l'arrêt de cycle en G2/M (Fischer *et al*, 2016). Ceci suggère qu'E7 seule est capable de contourner la réponse antiproliférative mise en place par l'augmentation de p53 dans les cellules surexprimant E7.

1.4.2.4 E7 et apoptose

L'expression de la protéine E7 dans les cellules infectées joue un rôle à la fois dans l'activation et l'inhibition de l'apoptose (Cai *et al*, 2013). Dans un premier temps, l'expression de E7 prédispose à l'apoptose des fibroblastes primaires cultivés en privation de facteurs de croissance (Jones *et al*, 1997b), par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation p53. L'expression de E7 dans des kératinocytes peut aussi sensibiliser les cellules à la mort cellulaire via l'activation de stress métaboliques et l'autophagie (Zhou & Münger, 2009).

Des fonctions anti-apoptotiques de E7 ont aussi été rapportées. Par exemple, l'interaction de E7 avec p600 pourrait déréguler l'anoïkis et inhiber l'apoptose dépendante de l'ancrage (Huh *et al*, 2005). Enfin, E7 inhiberait l'apoptose induite par le TNF α en augmentant l'expression de c-IAP2 et en inhibant l'activation de la caspase 8 (Cai *et al*, 2013).

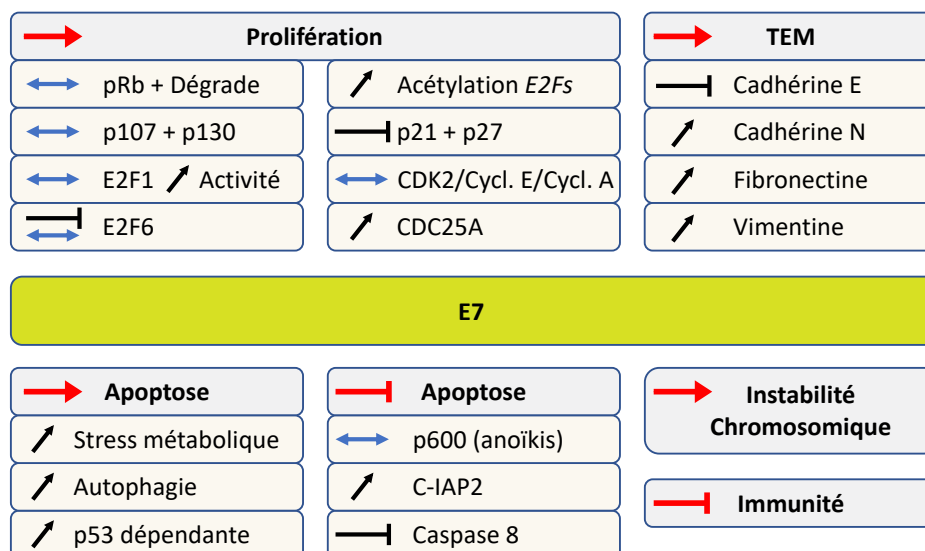


Figure 13 : Principales fonctions de E7.

E7 perturbe les voies de signalisation et mécanismes généraux (en vert) en perturbant des protéines et mécanismes sous-jacents (en rouge pâle). A l'intérieur des formes rouges : flèche bleu : interagit avec E6 ; flèche vers le haut : augmente l'expression, le niveau ou l'activité de ; trait avec une base : inhibe l'expression de. A l'intérieur des formes vertes : flèches rouges : active la voie de signalisation ou le mécanisme ; trait rouge avec une base : inhibe la voie de signalisation ou le mécanisme. E7 perturbe aussi les mécanismes épigénétiques (non montré, Figure 19). La liste des fonctions de E7 n'est pas exhaustive.

Première partie : Revue de la littérature

1.4.2.1 E7 et transition épithélio-mésenchymateuse et phénotype invasif

Comme E6, E7 favorise la TEM lorsqu'elle est exprimée dans des kératinocytes humains (Hellner *et al*, 2009). Dans des cellules épithéliales rénales de chien, les MDCK, la surexpression de E7 d'HPV16 entraîne un changement entre marqueurs épithéliaux (cadhérine E) et mésenchymateux (cadhérine N, fibronectine, vimentine) et augmente le nombre de cellule invasives (Jung *et al*, 2013). Cependant, les mécanismes d'induction de la TEM par E7 ne sont pas clairement élucidés.

1.4.3 E6 et E7 favorisent une instabilité génétique

Les deux oncoprotéines virales E6 et E7 d'HPV HR peuvent induire une instabilité génétique dans les cellules infectées, se traduisant par des réarrangements chromosomiques, des duplications (*TP63* à une fréquence de 77%, *TGFBR2* à 36%, *PIK3CA* à 50% dans les cancers du col de l'utérus) et des délétions (*FOXP1* à 42%, *PTEN* à 31%) de gènes ainsi que par des mutations plus localisées au niveau des gènes. Par exemple, *PIK3CA* (6 à 42%), *EGFR* (3 à 33%) *SMAD4* (28%) sont fréquemment mutés dans les cancers du col de l'utérus (Litwin *et al*, 2017; Ojesina *et al*, 2014). Les effets de E6 et de E7 sur la stabilité du génome cellulaire sont résumés Figure 14.

Les deux oncoprotéines d'HPV ciblent de nombreuses protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et la répartition de chromosomes homologues lors de la division, des mécanismes de réparation de l'ADN mais aussi de mécanismes favorisant l'apparition de mutations.

Premièrement, l'expression de E6 et E7 d'HPV HR dans des kératinocytes conduit à la polyploïdie des cellules (Chen, 2010). Ce nombre anormal de chromosomes provient du fait que l'expression de E7 interfère directement avec le contrôle de la duplication des centrioles, ayant pour conséquence une augmentation anormale de leur nombre (Duensing *et al*, 2007). En effet, le complexe CDK2/Cycline E et la protéine PLK4 sont nécessaires à la duplication des centrioles. E7 interagit avec ce complexe et favorise indirectement sa formation par dégradation de pRb et relargage des E2F, qui activent l'expression de la cycline E et de la cycline A. E7 interagit aussi avec PLK4 et favorise son expression (Korzeniewski *et al*, 2011; Fischer *et al*, 2014). Un autre mécanisme d'induction de centrioles surnuméraires serait lié à l'interaction de E7 avec la γ -tubuline, un composant du PCM (matériel péri-centriolaire) (Nguyen *et al*, 2007). Un nombre aberrant de centrioles favorise ainsi les mitoses multipolaires et l'instabilité chromosomique.

Ensuite, E7 d'HPV16 favorise la délocalisation de la dynéine, et interagit avec NuMa, deux protéines importantes pour l'organisation et la stabilisation des fuseaux et pour l'alignement des chromosomes (Loncarek *et al*, 2008). Ces perturbations provoquées par E7 engendrent un retard mitotique et un défaut d'alignement des chromosomes.

Concernant le cycle cellulaire, E6 et E7 d'HPV HR réduisent les contrôles cellulaires en inhibant le point de contrôle de l'assemblage des fuseaux (entre la métaphase et l'anaphase) ainsi que le point de contrôle post-mitotique (dépendant de p53 et pRb) (Southern *et al*, 2004; Heilman *et al*, 2009).

Les cellules exprimant E6 possèdent elles aussi une accumulation de centrosomes. De plus, la dégradation de MCM7 par E6 réduit le contrôle de la répartition des chromosomes (Kukimoto *et al*, 1998; Kühne & Banks, 1998).

Dans un deuxième temps, E6 et E7 peuvent perturber les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces mécanismes sont importants pour l'homéostasie cellulaire puisqu'on estime qu'une cellule subit quotidiennement 10 000 lésions oxydatives de l'ADN et 55 000 cassures ADNsb (simple brin) (Bernstein *et al*, 2013; Wallace & Galloway, 2015). Ainsi, l'apparition de mutations est favorisée par l'inhibition de MGMT, qui inhibe l'alkylation des bases guanines (Srivenugopal & Ali-Osman, 2002), et de XRCC1, impliquée dans la réparation des cassures simple brin d'ADN (Iftner *et al*, 2002), qui sont deux partenaires protéiques de E6. Bien que les conséquences de ces interactions ne soient pas encore complètement élucidées, E6 d'HPV HR interagit aussi avec BRCA1 (Zhang *et al*, 2005) et BARD1 (Yim *et al*, 2007), deux protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN.

De plus, l'expression des deux oncoprotéines favoriserait la mutation de l'ADN par un stress oxydatif. Dans un modèle de cancers des VADS, l'expression de E6 et E7 induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce à l'activation de l'oxydase NOX2 (NADPH oxydase 2), qui produit du O_2^- , H^+ et $NADP^+$ à partir de NADPH et O_2 (Marullo *et al*, 2015). Toutefois, d'après une étude plus récente, E6 d'HPV16 et 18 favoriserait la production de ROS en inhibant l'expression de CAT (catalase), tandis que E7 activerait cette enzyme, dans un modèle de cancer du col de l'utérus HPV négatif (Cruz-Gregorio *et al*, 2018). La génération de ROS favorise au final les dommages à l'ADN et les aberrations chromosomiques. Il a été montré récemment au laboratoire qu'une isoforme de E6, E6*I, favorisait la production de ROS par induction de NOX2 (Paget-Bailly *et al*, publication en cours).

Enfin, la présence de E6 et E7 permettrait des modifications de l'ADN plus fréquentes en ciblant des enzymes modifiant chimiquement les bases. En effet, l'expression de E6 seule permet l'augmentation de l'expression d'APOBEC3B (Vieira *et al*, 2014), impliquée dans des mécanismes de défense antivirale. Cette protéine est une cytosine désaminase, modifiant des bases cytosines en thymine ou guanine. Cette signature caractéristique des mutations par APOBEC3B est principalement retrouvée dans les cancers HPV positifs (Litwin *et al*, 2017).

De manière tout à fait intéressante mais hypothétique, les cancers du col de l'utérus possèdent une deuxième signature mutationnelle, nommée signature 1B par Alexandrov et collaborateurs (Alexandrov *et al*, 2013). Cette signature proviendrait de la désamination de la base 5-méthylcytosine au niveau des sites CpG et a été attribuée au facteur âge dans l'étude. Fait intrigant, la présence d'E6 et E7 d'HPV HR favorise l'expression de DNMT1 et DNMT3b, et E7 se lie directement à DNMT1

Première partie : Revue de la littérature

(Jiménez-Wences *et al*, 2014). Les DNMT catalysent l'ajout du groupement méthyle sur les cytosines. La question est donc ouverte pour savoir si la surexpression des DNMT pourrait favoriser indirectement l'apparition de mutations génétiques, au travers de la méthylation/désamination des cytosines de l'ADN, sachant que les oncoprotéines perturbent les mécanismes de réparation de l'ADN nécessaires à la déméthylation ?

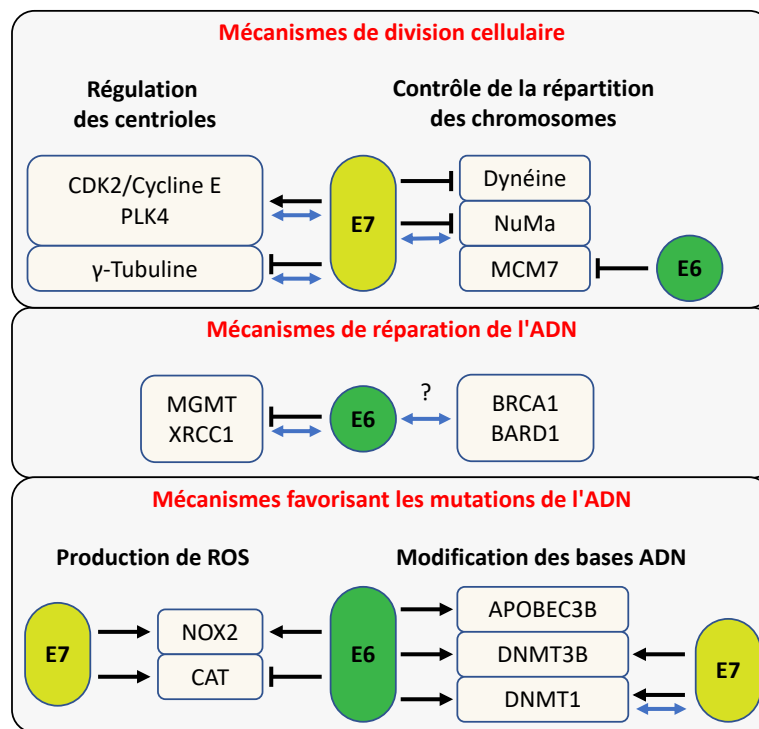


Figure 14 : Effets de E6 et E7 sur la stabilité génomique.

E6 et E7 provoquent une instabilité génomique des cellules infectées en perturbant les mécanismes impliqués dans la division cellulaire, la réparation de l'ADN et la modification de bases ADN. Flèche bleue : interagit avec ; flèche noire : augmente l'expression ou l'activité ; trait avec une base : inhibe l'expression ou l'activité.

1.4.4 L'oncoprotéine E5

E5 est une petite oncoprotéine de 40 à 85 acides aminés suivant le type de PV. Elle n'est pas présente chez tous les papillomavirus, et il n'existe pas de similarité au niveau de la séquence entre E5 des HPV et de BPV1 (DiMaio & Petti, 2013). Contrairement aux autres oncoprotéines virales, E5 est transmembranaire et est principalement localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 15). Elle ne possède pas d'activité catalytique mais impacte des voies de signalisation de RTK, de réponse immunitaire et d'apoptose principalement. Elle pourrait aussi favoriser une instabilité génétique.

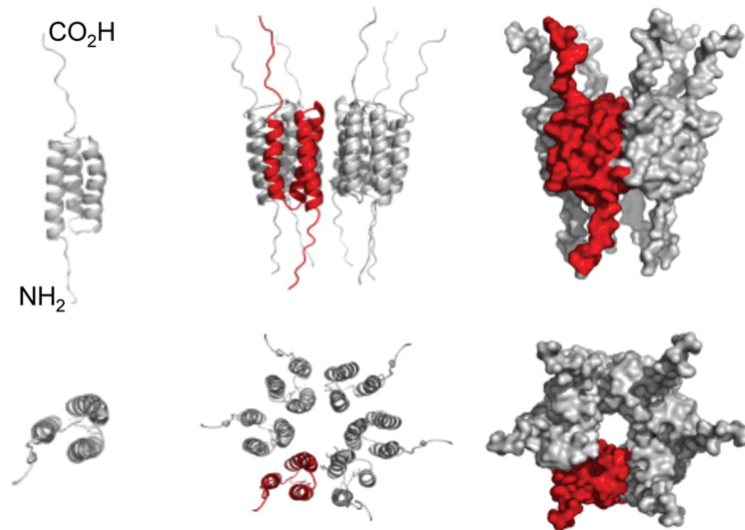


Figure 15 : Structure de la protéine E5 d'HPV16.

Structure tridimensionnelle modélisée de la protéine E5. Projection latérale (en haut) et descendante (en bas) de la protéine sous forme de monomère (à gauche) ou d'hexamère (au milieu et à droite). Projection du ruban (gauche et milieu) et de la surface (droite). Le complexe forme un canal dont la lumière est visible en projection descendante. En rouge : vue d'un monomère au sein du complexe. CO₂H : extrémité C-terminale de la protéine. NH₂ extrémité N-terminale de la protéine. D'après (Wetherill *et al*, 2012)

Premièrement, E5 d'HPV16 stimule la croissance des cellules en activant la voie de signalisation de l'EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique) (Pim *et al*, 1992; Crusius *et al*, 1998). Bien qu'E5 n'interagisse probablement pas directement avec l'EGFR, il augmente son expression en empêchant sa dégradation lysosomale (Straight *et al*, 1993), ce qui permet le recyclage de l'EGFR à la surface cellulaire, une meilleure sensibilité des cellules aux signaux de croissance et donc une prolifération accrue des cellules. Une première hypothèse suggère que l'inhibition de la dégradation serait due à l'inhibition de l'acidification des endosomes *via* l'inactivation de la V-ATPase (Straight *et al*, 1995; Disbrow *et al*, 2005). Cependant, une deuxième hypothèse affirme que ce mécanisme de recyclage est indépendant de la modulation du pH, mais découlerait plutôt d'une inhibition de la fusion de vésicules endosomales (Supryniewicz *et al*, 2010).

Deuxièmement, E5 favorise l'échappement au système immunitaire en diminuant la présentation des antigènes par les molécules de CMH I qu'elle séquestre dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Ashrafi *et al*, 2006). E5 interagit avec Bap31, une protéine chaperonne du CMH I (Regan & Laimins, 2008). En plus, la rétention de HLA-I est dépendante de l'interaction de E5 avec la calnexine (Gruener *et al*, 2007). Par ailleurs, E5 perturberait la maturation et le transport du CMH II à la surface membranaire (Zhang *et al*, 2003). Enfin, E5 empêcherait la production de cytokines pro-inflammatoires en inhibant l'expression de CD1d (Miura *et al*, 2010).

Troisièmement, E5 d'HPV16 inhibe l'apoptose par de multiples mécanismes, par exemple en stimulant la dégradation de Bax (Oh *et al*, 2010), en réduisant l'expression membranaire de Fas (Kabsch & Alonso, 2002) ou encore en régulant Bap31.

Première partie : Revue de la littérature

Enfin, l'expression de E5 à la membrane plasmique de deux cellules favorise leur fusion, générant des cellules binucléées (Hu *et al*, 2009). E5 provoque aussi une augmentation de la taille du noyau à cause d'une synthèse ADN et d'une augmentation du nombre de chromosomes caractérisée par une endoréplication d'après Hu et collaborateurs (Hu *et al*, 2010). La fusion de cellules et l'endoréplication favoriseraient au final l'instabilité génétique dans les cellules infectées.

1.5 Régulation de l'expression des protéines virales

L'expression des protéines virales est finement régulée au cours du cycle viral, qui est lui-même lié au programme de différenciation cellulaire. Les protéines virales ne sont pas toutes exprimées au même moment au cours du cycle viral, la différenciation des kératinocytes activant l'expression des gènes tardifs dans les couches des cellules les plus différenciées (Graham, 2017). La régulation de l'expression des gènes viraux est aussi modifiée au cours de la carcinogenèse associée aux HPV.

1.5.1 Régulation transcriptionnelle

1.5.1.1 Promoteur précoce et facteurs de transcription

Comme les gènes cellulaires transcrits par l'ARN polymérase II, une boîte TATA précède le TSS (site d'initiation de la transcription), qui lie le complexe de pré-initiation comprenant notamment TBP (Thierry, 2009). En amont de cette boîte TATA se situent deux E2BS (E2 binding site 1 et 2) et un site de liaison de SP1 (Bernard, 2013b). Ce facteur de transcription activateur est nécessaire à l'activité de p97 (Gloss & Bernard, 1990). Les deux E2BS1 et 2 sont positionnés entre les sites de liaison de SP1 et TBP, et E2 agit comme répresseur transcriptionnel en créant un encombrement stérique lors de sa liaison aux E2BS, empêchant ainsi la fixation de SP1 et TBP (Tan *et al*, 1992). L'organisation des E2BS adjacents au site SP1 est particulièrement conservée chez les α HPV, signifiant une fonction importante pour ces virus.

La région centrale du promoteur comprend de nombreux sites de fixation de facteurs de transcription, parmi lesquels AP1 qui a des rôles critiques sur la régulation de l'expression des gènes viraux. AP1 est un hétérodimère composé de c-fos et c-jun possédant trois sites de liaison sur le promoteur d'HPV16 (Hoppe-Seyler & Butz, 1994) et serait le principal activateur de p97 (Chan *et al*, 1990; Chong *et al*, 1990, 1991; Thierry *et al*, 1992; Butz & Hoppe-Seyler, 1993; Kyo *et al*, 1997). La LCR d'HPV16 contient aussi 7 motifs TTGGC, reconnus par les facteurs de transcription NFI (*nuclear factor 1*), des activateurs transcriptionnels (Gloss *et al*, 1989; Baldwin *et al*, 2007).

Enfin, d'autres facteurs de transcription comme TBX2 et TBX3 (Schneider *et al*, 2013), YY1 (Bauknecht *et al*, 1992; O'Connor *et al*, 1996), C/EBP (Wang *et al*, 1996; Struyk *et al*, 2000), MLL5 β

(Yew *et al*, 2011), Oct1 (O'Connor & Bernard, 1995), PEF1 (Cuthill *et al*, 1993), TEF1 (Ishiji *et al*, 1992), le récepteur au glucocorticoïde et celui à la progestérone (Gloss *et al*, 1987; Chan *et al*, 1989; Mittal *et al*, 1993), CUX1 (CDP) (O'Connor *et al*, 2000), SOX2 (Martínez-Ramírez *et al*, 2017) et FOXA1 (Sichero *et al*, 2012) ont été décrits comme pouvant moduler l'expression du promoteur précoce d'HPV de par leur interaction avec la LCR. Le Tableau II résume la fonction de ces FT.

Tableau II : Facteurs de transcription se fixant à la LCR.

Liste non exhaustive des facteurs de transcription se fixant à la LCR avec l'abréviation, le nom complet et son effet sur la LCR.

Effet sur la LCR	Nom
Activateurs	AP1 <i>Activating factor 1</i>
	FOXA1 <i>Forkhead box A1</i>
	GRE <i>Glucocorticoid response element</i>
	HRE <i>Hormone response element</i>
	MLL5β <i>Mixed lineage leukemia 5 beta</i>
	NFI <i>Nuclear factor I</i>
	OCT1 <i>Octamer-binding transcription factor-1</i>
	PEF1 <i>Penta-EF-hand domain containing 1</i>
	SP1 <i>Specificity protein 1</i>
	TEF1 <i>Transcriptional enhancer factor 1</i>
Répresseurs	CEBPβ <i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i>
	CUX1 <i>Cut like homeobox 1</i>
	E2 <i>HPV early protein 2</i>
	NFI-X <i>Nuclear factor 1</i>
	SOX2 <i>Sex determining region Y box 2</i>
	TBX2 <i>T-box 2</i>
	TBX3 <i>T-box 3</i>
	YY1 <i>Yin Yang 1</i>

1.5.1.2 Promoteur tardif et différenciation cellulaire

L'activation du promoteur tardif d'HPV16 permettant l'expression des gènes tardifs est observée dans les cellules différenciées. Il a été montré que l'ARN Polymérase II (Pol II) pouvait se fixer au promoteur viral tardif dans les kératinocytes indifférenciés sans pour autant permettre la transcription des gènes viraux tardifs. Au contraire, dans les cellules différenciées, BRD4 et CDK8 sont recrutées et mettent en contact la LCR avec le promoteur tardif grâce à un repliement topologique, facilitant l'association de CDK9 avec le complexe Pol II, et permettant l'activation et l'élongation transcriptionnelle (Songock *et al*, 2017).

Première partie : Revue de la littérature

1.5.1.3 Régulation épigénétique

L'expression des oncoprotéines est aussi contrôlée par des régulations épigénétiques qui ont été abordées dans le chapitre 1.2.2.2 : "Infections transformantes" et qui sont développées dans le chapitre 3 : "HPV et régulation épigénétique".

1.5.2 Régulation post-transcriptionnelle

1.5.2.1 Épissage

L'épissage est un mécanisme survenant au cours ou après la transcription et qui permet l'élimination des introns. L'épissage est réalisé au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques dans le transcrit, avec des sites donneurs (SD) et des sites accepteurs (SA). Cet épissage permet la régulation de l'expression des gènes ainsi que la production de différentes isoformes protéiques à partir d'un seul gène (Graham & Faizo, 2017). L'épissage est réalisé par le spliceosome qui est contrôlé au niveau de l'ARN par des protéines des familles SR et hnRNP (Graham & Faizo, 2017).

Avec 4 sites donneurs et 7 sites accepteurs, l'expression des transcrits précoces d'HPV16 est aussi régulée par épissage, et le nombre d'ARNm différents produits (au moins 20) est supérieur au nombre de protéines codées par le génome viral (Figure 16) (Johansson & Schwartz, 2013). La région 5' des transcrits, codant E6 et E7, comporte un SD (SD226) et 3 SA (SA409, SA526 et SA743). Le SD et les deux premiers SA sont localisés dans la POL E6 et le dernier SA dans la POL E7 (Schmitt *et al*, 2011; Chen *et al*, 2014a).

L'épissage entre SD226 et SA409 produit des transcrits matures possédant un décalage du cadre ouvert de lecture de E6 et un codon stop prématuré, conduisant à la production de l'isoforme E6*I. Cet arrêt prématuré de traduction sur le transcrit favorise la ré-initiation de la traduction à partir de la même sous-unité 60S du ribosome, ce qui n'aurait pas été possible sans épissage (Kozak, 2002; Tang *et al*, 2006). En effet, les POL E6 et E7 ne sont séparées que de deux nucléotides et ne permettent pas cette ré-initiation après traduction de la forme entière de E6. L'épissage entre SD226 et SA409 est très fréquent lors des infections par HPV et dans les cancers induits par HPV (Smotkin *et al*, 1989; Cornelissen *et al*, 1990), et il a été émis l'hypothèse que cet épissage permet une traduction plus efficace de la protéine E7. Une autre hypothèse est que cet épissage permet la production d'une isoforme d'E6, E6*I, dont le rôle biologique exact n'est pas encore complètement élucidé.

Cet épissage de la région précoce permet donc de réguler différenciellement l'expression de E6 par rapport à E7 à partir de l'ARN polycistronique transcrit après activation du promoteur p97.

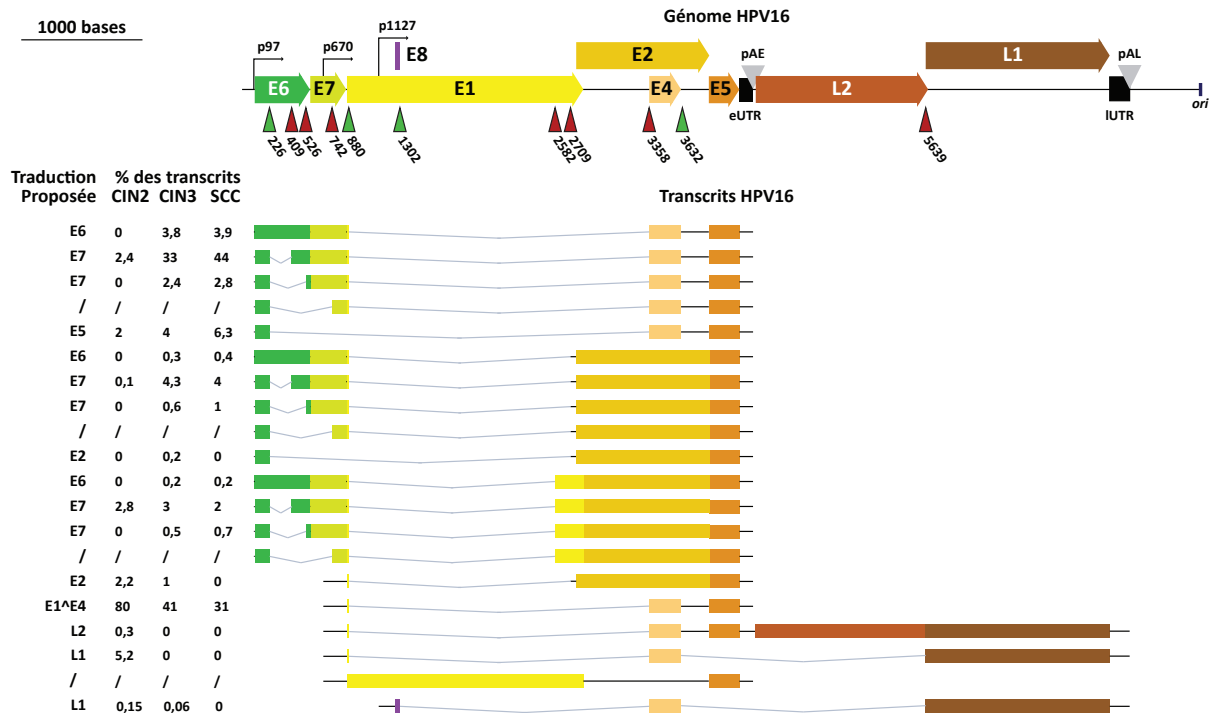


Figure 16 : Structure du génome d'HPV16 linéarisé et schéma d'épissage des transcrits.

Le génome d'HPV16 a une taille de 7906 pb et il est représenté à l'échelle (en haut à gauche) sous forme linéaire (en haut), avec les promoteurs précoces (p97) et tardifs (p670 et p1127 ou pE8), les 9 POL, les régions non traduites des ARNm précoces (eUTR) et tardives (IUTR), les sites de polyadénylation (pAE et pAL) et une partie de l'origine de réplication (ori). La pointe des triangles et les nombres associés indiquent la position d'un site donneur (triangle rouge) et d'un site accepteur (triangle vert) d'épissage des transcrits. Les transcrits (en bas) sont représentés avec les POL complètes ou potentiellement traduites, les régions épissées (trait fin en biais) et les régions non épissées mais non codantes (trait gras horizontal). Certains transcrits ont une capacité de traduction, proposée par Chen et collaborateurs. Les nombres à gauche des transcrits indiquent la proportion relative de leur expression par rapport à la totalité des transcrits HPV exprimés dans chaque type de lésion, d'après (Chen *et al*, 2014a). Toutes les fractions n'ont pas été calculées, et tous les transcrits n'ont pas été montrés. D'après (Zheng & Baker, 2006; Johansson & Schwartz, 2013; Graham & Faizo, 2017)

1.5.2.2 Polyadénylation des transcrits viraux et stabilité

HPV16 possède deux sites de polyadénylation, un précoce (pAE) et un tardif (pAL). Le premier site régule négativement l'expression des gènes tardifs lors des premières étapes du cycle viral (Johansson & Schwartz, 2013). E2 est un régulateur négatif de la polyadénylation au niveau de pAE et favorise ainsi l'expression des gènes tardifs. Il a été proposé qu'un niveau faible ou modéré de E2 permettrait la réplication du génome viral à un nombre élevé de copies, et qu'un haut niveau de E2 inhiberait l'activité de p97 et provoquerait un changement entre l'expression des gènes précoces et tardifs (Bernard, 2002; Johansson & Schwartz, 2013).

L'expression des oncogènes viraux est aussi contrôlée en modulant la stabilité des transcrits, soit après intégration du génome viral soit par liaison de miARN aux transcrits viraux. Lors de la carcinogenèse, l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule infectée augmente la stabilité des ARN E6/E7 à cause d'un remplacement de l'UTR 3' virale par une UTR 3' cellulaire (Jeon &

Première partie : Revue de la littérature

Lambert, 1995). En effet, l'UTR 3' des transcrits précoces viraux contient des éléments riches en A et U (ARE, pour *A/U rich element*) diminuant la demi-vie des ARNm. Le remplacement de l'UTR 3' de l'ARNm de la β -globine par l'UTR 3' des transcrits viraux précoces diminue d'ailleurs plus de sept fois leur demi-vie, alors que la demi-vie des transcrits viraux ayant subi une intégration augmente de deux à quatre fois (Jeon & Lambert, 1995).

De plus, les miARN cellulaires pourraient contrôler la stabilité des ARN viraux. En effet, plusieurs miARN peuvent lier les transcrits viraux, comme le miR-375 (Jung *et al*, 2014). Le miR-122 pourrait potentiellement se fixer sur les transcrits précoces grâce à deux sites de liaison (He *et al*, 2014). Lin et collaborateurs ont aussi montré qu'une interaction directe entre l'ARNm de E6 et les miR-875 ou miR-3144 pouvait inhiber l'expression de E6 (Lin *et al*, 2015). Enfin, d'autres études ont montré une interaction entre les transcrits HPV et les miR-139 (Sannigrahi *et al*, 2017), miR-187 (Lin *et al*, 2017) et miR-145 (chez HPV31) (Gunasekharan & Laimins, 2013)

2 Régulation épigénétique

Le génome des cellules eucaryotes est contenu dans le noyau en un complexe macromoléculaire nommé chromatine, contenant de l'ADN, de l'ARN, et des protéines histones et non-histones. L'unité structurale minimale de la chromatine est le nucléosome, composé de 147 pb d'ADN et d'un octamère d'histones formé par des paires d'histones H3, H4, H2A et H2B (Kouzarides, 2007). La chromatine est régulée dynamiquement à plusieurs niveaux : premièrement les chromosomes occupent à l'interphase une région bien définie, nommée territoire chromosomique (Gorkin *et al*, 2014). Ensuite, des régions de ces chromosomes forment des domaines topologiquement associés (TAD, *topologically associated domains*), caractérisés par des interactions chromatiniennes entre leurs *loci* (Dixon *et al*, 2012). Finalement, des boucles de chromatine au sein des TAD organisent des gènes co-régulés par la transcription (Aranda *et al*, 2015). La régulation transcriptionnelle spécifique à un type cellulaire, qui est un déterminant majeur de la diversité cellulaire chez les organismes multicellulaires, est initialement induite par un signal et peut être soutenue par des informations épigénétiques dans le temps et au fil des divisions cellulaires. Le terme épigénétique a été introduit pour la première fois en 1942 par Conrad Waddington et regroupe les phénomènes réversibles et héréditaires contrôlant l'expression des gènes sans altérer la séquence ADN (Liyanage *et al*, 2014). D'après Zhang et Pradhan, les quatre déterminants majeurs de la régulation épigénétique sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, la conformation de la chromatine et les ARN non codants (ARNnc) (Zhang & Pradhan, 2014).

2.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la plus étudiée du génome des mammifères. Concrètement, cette méthylation se caractérise par l'ajout d'un groupement méthyle en position C-5 d'une cytosine, formant une 5-méthylcytosine (5mC). Elle survient généralement au niveau du dinucléotide CpG, bien qu'une faible proportion, de 0,02% à 25% suivant la lignée cellulaire (Lister *et al*, 2009), puisse être observée au niveau de séquence CHG et CHH (où H représente A ou T ou C).

Durant l'embryogenèse, la méthylation appropriée des gènes permettant leur régulation transcriptionnelle au niveau spatial et temporel est d'importance vitale (Zhang & Pradhan, 2014). La méthylation de l'ADN joue aussi un rôle crucial dans la maintenance de la pluripotence des cellules, l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique, et favorise la stabilité du génome (Bird, 2002; Goll & Bestor, 2005; Denis *et al*, 2011). Dans le génome humain, certaines régions sont riches en séquence CpG, et sont définies comme îlot CpG lorsque la densité de CpG est plus importante qu'attendue sur un minimum de 200 pb. Sur les 29 000 îlots CpG prédits dans le génome humain (Bird, 2002), 30% se situent dans un TSS, (*transcription start site*) et 32% dans des régions transcrites. De 60% (Bird, 2002) à 70% (Saxonov *et al*, 2006) des gènes humains contiennent au moins un îlot CpG.

Généralement considérée comme une marque répressive, la méthylation de l'ADN affecte la transcription des gènes de trois manières différentes : en changeant l'affinité de liaison des FT aux promoteurs de gènes, en recrutant des facteurs reconnaissant l'ADN méthylé au niveau des promoteurs ou des corps de gènes, et/ou en altérant la structure de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN aux FT (Zhang & Pradhan, 2014). En effet, la méthylation de l'ADN peut être reconnue par trois familles de protéines : MBD, UHRF et en doigt de zinc (Moore *et al*, 2013). La famille MBD est composée des membres MeCP2 et MBD1, 2, 3 et 4. Seules MeCP2, MBD1 et MBD2 peuvent lier directement l'ADN méthylé et contiennent un domaine de répression transcriptionnelle (TDR) permettant le recrutement de complexes répresseurs (Nan *et al*, 1998; Ng *et al*, 1999; Sarraf & Stancheva, 2004). MeCP2 est capable en outre de recruter DNMT1 au niveau de l'ADN hémi-méthylé pour effectuer une méthylation de maintenance (Kimura & Shiota, 2003). Les deux protéines de la famille UHRF, UHRF1 et 2, peuvent aussi lier l'ADN méthylé et DNMT1. Leur fonction première n'est pas de réprimer la transcription mais de maintenir la méthylation durant la réplication de l'ADN en recrutant la DNMT1 au niveau de l'ADN hémi-méthylé (Bostick *et al*, 2007; Sharif *et al*, 2007). Enfin, la famille des protéines en doigt de zinc liant l'ADN méthylé est composée de Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38, qui peuvent réprimer la transcription en fonction de l'état de méthylation de l'ADN.

Première partie : Revue de la littérature

2.1.1 DNA méthyltransférases

Chez les mammifères, il existe trois DNMT catalysant le transfert d'un groupement méthyle d'un SAM (S-adénosylméthionine) à une cytosine, DNMT1, DNMT3a et DNMT3b ; et une DNMT régulatrice DNMT3L, sans activité catalytique. Ces DNMT permettent l'établissement de la méthylation des cytosines, mais aussi la maintenance de l'état méthylé au fil de la division cellulaire (Goll & Bestor, 2005). Ainsi, la DNMT1 est généralement considérée comme une DNMT de maintenance, s'associant à UHRF1 au niveau de la fourche de réplication de l'ADN durant la phase S afin de reproduire le schéma de méthylation sur le brin ADN néosynthétisé à partir de séquences CpG hémi-méthylées du brin matrice (Avvakumov *et al*, 2008; Sharif *et al*, 2007). DNMT3a et DNMT3b sont considérées comme des DNMT *de novo*. Ces deux enzymes sont hautement homologues mais possèdent des cibles et des expressions temporelles et spatiales distinctes (Watanabe *et al*, 2002). La DNMT1 recombinante purifiée possède 7 à 21 fois plus d'affinité pour l'ADN hémi-méthylé que non-méthylé, tandis que DNMT3a a 3 fois plus d'activité sur l'ADN non-méthylé qu'hémi-méthylé (Pradhan *et al*, 1999; Hermann *et al*, 2004; Zhang & Pradhan, 2014). Ces études nuancent donc la catégorisation des enzymes, puisque les trois catalysent la méthylation de maintenance et *de novo*. De plus, DNMT1 peut former des complexes avec DNMT3a et DNMT3b, suggérant un rôle dans la méthylation de maintenance pour ces deux dernières enzymes (Kim *et al*, 2002).

2.1.2 Mécanismes de déméthylation

De très nombreux processus physiologiques nécessitent une déméthylation de l'ADN, survenant par exemple au début du développement de l'embryon (Popp *et al*, 2010; Guibert *et al*, 2012), durant la différenciation cellulaire (Borgel *et al*, 2010; Calvanese *et al*, 2012), la reprogrammation cellulaire (Bhutani *et al*, 2010) ou lors de réponses cellulaires aux hormones, aux facteurs de croissance ou aux stimuli environnementaux (Dhiman *et al*, 2015; Yasuda *et al*, 2016; Scantamburlo *et al*, 2017).

Il existe deux sortes de déméthylation : passive et active. La première correspond à l'absence de méthylation de maintenance durant la division cellulaire. Il en résulte une dilution progressive de la marque épigénétique après plusieurs réplications successives de l'ADN (Auclair & Weber, 2012). Par exemple, ce mécanisme passif est en particulier responsable de la déméthylation du génome après la fécondation, DNMT1 étant exclue du noyau durant le développement préimplantatoire (Okamoto *et al*, 2016; Dean, 2016; Auclair & Weber, 2012). Le second mécanisme fait intervenir une déméthylation plus rapide de l'ADN et ne nécessite pas de division cellulaire (Figure 17). Il a été documenté par exemple au niveau du zygote (Auclair & Weber, 2012). Cependant, il n'y a pas d'enzymes connues dans les cellules de mammifère capables de cliver la liaison covalente carbone/carbone reliant le groupe méthyle à la cytosine (Moore *et al*, 2013). A la place, la déméthylation survient après une série de

réactions chimiques modifiant la 5mC en produit reconnu par le système BER (*base excision repair*), afin de remplacer la base par une nouvelle cytosine. Plusieurs mécanismes ont été proposés. Le premier mécanisme convertit par désamination le groupement amine en carbonyle grâce aux enzymes AID/APOBEC, produisant au final une thymine. Cette modification provoque un appariement incorrect G/T, reconnu par le système BER et réparé en cytosine (Moore *et al*, 2013). Un autre mécanisme nécessite l'action des enzymes Tet (*ten-eleven translocation*), Tet1, 2 et 3, qui catalysent l'hydroxylation du groupe méthyle en hydroxyméthyle (5hmC) (Tahiliani *et al*, 2009; Ito *et al*, 2010). Cette 5hmC est ensuite transformée en 5formylcytosine (5fC) puis en 5carboxycytosine (5caC) par oxydation, toujours grâce aux enzymes Tet (Ito *et al*, 2011), ou transformée en 5hydroxyméthyluracile (5hmU) par désamination par AID/APOBEC (Guo *et al*, 2011). Finalement, les résidus modifiés sont pris en charge par le système BER et plus précisément par la thymine DNA glycosylase (TDG) pour être remplacés par une cytosine non modifiée (Cortellino *et al*, 2011; He *et al*, 2011). Un mécanisme alternatif a été décrit, conduisant à la formation de cytosine par décarboxylation directe de la 5caC (Ito *et al*, 2011; Xu *et al*, 2013b; Liutkevičiūtė *et al*, 2014).

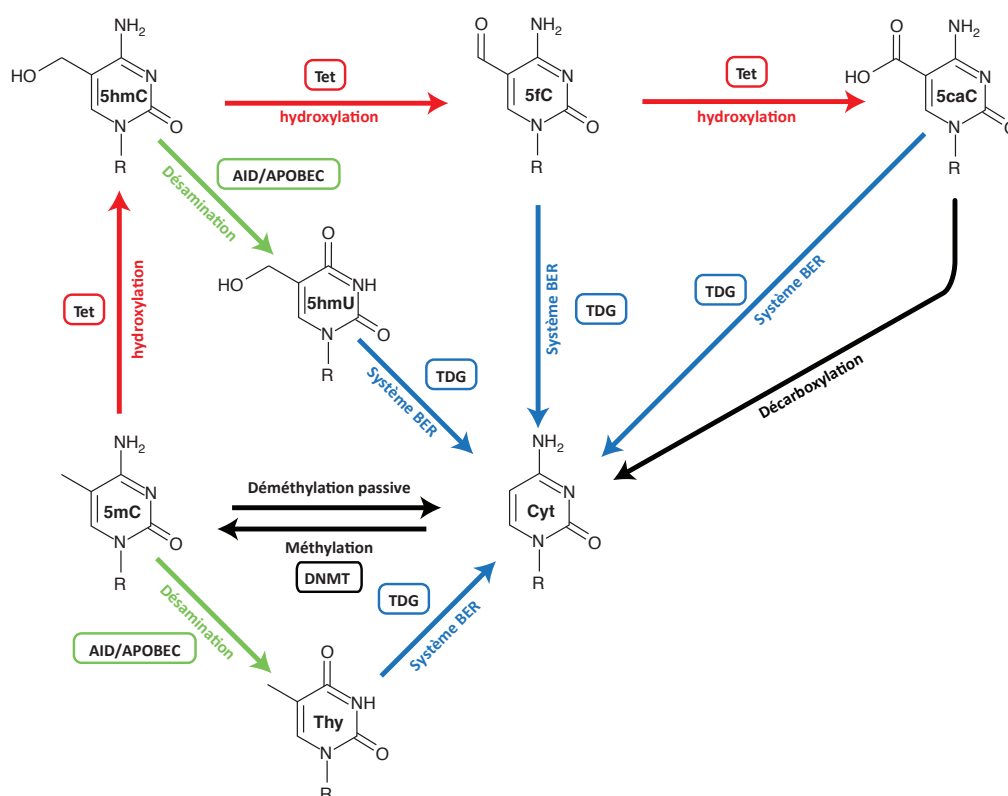


Figure 17 : Voies de déméthylation de la méthylcytosine.

Un mécanisme potentiel de la déméthylation active est la désamination de la 5mC catalysée par AID/APOBEC (vert) et suivie de l'excision de la Thy par TDG et de la réparation par le système de réparation BER (bleu). La 5mC peut aussi être hydroxylée en 5hmC par les enzymes Tet (rouge). Finalement, la 5hmC peut être transformée en 5hmU par AID/APOBEC et prise en charge par le système de réparation BER, ou alors être transformée par Tet en 5fC puis en 5caC, cette dernière pouvant être prise en charge par le système de réparation BER ou transformée en Cyt par décarboxylation. Cyt : Cytosine ; 5mC : 5-méthylcytosine ; Thy :

Première partie : Revue de la littérature

Thymine ; 5hmC : 5hydroxymethylcytosine, 5hmU : 5hydroxyméthyluracile ; 5fC : 5formylcytosine ; 5caC : 5carboxylcytosine ; BER : *Base excision repair* ; TDG : Thymine DNA Glycosylase ; AID/APOBEC : *activation-induced cytidine deaminase/apolipo-protein B mRNA-editing enzyme complex* ; DNMT : DNA Méthyltransférase ; Tet : *ten-eleven translocation*. (Auclair & Weber, 2012; Moore *et al*, 2013)

2.1.1 Inhibiteurs de DNMTs

Les cellules cancéreuses possèdent généralement un profil épigénétique différent des cellules normales, avec une diminution générale de la méthylation de l'ADN, par exemple sur les rétrotransposons, et une hyperméthylation spécifique et localisée d'îlots CpG de promoteurs de gènes, la plupart de ces gènes étant des suppresseurs de tumeurs (Pechalrieu *et al*, 2017). Le fait que la prolifération soit accrue dans les cellules cancéreuses et que l'expression des gènes soit différente en partie due à la méthylation de l'ADN suggère que les cellules cancéreuses seraient les plus impactées par un traitement par des inhibiteurs de DNMT (DNMTi) (Pechalrieu *et al*, 2017). Ces inhibiteurs peuvent être nucléosidiques ou non-nucléosidiques et cibler toutes les DNMT ou une enzyme spécifiquement.

Actuellement, deux DNMTi, le 5-azacytidine (5azaC) et le 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC), développés en 1964 à la base comme agent cancérostatique (Sorm *et al*, 1964), ont été approuvés par la FDA (*food and drug administration*) pour le traitement clinique de certaines hémopathies malignes comme les SMD (syndromes myélodysplasiques), les LAM (leucémie aigüe myéloïde) et les LMC (leucémies myéloïdes chroniques) (Derissen *et al*, 2013). Ces deux agents ont été caractérisés comme DNMTi dans les années 1980 (Schapira & Arrowsmith, 2016) et font partie des inhibiteurs analogues des nucléosides. Après leur tri-phosphorylation (Momparker, 2005), ils sont incorporés dans la séquence ADN (et ARN pour le 5azaC) lors de la phase S et piègent irréversiblement la DNMT (1, 3a ou 3b) sur l'ADN par liaison covalente, provoquant la dégradation de l'enzyme par le protéasome (Jüttermann *et al*, 1994; Ghoshal *et al*, 2005). La déméthylation de l'ADN est donc passive, au fur et à mesure des divisions cellulaires. En plus de la diminution du niveau global de méthylation et de la réexpression de gènes éteints, l'activité anti-tumorale des deux inhibiteurs proviendrait de la cytotoxicité produite par les dommages à l'ADN induits par la liaison covalente ADN-DNMT (Pechalrieu *et al*, 2017; Flotho *et al*, 2009).

Finalement, les deux composés 5azaC et 5azadC sont chimiquement instables du fait de leur désamination par l'enzyme cytidine désaminase (Rogstad *et al*, 2009), c'est pourquoi de nombreux composés sont à l'étude (Agrawal *et al*, 2018), comme la zébularine ou le SGI-110, qui sont plus stables. Concernant la zébularine, les études cliniques n'ont pas débuté car le composé est moins efficace que les autres analogues, et surtout parce que sa toxicité hépatique et rénale est trop importante à des doses efficaces *in vivo*, après des études sur des singes (Holleran *et al*, 2005; Johnson *et al*, 2006). Le

SGI-110 est quant à lui un candidat prometteur, actuellement testé en études cliniques de phase 3 pour le traitement de LAM, SMD et LMC, avec un profil de tolérance acceptable (Sannigrahi *et al*, 2017). Le taux de réponse complète serait de 30% dans une étude de phase 2, chez des patients atteints de LAM et en rechute ou réfractaire au traitement standard (Roboz *et al*, 2018).

En plus des DNMTi analogues des nucléosides, un intérêt considérable a été porté concernant le développement d'inhibiteurs non-nucléosidiques (Pechalrieu *et al*, 2017), qui se lieraient directement aux DNMT sans incorporation préalable dans l'ADN (Brueckner & Lyko, 2004; Song *et al*, 2012), et qui pourrait donc être moins cytotoxique que les inhibiteurs nucléosidiques (Song *et al*, 2012). Dans cette classe de molécules, sont retrouvés EGCG, hydralazine, mitoxanthrone, N-acétylprocaïnamide, psammapline A, procaïnamide et procaïne (Liang & Weisenberger, 2017). L'hydralazine et la procaïnamide sont par exemple utilisées cliniquement contre l'hypertension et l'arythmie, respectivement, et l'hydralazine est même testée en essai clinique pour le traitement de cancer du sein. De plus, certains flavonoïdes possèdent des propriétés d'inhibiteurs des DNMT, comme par exemple l'EGCG qui est un polyphénol naturel retrouvé dans le thé vert (Lee *et al*, 2005).

Finalement, cette classe d'inhibiteurs comprend aussi des composés dont le mécanisme d'action est indirect, c'est à dire qu'ils ne se lient pas directement aux DNMT, comme le MG98, qui est un oligonucléotide antisens inhibant l'expression de l'ARNm de DNMT1 (Davis *et al*, 2003). Il a été testé en étude clinique de phase 1 (Stewart *et al*, 2003).

En conclusion, la recherche de nouveaux inhibiteurs des DNMTs progresse dans les deux classes d'inhibiteurs. Cependant, Cheray et collaborateurs ont publié en 2014 que l'utilisation de composés inhibant toutes les DNMT, comme la décitabine, pouvait avoir un effet tumorigénique de par la déméthylation et donc la surexpression d'oncogènes cellulaires (Cheray *et al*, 2014). C'est pourquoi les auteurs proposent de développer de nouvelles générations de DNMTi, qui cibleraient spécifiquement une DNMT et non toutes, ou encore des composés qui altéreraient uniquement l'interaction entre une DNMT et un seul de ses partenaires protéiques. Cette spécificité favoriserait la déméthylation d'un petit groupe de gènes plutôt que le génome complet, et permettrait donc d'éviter la déméthylation non désirée d'oncogènes.

Les DNMTi approuvés pour le traitement du cancer ne sont utilisés que contre les leucémies. Pourtant, sur la base de résultats précliniques encourageants, les inhibiteurs de DNMT pourraient être efficaces aussi pour le traitement des tumeurs solides (Linnekamp *et al*, 2017), qui possèdent un profil de méthylation aberrant. Lors d'une étude clinique de phase 3, le traitement du cancer du col de l'utérus a même été plus efficace lorsque l'hydralazine était ajoutée au traitement combinant valproate, topotécan, et cisplatine (Coronel *et al*, 2011), avec un taux de réponse global de 24%, au lieu de 5% pour le traitement de base et une survie sans progression de 10 mois au lieu de 6.

2.2 Modification post-traductionnelle des histones

Chez les eucaryotes, l'ADN est contenu dans la chromatine plus ou moins condensée par les nucléosomes. Les extrémités N-terminales et C-terminales des histones dépassent du corps globulaire des histones du nucléosome, et sont exposées à des modifications post-traductionnelles permettant de réguler la structure de la chromatine (Zhang *et al*, 2015b). La modification de la compaction de l'ADN par modification post-traductionnelle (MPT) des histones est contrôlée par deux mécanismes, à savoir une interaction physique directe entre les nucléosomes et l'ADN et le recrutement de facteurs protéiques (Kouzarides, 2007). Pour une interaction physique directe par exemple, l'acétylation d'une lysine des histones supprime la charge positive du groupement NH_3^+ , ce qui diminue la capacité d'interaction entre les nucléosomes et l'ADN, chargé négativement. L'acétylation d'une lysine est donc considérée comme une marque activatrice de la transcription. Les MPT des histones les plus étudiées sont la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation, bien que les histones puissent subir une multitude de MPT, avec dix-sept sortes de modifications différentes décrites en 2014 (Xu *et al*, 2014). Les modifications surviennent sur toutes les histones du nucléosome et plus de soixante acides aminés différents peuvent porter une MPT (Kouzarides, 2007), comme les lysines, arginines, sérines, thréonines, cystéines et tyrosines (Arnaudo & Garcia, 2013). La présence d'une marque sur un acide aminé peut influencer la modification d'autres résidus sur le nucléosome, et ainsi constituer un profil de MPT particulier plus ou moins favorable à la compaction de l'ADN. Pour chaque marque épigénétique, il existe trois catégories de protéines interagissant avec : (i) des enzymes catalysant la réaction d'ajout de la marque, dites "*writers*" comme les HAT et les HMT (histone acétyltransférases et histone méthyltransférases), (ii) des enzymes catalysant la réaction inverse, dites "*erasers*" comme les HDAC et les HDM (histone désacétylases et histone déméthylases), et enfin (iii) des protéines reconnaissant la marque sans la modifier chimiquement, dites "*readers*" (Zhang & Pradhan, 2014). Par exemple, la marque épigénétique H3K27me3 est catalysée par l'enzyme EZH2, éliminée par les enzymes KDM6A ou KDM6B, et cette marque peut être reconnue par le complexe PRC1 (Peng *et al*, 2018), ainsi que par la protéine CDYL (Zhang *et al*, 2011).

Comme pour les DNMTi, des inhibiteurs des enzymes impliquées dans l'établissement des marques épigénétiques ont été développés et sont actuellement à l'étude pour évaluer leur efficacité anti-tumorale et leur sécurité. Par exemple, dans les cancers du col de l'utérus mais aussi du pancréas, les traitements de lignées cellulaires avec un virus oncolytique, le parvovirus H-1PV, et l'acide valproïque (un inhibiteur des HDAC, HDACi), agissent en synergie pour induire la mort cellulaire. En effet, l'acide valproïque augmente l'effet cytotoxique du parvovirus en favorisant l'acétylation de la protéine virale NS1, ce qui l'active et induit un stress oxydatif causant des dommages à l'ADN, un arrêt de cycle et l'apoptose des cellules cancéreuses (Li *et al*, 2013).

2.3 ARN non codants

Les ARN non codants (ARNnc) sont issus de la transcription mais ne sont pas traduits en protéine. En plus des ARNt et des ARNr, il existe d'autres ARN non codants comme les ARNlnc (long non-codant), les miARN (microARN) et les piARN (*piwi-interacting* ARN), qui régulent l'expression des gènes (Zhang & Pradhan, 2014).

Les ARNlnc sont des transcrits de plus de deux cents paires de bases. Il en existe plus de 27 919 dans le génome humain, dont 19 175 potentiellement fonctionnels (Hon *et al*, 2017). Bien que leurs rôles ne soient pas complètement élucidés, ils permettraient le recrutement d'enzymes catalysant les marques épigénétiques sur des séquences spécifiques du génome pour modifier l'expression des gènes. En effet, il a été montré que les ARNlnc pouvaient s'associer à l'ADN pour former des structures en triplex, et recruter par exemple un complexe de méthylation contenant DNMT3b (Schmitz *et al*, 2010).

Les miARN et les siARN sont connus pour inhiber l'expression des gènes en s'hybridant aux ARNm. Les miARN sont transcrits à partir du génome alors que les siARN sont des outils synthétiques d'acides nucléiques double brins mimant les miARN. D'une séquence d'environ vingt-deux nucléotides, le premier miARN a été découvert en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al*, 1993). En 2014, plus de 2500 gènes codant des miARN ont été identifiés dans le génome humain (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014).

Après transcription du gène codant le miARN par l'ARN Pol II, le pri-pré-miARN, pouvant contenir plusieurs pré-miARN, est pris en charge par Drosha, une ARNase, libérant des pré-miARN (Han *et al*, 2004). Ce dernier est exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5 (Yi *et al*, 2003), puis pris en charge par Dicer pour donner un ARN mature, qui est apprêté sur le RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Connerty *et al*, 2015). Le miARN sert alors de guide au complexe pour inhiber l'expression des ARNm cibles, soit en empêchant leur traduction, soit en clivant les ARN grâce à la protéine argonaute du complexe (Zhang & Pradhan, 2014).

3 HPV et régulation épigénétique

3.1 Méthylation de l'ADN

Parmi les cent cinquante partenaires protéiques de E6 et E7, sont retrouvées des protéines impliquées dans l'établissement des marques épigénétiques comme la modification post-traductionnelle des histones et la méthylation de l'ADN. Mais E6 et E7 dérégulent aussi l'expression de certaines de ces protéines.

3.1.1 Oncoprotéines et ADN méthyltransférases

Des altérations dans le schéma de méthylation de l'ADN, comme par exemple une hypométhylation globale de l'ADN et une hyperméthylation spécifique des gènes suppresseurs de tumeur, surviennent durant la carcinogenèse viro-induite (Lu *et al*, 2012; Durzynska *et al*, 2017). En effet, selon Durzynska et collaborateurs, tous les virus cancérogènes codent des oncoprotéines qui dérèglent la machinerie de méthylation de l'ADN et altère l'expression des gènes viraux et cellulaires (Durzynska *et al*, 2017). Par exemple, les oncoprotéines des virus HPV, EBV, HBV et AdV stimulent l'activité de DNMT1 (Figure 18), et induisent l'expression de DNMT3a et DNMT3b (sauf AdV) (El-Araby *et al*, 2016; Durzynska *et al*, 2017).

L'oncoprotéine E6 des HPV16 accroît l'expression de DNMT1 en inhibant p53 (Au Yeung *et al*, 2010; Liu *et al*, 2016a). Dans les modèles cellulaires Ca Ski et SiHa qui possèdent des copies HPV16 intégrées au génome cellulaire, une inhibition de E6 entraîne une augmentation de l'expression de p53, et une diminution de l'expression de DNMT1. Lors d'expériences d'interférence à l'ARN, l'inhibition de p53 accroît l'expression de DNMT1 par activation de son promoteur, sauf lorsque le site de fixation de p53 est muté. Finalement, la surexpression de E6 dans les cellules SiHa augmente l'activité du promoteur de *DNMT1*, sauf lorsque le site de fixation de p53 est muté (Au Yeung *et al*, 2010). Puisque la surexpression de DNMT1 en présence de E6 est liée à l'inhibition de p53, Jiménez-Wences et collaborateurs suggèrent que E6 empêche la formation du dimère SP1-p53, libérant le facteur de transcription SP1, qui peut alors stimuler l'activité des promoteurs de gènes, comme par exemple celui de DNMT1 (Figure 18) (Lin *et al*, 2010; Jiménez-Wences *et al*, 2014; Sen *et al*, 2018).

En plus de E6, la présence de E7 accroît l'expression de DNMT1, ainsi que son activité (Burgers *et al*, 2007; Laurson *et al*, 2010; Leonard *et al*, 2012). En effet, la transfection de plasmides codant E7 dans des cellules épithéliales immortelles NIKS (*normal immortal keratinocytes*, issues de prépuce humain) augmente l'expression de la protéine DNMT1, détectée par western blotting, ainsi que son activité (Laurson *et al*, 2010). Selon Jiménez-Wences et collaborateurs, l'expression de E7 provoque une dégradation de pRb, libérant les facteurs de transcriptions E2F qui possèdent eux aussi des séquences de liaison dans le promoteur de *DNMT1*. Il en résulte une augmentation de l'activité du promoteur de *DNMT1*, donc une surexpression des transcrits et de la protéine (Figure 18) (Jiménez-Wences *et al*, 2014; Sen *et al*, 2018). Par ailleurs, E7 interagit avec DNMT1 par son domaine CR3 (Burgers *et al*, 2007). Cette interaction changerait la conformation de DNMT1, exposant son domaine catalytique, ce qui augmenterait sa liaison à l'ADN (Jiménez-Wences *et al*, 2014). Après libération de E7 du complexe, DNMT1 formerait un complexe stable avec l'ADN, induisant un profil de méthylation aberrant.

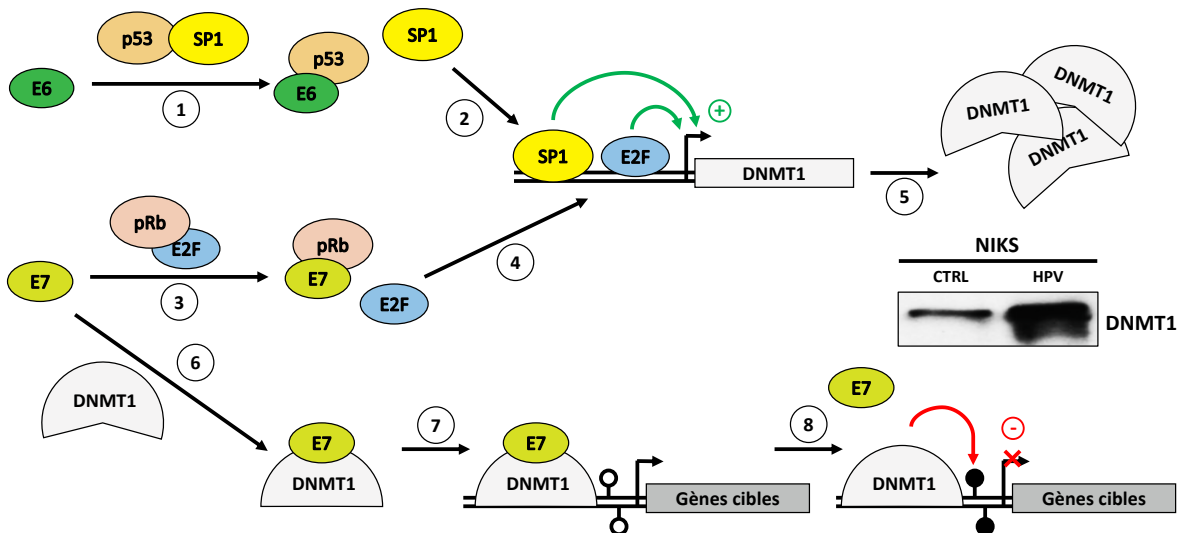


Figure 18 : Mécanisme de régulation de l'activité de DNMT1 par les oncoprotéines virales.

Dans un premier temps, E6 interagit avec et facilite la dégradation de p53 (1). Le complexe répresseur SP1/p53 n'est donc plus présent dans la cellule, SP1 se fixe à ses sites de liaison ADN et active le promoteur de *DNMT1* (2). En parallèle, E7 interagit avec et facilite la dégradation de pRb (3), ce qui libère E2F. Ce dernier active lui aussi le promoteur de *DNMT1* (4). L'activité du promoteur de *DNMT1* étant augmentée par la fixation de SP1 et E2F, la protéine DNMT1 est surexprimée dans la cellule (5) comme montré par western blotting dans des cellules épithéliales immortelles NIKS surexprimant les oncoprotéines (HPV) par rapport à des cellules sans surexpression (CTRL, pour contrôle). Enfin, E7 se lie directement à la DNMT1 (6), ce qui provoque son changement de conformation. Le complexe DNMT1/E7 peut donc se fixer à l'ADN (7) et le relargage de E7 permet à la DNMT1 de catalyser la méthylation des cytosines en méthylcytosines (8) ce qui peut provoquer une inhibition de l'expression de gènes cibles.

L'effet des oncoprotéines d'HPV sur DNMT3a et DNMT3b est plus controversé, car plusieurs études présentent des résultats différents. Selon Laurson et collaborateurs, après transfection du génome d'HPV16 dans des cellules NIKS, une augmentation marginale de l'expression de DNMT3a a été constatée par western blotting (Laurson *et al*, 2010). Par ailleurs, DNMT3b n'est pas observée par western blotting car en dessous du niveau de détection. Au contraire, Leonard et collaborateurs n'ont pas observé de changement dans l'expression de DNMT3a par immunohistochimie sur des cultures organotypiques de cellules infectées par HPV16 (Leonard *et al*, 2012). A l'inverse HPV18 augmente l'expression de DNMT3b, comme observé par immunohistochimie sur des cultures organotypiques (Leonard *et al*, 2012). En parallèle de ces travaux, Li et collaborateurs ont observé que l'extinction de E6 ou de E7 par transfection de shARN (miARN codé à partir d'un plasmide) dans les cellules SiHa inhibe l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de DNMT3a et DNMT3b (Li *et al*, 2015a). Le rôle des oncoprotéines sur DNMT3a et DNMT3b n'est donc pas clair et semble dépendre du type d'HPV, du modèle ou des techniques expérimentales utilisés.

En conclusion, l'augmentation de l'expression et de l'activité des DNMT, principalement de DNMT1, causerait un schéma de méthylation aberrant au niveau du génome cellulaire. Ce phénomène

Première partie : Revue de la littérature

pourrait alors favoriser la transformation cellulaire en inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs.

3.1.2 Conséquences de l'expression de E6 et de E7 sur la méthylation de l'ADN

L'expression des oncoprotéines virales dans les cellules infectées modifie le profil de méthylation de l'ADN cellulaire, avec par exemple des hyperméthylations au niveau de promoteurs de gènes inhibant leur expression. Ces hyperméthylations sont principalement étudiées au cours de la carcinogenèse induite par HPV et concernent des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme *FHIT* et *CCNA1*, l'apoptose avec *DAPK1* et *RASSF1*, la réparation de l'ADN avec *MGMT*, la différenciation cellulaire et la prolifération, comme *APC*, *RARB*, *PTEN*, et *POU2F3*, l'adhérence cellulaire, avec *CADM1* et *CDH1* (Fang *et al*, 2014).

Par exemple, *CCNA1* code la cycline A1, une protéine essentielle pour l'entrée en métaphase de la méiose I chez l'homme. Considéré comme un gène suppresseur de tumeur, la fréquence de méthylation du gène augmente en fonction de la sévérité des lésions du col de l'utérus, passant de 0% dans les tissus normaux et LSIL, à 36,6% dans les HSIL, 60% dans les cancers micro-invasifs et jusqu'à 93,3% dans les cancers invasifs (Kitkumthorn *et al*, 2006). La méthylation du promoteur semble directement dépendante de l'expression de E7, puisque un complexe composé d'au moins E7 et DNMT1 est retrouvé au niveau du promoteur de *CCNA1* (Chalertpet *et al*, 2015).

3.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Les oncoprotéines E6 et E7 dérégulent aussi de nombreuses protéines impliquées dans l'établissement des modifications post-traductionnelles des histones (Figure 19). Globalement, des études décrivent des interactions, surexpressions ou inhibitions d'expression d'enzymes catalysant des MPT des histones. Parmi ces protéines, KDM6A, KDM6B et JARID1B sont des déméthylases, EZH2, CARM1, PRMT1 et SET7 sont des méthyltransférases, et TIP60, NCOA1 (SRC1), P300/CBP et pCAF sont des acétyltransférases. Mais E6 et E7 perturbent aussi les fonctions de nombreuses protéines qui structurent et régulent l'activité des complexes dont font partie ces enzymes, comme les protéines BMI1 et E2F6 du PcG (*polycomb group*), Mi2 β du complexe NuRD (*nucleosome remodeling deacetylase*), et BRG1 du complexe SWI/SNF (*switch mutants/sucrose non-fermenting*) (pour revue, (Soto *et al*, 2017a; Groves & Coleman, 2015)).

Brièvement, la surexpression de la protéine E7 provoque l'inhibition de BMI1 et une surexpression de EZH2, KDM6A et KDM6B (Holland *et al*, 2008; Hyland *et al*, 2011; McLaughlin-Drubin *et al*, 2011). L'expression d'EZH2 augmente d'ailleurs en fonction de la sévérité des lésions du col de l'utérus, et les patientes dont la tumeur a une expression importante d'EZH2 présentent une survie

globale diminuée comparée aux patientes avec des tumeurs sans expression d'EZH2 (Liu *et al*, 2014). Bien qu'EZH2 soit surexprimée, une réduction globale du niveau de H3K27me3 est observée, probablement à cause d'une inhibition de l'activité d'EZH2 par phosphorylation de sa sérine 21 (Hyland *et al*, 2011), et à cause de la surexpression parallèle de KDM6A et KDM6B (McLaughlin-Drubin *et al*, 2011). La surexpression de KDM6A est d'ailleurs nécessaire à la survie des cellules exprimant E7 en permettant l'augmentation de p21^{CIP1} par déméthylation des histones du promoteur de *CDKN1A*. En effet, p21^{CIP1} inhibe la réplication de l'ADN en liant PCNA, indispensable pour limiter le stress réplcatif à un niveau viable dans les cellules surexprimant E7 (Soto *et al*, 2017b).

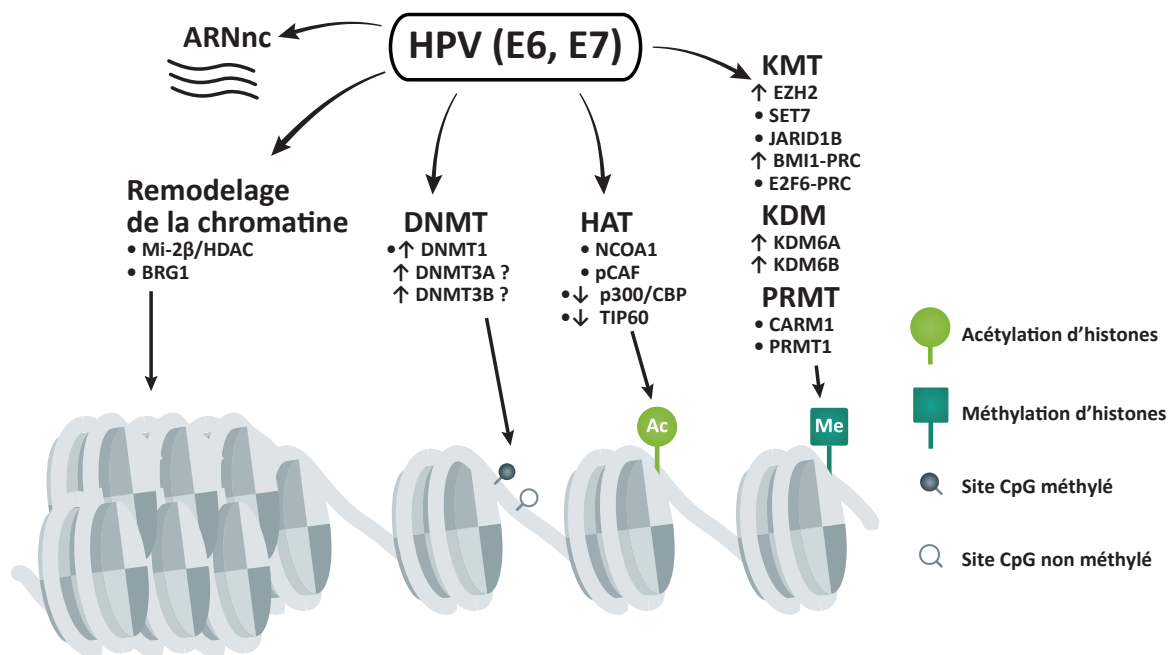


Figure 19 : HPV dérégule les mécanismes épigénétiques.

Vue schématique de la chromatine compactée (à gauche) ou décompactée (à droite) avec l'ADN (en gris clair) méthylé (rond noir) ou non (rond blanc) enroulé autour des nucléosomes (camembert) dont les histones possèdent des modifications épigénétiques (en vert). Les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV modifient l'expression ou interagissent avec des ARN non codants (ARNnc), des protéines impliquées dans la méthylation de l'ADN (DNMT), dans l'acétylation des histones (HAT), dans la méthylation des arginines (PRMT) ou des lysines (KMT) des histones et dans leur déméthylation (KDM). Les oncoprotéines dérégulent aussi des protéines de complexe de remodelage de la chromatine. Flèche vers le haut : expression augmentée ; flèche vers le bas : expression diminuée ; point noir : interagit avec E6 et/ou E7. Adapté de (Durzynska *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2015b)

E7 interagit aussi avec les protéines p300 et CBP (Jansma *et al*, 2014), pCAF (Avvakumov *et al*, 2003), NCOA1 (Baldwin *et al*, 2006), E2F6 (McLaughlin-Drubin *et al*, 2008), BRG1 (Lee *et al*, 2002) et indirectement avec des HDAC par l'intermédiaire de Mi2β (Brehm *et al*, 1999; Longworth & Laimins, 2004). En plus, E7 induit la formation d'un complexe répresseur contenant les protéines NF-κBp50-p65, E α , JARID1B et HDAC1 et détourne donc l'activité enzymatique de JARID1B et HDAC1 pour déréguler l'expression de gènes cibles, comme *TLR9* (Hasan *et al*, 2013). Certains effets de ces interactions ont été décrits précédemment, affectant la réponse immunitaire avec p300 et pCAF (voir

Première partie : Revue de la littérature

1.2.3.2 : "Échappement au système immunitaire") et le contrôle de la prolifération cellulaire avec p300 et E2F6 (voir 1.4.2.2 : "E7 et prolifération cellulaire").

La protéine E6 interagit, elle aussi, avec p300 et CBP (Patel *et al*, 1999) et avec CARM1, PRMT1 et SET7 et inhibe leur activité méthyltransférase. Toutes ces interactions ont été décrites comme favorisant l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de p53 (1.4.1.2 : "E6 et p53") (Hsu *et al*, 2012). De plus, E6 déstabilise la protéine TIP60 en formant un complexe avec l'ubiquitine ligase EDD1, conduisant à sa dégradation par le protéasome (Jha *et al*, 2010; Subbaiah *et al*, 2016). L'inhibition de TIP60 permettrait la surexpression de E6 puisque TIP60 favorise l'acétylation de l'histone H4 du promoteur viral, ce qui provoque le recrutement du répresseur transcriptionnel BRD4 (Jha *et al*, 2010).

3.3 Oncoprotéines virales et ARN non codants

3.3.1 Dérégulation des ARNnc

L'expression d'ARN non codants est dérégulée lors de la carcinogenèse associée aux HPV. Concernant les miARN, une méta-analyse compilant les résultats de 86 articles sur plus de 3 900 lésions a identifié 63 miARN différentiellement régulés au cours de la carcinogenèse (He *et al*, 2016), 42 étant surexprimés et 21 sous-exprimés. Cependant, cette méta-analyse a exclu de ses résultats les miARN identifiés comme dérégulés dans une seule publication, soit 152 miARN dont la dérégulation nécessite des confirmations additionnelles. De manière intéressante, le nombre de miARN dérégulés s'accroît avec la gravité des lésions, passant de 12 miARN dérégulés dans les CIN1 à 63 dans les cancers. De plus, les miARN identifiés dans les CIN1 présentent le même profil d'expression dans les CIN2-3 et les cancers, suggérant un rôle important de ces 12 miARN dans le développement du cancer (He *et al*, 2016).

Au cours de la carcinogenèse du col de l'utérus, l'expression de ARNnc est aussi dérégulée (Peng *et al*, 2016). D'après Peng et collaborateurs, l'expression des ARNnc GAS5, LET (gène *NPTN-IT1*), MEG3 et TUSC8 est inhibée dans les cancers du col de l'utérus contrairement à l'expression des ARNnc HOTAIR, ANRIL, CCHE1, EBIC, MALAT1, qui est augmentée. Récemment, Sharma et Munger ont montré que l'expression de E6 dans des cellules HFK (*human foreskin keratinocyte*) favorisait la surexpression de l'ARNnc CCEPR (CCHE1) (Sharma & Munger, 2018).

3.3.2 Mécanismes de dérégulation des ARNnc

L'implication des oncoprotéines d'HPV dans les dérégulations des ARNnc n'est pas forcément claire et directe, dans la mesure où ces dérégulations sont souvent étudiées sur des échantillons cliniques de cancers. Cependant, plusieurs mécanismes indirects pourraient expliquer la dérégulation

de ces ARN, comme les mutations génétiques et réarrangements chromosomiques, les modifications épigénétiques, la modulation de l'activité des facteurs de transcription ou encore la perturbation de la biogenèse des miARN. Récemment, une étude a même identifié une interaction directe de E7 avec l'ARNInc HOTAIR.

Premièrement, l'instabilité génétique causée par la présence de E6 et de E7 dans les cellules provoque des réarrangements chromosomiques. Les ARNnc sont ainsi surexprimés si la région contenant le gène est amplifiée, ou au contraire sous-exprimés si le gène est délété. Par exemple, Wilting et collaborateurs ont identifié une relation directe entre les altérations chromosomiques et la différence d'expression entre lésions (CIN2-3/cancers) et tissu sain. En effet, la délétion de la région 11q24.1 est liée à une diminution de l'expression du miR-100 et du miR-125b et une amplification de la région 1q23.2 est liée à la surexpression du miR-9 (Wilting *et al*, 2013a).

Deuxièmement, la dérégulation des protéines et des transcrits impliqués dans l'établissement des marques épigénétiques par E6 et E7 au cours de la carcinogenèse pourrait moduler l'expression des miARN (Soto *et al*, 2017a). Par exemple, la méthylation des gènes *MIR149*, *MIR203*, *MIR375* est accrue dans les cancers du col de l'utérus comparé aux tissus sains (Wilting *et al*, 2013b). *MEG3*, codant un ARNInc, a aussi été identifié comme hyperméthylé dans les cancers du col de l'utérus (Zhang *et al*, 2016a). D'autre part, l'ARNInc PVT1 est surexprimé dans les tissus cancéreux du col de l'utérus comparés aux tissus sains, et sa surexpression est associée à des tumeurs plus volumineuses, avec un stade plus avancé et une survie plus faible (Zhang *et al*, 2016b). La surexpression de cet ARNInc dans les cellules SiHa inhibe l'expression du gène *MIR200B* en recrutant EZH2 au niveau du promoteur du gène et en augmentant le niveau de la marque répressive de la transcription H3K27me3, ce qui favorise au final la progression du cycle cellulaire, la prolifération et la migration des cellules (Zhang *et al*, 2016b).

Ensuite, la dérégulation de l'expression des miARN pourrait être causée par la modulation de l'activité de facteurs de transcription, comme p53 (Hermeking, 2012). Concrètement, l'expression du miR-34a est inhibée dans les cancers du col de l'utérus comparés aux tissus sains (Li *et al*, 2010; Wang *et al*, 2018; Zhu *et al*, 2018), et ce miARN est régulé positivement par la protéine p53, elle-même ciblée par E6 d'HPV (Chen & Zhao, 2015). Le miR-34a inhibe l'expression de la cycline E2, CDK4, c-Myc et Bcl-2, favorisant l'arrêt de cycle, l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose (Wang *et al*, 2018).

En plus, comme dans de nombreux types de cancers, la biogenèse des miARN est dérégulée au cours de la carcinogenèse associée aux HPV (Adams *et al*, 2014; Hata & Lieberman, 2015), avec des amplifications de la région 5p provoquant la surexpression du gène *DROSHA*. Cette amplification est d'ailleurs présente dans 27% des carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus (Litwin *et al*, 2017) et dans 63% des cancers du col invasifs (Scotto *et al*, 2008). Récemment, Harden et Munger ont révélé

Première partie : Revue de la littérature

que la présence de E6 et E7 dans les cellules provoquait une surexpression de DICER et DROSHA au niveau transcriptionnel et protéique (Harden & Munger, 2017). La surexpression de DROSHA dans des lignées de cancer du col de l'utérus modifie le profil d'expression de 45 miARN, 40 miARN ayant une expression augmentée et 5 une expression diminuée, sur 319 miARN testés (Muralidhar *et al*, 2011).

Finalement, la protéine E7 est capable d'interagir directement avec l'ARNlnc HOTAIR (Sharma *et al*, 2015). Sharma et collaborateurs ont d'abord utilisé une approche *in silico* qui a permis d'identifier une forte probabilité d'interaction entre E7 et HOTAIR, avec deux zones probables d'interaction. Les auteurs de l'étude ont ensuite confirmé qu'E7 d'HPV interagit physiquement avec HOTAIR grâce à une immunoprécipitation d'ARN, à l'aide d'anticorps anti-E7. En effet, l'ARN HOTAIR était enrichi plus de sept fois par rapport au témoin sans anticorps spécifique. Cette interaction pourrait probablement empêcher l'interaction entre HOTAIR et le complexe PRC2, affectant le recrutement de ce dernier, ce qui pourrait expliquer en partie la diminution du taux de la marque H3K27me3 dans les cellules infectées par HPV (Hyland *et al*, 2011).

3.3.2.1 Exemple de dérégulation : cas du miR-375

Le gène *MIR375* est localisé dans la région q35 du chromosome 2. L'expression de ce miARN est inhibée dans de nombreux types de cancers, comme les cancers hépatiques, œsophagiens, gastriques, des VADS, mais aussi dans les mélanomes et les gliomes (Yan *et al*, 2014). Dans les cancers du col de l'utérus, l'expression du miR-375 est diminuée d'environ 4,4 fois comparé à l'expression dans les tissus sains (Wang *et al*, 2011). L'expression plus faible du miARN est par exemple corrélée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques et à un stade avancé de la tumeur. La réexpression du miR-375 dans des lignées de cancer du col de l'utérus inhibe la prolifération cellulaire, induit un arrêt de cycle en G1 et inhibe la migration et l'invasion cellulaires (Wang *et al*, 2011). Des études ont montré que le miR-375 liait les transcrits d'oncogènes comme *MTDH*, *YAP1*, *IGF1R* et *PDK1*, le classant comme potentiel gène suppresseur de tumeurs (Yan *et al*, 2014). Les cibles les plus intéressantes du miARN dans les cancers du col de l'utérus sont probablement les transcrits de *SP1*, un régulateur de la LCR, de *UBE3A*, codant l'ubiquitine ligase E6AP, un partenaire de E6, mais aussi les transcrits viraux polycistroniques codant E6 et E7.

Dans les cancers du col de l'utérus, l'expression du miR-375 peut être altérée de plusieurs manières, probablement par méthylation, mais aussi parfois par délétion du gène. En effet, la méthylation de l'ADN du promoteur de *MIR375* est détectée dans trois lignées cancéreuses du col de l'utérus mais pas dans les cellules non cancéreuses HFK servant de contrôle. Le taux de méthylation du promoteur est aussi plus élevé dans les cancers et les CIN3 comparé aux tissus sains (Wilting *et al*, 2013b). De plus, le traitement des cellules SiHa par un inhibiteur des DNMT, le 5azadC, augmente

l'expression du miR-375 et diminue le taux de méthylation du promoteur (Wilting *et al*, 2013b; Stich *et al*, 2016; Liu *et al*, 2016a). D'autre part, la délétion du gène *MIR375* a été observée dans dix (16,6%) échantillons de CIN2/3 sur un total de soixante échantillons étudiés. L'expression du miR-375 est plus faible dans les échantillons dans lesquels le gène a été délété comparé aux échantillons sans délétion du gène (Bierkens *et al*, 2013).

4 La famille des T-Box et TBX2

4.1 Les T-Box

Les 17 membres de la famille des T-Box (Boîte T) chez l'Homme sont des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'une région hautement conservée de 200 acides aminés, correspondant à un domaine de liaison nommé T-Box (Abrahams *et al*, 2010). Ce domaine ne possède pas de séquences similaires aux autres motifs de liaison à l'ADN connus (Wilson & Conlon, 2002). Ces 17 gènes sont répartis suivant leur degré d'homologie dans les sous-familles T, Tbx1, Tbx2, Tbx6 et Tbr1 (Papaioannou, 2014). Bien que les protéines T-Box jouent un rôle clef dans le développement embryonnaire des métazoaires, le gène ancestral est apparu avant l'embranchement des animaux et des champignons, la protéine T étant retrouvée chez certaines espèces de champignons et d'unicellulaires eucaryotes (Sebé-Pedros & Ruiz-Trillo, 2017). Les protéines T-Box agissent comme répresseurs et/ou activateurs transcriptionnels, par exemple TBX2 possède ces deux fonctions (Abrahams *et al*, 2010).

Chez l'Homme, ces protéines sont impliquées dans les voies de signalisation du développement, mais aussi dans la différenciation cellulaire et la carcinogenèse (Papaioannou, 2014). Plus précisément, les gènes de la famille des T-Box jouent un rôle dans le développement cranio-facial (*Tbx1*, *Tbx10*, *Tbx15*, *Tbx22*), du cerveau (*Tbr1*, *Eomes*), de la glande mammaire (*Tbx2*, *Tbx3*), de l'hypophyse (*Tbx3*, *Tbx19*), du thymus (*Tbx1*), du foie (*Tbx3*), du poumon (*Tbx2*, *Tbx4*, *Tbx5*), dans la pigmentation (*Tbx15*) et le système immunitaire (*Tbx21*) (Papaioannou, 2014).

4.2 TBX2

4.2.1 Le gène *TBX2*

TBX2 est un membre de la famille des T-Box, et de la sous-famille TBX2, comprenant en plus *TBX3*, *TBX4* et *TBX5* (Papaioannou, 2014). *TBX2* d'*Homo sapiens* est localisé sur le chromosome 17q23 et s'étend sur 9,53 kilobases. Il existe trois transcrits potentiels, dont un non-codant, un possédant un codon stop prématuré, codant potentiellement une protéine de 146 acides aminés, et enfin un

Première partie : Revue de la littérature

transcrit de 7 exons produisant un ARNm de 3 339 pb et codant la protéine TBX2 de 712 acides aminés (Wansleben *et al*, 2014).

TBX2 joue un rôle primordial dans le développement de l'embryon, puisque des souris *TBX2*^{-/-} ne sont pas viables et meurent *in utero* d'anomalies cardiaques (Wansleben *et al*, 2014). Plus précisément, *TBX2* joue un rôle central dans le développement des membres antérieurs et postérieurs, de la glande mammaire, des poumons, du cœur, du cerveau, des os, des yeux et des reins. Il est aussi exprimé chez l'adulte dans les poumons, les reins, la prostate, la rate et les ovaires.

De manière intéressante, quatre îlots CpG sont présents dans le gène *TBX2*, dont un est situé au niveau du promoteur et du premier exon. Il a d'ailleurs été observé une méthylation de séquences CpG au niveau de *TBX2* dans des tumeurs de vessie, ce qui signifie que son expression pourrait être régulée par méthylation de l'ADN. La méthylation de *TBX2* est associée à une progression de la maladie et une invasion du muscle par les cellules tumorales de la vessie (Kandimalla *et al*, 2012).

4.2.2 La protéine TBX2

Généralement, les FT de la famille des T-Box sont des activateurs de la transcription (Abrahams *et al*, 2010; Sebé-Pedrós & Ruiz-Trillo, 2017). Les protéines TBX2 et TBX3 possèdent pourtant à la fois des domaines de répression et de transactivation (Abrahams *et al*, 2010), tout comme l'isoforme TBX20a (Stennard *et al*, 2003). La surexpression de TBX2 dans les cellules 293T augmente par exemple faiblement l'activité luciférase sous la dépendance du promoteur de *TGFB2* (Sakabe *et al*, 2012).

Le FT TBX2 reconnaît les séquences consensus GTGTGA, GGGTGA ou GTGTTA (Abrahams *et al*, 2010) et peut être impliqué dans le contrôle de la sénescence, de la prolifération, de l'instabilité chromosomique, de la transition épithélio-mésenchymateuse, de la réponse aux dommages à l'ADN et du cycle cellulaire.

4.2.3 Exemple de fonction de TBX2 dans le développement de l'embryon

TBX2 est impliquée dans de nombreux processus de développement, comme la différenciation cellulaire, la structuration et la morphogenèse de certains tissus et organes. Une revue d'Abrahams et collaborateurs de 2010 synthétise les données sur l'implication de TBX2 dans l'embryogenèse, notamment du cœur ou de l'hypothalamus (Abrahams *et al*, 2010).

Le développement du cœur fait intervenir une série de transformations complexes conduisant à un organe possédant de multiples cavités à partir d'un tube linéaire. L'expression de TBX2 est détectée dans le myocarde des embryons de souris dès huit à dix jours *post-coïtum* (Christoffels *et al*, 2004). Plusieurs résultats suggèrent que l'expression de *TBX2* est dépendante de BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*), une cytokine de la famille du TGF- β . En effet, les profils d'expression de

TBX2 et de *BMP2* se superposent durant le développement cardiaque du poussin (Yamada *et al*, 2000). En plus, l'expression ectopique de *BMP2* induit *TBX2* dans des tissus capables de former le tissu cardiaque (Yamada *et al*, 2000). Ensuite, l'inhibition de *BMP2* par un antagoniste de la signalisation des BMP, *Noggin* (Pera *et al*, 2004), diminue l'expression de *TBX2* (Yamada *et al*, 2000). Enfin, l'expression de *TBX2* est diminuée dans la région cardiaque d'embryons de souris déficientes en *BMP2* (*BMP2*^{-/-}) (Yamada *et al*, 2000), ou déficientes en son récepteur de type I (*BMPRI1A*^{-/-}) (Yang *et al*, 2006). La voie de signalisation BMP est donc un important inducteur de l'expression de *TBX2* durant le développement cardiaque.

L'expression de *TBX2* dans les cellules permet la formation du myocarde qui n'est pas encore cloisonné en réprimant les gènes *Nppa*, *GJA5* (connexine 40), *GJA1* (connexine 43) (Christoffels *et al*, 2004). En revanche, la répression de *TBX2* par *TBX20* est requise pour la formation des cavités (ventricules et oreillettes), ce qui prévient la répression de *MYCN* (codant N-Myc) par *TBX2* (Cai *et al*, 2005).

TBX2 est aussi impliquée dans le développement de l'hypothalamus, une structure du système nerveux régulant de nombreux processus végétatifs comme la température du corps, la pression sanguine, des comportements comme la peur, mais aussi la synthèse de neuropeptides. *TBX2* régule la différenciation des cellules précurseurs provenant de la plaque neurale en cellules hypothalamiques tubero-mamillaires ventrales. En effet, la différenciation des cellules requiert l'inhibition de *Shh* (*sonic hedgehog*), qui est conduite par la voie de signalisation BMP-*TBX2*. Le promoteur de *SHH* possède d'ailleurs un site de liaison aux motifs T-Box (Manning *et al*, 2006).

Ces deux exemples montrent ainsi que l'expression de *TBX2* est finement régulée et permet de contrôler la différenciation des cellules et la prolifération cellulaire, conduisant au final à structurer des organes aussi complexes que le cœur et des structures nerveuses.

4.2.4 Les fonctions de *TBX2* et leurs implications dans les cancers

La région chromosomique 17q23, qui contient le gène *TBX2*, est amplifiée de façon récurrente dans les cancers du sein (Bärlund *et al*, 2000) et du pancréas (Mahlamäki *et al*, 2002), mais aussi dans les cancers anaux HPV positifs (Heselmeyer *et al*, 1997). De plus, *TBX2* est surexprimé dans de nombreux cancers comme les mélanomes, carcinomes du poumon à petites cellules, carcinomes du sein, pancréas, foie, et de la vessie (Wansleben *et al*, 2014). *TBX2* pourrait être impliqué dans l'oncogenèse parce qu'il favorise le contournement de la sénescence et l'augmentation de la prolifération, agissant comme un oncogène. Pourtant, des propriétés anti-tumorales de *TBX2* ont aussi été décrites, comme une inhibition de la prolifération de cellules d'adénocarcinome du poumon (Khalil *et al*, 2017, 2018).

4.2.4.1 Rôle de TBX2 dans la sénescence et la prolifération

La sénescence des cellules est définie comme un programme physiologique provoquant un arrêt durable, voire définitif, de la prolifération cellulaire. La sénescence survient par exemple lors du développement embryonnaire ou lors du processus de cicatrisation, ou encore lors d'un stress cellulaire. En effet, la sénescence peut être induite par le raccourcissement des télomères suite aux divisions cellulaires. Ce raccourcissement est considéré par la cellule comme de l'ADN endommagé et conduit à la sénescence répllicative. Mais la sénescence peut aussi être causée par des lésions irréparables de l'ADN, un stress oxydatif, des dysfonctions mitochondriales, ou une expression importante d'oncogènes : elle est alors qualifiée de sénescence prématurée ou induite (Bischof *et al*, 2009; Wansleben *et al*, 2014). En plus de l'arrêt de prolifération, les cellules en sénescence sont caractérisées par l'expression de molécules antiprolifératives, comme p16^{INK4A} et p14^{ARF}, deux protéines codées par *CDKN2A*, l'activation des voies de signalisation de détection des dommages à l'ADN, comme p38^{MAPK} ou NF-κB, mais aussi une taille accrue, l'expression de SA-β-GAL (*senescence-associated beta-galactosidase*) et d'un sécrétome comprenant des molécules pro-inflammatoires, des métalloprotéases et des facteurs de croissance (He & Sharpless, 2017). De plus, l'arrêt de croissance est souvent réalisé par l'activation constitutive des voies ATM/p14^{ARF}-p53-p21 et/ou p16^{INK4A}-pRb (Childs *et al*, 2015). Dans la première voie, l'expression de p53 est augmentée soit par ATM, elle-même activée par le système de réponse aux dommages à l'ADN (DDR), soit indépendamment des DDR par p14^{ARF}, qui inhibe l'ubiquitine ligase MDM2. La protéine p21 est ensuite exprimée en réponse à p53 et inhibe l'activité de CDK2. Dans la deuxième voie, p16^{INK4A} inhibe CDK4 et CDK6, empêchant la phosphorylation de pRb et la libération des facteurs E2F.

En 2000, Jacobs et collaborateurs ont été les premiers à publier que TBX2 empêche la sénescence en réprimant le gène murin *CDKN2A*, qui code p19^{ARF} (homologue murin de p14^{ARF}) (Jacobs *et al*, 2000). Les auteurs ont réalisé un criblage d'oncogènes à partir d'une librairie d'ADNc transfectés dans des cellules MEF *BM11*^{-/-} (fibroblastes embryonnaires de souris déficients en *BM11*), surexprimant p16^{INK4A} et p19^{ARF} par dé-répression du promoteur de *CDKN2A*, dans le but d'identifier des gènes susceptibles d'être des oncogènes car régulant négativement la voie de signalisation comprenant *CDKN2A*. Le criblage a permis de sélectionner vingt-deux clones indépendants et immortels, dont dix contenant l'ADNc de *TBX2*. Le contournement de la sénescence a été confirmé par surexpression de *TBX2* dans des MEF, permettant aux cellules de supporter plus de vingt passages en culture sans sénescence, contre environ sept passages pour des MEF sauvages. La présence de TBX2 provoque une forte diminution à la fois transcriptionnelle et traductionnelle de p19^{ARF}, et une diminution plus modérée de p16^{INK4A}. La surexpression de TBX2 dans des cellules TIG3 (fibroblastes humains) provoque aussi un retard dans l'entrée en sénescence, suggérant un mécanisme anti-sénescence conservé chez

l'Homme. La répression directe de *CDKN2A* par TBX2 a été mise en évidence en clonant les promoteurs humains et murins de *CDKN2A* sous la dépendance de *CAT*, codant une catalase et en mesurant son activité. La répression de TBX2 est toujours effective sur un fragment contenant la région -19 à +54 nt du promoteur humain (Jacobs *et al*, 2000).

En 2004, Prince et collaborateurs ont aussi montré que TBX2 réprimait directement l'expression de p21 (Prince *et al*, 2004). En effet, le promoteur de *CDKN1A* possède une séquence de liaison de TBX2 parfaite, AGGTGTGA, qui en plus est conservée entre les espèces *Homo sapiens*, *Mus musculus*, et *Rattus rattus*. Lors d'expériences sur l'activité du gène rapporteur, la surexpression de TBX2 réduit de quatre à six fois l'activité du gène *CAT* comparé au contrôle, et la mutation du site de liaison (TGT en CTC) abroge cette répression. Finalement, la liaison de TBX2 au promoteur de *CDKN1A* a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, dans lesquelles l'immunoprécipitation d'ADN par un anticorps anti-TBX2 permet l'amplification par PCR de *CDKN1A*, contrairement à l'utilisation d'un anticorps contrôle (Prince *et al*, 2004).

De manière intéressante, Vance et collaborateurs ont montré que TBX2 interagissait avec la forme hypophosphorylée de pRb et que cette association augmentait la capacité de liaison à l'ADN de TBX2, notamment au niveau du promoteur de *CDKN1A* (Vance *et al*, 2010). Finalement, l'inhibition de *CDKN1A* par TBX2 semble liée à la présence de cofacteurs et au contexte cellulaire, puisque cette inhibition n'a pas été observée dans toutes les études (Harrelson *et al*, 2004; Davis *et al*, 2008). Wansleben et collaborateurs expliquent d'ailleurs qu'au vu de l'implication de p21 dans de nombreux processus cellulaires, il est peu probable que TBX2 puisse réprimer p21 dans tous les contextes cellulaires (Wansleben *et al*, 2013).

4.2.4.2 Rôle de TBX2 dans la voie de réparation des dommages à l'ADN

La voie de réparation des dommages à l'ADN est souvent dérégulée au cours de la carcinogenèse. Par exemple, la plupart des gènes de susceptibilité aux cancers du sein sont impliqués dans la réparation de l'ADN, comme les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (représentant environ 80% des cancers du sein familiaux), *ATM*, *CHEK2* (codant CHK2), *PALB2* et *BRIP1* (représentant environ 5% des cas de cancers du sein familiaux) (Mavaddat *et al*, 2010; Wansleben *et al*, 2014). Ainsi, lors de dommages à l'ADN, CHK2 est activée par phosphorylation par ATM, et agit comme transducteur de la voie ATM en phosphorylant plus d'une vingtaine de substrats dont p53 et BRCA1. L'activation de CHK2 favorise au final la réparation de cassures double brins (Ahn *et al*, 2004; Zannini *et al*, 2014).

Il existe une accumulation de preuves suggérant que TBX2 pourrait moduler les réponses aux dommages à l'ADN, par exemple dans les cancers familiaux, ou à l'occasion de dommages induits par les rayonnements ultra-violets (UV). Premièrement, TBX2 est préférentiellement amplifié dans les

Première partie : Revue de la littérature

cancers du sein mutés au niveau de *BRCA1/2* (Sinclair *et al*, 2002), avec une amplification du gène dans 50% et 87% des tumeurs présentant une mutation de *BRCA1* et *BRCA2*, respectivement. De plus, il pourrait jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (Sinclair *et al*, 2002). En effet, dans les cellules MCF-7 résistantes au cisplatine, l'inhibition de TBX2 sensibilise les cellules à cette chimiothérapie en inhibant la voie de signalisation ATM-CBK2-p53. Les auteurs de l'étude suggèrent que TBX2 active indirectement CBK2 (par phosphorylation), qui stabilise p53 par phosphorylation, favorisant ainsi l'arrêt de cycle en phase S et la réparation de l'ADN (Wansleben *et al*, 2013).

Deuxièmement, le niveau de la protéine TBX2 est augmenté après induction de dommages à l'ADN induits par les UV (Abrahams *et al*, 2008). Dans les cellules MCF-7, l'exposition aux UVC induit la phosphorylation de TBX2 catalysée par la kinase p38 aux résidus 336, 623 et 675, qui conduit à l'augmentation du niveau de protéine TBX2. Alors que TBX2 est présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules MCF-7, l'exposition aux UVC favorise une relocalisation au niveau du noyau exclusivement, et augmente la capacité de TBX2 à réprimer *CDKN1A*. Ces données suggèrent donc que TBX2 pourrait avoir un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN.

4.2.4.3 Rôle de TBX2 dans la transition épithélio-mésenchymateuse

En plus de ces fonctions, il a été suggéré que TBX2 serait un inducteur de la TEM. Par exemple, l'expression ectopique de TBX2 dans des cellules épithéliales normales de sein (HC11 et MCF10A) provoque une inhibition de l'expression de la cadhérine E, la β -Caténine et ZO-1, et une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la cadhérine N et la vimentine. Ces cellules surexprimant TBX2 possèdent une plus grande capacité de migration et d'invasion. A l'inverse, l'inhibition de TBX2 dans des cellules cancéreuses métastatiques de sein (MDA-MB-435 et -157) favorise l'expression des marqueurs épithéliaux au détriment des marqueurs mésenchymateux, et réduit la migration et l'invasion des cellules (Wang *et al*, 2012). Finalement, des expériences de ChIP ont permis de montrer que TBX2 réprime directement la transcription de *CDH1*, dont la répression est causalement impliquée dans la TEM et la formation de métastases (Wang *et al*, 2012)

4.3 Implication de TBX2 dans la régulation de l'expression des oncogènes viraux

La protéine TBX2 pourrait aussi réguler l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7, suivant le contexte cellulaire. Un seul article scientifique aborde cette problématique, après avoir visualisé une interaction entre L2 et TBX2 après un criblage avec la technique de double hybride, en utilisant comme appât le fragment 280-473 de L2 et comme proie des protéines exprimées à partir de plasmides contenant des ADNc d'une librairie. Cette interaction entre L2 et TBX2 a été confirmée à nouveau avec

une technique de co-immunoprécipitation. Puisque TBX2 et TBX3 présentent un haut degré d'homologie, les auteurs ont aussi montré une interaction entre TBX3 et L2 (Schneider *et al*, 2013).

Pour vérifier l'interaction de TBX2 et L2 dans des cellules de mammifère, la localisation des protéines a été analysée par immunofluorescence dans les cellules HeLa transfectées par TBX2 avec ou sans L2. TBX2 est majoritairement localisée dans le noyau indépendamment de la présence de L2. Dans environ 70% des cas de double transfection, L2 est localisée au niveau des corps nucléaires ND10 et co-localise peu avec TBX2. En revanche, dans environ 30% des cellules doublement transfectées, L2 n'est pas confinée au niveau des corps ND10 et co-localise fortement avec TBX2. Cette co-localisation a aussi été confirmée dans des cellules WM266-4 et SiHa, ainsi que lors d'une infection naturelle du col de l'utérus par HPV16. En effet, des échantillons de tissus infectés (CIN1 et CIN2) présentent une expression de TBX2 dans le noyau des cellules de la couche superficielle de l'épithélium, et une co-localisation forte entre TBX2 et L2 est observée (Schneider *et al*, 2013).

Ensuite, le rôle physiologique de cette interaction a été étudié, notamment sur l'expression des oncogènes viraux E6 et E7, grâce à des expériences avec un rapporteur luciférase sous la dépendance de la LCR d'HPV16 co-transfecté avec TBX2 dans les cellules HeLa, HaCaT et NHEK. L'activité luciférase est réprimée significativement en présence de TBX2, avec une activité de 20% à 40% par rapport à l'activité basale, suivant le modèle cellulaire utilisé. De manière intéressante, l'ajout de L2 dans les cellules renforce la répression exercée par TBX2 sur l'activité luciférase. De plus, TBX2 est non seulement capable de réprimer l'activité luciférase sous la dépendance de la LCR d'HPV16, mais aussi celle sous la dépendance de la LCR d'HPV18 et d'HPV11 (Schneider *et al*, 2013).

Dans le but de préciser la région de la LCR d'HPV16 nécessaire à la répression de TBX2, une série d'expériences a été réalisée en utilisant un rapporteur luciférase sous la dépendance de fragments de la LCR. Les résultats indiquent que la séquence située entre les nucléotides 7564 et 7756 est requise pour la répression de la LCR par TBX2, bien que cette portion d'ADN ne contienne aucun site de liaison aux FT T-Box consensus.

L'expression de E6 endogène a ensuite été analysée dans les cellules HeLa transfectées ou non par TBX2 afin de déterminer si TBX2 affecte l'activité de la LCR d'HPV18 qui est intégré au génome cellulaire. Par western blotting, l'expression de E6 est effectivement diminuée en présence de TBX2.

Finalement, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine en utilisant un anticorps anti-Flag, les auteurs ont confirmé que TBX2-Flag transfecté interagissait bien avec un fragment de la LCR d'HPV18 (entre nt 7735 et nt 124) stablement intégré au génome cellulaire. En outre, l'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-TBX2 permet d'immunoprécipiter la protéine TBX2 endogène ainsi que la LCR d'HPV16 dans les cellules SiHa (Schneider *et al*, 2013).

Rationnel du travail de recherche

Malgré le développement de moyens de prévention primaire et secondaire pour lutter contre l'apparition des cancers du col de l'utérus, l'incidence mondiale est de 570 000 nouveaux cas en 2018, attribuables aux HPV-HR. Le processus de carcinogenèse dure des années voire des dizaines d'années et nécessite la persistance de l'infection et surtout la surexpression des oncoprotéines virales E6 et E7. Les cellules cancéreuses sont mêmes dépendantes de l'expression des deux oncoprotéines virales, et leur extinction provoque la mort des cellules. Leur surexpression peut être causée par l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, mais aussi par un profil de méthylation aberrant de la LCR.

Les protéines E6 et E7 possèdent à elles seules plus de 150 partenaires protéiques cellulaires et elles dérégulent de nombreuses voies de signalisation, comme les voies d'adhérence, de différenciation et de prolifération cellulaire ou d'apoptose par exemple. Les protéines E6 et E7 dérégulent aussi des enzymes impliquées dans l'établissement des marques épigénétiques, contrôlant l'expression des gènes cellulaires mais aussi des gènes viraux. Comme tous les cancers présentent des profils de marques épigénétiques altérés, comparé aux cellules saines, E6 et E7 pourraient détourner les phénomènes épigénétiques en faveur de la carcinogenèse. La méthylation des E2BS proximaux de la LCR permet par exemple de diminuer l'affinité de E2 pour ses séquences cibles, ce qui explique parfois la surexpression des oncoprotéines virales malgré la présence de E2 fonctionnelle dans les cellules infectées. Puisque E6 et E7 détournent les mécanismes épigénétiques de la cellule, et notamment altèrent l'activité de la DNMT1, les effets d'un inhibiteur des DNMT sur les cellules de cancer du col de l'utérus, provoquant une hypométhylation globale de l'ADN, ont été étudiés.

Il a été observé au laboratoire que la fréquence de méthylation des E2BS augmente en fonction de la sévérité des lésions du col de l'utérus. Un modèle cellulaire, la lignée Ca Ski, issu d'une métastase de cancer du col de l'utérus, possède d'ailleurs un niveau élevé de méthylation des E2BS proximaux de la LCR du génome HPV16 intégré. Afin d'étudier le rôle de cette méthylation sur l'expression des oncogènes viraux, les cellules ont été traitées par un agent déméthylant de l'ADN, le 5-aza-2'-déoxycytidine (5azadC). Dans les cellules Ca Ski, le traitement induit une déméthylation des E2BS de la LCR ainsi qu'une répression des oncogènes viraux, à la fois transcriptionnelle et traductionnelle. Alors que la déméthylation des E2BS suggère une répression des oncogènes viraux dépendante de E2, les cellules Ca Ski n'expriment pas la protéine E2 fonctionnelle. En plus, les cellules SiHa, sans méthylation basale des E2BS ni expression de E2, traitées avec le 5azadC, présentent aussi une répression de E6 et E7. Le but du travail de thèse a donc été d'étudier les mécanismes responsables de la répression des oncogènes E6 et E7 dans les cellules Ca Ski et SiHa après traitement avec le 5azadC.

Les travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action responsables de la répression des oncogènes viraux lors du traitement, à la fois au niveau post-transcriptionnel avec l'étude du miR-375, et au niveau transcriptionnel avec une focalisation sur TBX2.

Deuxième partie : Travaux personnels

1 Rôle du miR-375 dans la répression de E6 au cours d'un traitement au 5azadC

1.1 Première publication de Morel et collaborateurs

Des mécanismes épigénétiques sont perturbés par les oncoprotéines virales d'HPV16, avec par exemple la surexpression de DNMT1, et ces mécanismes semblent impliqués dans la régulation de l'expression des oncoprotéines virales elles-mêmes et des oncogènes cellulaires, favorisant ainsi la carcinogenèse associée aux HPV. C'est pourquoi l'objectif du travail dans cette publication a été de déterminer l'impact qu'aurait l'inhibition des DNMT sur l'expression des oncoprotéines virales. L'utilisation d'un inhibiteur de DNMT est d'autant plus pertinente qu'il a été montré une fréquence de méthylation accrue dans les cancers comparé aux lésions précancéreuses ou tissus normaux. Il existe par ailleurs des taux variables de méthylation localisée au niveau de la LCR, plus particulièrement des E2BS et SP1BS en fonction de la lignée cellulaire HPV16 positive étudiée. En effet, les cellules Ca Ski présentent des séquences méthylées à 75%, alors que les cellules SiHa ne présentent pas de méthylation au niveau des E2BS/SP1BS. Le 5-aza-2'-déoxycytidine (5azadC) a été choisi parmi une large gamme d'inhibiteurs, d'une part parce qu'il est régulièrement utilisé dans le traitement de certaines tumeurs liquides, et d'autre part parce que la molécule présente une meilleure stabilité que son analogue, le 5-azacytidine. Cet inhibiteur provoque entre autres une déméthylation passive de l'ADN en empêchant les DNMT de catalyser la méthylation de maintenance, c'est pourquoi un temps de traitement long a été utilisé, afin de prendre en compte une déméthylation conduite par plusieurs divisions cellulaires.

Par qPCR et western blotting, une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de E6 a été observée à la fois dans les cellules Ca Ski et SiHa, suggérant que cette inhibition est indépendante du statut de méthylation des E2BS. Malgré la présence de transcrits E2 détectés dans les cellules Ca Ski, aucune des deux lignées n'exprime une protéine E2 fonctionnelle, comme observé par des expériences avec des gènes rapporteurs dont l'expression est dépendante de la fixation de E2 au promoteur.

Afin de comprendre comment survenait la répression de E6, l'expression de la plupart des facteurs de transcription se fixant à la LCR, l'épissage et la stabilité des transcrits viraux ont été étudiés. Aucune variation transcriptionnelle significative des facteurs de transcription se fixant à la LCR n'a été observée et l'épissage des transcrits viraux n'est pas modifié après traitement au 5azadC. En revanche, la stabilité des transcrits E6 est diminuée après traitement au 5azadC, comme observé en qPCR après inhibition de la transcription avec l'actinomycine D.

A partir des données de la littérature, un microARN candidat, le miR-375, pourrait expliquer cette déstabilisation des transcrits. En effet, le promoteur du *MIR375* n'est pas méthylé dans les

Deuxième partie : Travaux personnels

kératinocytes non tumorigènes alors qu'il l'est dans les cellules SiHa. De même, le taux de méthylation du promoteur augmente en fonction de la sévérité des lésions du col de l'utérus. En plus, le miR-375 est capable de lier les ARNm polycistroniques viraux codant E6 et E7, grâce à 5 sites de liaison potentiels. La mutation des sites de liaison abolit d'ailleurs l'inhibition par le miR-375 de l'expression des transcrits codant E6 et E7. Finalement, le miR-375 est surexprimé dans les cellules SiHa après traitement au 5azadC. Tous ces arguments suggèrent que le miR-375 est capable de réprimer l'expression de E6 après traitement des cellules SiHa et Ca Ski par le 5azadC, grâce à la déstabilisation des transcrits.

D'après les données publiées dans cet article, le miR-375 est effectivement surexprimé après traitement au 5azadC des cellules SiHa. Cette surexpression est aussi retrouvée dans les cellules Ca Ski. Les travaux dans la partie 1.2.2 : "Cinétique d'expression du *MIR375* et méthylation de son promoteur" et non publiés confirment aussi la déméthylation relative du promoteur du *MIR375* après traitement dans les deux types de cellules. Finalement, la dernière expérience de la publication confirme l'implication du miR-375 dans la répression de E6. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du miR-375 (un oligonucléotide antisens) permet de réduire la répression du miR-375 sur l'expression de E6 lors du traitement au 5azadC, comme montré au niveau transcriptionnel par qPCR et au niveau protéique par western blotting.

SazadC treatment upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression

Adrien Morel¹, Aurélie Baguet¹, Jérôme Perrard¹, Caroline Demeret², Elise Jacquin³, David Guenat^{4,5}, Christiane Mougin^{1,4} and Jean-Luc Prétet^{1,4}

¹EA3181, Univ. Bourgogne Franche-Comté, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Rue Ambroise Paré, Besançon Cedex, France

²Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Département de Virologie, CNRS UMR 3569, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³Signalling Department, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge, United Kingdom

⁴Centre Hospitalier Régional Universitaire, Boulevard Alexandre Fleming, Besançon Cedex, France

⁵Department of Medicine, Division of Oncology, Stanford Cancer Institute, Stanford University, Stanford, California, USA

Correspondence to: Jean-Luc Prétet, **email:** jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr

Keywords: HPV, DNA methylation, E6, miRNA, SazadC

Received: August 20, 2016

Accepted: April 10, 2017

Published: May 02, 2017

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

ABSTRACT

High risk human papillomaviruses are the etiological agents of cervical cancer and HPV16 is the most oncogenic genotype. Immortalization and transformation of infected cells requires the overexpression of the two viral oncoproteins E6 and E7 following HPV DNA integration into the host cell genome. Integration often leads to the loss of the E2 open reading frame and the corresponding protein can no longer act as a transcriptional repressor on p97 promoter. Recently, it has been proposed that long control region methylation also contributes to the regulation of E6/E7 expression.

To determine which epigenetic mechanism is involved in HPV16 early gene regulation, 5-aza-2'-deoxycytidine was used to demethylate Ca Ski and SiHa cell DNA. Decreased expression of E6 mRNA and protein levels was observed in both cell lines in an E2-independent manner. E6 repression was accompanied by neither a modification of the main cellular transcription factor expression involved in long control region regulation, nor by a modification of the E6 mRNA splicing pattern. In contrast, a pronounced upregulation of miR-375, known to destabilize HPV16 early viral mRNA, was observed. Finally, the use of miR-375 inhibitor definitively proved the involvement of miR-375 in E6 repression. These results highlight that cellular DNA methylation modulates HPV16 early gene expression and support a role for epigenetic events in high-risk HPV associated-carcinogenesis.

INTRODUCTION

Among the 170 HPV described in 2013 [1], 12 high-risk HPV (hrHPV) are classified as carcinogenic to humans by the IARC [2]. High-risk HPV are the etiologic agents of cervical cancer and are also responsible for the majority of anal cancers and part of head and neck, vaginal, vulvar and penile cancers. HPV16 is the most carcinogenic genotype, found in 61% of cervical cancers according to a retrospective cross-sectional worldwide study [3], in 73.4% of anal cancers [4] and 30.9% of oropharyngeal cancers [5].

The HPV16 genome is a circular double-stranded DNA. It harbors 8 open reading frames (ORFs) encoding early (E1, E2, E4, E5, E6 and E7) and late (L1 and L2) viral proteins and a long control region (LCR) containing transcription control sequences. The LCR presents numerous binding sites for cellular transcription factors known to activate (TATA binding protein, Sp1, AP-1 and NF1) or repress (YY1) transcription of viral early genes [6]. It also exhibits four E2 Binding Sites (E2BS) with common consensus sequence 5'-ACCG(N)₄CGGT-3' and different affinities for E2 [7]. The two E2BS closest to the TATA box (proximal E2BS) are the main sites involved

in the repression of p97 promoter activity by E2. The repressor activity of E2 is linked to its ability to displace cellular transcriptional activators from their binding site due to steric hindrance [8].

The p97-mediated transcription produces polycistronic mRNAs undergoing alternative splicing [9]. In the absence of splice-site recognition in the E6 ORF, the full length E6 (E6Fl) protein, showing oncogenic properties, is produced. In contrast, the recognition of alternative splice sites generates transcripts potentially encoding truncated E6 proteins such as E6*I and E6*II [10], two isoforms whose function remains poorly understood [11, 12].

HPV16 DNA integration into the host cell genome is thought to play a pivotal role in HPV-associated carcinogenesis. Integration generally results in the disruption of the E2 ORF, thereby preventing the repressive function of E2 on p97 promoter. This leads to an upregulation of E6 and E7, two viral oncoproteins that deregulate the p53 and p105Rb pathways respectively [13, 14]. Consequently, E6 and E7 induce the immortalization and transformation of infected cells.

Some authors have proposed that sequence variations or changes of the LCR methylation status could contribute to the regulation of E6/E7 expression [15]. In this regard, we and others previously showed CpG dinucleotide methylation of HPV16 E2BS in precancerous and cancerous lesions of the cervix [16–20]. However, upregulation of E6 and E7 is not only due to the transcriptional activation of p97, but also to the increased stability of early viral mRNA transcribed from integrated HPV16 genomes [21].

Recently, several studies reported an aberrant expression profile of 341 miRNAs [22] in HPV-associated carcinomas and the detection of miR-424/miR-375/miR-218 from cervical smears has been proposed for cervical cancer screening [23]. Furthermore, miR-375, a tumor suppressor miRNA known to target HPV16 E6/E7 mRNA [24] is downregulated in cervical carcinomas compared to normal tissues or precancerous lesions [25, 26] thanks to promoter methylation [27].

In this study, the demethylating agent 5-aza-2'deoxyctidine (5azadC) was used to treat the HPV16-positive cervical carcinoma Ca Ski and SiHa cell lines. Our objective was to characterize the impact of DNA demethylation on early viral gene expression.

RESULTS

5azadC treatment decreases HPV16E6 expression in Ca Ski and SiHa cells in E2-independent manner

In order to determine the impact of 5azadC on endogenous HPV16 E6 protein levels, time-course and

dose-response experiments were conducted in Ca Ski and SiHa cells. These cell lines differ in their status regarding HPV16 genome integration. The Ca Ski cells harbor up to 500 copies of integrated HPV16 genomes, most copies being hyper-methylated. In contrast, SiHa cells harbor one to two integrated viral genomes per cell [28]. Interestingly, from 24h to 96h, E6 protein levels gradually decreased in both cell lines treated with 5azadC. In parallel, an accumulation of p53 protein was observed (Supplementary Figure 1). According to these results, the treatment condition used to monitor the effect of 5azadC on E6 expression was set at 0.25 μ M for 96h.

Then, the methylation status of proximal E2BS located in the LCR was investigated in both cell lines treated with 5azadC using HRM PCR as we previously described [17]. Untreated Ca Ski and SiHa cells were assigned to the 75% and 0% methylation profiles respectively. The proportion of methylated proximal E2BS decreased to 25% in Ca Ski cells exposed to 5azadC for 96h. As expected, this proportion was not modified in SiHa cells that were assigned to the 0% methylation profile (Figure 1A). These data showed that 5azadC efficiently reduced the methylation level of proximal E2BS in Ca Ski cells.

Next, E6 protein and full length E6-encoding mRNA (E6Fl) levels were analyzed using Western Blotting and RT-qPCR in Ca Ski and SiHa cells treated with 5azadC at 0.25 μ M for 96h. The decrease in E6 protein in treated cells (Figure 1B) was confirmed and a decrease in E6Fl mRNA levels was observed in both cell lines compared to control cells (Figure 1C).

Taking into account that E2 is the major regulator of the p97 promoter, the loss of E6 protein expression could be the consequence of the E2 interaction with demethylated E2BS at least in Ca Ski cells that harbor intact E2 ORFs. Regarding SiHa cells, E2 independent mechanism(s) likely decrease E6 expression in cells harboring demethylated DNA due to the disruption of the E2 gene. To address whether Ca Ski cells expressed constitutively the E2 protein, a luciferase reporter construct under the control of E2BS (pGL3E2BSTKminLuc) was transfected in these cells. SiHa cells were used as negative control. The co-transfection of pciNeoE2 was used as a positive control. As shown in Figure 1D, no luminescence was emitted by cells transfected with pGL3TKminLuc or pGL3E2BSTKminLuc. Luciferase activity was observed only in Ca Ski and SiHa cells co-transfected with pGL3E2BSTKmin Luc and pciNeoE2. These data indicate that the E2 protein is either not expressed or expressed as a non-functional protein in Ca Ski and SiHa cell lines, suggesting that the repression of E6 expression by 5azadC was not due to E2 in Ca Ski cells. Thus, we explored other possible processes for the effect of 5azadC treatment on E6 repression.

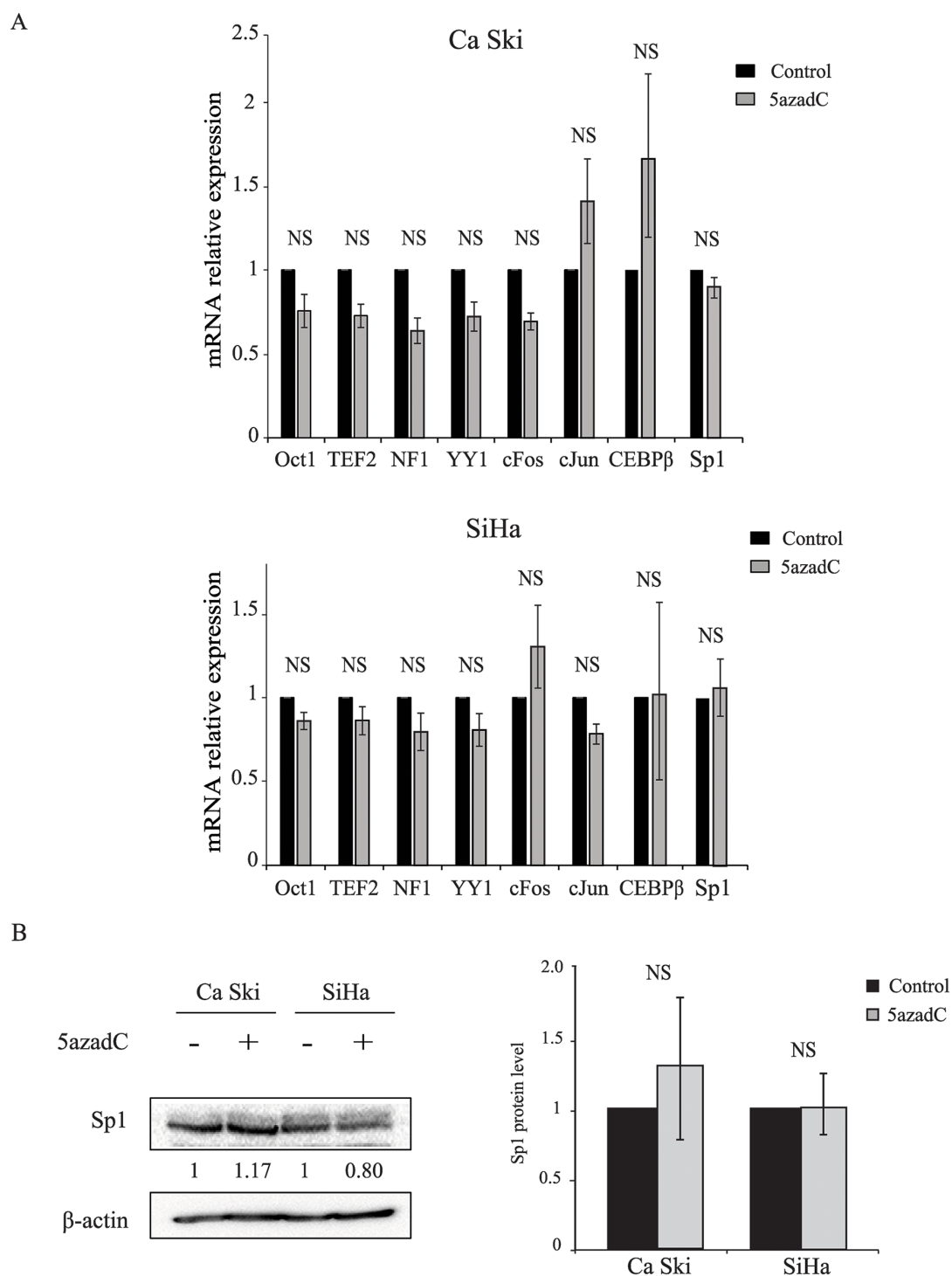


Figure 2: Effect of 5azadC treatment on cellular transcription factor expression. (A) Total RNAs were extracted from Ca Ski and SiHa cells treated or not with 5azadC for 96h and the relative expression of Oct1, TEF-2, NF1, YY1, cFos, cJun, CEBPβ and Sp1 mRNA was measured by RT-qPCR and normalized to β2M mRNA level. The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and *p* values were calculated by performing Mann Whitney's test: NS: no significant. (B) Mock treated and 5azadC-treated (0.25 μM for 96h) Ca Ski and SiHa cells were lysed and the protein fraction was assayed for the presence of Sp1 by Western blotting. β-actin served as a loading control. A representative blot is shown; the values of the densitometric analysis were normalized with β-actin (left). The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and *p* values were calculated by performing Mann Whitney test: NS: no significant (right).

cells respectively) (Figure 2B). These results suggest that 5azadC does not modify the expression of the main transcription factors involved in p97 regulation.

E6 RNA splicing pattern is not modified but E6 mRNA stability is decreased after 5azadC treatment

HPV16 gene expression is also post-transcriptionally regulated by RNA splicing. Recently, next generation sequencing allowed the identification of at least 20 polycistronic HPV transcripts due to alternative splicing and expressed in high grade cervical lesions [29]. At least three E6 RNAs, commonly named E6F1, E6*I and E6*II can be generated by alternative splicing (Figure 3A). In order to assess whether 5azadC modifies the splicing pattern of E6 transcripts, unspliced and spliced E6 RNAs

were analyzed by RT-PCR using primers specifically designed to amplify simultaneously E6F1, E6*I and E6*II transcripts. These transcripts were expressed in Ca Ski and SiHa cells and 5azadC treatment did not modify the splicing profile of E6 transcripts (Figure 3B). RT-qPCR was used to independently quantify either all E6 transcripts (E6all), or E6F1 and E6*I individually (Figure 3C). As expected, the level of E6all RNA was lower in treated cells compared to control cells (Figure 3D). The same trend was observed for E6*I RNA level (Figure 3E). Finally, the E6F1/E6all mRNA ratios calculated in control and treated cells were very similar, ruling out the hypothesis that 5azadC treatment modified the splicing pattern of E6 transcripts (Figure 3F).

To assess whether 5azadC affects the stability of E6F1 RNA, we monitored RNA level during a time-course treatment with actinomycin D. As shown in Figure 4A, the

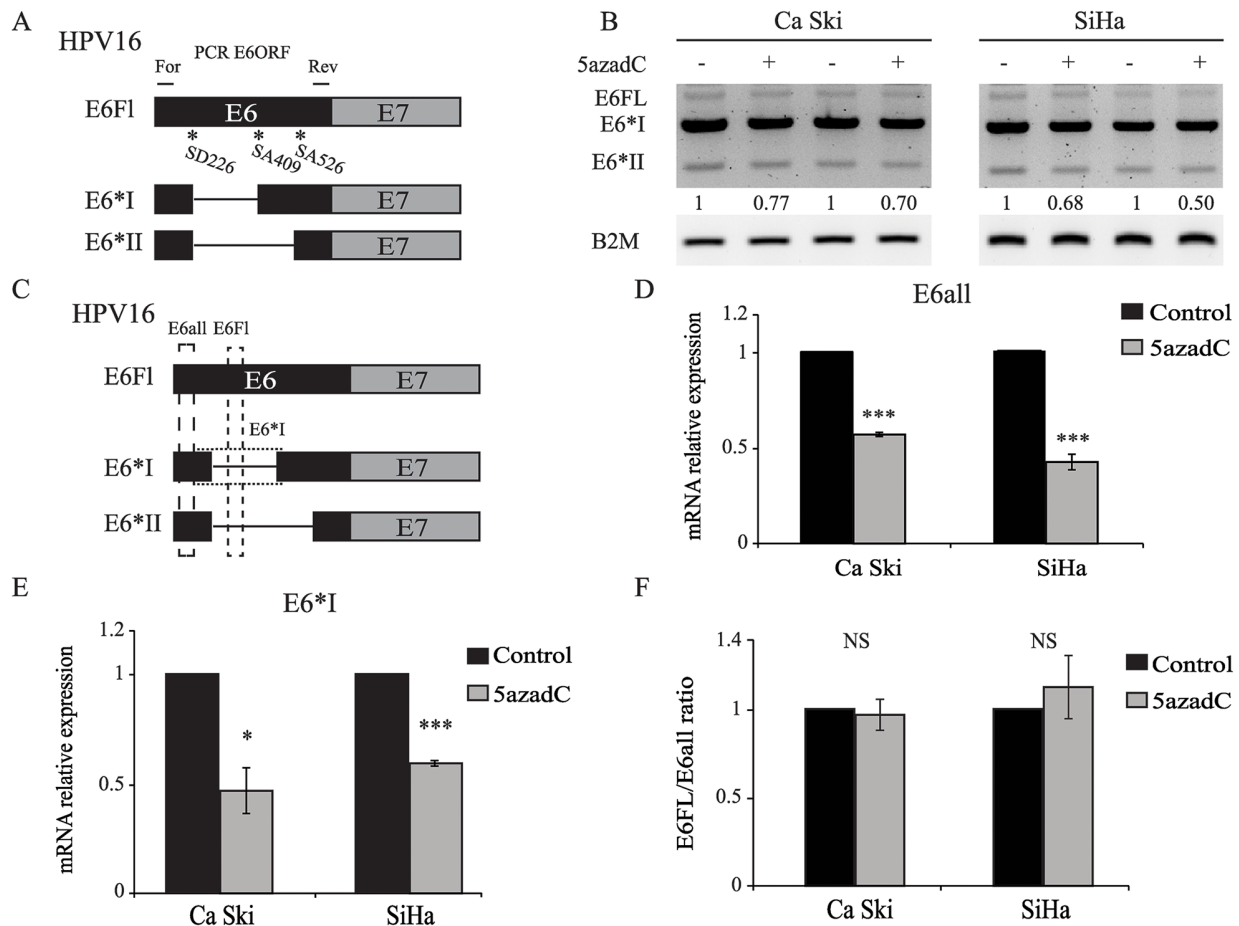


Figure 3: E6 RNA splicing pattern is not modified by 5azadC treatment. (A) Splicing pattern of E6 RNAs. The position of forward (For) and reverse (Rev) primers is shown. (B) Total RNAs were extracted from mock treated and 5azadC-treated (0.25 μ M for 96h) Ca Ski and SiHa cells. Two representative and independent RT-PCR analysis of the E6ORF show E6F1, E6*I and E6*II mRNA after gel electrophoresis. Semi-quantitation of all E6 transcripts was carried out by densitometry analysis normalized to β 2M mRNA level. (C) Schematic view of E6all, E6F1 and E6*I RT-qPCR products. (D, E) E6all (D) and E6*I (E) mRNA were quantified by RT-qPCR and normalized to β 2M mRNA level in three independent experiments. (F) E6F1/E6all mRNA ratios were calculated to reveal changes in the splicing pattern of E6 transcripts. The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and p values were calculated by performing Mann Whitney test: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; NS: not significant.

half-life of E6f1 mRNA was significantly decreased from 40 min to 20 min in Ca Ski cells after 5azadC treatment. In SiHa cells, a slight but significant decrease of E6f1 mRNA half-life was observed from 65 min to 51 min (Figure 4B). Taken together, these results suggest that the modulation of E6 expression might be partly due to a destabilization of E6 transcripts.

Demethylation induces an increased expression of miR-375 which correlates with E6 RNA destabilization and protein loss

Recently, it was reported that miR-375 mimics induced the suppression of E6 expression in HPV positive

cell lines [24, 30]. First the miR-375 level was measured in HPV16 positive cell lines (CaSki and SiHa) and in HPV negative cell lines (C33A and U2OS). As shown in Figure 5A, miR-375 expression was low in Ca Ski and SiHa cells compared to the HPV negative cervical cancer cell line C33A or to the osteosarcoma cell line U2OS.

To determine whether miR-375 level was modulated after DNA demethylation, RT-qPCR was performed in HPV16 positive cells treated or not with 5azadC. Interestingly, after 5azadC exposure, the miR-375 expression was upregulated 7.4-fold and 2.2-fold in CaSki and SiHa cells respectively (Figure 5B).

To confirm the implication of miR-375 in HPV16 transcript repression, the effect of a miR-375 inhibitor was

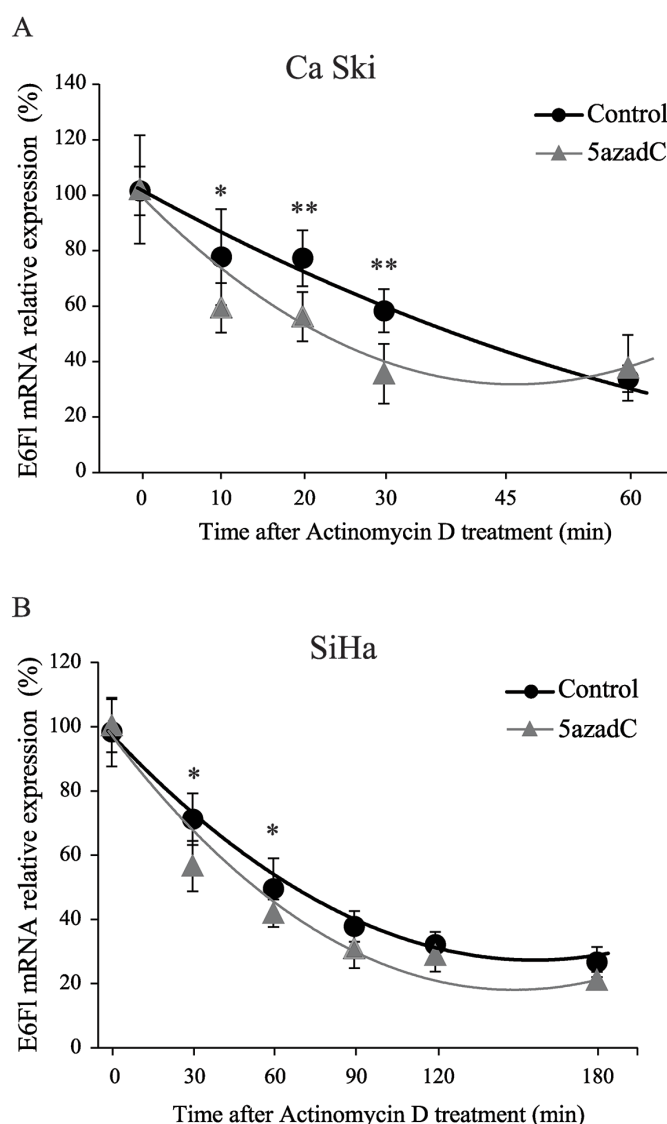


Figure 4: Destabilization of E6 transcripts after 5azadC treatment. (A, B) RNAs were extracted from Ca Ski (A) and SiHa (B) cells treated or not with 5azadC at 0.25 μ M during 96h and treated with 4 μ g/mL actinomycin D. Relative expression of E6f1 mRNA was determined by RT-qPCR and normalized to β 2M mRNA level. The diagram shows the mean values for at least three independent experiments and the standard deviation. Mann-Whitney's test was performed to calculate p values using DMSO treated cells as a reference control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

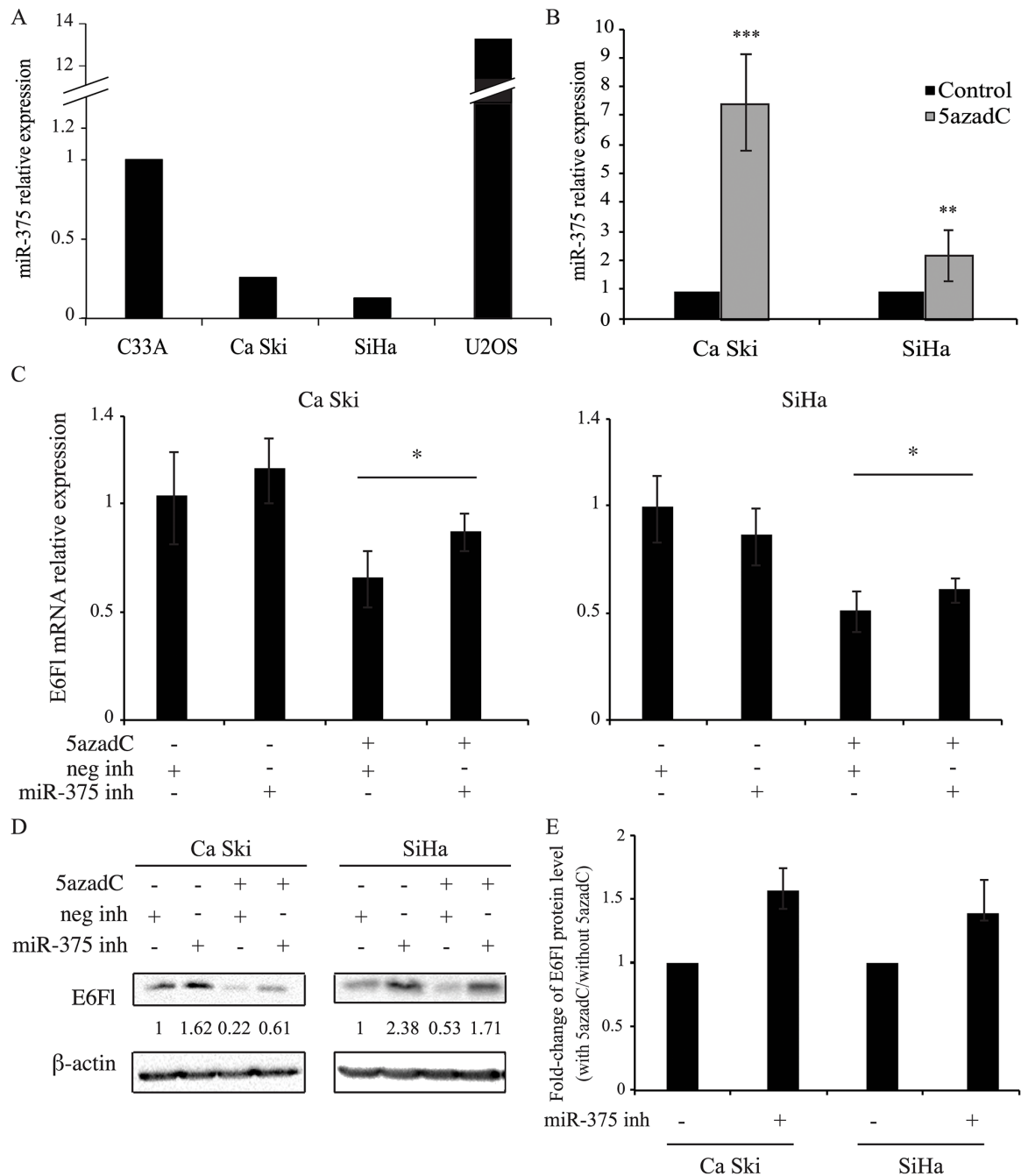


Figure 5: miR-375 is involved in the decrease of E6 expression. (A, B) miR-375 relative expression was quantified by RT-qPCR and normalized to U6 snRNA level in C33A, Ca Ski, SiHa and U2OS cells (A) and in Ca Ski and SiHa cells (B) treated or not with 0.25 μ M of 5azadC for 96h. The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and *p* values were calculated by performing Mann Whitney test: ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001 (B) (C, D) Ca Ski and SiHa cells were treated with 5azadC at 0.25 μ M during 96h. Cells were transfected with miRIDIAN microRNA negative control or miR-375 inhibitors at 200 nM during the last 24h. E6Fl mRNAs were analyzed by RT-qPCR and normalized to β 2M mRNA level (C) and E6 proteins were analyzed by Western blotting and normalized to β -actin protein level (D). The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and *p* values were calculated by performing Mann Whitney's test between 5azadC-treated cells +/- miR-375 inhibitor: * *p* < 0.05 (E) Fold-change in E6Fl protein levels induced by miR-375 inhibitor was calculated in 5azadC-treated cells compared to control cells. The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and *p* values were calculated by performing Mann Whitney's test: *p*=0.06 for both cells.

tested in HPV16 positive cells. In the absence of 5azadC, no significant change was observed in E6F1 mRNA level after addition of miR-375 inhibitor (Figure 5C) while the corresponding protein was increased (Figure 5D). As expected, decreased expression of E6F1 at both mRNA (Figure 5C) and protein (Figure 5D) levels was observed in 5azadC-treated cells. Interestingly, we observed that the miR-375 inhibitor restored E6F1 mRNA expression in 5azadC-treated cells, from 0.65 to 0.86 in Ca Ski cells and from 0.51 to 0.61 in SiHa cells (Figure 5C). This increase was also observed at the protein level (Figure 5D). Then, the E6F1 protein rescue was estimated in cells transfected with the miR-375 inhibitor in the presence or not of 5azadC. As shown in Figure 5E, miR-375 inhibitor transfection induced an increase of 1.52- and 1.35-fold in E6 expression in Ca Ski and SiHa cells respectively compared to control cells at the limit of significance ($p=0.06$).

Altogether, these data show that global DNA demethylation by 5azadC upregulates miR-375 expression, which consequently likely leads to destabilization of HPV16 transcripts and loss of E6 protein expression.

DISCUSSION

In this study, we showed that the treatment of HPV16 positive Ca Ski and SiHa cells with the demethylating agent 5azadC induces repression of E6 expression at both mRNA and protein levels. This result was somewhat unexpected for Ca Ski cells. Indeed, this cell line presents nearly 500 integrated HPV16 genomes in head-to-tail concatemers and a highly methylated LCR (>80%), especially on the 5 CpG involved in the regulation of early viral gene expression and located in the two proximal E2BS [17]. Usually, high levels of CpG methylation contribute to gene silencing by preventing the binding of transcription factors to specific regulatory sequences or by inducing chromatin compaction [31]. In this regard, it has been demonstrated by *in vitro* studies that LCR methylation can silence p97 promoter and limit the expression of early genes [32, 33]. Thus, it would have been consistent to observe increased expression of E6 after 5azadC treatment. Indeed, proximal E2BS were effectively demethylated in treated Ca Ski cells making promoter sequences accessible to binding by transcription factors. Because E2 is the main repressor of p97, we sought to determine whether this protein was expressed in Ca Ski cells. The use of a very sensitive luciferase test demonstrated the absence of functional E2 protein as previously described [34]. Furthermore, E6 was also downregulated in SiHa cells which exhibit disrupted E2 ORFs and unmethylated E2BS. Thus, the repression of E6 in response to DNA demethylation by 5azadC treatment appears independent of E2 protein. Hence, we explored other possible mechanisms for the effect of 5azadC treatment on E6 repression.

We focused our attention on the cellular transcription factors (Oct1, TEF-2, NF1, YY1, cFos, cJun, CEBP β and Sp1) known to bind sequences that regulate HPV16 early gene expression [6, 35]. Few data concerning epigenetic regulation of transcription factors are available. Some studies have reported that 5azadC induces a decrease in AP-1 expression in bone marrow mononuclear cells [36], an increase in CEBP α but a decrease in CEBP γ expression in acute myeloid leukemia cells [37] and an increase in CEBP α expression in three HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines [38]. In Ca Ski and SiHa cells, none of the studied transcription factors (either activator or repressor) appeared significantly increased or decreased by 5azadC treatment. Post-translational modifications of transcription factors are known to modulate their activity and/or stability [39]. Such modifications were not investigated in the present study and it cannot be excluded that they can be altered by DNA demethylation leading to variations in the function of these central regulators of gene expression.

HPV16 transcripts are polycistronic mRNAs submitted to alternative splicing. Interestingly, Piotrowska *et al.* showed that 5azadC contributes to the variable expression of splice variants of Glucocorticoid Receptor alpha and beta, which was accompanied by increased expression of the serine/arginine splicing factor 2 (SRSF2) in breast carcinoma cells [40]. In our cellular models, the different splice variants of E6 were decreased after 5azadC treatment and no change in the E6FL/E6all mRNA ratio was observed, indicating that demethylation of DNA did not favor the splicing of E6F1 mRNA into small spliced isoforms E6*I or E6*II. McFarlane *et al.* showed that the depletion of the splicing factor SRSF2 in Ca Ski cells favored the reduction of E6/E7 transcripts [41]. They demonstrated that it was not due to down-modulation of transcription initiation or elongation, but rather to mRNA destabilization, and they proposed that SRSF2 might protect viral mRNA from non-sense mediated RNA decay (NMD).

The exposure of Ca Ski and SiHa cells to actinomycin D made it possible to demonstrate that the stability of E6F1 mRNA was reduced after 5azadC treatment. Similarly, Luczak *et al.* used the HDAC inhibitor apicidin, another epidrug, and observed a decrease of E6/E7 transcript stability in SiHa cells. However, the molecular mechanism underlying transcript destabilization by apicidin was not investigated in Luczak's study [42]. Recently, miR-375 has been shown to negatively regulate E6/E7 transcripts in HPV16 positive carcinoma cell lines [24, 30]. Consistent with these observations, a 2.2 to 7.4-fold increase in miR-375 expression was observed in 5azadC-treated SiHa and Ca Ski cells, respectively, suggesting that miR-375 could play a role in E6 mRNA destabilization. In treated Ca Ski cells, the E6F1 mRNA half-life decreased by half (from 40 to 20 min) compared to control cells. There was only a 22% decrease (65 to 51 min) in SiHa cells, suggesting that E6F1 mRNA destabilization was less efficient in this cell line as

Table 1: Primer sequences

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Amplicon
E6F1	CACAGGAGCGACCCAGAAA	CCCGAAAAGCAAAGTCATATACC	131 bp
E6*I	CTGCGACGTGAGGTGTATTA	TGTCCAGGTGTCTTTGCTTT	68 bp
E6all	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC	80 bp
B2M	GATGAGTATGCCGTGTG	CAATCCAAATGCGGCATCT	114 bp
Oct1	CAGATCGCACAGGATCTTCA	GGATGCACCAACACAAACTG	80 bp
TEF-2	AAAGCTCCCACCTGAAAGCA	AACTTCCATGTGCACCCCTC	85 bp
NF1	GTGTTCCATGTGCGATTACG	TCATGTGCCTTTTCAGCTTG	140 bp
YY1	ACCTGGCATTGACCTCTCAG	TTCTCATGGCCGAGTTATCC	149 bp
cFos	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA	CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG	150 bp
cJun	TGACTGCAAAGATGGAAACG	CAGGGTCATGCTCTGTTTCA	119 bp
CEBPβ	TACTACGAGGCGGACTGCTT	AGGTACGGGCTGAAGTCGAT	149 bp
U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC	AAAATATGGAACGCTTCACGA	100 bp

compared to Ca Ski cells. This may be due to the lower level of miR-375 measured in SiHa cells compared to Ca Ski cells after 5azadC treatment. Interestingly, Wilting *et al.* and Stich *et al.* have demonstrated that the treatment of HPV16 positive cervical and head and neck cancer cell lines by 5azadC led to miR-375 promoter demethylation, an observation consistent with a direct effect of 5azadC in miR-375 overexpression [27, 30]. In this report, we confirmed that the treatment with a demethylating agent increases the expression of miR-375 in SiHa cells and to a greater extent in Ca Ski cells. Moreover, the use of miR-375 inhibitor supported a role for miR-375 in the repression of E6 by 5azadC since it reverses the effect of the demethylating agent on E6 expression. These data are consistent with those obtained by Jung *et al.* and Stich *et al.* who used miR-375 mimic to repress the expression of E6/E7 RNA and E7 protein in HPV16 positive carcinoma cell lines [24, 30].

The weaker effect of miR-375 inhibitor on E6F1 mRNA compared to the effect on protein expression could be related to the mechanisms by which miRNAs regulate gene expression. Indeed, miRNAs can induce translational repression and/or mRNA decay, and miRNA-mediated silencing depends on the concentration of RNA-induced silencing complex (RISC) components, the sequence of target mRNAs (number of miRNA-binding sites) and cell types. Moreover, recent genome-wide analyses support the model that miRNAs induce translational repression before mRNA decay [43]. Thus, miR-375 inhibitor probably first modulate translation repression induced by miR-375, while an increase in E6F1 mRNA expression would require much longer exposure to miR-375 inhibitor. Additional studies on RISC composition and function following 5azadC treatment could help to better understand the role of miR-375 in E6 repression.

The miR-375 exhibits tumor suppressor activity through inhibition of proliferation, invasion and motility [44]. E6 and E7 are known to modulate the activity and the expression of DNMT1 and histone methyltransferase to down-regulate the expression of numerous tumor suppressor genes [45–48] or miRNA through promoter methylation or cell signaling pathway [49–51]. Thus, miR-375 promoter methylation may be one strategy developed by HPV16 to allow efficient and sustained expression of E6/E7 oncogenes to functionally inactivate anti-proliferative and anti-apoptotic signaling pathways. Furthermore, Liu *et al.* recently showed that E6 participates in the silencing of miR-375 expression through overexpression of DNMT1, which in turn methylates miR-375 promoter [52].

Nonetheless, our study presents some limitations. Experiments addressed the role of miR-375 only, but other miRNAs (miR-122, miR-875 and miR-3144) have been shown to repress the expression of E6/E7 transcripts [53, 54]. Therefore, it cannot be excluded that one of these miRNAs participates in E6 repression after 5azadC treatment. This would explain why E6 expression is not totally rescued following miR-375 inhibitor treatment. The conclusions presented here rely on the analysis of two cervical cancer cell lines. We obtained similar results with a HPV16-positive head and neck cancer cell line regarding the down-regulation of E6 expression at RNA and protein levels following 5azadC treatment (data not shown). Our results are consistent with those recently published by Stich *et al.* who also reported a 2- to 3-fold reduction in miR-375 promoter methylation following the treatment of HPV16-positive cell lines with 5azadC [30], an observation consistent with a direct effect of this demethylating agent on miR-375 up-regulation. The effect of 5azadC treatment on cell viability was not investigated.

Since it was previously shown that E6 was repressed in apoptotic HPV16-positive cells following staurosporine- or isoliquiritigenin exposure [55, 56], we can hypothesize that 5azadC could favor cell death of HPV16-positive cells.

To conclude, in this study we have shown that HPV16 E6 expression was down-regulated in Ca Ski and SiHa cells at mRNA and protein levels after 5azadC treatment. This repression was not associated with modifications of expression of ubiquitous cellular transcription factors known to bind the LCR. Moreover, the splicing pattern of E6 mRNA was not altered. Rather, we evidenced a destabilization of E6 mRNA thanks to miR-375 upregulation. Further investigations are necessary to better understand the relationship between E6 and miR-375 regulation, to gain further insight into HPV16-associated carcinogenesis. Moreover, the development of targeted therapies based on miRNA mimics [57] or epidrugs [58–59] will pave the way for the emergence of new therapeutic strategies for HPV-associated cancers.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Ca Ski cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in RPMI-1640 medium while SiHa, C33-A and U2OS cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), both supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Lonza, Basel, Switzerland) in a humidified CO₂ incubator at 37°C. Ca Ski and SiHa cells, two HPV16 cell lines, were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) at a final concentration of 0.25 µM for 48h or 96h. The treatment medium was renewed every day.

DNA extraction and bisulfite conversion

DNA was extracted using QiAmp DNA Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and converted using Cells to CpG bisulfite conversion kit (Life Technologies). Briefly, 500 ng of DNA were denatured at 50°C for 10 min with the denaturation agent. One hundred microliters of reconstituted conversion reagent were added to the denatured DNA and the solution was incubated for two cycles of 30 min at 65°C and 1.5 min at 95°C followed by 30 min at 65°C. The converted DNA was purified to remove salts and sulfonic groups and eluted in 40 µL of elution buffer.

HRM PCR

The HRM PCR assesses the 5 CpG islands methylation located on the proximal E2BS of HPV16 p97 promoter. The experiment was performed using the

ABI 7500 Fast real-time PCR system and Melt Doctor HRM Master mix (Life Technologies) as we previously described in Jacquin *et al.*, 2013 [18].

Plasmid transfection and luciferase assay

Ca Ski and SiHa cells were transfected with the mixture of each vector (pciNeo+/-E2 and pGL3TKmin Luc+/-E2BS) using JetPEI® transfection reagent (Polyplus transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were lysed by Lysis reagent 1X of Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega, Charbinnières les bains, France). Lysates were mixed with the Luciferase assay reagent and the luminescence was recorded. Luminescence signals were then stopped through Stop and Glo reagent and *Renilla* signals were measured to normalize luciferase luminescence.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNAs were extracted by Trizol®-chloroform method (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). cDNA were synthesized using the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations.

qPCR

Viral (E6 Full length, E6*I, E6all), cellular transcription factors (TF) (Oct1, cFos, cJun, TEF-2, NF1, CEBPβ, YY1 and Sp1) cDNA were quantified by real-time PCR using the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) with the SYBR Green real time PCR master mix (Life Technologies, Saint Aubin, France). The specific primer sequences of selected genes are shown in Table 1. Thermal cycling for all qPCR consisted in 95°C 5 min followed by 40 cycles of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C. mRNA levels were normalized to β2 microglobulin using the 2^{-ΔΔCt} method.

E6ORF PCR

E6ORF_For5'-ATGCACCAAAAGAGAACTGC-3' and E6ORF_Rev5'-TTACAGCTGGGTTTCTCTACGTGT-3' primers were designed to target the ORF of E6Fl, E6*I and E6*II. PCR were performed with 0.5 µM of each primer, 0.625 U DreamTaq Polymerase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), DreamTaq Buffer 1X and 2.5 µL of cDNA. Amplification consisted in a first step at 95°C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 95°C (30 sec), hybridization at 50°C (20 sec), elongation at 72°C (30 sec) and a final step at 72°C for 5 min. After electrophoresis on a 2% agarose gel, PCR product levels were normalized to β2 microglobulin using densitometry.

Quantification of miR-375

After RNA extraction, reverse transcription was carried out using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). Relative quantities of miR-375 (Cat#4427975, Life Technologies) were determined with the 7500 Real-Time PCR System by using TaqMan® microRNA Assays and TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies). miR-375 expression was normalized by the endogenous control U6 snRNA (Primers: Table 1) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Suppression of miR-375 activity

Ca Ski and SiHa cells were treated with 5azadC at 0.25 μ M for 96h. During the last 24h, cells were transfected with miRIDIAN microRNA Human miR-375 hairpin inhibitor (IH-3006882-07) or miRIDIAN miRNA Hairpin Inhibitor Negative Control (IN-001005-01) (Dharmacon, GE Healthcare, LaFayette, USA) at 200 nM with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then processed for analysis of E6F1 mRNA and protein expression.

Western blotting

Proteins were extracted with radioimmuno-precipitation assay lysis buffer (50mM Tris/HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% Na deoxycholate, 1mM EDTA), protease inhibitor (30 μ g/mL) (Roche Diagnostics, Meylan, France). After sonication, protein concentrations were determined using the BioRad Protein assay (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's recommendations. Each sample was subjected to SDS-PAGE and then transferred onto Hybond TM-P polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, Amersham, England) which were blocked with 5% nonfat milk overnight at 4°C under constant shaking. Membranes were then incubated with primary antibodies (see below), washed and incubated with anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin antibodies conjugated with horseradish-peroxydase. The following primary antibodies were used for this study: 2E3F8 anti-E6HPV16 (Euromedex, Souffelweyersheim, France); DO7 anti-p53 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France); ABE135 anti-Sp1 (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and AC15 anti- β -actin (Sigma-Aldrich) antibodies. The immune complexes were revealed by chemiluminescence with Pierce ECL2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) using ChemiDoc XRS+ with image lab software (Biorad).

Statistical analyses

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Group comparisons were performed using the Mann-

Whitney test. A p value <0.05 was considered as statistically significant; *, **, and *** illustrate significance at 0.05, 0.01, and 0.001 levels respectively. A one-way ANOVA has been used to correct for multiple testing.

Author contributions

AM, AB, CM, JLP conceived and designed the study; AM, JP, EJ performed experiments and analyzed the data; AM, AB, CM, JLP drafted the manuscript; CD, EL, DG performed a critical revision of the manuscript; CD provided plasmid constructions. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Eric Hervouet, Université de Franche-Comté in Besançon, France for his help with ChIP assay. A. Morel, J. Perrard and E. Jacquin were the recipients of a predoctoral scholarship from the Conseil Régional de Franche-Comté. The authors thank Fiona Ecarnot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for editorial assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

FUNDING

Part of this work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (Comité du Doubs and CCIR-GE) and the Conseil Régional de Franche-Comté.

REFERENCES

1. de Villiers E-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013; 445: 2–10. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.023.
2. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglian V, WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 321–2.
3. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin H-R, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11: 1048–56. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70230-8.
4. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of

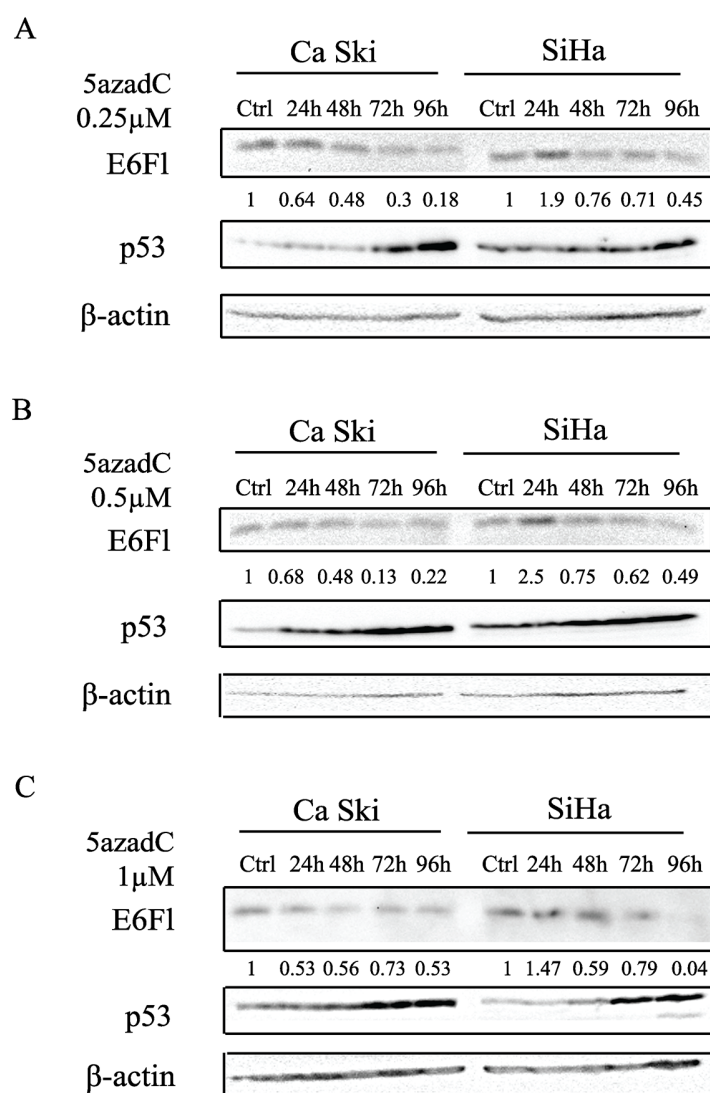
- human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009; 124: 1626–36. doi: 10.1002/ijc.24116.
5. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2005; 14: 467–75. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
6. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol*. 1991; 65: 5933–43.
7. Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol*. 1994; 68: 6411–20.
8. Dong G, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol*. 1994; 68: 1115–27.
9. Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11: 239–51. doi: 10.1038/nrmicro2984.
10. Zheng Z-M, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2006; 11: 2286–302.
11. Zheng Z-M. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci*. 2004; 11: 278–94. doi: 10.1159/000077096.
12. Filippova M, Evans W, Aragon R, Filippov V, Williams VM, Hong L, Reeves ME, Duerksen-Hughes P. The small splice variant of HPV16 E6, E6, reduces tumor formation in cervical carcinoma xenografts. *Virology*. 2014; 450-451: 153–64. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.011.
13. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75: 495–505.
14. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 4549–53.
15. Gao C, Pan M-M, Lei Y-J, Tian L-Q, Jiang H-Y, Li X-L, Shi Q, Tian C, Yuan Y-K, Fan G-X, Dong X-P. A point mutation in the DNA-binding domain of HPV-2 E2 protein increases its DNA-binding capacity and reverses its transcriptional regulatory activity on the viral early promoter. *BMC Mol Biol*. 2012; 13: 5. doi: 10.1186/1471-2199-13-5.
16. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*. 2006; 354: 280–5. doi: 10.1016/j.virol.2006.06.018.
17. Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, Carcopino X, Morel A, Valmary-Degano S, Bravo IG, de Sanjosé S, Riethmuller D, Mougin C, Prétet J-L. Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 3207–15. doi: 10.1128/JCM.01106-13.
18. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PloS One*. 2011; 6: e24451. doi: 10.1371/journal.pone.0024451.
19. Das Ghosh D, Bhattacharjee B, Sen S, Premi L, Mukhopadhyay I, Chowdhury RR, Roy S, Sengupta S. Some novel insights on HPV16 related cervical cancer pathogenesis based on analyses of LCR methylation, viral load, E7 and E2/E4 expressions. *PloS One*. 2012; 7: e44678. doi: 10.1371/journal.pone.0044678.
20. Leung T-W, Liu SS, Leung RCY, Chu MMY, Cheung ANY, Ngan HYS. HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *J Med Virol*. 2015; 87: 1022–33. doi: 10.1002/jmv.24129.
21. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 1654–8.
22. Kumar Gupta A, Kumar M. HPVbase-a knowledgebase of viral integrations, methylation patterns and microRNAs aberrant expression: As potential biomarkers for Human papillomaviruses mediated carcinomas. *Sci Rep*. 2015; 5: 12522. doi: 10.1038/srep12522.
23. Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, Ye F, Wang X, Cheng X, Chen Y, Wan X, Lu W, Xie X. MicroRNA Detection in Cervical Exfoliated Cells as a Triage for Human Papillomavirus-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106: dju241. doi: 10.1093/jnci/dju241.
24. Jung HM, Phillips BL, Chan EK. miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 ζ . *Mol Cancer*. 2014; 13: 80. doi: 10.1186/1476-4598-13-80.
25. Wang F, Li Y, Zhou J, Xu J, Peng C, Ye F, Shen Y, Lu W, Wan X, Xie X. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. *Am J Pathol*. 2011; 179: 2580–8. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.037.

26. Bierkens M, Krijgsman O, Wilting SM, Bosch L, Jaspers A, Meijer GA, Meijer CJLM, Snijders PJF, Ylstra B, Steenbergen RDM. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52: 56–68. doi: 10.1002/gcc.22006.
27. Wilting SM, Verlaet W, Jaspers A, Makazaji NA, Agami R, Meijer CJLM, Snijders PJF, Steenbergen RDM. Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis. *Epigenetics*. 2013; 8: 220–8. doi: 10.4161/epi.23605.
28. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol*. 1985; 119: 361–6.
29. Chen J, Xue Y, Poidinger M, Lim T, Chew SH, Pang CL, Abastado J-P, Thierry F. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology*. 2014; 462–463: 14–24. doi: 10.1016/j.virol.2014.05.026.
30. Stich M, Ganss L, Puschhof J, Prigge E-S, Reuschenbach M, Guterres A, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget*. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10631.
31. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31: 89–97. doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.008.
32. De-Castro Arce J, Göckel-Krzikalla E, Rösl F. Silencing of multi-copy HPV16 by viral self-methylation and chromatin occlusion: a model for epigenetic virus-host interaction. *Hum Mol Genet*. 2012; 21: 1693–705. doi: 10.1093/hmg/ddr604.
33. Rösl F, Arab A, Klevenz B, zur Hausen H. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J Gen Virol*. 1993; 74 (Pt 5): 791–801. doi: 10.1099/0022-1317-74-5-791.
34. Xue Y, Lim D, Zhi L, He P, Abastado J-P, Thierry F. Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *Open Virol J*. 2012; 6: 163–72. doi: 10.2174/1874357901206010163.
35. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J*. 1987; 6: 3391–7.
36. Guan H, Mi B, Li Y, Wu W, Tan P, Fang Z, Li J, Zhang Y, Li F. Decitabine represses osteoclastogenesis through inhibition of RANK and NF- κ B. *Cell Signal*. 2015; 27: 969–77. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.006.
37. Alberich-Jordà M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, DiRuscio A, Radomska HS, Ebraldize AK, Amabile G, Ye M, Zhang J, Lowers I, et al. C/EBP γ deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2012; 122: 4490–504. doi: 10.1172/JCI65102.
38. Bennett KL, Hackanson B, Smith LT, Morrison CD, Lang JC, Schuller DE, Weber F, Eng C, Plass C. Tumor suppressor activity of CCAAT/enhancer binding protein alpha is epigenetically down-regulated in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2007; 67: 4657–64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4793.
39. Filtz TM, Vogel WK, Leid M. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci*. 2014; 35: 76–85. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.005.
40. Piotrowska H, Jagodzinski PP. Glucocorticoid receptor alpha and beta variant expression is associated with ASF/SF2 splicing factor upregulation in HT-29 colon cancer and MCF-7 breast carcinoma cells. *Arch Med Res*. 2009; 40: 156–62. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.02.004.
41. McFarlane M, MacDonald AI, Stevenson A, Graham SV. Human Papillomavirus 16 Oncoprotein Expression Is Controlled by the Cellular Splicing Factor SRSF2 (SC35). *J Virol*. 2015; 89: 5276–87. doi: 10.1128/JVI.03434-14.
42. Luczak MW, Jagodzinski PP. Apicidin down-regulates human papillomavirus type 16 E6 and E7 transcripts and proteins in SiHa cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 2008; 272: 53–60. doi: 10.1016/j.canlet.2008.06.030.
43. Iwakawa H, Tomari Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*. 2015; 25: 651–65. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011.
44. Mazar J, DeBlasio D, Govindarajan SS, Zhang S, Perera RJ. Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Lett*. 2011; 585: 2467–76. doi: 10.1016/j.febslet.2011.06.025.
45. Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, Co NN, Yau PL, Kwok TT. HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*. 2010; 24: 1599–604.
46. McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Mürner K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 2130–5. doi: 10.1073/pnas.1009933108.
47. Hsu C-H, Peng K-L, Jhang H-C, Lin C-H, Wu S-Y, Chiang C-M, Lee S-C, Yu WCY, Juan L-J. The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. *Oncogene*. 2012; 31: 2335–49. doi: 10.1038/nc.2011.415.
48. D'Costa ZJ, Jolly C, Androphy EJ, Mercer A, Matthews CM, Hibma MH. Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PloS One*. 2012; 7: e48954. doi: 10.1371/journal.pone.0048954.
49. Au Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene*. 2011; 30: 2401–10. doi: 10.1038/nc.2010.613.
50. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen S-K, Auvinen P, Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the

- expression of host microRNAs. *PloS One*. 2011; 6: e21646. doi: 10.1371/journal.pone.0021646.
51. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. *BioMed Res Int*. 2013; 2013: 407052. doi: 10.1155/2013/407052.
 52. Liu S, Song L, Yao H, Zhang L, Xu D, Gao F, Li Q. MiR-375 Is Epigenetically Downregulated by HPV-16 E6 Mediated DNMT1 Upregulation and Modulates EMT of Cervical Cancer Cells by Suppressing lncRNA MALAT1. *PloS One*. 2016; 11: e0163460. doi: 10.1371/journal.pone.0163460.
 53. He J, Ji Y, Li A, Zhang Q, Song W, Li Y, Huang H, Qian J, Zhai A, Yu X, Zhao J, Shang Q, Wei L, et al. MiR-122 directly inhibits human papillomavirus E6 gene and enhances interferon signaling through blocking suppressor of cytokine signaling 1 in SiHa cells. *PloS One*. 2014; 9: e108410. doi: 10.1371/journal.pone.0108410.
 54. Lin L, Cai Q, Zhang X, Zhang H, Zhong Y, Xu C, Li Y. Two less common human microRNAs miR-875 and miR-3144 target a conserved site of E6 oncogene in most high-risk human papillomavirus subtypes. *Protein Cell*. 2015; 6: 575–88. doi: 10.1007/s13238-015-0142-8.
 55. Bernard B, Prétet J-L, Charlot J-F, Mougin C. Human papillomaviruses type 16+ and 18+ cervical carcinoma cells are sensitive to staurosporine-mediated apoptosis. *Biol Cell*. 2003; 95: 17–26.
 56. Hirchaud F, Hermetet F, Ablise M, Fauconnet S, Vuitton DA, Prétet J-L, Mougin C. Isoliquiritigenin induces caspase-dependent apoptosis via downregulation of HPV16 E6 expression in cervical cancer Ca Ski cells. *Planta Med*. 2013; 79: 1628–35. doi: 10.1055/s-0033-1350956.
 57. Reid G, Kao SC, Pavlakis N, Brahmbhatt H, MacDiarmid J, Clarke S, Boyer M, van Zandwijk N. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. *Epigenomics*. 2016. doi: 10.2217/epi-2016-0035.
 58. Valdespino V, Valdespino PM. Potential of epigenetic therapies in the management of solid tumors. *Cancer Manag Res*. 2015; 7: 241–51. doi: 10.2147/CMAR.S70358.
 59. Wang Z, Murigneux V, Le Hir H. Transcriptome-wide modulation of splicing by the exon junction complex. *Genome Biol*. 2014; 15: 551. doi: 10.1186/s13059-014-0551-7.

5azadC treatment upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression

SUPPLEMENTARY FIGURE



Supplementary Figure 1: Ca Ski and SiHa cells were treated with 0.25 μ M (A), 0.5 μ M (B) and 1 μ M (C) of 5azadC for 24 to 96h. Cells were lysed and protein extracts were assayed by Western Blotting to assess the levels of E6F1 and p53 proteins. β -actin served as a loading control.

1.2 Travaux complémentaires non publiés

1.2.1 Méthodologie

Culture des cellules et traitements : les cellules ont été cultivées et ont été traitées au 5azadC de 24 à 96 h à 0,25 μ M dans les conditions décrites dans l'article de Morel et collaborateurs.

Transfections plasmidiques : les cellules U2-OS ont étéensemencées dans des plaques six puits à une densité de 350 000 cellules par puits. Elles ont été transfectées dans les conditions décrites dans l'article de Perrard et collaborateurs avec les plasmides pXJ40 vide (Ctrl), pXJ40 codant toutes les isoformes de E6 (E6all) ou le plasmide pXJ40 codant E6 non épissé uniquement (E6fl), en utilisant le réactif de transfection JetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France) suivant les recommandations du fournisseur. Après 48 h de transfection, les cellules ont été récoltées.

Interférence à l'ARN : les cellules SiHa et Ca Ski ont étéensemencées dans des plaques six puits à une densité de 350 000 cellules par puits. Elles ont été transfectées par 20 nM de siARN contrôle (Ctrl) ou siARN E6fl, grâce à la Lipofectamine 2000, suivant le protocole du fournisseur. Les cellules ont été récoltées 48 h après traitement. Le siARN CTRL est commercialisé par Eurogentec (Seraing, Belgique, SR-CL000-005). Le siARN E6fl a été produit par Eurogentec, et la séquence est CCGUUGUGUGAUUUGUAAUU.

Extraction, conversion et quantification de l'ADN : l'ADN des cellules a été extrait en utilisant la trousse *QIAamp DNA minikit* (Qiagen, Courtaboeuf, France), suivant le protocole du fournisseur. L'ADN (500 ng) a été converti par ajout de bisulfite de sodium en utilisant le kit *MethylEdge™ Bisulfite Conversion System* (Promega, Charbonnières, France), selon les recommandations du fournisseur. L'ADN converti (100 ng) a été amplifié par qPCR en utilisant le thermocycleur *7500 real-time PCR system* et le mélange *TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG* (ThermoFisher Scientific, Waltham, E.U.) avec les amorces sens GGGGCGTTGTGTAGTATTGAGTTC, antisens GAAACGAAAACGAAAACCCG et la sonde FAM-AAACCTAACGATCGCCCTCGATAATCTCCTAATC-BHQ1, ciblant des séquences méthylées du promoteur de *MIR375* et converties au bisulfite de sodium. Les résultats ont été normalisés par rapport à la quantité du promoteur non méthylé de *ACTIN* avec les amorces sens TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT et antisens AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA et la sonde FAM-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-BHQ1.

Extraction, rétro-transcription et quantification des ARN : les ARN ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés dans les conditions décrites dans l'article de Morel et collaborateurs, c'est à dire extraits avec la méthode du phénol-chloroforme, rétro-transcrits avec le kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase* (ThermoFisher Scientific) avec une quantité de 500 ng,

et quantifiés par qPCR avec le kit *SYBR Green real time PCR master mix* (Life Technologies), avec les amorces citées dans la publication.

Extraction, rétro-transcription et quantification du miR-375 : les ARN totaux des cellules ont été extraits avec la méthode du phénol-chloroforme dans les conditions précédemment décrites, la rétro-transcription a été réalisée avec l'amorce ciblant le miR-375 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACGC et celle ciblant l'ARNnc snU6 AACGCTTCACGAATTTGCGT et la trousse *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription kit* (ThermoFisher Scientific, Waltham, E.U.), suivant le protocole du fournisseur. La quantification du miR-375 a été réalisée avec l'appareil *7500 real-time PCR system* (Life Technologies), le mix *SYBR Green real time PCR master mix* (Life Technologies) et les amorces sens AGCCGTTTGTTCTCGGCT et antisens GTGCAGGGTCCGAGGT. L'expression du miR-375 a été normalisée par rapport à l'expression de snU6, avec les amorces sens CTCGCTTCGGCAGCACA et antisens AACGCTTCACGAATTTGCGT.

Western blotting : les western blotting ont été réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes anticorps cités dans l'article de Morel et collaborateurs.

Analyses statistiques : Les données sont présentées comme des moyennes d'au moins trois expérimentations indépendantes avec un écart-type (sauf précision contraire). Les analyses statistiques visant à établir des différences significatives ($p < 0,05$) entre les groupes ont été calculées grâce au test de Student (bilatéral avec des échantillons de variances différentes). Les différences significatives sont représentées par *, ** ou *** lorsque $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$, respectivement.

1.2.2 Cinétique d'expression du *MIR375* et méthylation de son promoteur

L'expression du miR-375 est donc augmentée dans les cellules SiHa et Ca Ski traitées au 5azadC à 250 nM pendant 96 heures. Le but de ces expérimentations est de détailler cette surexpression dans le temps et en fonction de la dose d'inhibiteur, afin de comparer les profils d'expression du miR-375 à ceux d'E6 des cellules traitées au 5azadC (voir publication 2), avec des doses de 250 nM ou 5 μ M et pour des temps de 24, 48, 72 et 96 heures.

Une qPCR-MSP a été réalisée dans le but d'étudier la méthylation relative d'une partie du promoteur de *MIR375* après traitement au 5azadC des cellules SiHa et Ca Ski. Les amorces de qPCR ciblent une partie du promoteur de *MIR375* dont l'ADN a préalablement réagi avec le bisulfite de sodium qui convertit les cytosines non méthylées en uraciles, sans modifier les cytosines méthylées, ce qui permet de discerner en qPCR les séquences méthylées des séquences non méthylées. Les amorces possèdent une plus grande affinité pour les séquences méthylées par rapport aux séquences non méthylées, les séquences méthylées seront donc davantage amplifiées lors de la qPCR.

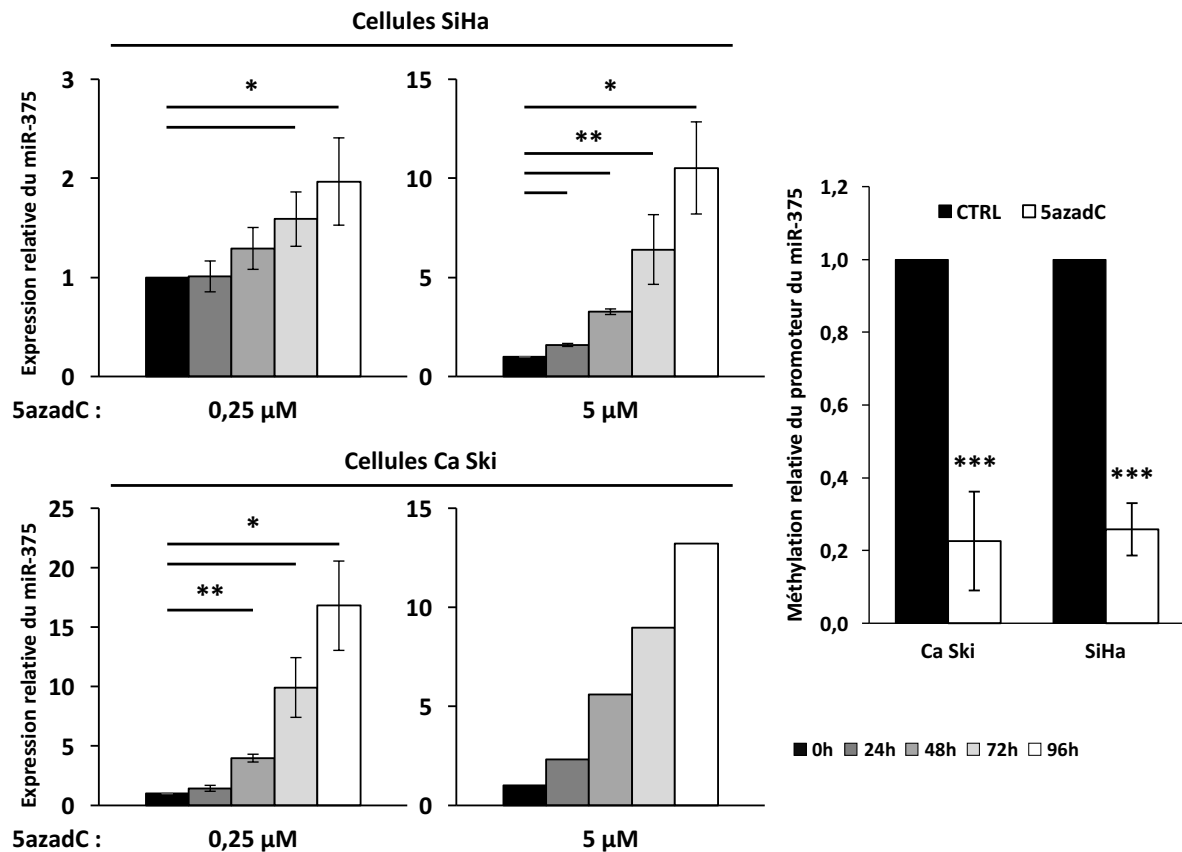


Figure 20 : Cinétique d'expression du miR-375 et méthylation de son promoteur après traitement au 5azadC. Effet du traitement au 5azadC sur l'expression de *MIR375* (à gauche). Expérience de qPCR-MSP (à droite) en utilisant des amorces ciblant le promoteur de *MIR375*, pour étudier la méthylation de son promoteur.

L'expression du miR-375 a été quantifiée par qPCR à partir d'amorces différentes de celles utilisées dans la publication (passage d'amorces commerciales à non-commerciales, avec une séquence connue). Des tests ont été effectués et ont permis de valider les amorces non-commerciales. Lors du traitement au 5azadC des cellules Ca Ski et SiHa, l'expression du miR-375 augmente régulièrement au cours du temps avec plus ou moins d'intensité. Par exemple, l'expression relative du miR-375 dans les cellules SiHa est augmentée de 2,0 fois après traitement à 0,25 μ M durant 96 h, alors qu'elle est de 10,5 pour une dose de 5 μ M et même de 16,8 pour cette même dose dans les cellules Ca Ski, toujours à 96 h.

La méthylation relative du promoteur de *MIR375* a aussi été quantifiée, cette fois par qPCR-MSP, c'est à dire en utilisant des amorces spécifiques de l'état de méthylation. Le taux relatif de méthylation du promoteur est réduit après traitement au 5azadC (96 h à 0,25 μ M) des cellules SiHa et Ca Ski.

L'utilisation du 5azadC sur les deux modèles cellulaires permet bien la surexpression du miR-375. Cette surexpression semble dépendre du temps de traitement, ainsi que de la concentration utilisée pour les cellules SiHa. Dans les cellules Ca Ski, il semble que l'ordre de grandeur de la

surexpression soit similaire entre 0,25 et 5 μM , indiquant que la déméthylation est déjà très efficace à des doses minimales.

La surexpression du miR-375 semble provenir d'une action directe de l'inhibition des DNMT sur le promoteur de *MIR375*, avec une déméthylation relative de celui-ci. Il est à noter que les amorces utilisées ne ciblent qu'une zone bien précise du promoteur et non tout le promoteur, et ne ciblent pas toutes les séquences CpG de cette zone. En outre, la déméthylation n'est pas quantifiée en valeur absolue mais relative au contrôle et dépend de l'affinité des amorces. Le taux de méthylation basal n'est donc pas connu.

1.2.3 Effet sur le miR-375 de la surexpression et de l'inhibition de E6

Au cours de la carcinogenèse, l'expression du miR-375 est diminuée, et le taux de méthylation du promoteur de *MIR375* augmente en parallèle. Comme le miR-375 réprime l'expression des transcrits E6/E7, le but de ce travail a été de voir s'il existait une boucle de rétroaction entre E6 et le miR-375. En effet, E6 favorise la surexpression de la DNMT1, et la méthylation catalysée par les DNMT est responsable de la répression du miR-375. La protéine E6 a donc été exprimée dans les cellules U2-OS qui ne contiennent pas de copies HPV, et l'expression de E6 dans les cellules HPV positives a été inhibée, puis l'expression du miR-375 a été quantifiée.

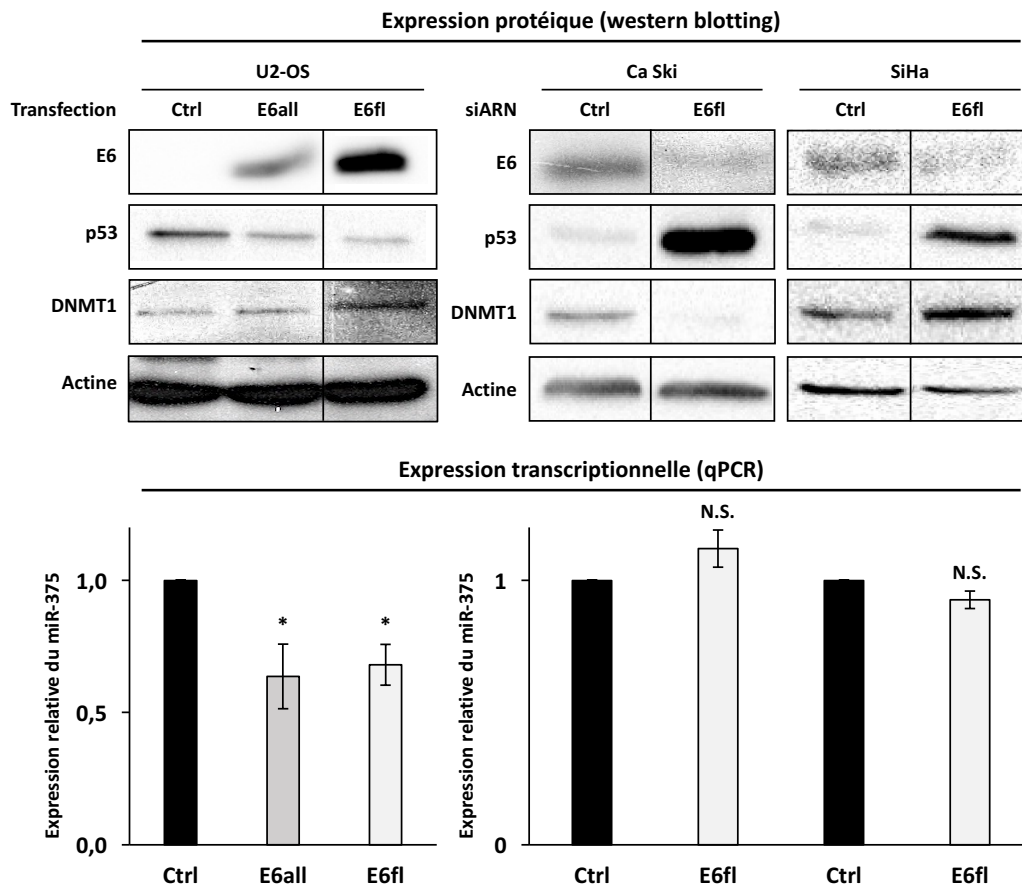


Figure 21 : Expression du miR-375 lors de la surexpression et de l'inhibition de E6.

Les cellules U2-OS ont été transfectées avec un plasmide contrôle (Ctrl), avec un plasmide permettant l'expression des transcrits E6 épissés et non épissés (E6all), et avec un plasmide permettant l'expression des transcrits E6 non épissés uniquement (E6fl). Les cellules Ca Ski et SiHa ont été transfectée avec un siARN contrôle ou dirigé uniquement contre les transcrits non épissés codant E6 (E6fl). En haut : western blotting confirmant la surexpression ou l'extinction de la protéine E6 et l'effet sur p53 et DNMT1 ; en bas : expression relative du miR-375 dans les mêmes expériences.

Dans un premier temps, la surexpression de E6 dans les cellules U2-OS a été validée en quantifiant son taux ARN par qPCR (non montré) et son taux protéique par western blotting. La surexpression s'accompagne bien d'une diminution de l'expression de p53 et d'une légère augmentation du taux de protéines DNMT1. La surexpression induit une répression du miR-375 de l'ordre de 30 à 35%, comme observé en qPCR.

La transfection de siARN E6 dans les cellules Ca Ski et SiHa entraîne une répression des transcrits (non montré) et de la protéine E6. Cette répression s'accompagne d'une surexpression de p53 dans les deux modèles cellulaires, et de sa cible p21 au niveau transcriptionnel (non montré). Suite à la transfection des siARN E6, l'expression de la DNMT1 est diminuée dans les cellules Ca Ski, mais augmentée dans les cellules SiHa. Finalement, l'inhibition de E6 n'induit pas de variation de l'expression du miR-375.

Pour conclure, la présence de la protéine E6 dans les cellules U2-OS favorise l'inhibition du miR-375, ce qui semble indiquer qu'il existe un lien entre la protéine E6 et le miR-375. Il est possible que E6 favorise la surexpression de DNMT1, et que celle-ci augmente le taux de méthylation du gène *MIR375*. Cependant, l'inhibition de E6 dans les cellules HPV positives ne permet pas l'augmentation de l'expression du miR-375. Il est possible que les mécanismes induisant la réexpression du miR-375 nécessitent plus de temps que les mécanismes d'inhibition. En effet, la méthylation de l'ADN est un phénomène actif, catalysé par des enzymes, alors que la déméthylation de l'ADN peut être un mécanisme soit actif soit passif, ce dernier dépendant de la division cellulaire. Dans ce dernier cas, il est possible que le temps de traitement de 48 h soit trop court pour que la surexpression du miR-375 soit quantifiée. Une autre hypothèse est que la présence de E7 dans les cellules inhibe la surexpression malgré l'inhibition de E6.

1.2.4 Cinétique d'expression transcriptionnelle de SP1 au cours du traitement au 5azadC

Au cours des expériences présentées dans la publication de Morel et collaborateurs, l'expression de SP1 a été étudiée à la fois au niveau transcriptionnel et protéique, dans le but de vérifier si l'expression de l'un des facteurs de transcription liant la LCR était modifiée. La modulation de leur expression aurait pu être le signe d'une modification de l'activité du promoteur viral p97 susceptible d'expliquer la répression de E6. En outre, elle est facilement quantifiable par qPCR. C'est pourquoi l'expression transcriptionnelle de SP1 a été étudiée plus en détail, avec une dose de 250 nM pour des temps de 24, 48, 72 et 96 heures.

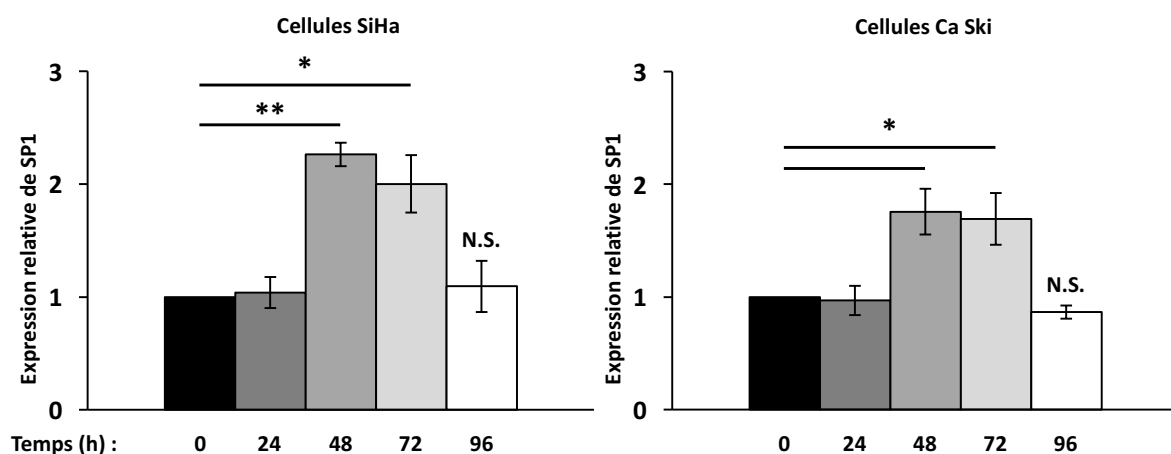


Figure 22 : Cinétique d'expression de SP1 au cours du traitement au 5azadC.
des cellules SiHa et Ca Ski. Les cellules ont été traitées avec 0,25 μM de 5azadC de 24 à 96 h.

Deuxième partie : Travaux personnels

Alors que les résultats présentés dans la publication ne révèlent pas de modifications de l'expression à 96 h de traitement (à 0,25 μ M, comme présenté ici), une cinétique plus précise révèle une surexpression temporaire du taux d'ARN de SP1 à 48 et 72 h. En effet, l'expression relative de SP1 est de 2,3 et 2,0 fois à 48 et 72 h de traitement dans les cellules SiHa, et de 1,8 et 1,7 fois dans les cellules Ca Ski, avant de revenir à une valeur proche de la valeur initiale (1,1 et 0,9 à 96 h pour les cellules SiHa et Ca Ski, variation non significative).

Les résultats montrent que l'expression de SP1 ne varie pas entre les cellules Ca Ski et SiHa traitées 96 h par le 5azadC et les cellules contrôles, confirmant les résultats publiés. En revanche, pour des temps plus courts, le taux d'ARNm de SP1 augmente d'un facteur deux environ. L'expression protéique de SP1 pourrait donc être impactée par les variations de l'expression de ses transcrits, suggérant une possible régulation de l'activité de p97 lors du traitement des cellules par le 5azadC.

2 Rôle de TBX2 dans la répression de E6 au cours d'un traitement au 5azadC

2.1 Deuxième publication de Perrard et collaborateurs

L'expression des oncogènes viraux est réprimée dans les deux modèles cellulaires traités par le 5azadC, comme présenté dans la publication de Morel et collaborateurs. L'expression de certains facteurs de transcription se fixant à la LCR ne varie pas et l'épissage des transcrits viraux n'est pas modifiée après traitement au 5azadC. En revanche, E6 est inhibé par la réexpression du miR-375, qui se lie aux transcrits polycistroniques précoces HPV16 et les déstabilise. Cependant, empêcher la réexpression du miR-375 au cours du traitement ne restaure pas complètement l'expression de E6, peut-être parce que la dose d'anti-miRNA n'était pas assez élevée, ou parce qu'il existe un autre mécanisme agissant de concert avec le miR-375 pour réprimer E6 durant le traitement. En effet, la publication apporte la preuve que le miR-375 est impliqué dans cette répression, mais l'importance de ce microARN n'a pas été étudié. La question est de savoir si le miR-375 est le seul phénomène responsable de la répression de E6 dans ces modèles, ou si d'autres mécanismes sont impliqués ? Cette deuxième publication, de Perrard et collaborateurs, a pour but de répondre partiellement à cette question en étudiant le rôle de la protéine TBX2 lors du traitement des cellules par le 5azadC.

Un des mécanismes hypothétiques possibles est la modulation de l'activité de la LCR, qui conduirait à une réduction du nombre de transcrits produits. La première publication apporte déjà un élément de réponse à cette hypothèse : il n'existe pas de variation significative du taux de transcrits des FT se fixant à la LCR 96 heures après le traitement. Mais cet argument n'est pas une preuve suffisant pour au moins trois raisons :

- D'abord, l'expression a été quantifiée avant traitement et après 96 heures de traitement. Comme observé, le taux d'ARN de SP1 est multiplié par deux après 48 h mais aucune variation n'est observée après 96 h de traitement, comparé au contrôle. Il est tout à fait possible d'émettre l'hypothèse qu'un FT se fixant à la LCR subisse des variations de son expression au cours du traitement, modulant ainsi l'expression de la LCR, avant de revenir à un niveau basal sans pour autant que l'activité de la LCR retourne à son état basal.

- Ensuite, seule l'expression de huit transcrits a été quantifiée, ce qui ne représente pas la totalité des FT se fixant à la LCR. Il est donc possible qu'un de ces facteurs de transcription non étudiés soit responsable de la répression du promoteur viral.

- Finalement, l'expression des transcrits d'un FT ne permet pas de savoir le nombre de FT qui se fixe sur l'ADN d'un promoteur, ni son activité. Il est possible que l'expression transcriptionnelle reste stable mais que le taux de protéine varie. Cette expression ne reflète pas non plus l'état post-transcriptionnel de la protéine, sa localisation ni ses partenaires présents dans la cellule ou sa capacité à moduler l'activité d'un promoteur.

L'étude des facteurs de transcription se fixant à la LCR est donc une piste d'étude à approfondir pour savoir si l'un d'entre eux serait susceptible de moduler l'expression de E6 durant le traitement, parallèlement à la répression exercée par le miR-375. Pour commencer, un candidat potentiel, TBX2, a été étudié. Ce FT impliqué à la base dans l'embryogenèse a été identifié en 2013 comme capable de se fixer à la LCR et de réprimer p97 (Schneider *et al*, 2013). En outre, de nombreux îlots CpG sont présents tout le long du gène *TBX2* et sa méthylation ADN a déjà été observée dans des modèles de cancers de vessie, ce qui suggère une régulation de son expression par méthylation ADN. Ainsi, l'utilisation d'un DNMTi pourrait hypothétiquement favoriser la déméthylation du répresseur de la LCR, d'où l'inhibition de E6 observée au cours du traitement.

Dans cette publication, nous avons confirmé que E6 était bien réprimé à différents temps et par différentes doses, lors du traitement au 5azadC des cellules Ca Ski et SiHa. Le traitement induit en plus une mort des cellules Ca Ski, observé par un blocage du cycle en phase G2/M, une augmentation du pourcentage de cellules en sub-G1 et un clivage de la PARP. Les cellules SiHa sont en revanche plus résistantes à la mort induit par le 5azadC. Au niveau de l'expression de TBX2, le traitement induit une surexpression transcriptionnelle, particulièrement pour les temps longs et à forte concentration. Cependant, la protéine n'est pas détectée dans les deux modèles cellulaires, avec ou sans traitement. Finalement, la surexpression de TBX2 dans les deux modèles cellulaires ne provoque pas de modification de l'expression de E6, suggérant que TBX2 n'est pas impliqué dans la répression des oncogènes viraux après traitement des cellules au 5azadC.

DNA demethylation agent 5azadC downregulates HPV16 E6 expression in cervical cancer cell lines independently of TBX2 expression

Jérôme Perrard^a, Adrien Morel^{a,b}, Koceila Meznad^a, Philippe Paget-Bailly^a, Véronique Dalstein^c, David Guenat^{a,d}, Céline Mourareau^c, Christine Clavel^c, Sylvie Fauconnet^a, Aurélie Baguet^a, Christiane Mougin^{a,d}, Jean-Luc Prétet^{a,d}

^a EA3181, Univ. Bourgogne Franche-Comté, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France

^b Center For Research in Genetics and Genomics-CIGGUR, GENIUROS Research Group, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

^c INSERM, UMR-S 1250, Reims; Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Médecine, Reims; CHU Reims, Laboratoire Biopathologie, 51000 Reims, France

^d Centre National de Référence Papillomavirus, CHU Besançon, Boulevard Alexandre Fleming, 25000 Besançon, France

Corresponding author: Jean-Luc Prétet, email: jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr

EA3181 HPV-associated carcinogenesis: 19, rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France

Abstract

Background: HPV16 is the most carcinogenic human papillomavirus causing more than half of cervical cancers, most if not all anal cancers and 30% of oropharyngeal squamous cell carcinomas. HPV carcinogenesis relies on the continuous expression of the two main viral oncoproteins E6 and E7 that target more than 150 cellular proteins. Among them, epigenetic modifiers such as DNA Methyl Transferases (DNMT) are dysregulated promoting aberrant methylation pattern in HPV-positive cancer cells. We previously reported that the treatment of HPV-positive cervical cancer cells with the DNMT inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) caused the downregulation of E6 expression due to mRNA destabilization mediated by miR-375. Recently, the transcription factor TBX2 was found to repress the HPV LCR activity. In this study, the potential role of TBX2 in E6 repression was investigated in HPV16 cervical cancer cell lines following 5azadC treatment.

Results: A decrease of E6 expression was accompanied by p53 and p21 restoration, PARP cleavage and apoptosis induction especially in Ca Ski cells. While TBX2 mRNA was upregulated in 5azadC-treated SiHa and Ca Ski cells, the TBX2 protein was not detectable. Furthermore, the overexpression of TBX2 protein in cervical cancer cells did not allow the repression of E6 expression.

Conclusion: the TBX2 transcription factor is unlikely involved in the repression of E6 following 5azadC treatment of SiHa and Ca Ski cells.

Keywords: Epigenetic; DNA methyltransferase inhibitor; 5-aza-2'-deoxycytidine; Human Papillomavirus; HPV-induced cancer; T-Box

Background

High Risk Human Papillomaviruses (HR HPV) are ~55 nm non-enveloped circular DNA viruses causing anogenital and oropharyngeal cancers [1]. Carcinogenic properties of HR HPV are mainly due to continuous expression of E6 and E7 oncoproteins. Indeed, the most described effects of these two oncoproteins are to bind and abrogate the functions of the tumor suppressor proteins p53 and pRb respectively [2–4]. This leads to altered cell cycle regulation with increased cell proliferation rate, immortalization, chromosomal instability driving malignant transformation of infected cells [5].

Transcriptional stimulation of the E6/E7 promoter (called p97) depends on cis-regulatory elements within the long control region (LCR) bound by SP1, AP-1, AP-2, NF-1/CTF, TEF-1, PEF-1 [6], while other transcription factors as YY1 downregulates p97 [7]. The p97 promoter also harbors two proximal E2 binding sites (E2BS) for the viral E2 protein. The binding of E2 to E2BS leads to the displacement of SP1 contributing to p97 downregulation and E6/E7 repression [8].

During HPV-associated carcinogenesis, deregulation of E6 and E7 expression may result from HPV DNA integration into the cellular genome. Integration generally leads to the complete or partial loss of the E2 open reading frame (ORF) and the corresponding protein cannot anymore repress the p97 activity [9]. E6 and E7 expression are also regulated by epigenetic mechanisms. Because the E2 ORF is not always disrupted during HPV-associated carcinogenesis [10], some authors have proposed that sustained expression of E6 and E7 is possible by the methylation of CpG dinucleotides within the proximal E2BS [11] that decreases its affinity for E2 [12]. Thus, it has been observed in our laboratory a higher frequency of proximal E2BS methylation in HPV-associated cancers than in precancerous lesions or in normal tissues [13]. Recently, studies revealed that E6 and E7 expression was downregulated following treatment of HPV positive cancer cell lines by 5aza-2'-

deoxycytidine (5azadC), a DNA methyl transferase (DNMT) inhibitor also named decitabine [14–16]. This repression was however independent of the E2BS methylation status because 5azadC effect was observed in SiHa cells presenting non-methylated E2BS [16]. Rather, the downregulation of E6 was partly due to the upregulation of miR-375 [15, 16], known to target the early HPV16 transcripts [17]. Indeed, E6 expression was only partially restored by miR-375 inhibitor in 5azadC-treated cells [16]. This suggests that other mechanisms are involved in E6 downregulation following 5azadC treatment.

In 2013, it has been shown that the HPV16 LCR could be repressed, at least *in vitro*, by two members of the T-Box family, TBX2 and TBX3 [18]. Both transcription factors, involved in embryonic development, are encoded by highly conserved genes among vertebrates [19]. T-Box factors recognize and bind the core sequence GGTGTGA, also known as the T-element [20]. Although the HPV16 LCR lacks the canonical T-element, TBX2 is able to repress the p97 activity by binding the sequence located between nt 7564 and nt 7756 [18]. Conversely to other T-Box family members, TBX2 and TBX3 have repressive activities thanks to the presence of a strong repression domain located in the C-terminal region of the proteins.

The role of TBX2 and TBX3 in tumorigenesis remains controversial because they may exert both anti- and pro-tumorigenic activities.

On the one hand, TBX2 and TBX3 are able to bypass senescence and activate cell proliferation by repressing p14^{ARF} and p21 in different cancer models [19]. Thus, these two transcription factors may contribute to tumorigenesis and numerous studies reported the overexpression of TBX2 and TBX3 in cancers. For example, TBX2 expression was significantly increased in prostate cancer compared to healthy adjacent tissue, and its silencing inhibited proliferation and promoted cell senescence [21]. TBX2 was also shown to

be upregulated in cervical squamous cell carcinoma [22] in association with lymph node metastasis [23, 22].

On the other hand, TBX2 expression is decreased in lung cancers compared to normal tissue [24]. TBX3 expression has been shown to be downregulated by DNA methylation in different tumors compared to normal tissues [25–27]. Furthermore, TBX2 and TBX3 methylation has been associated with a poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia [28], endometrial cancer [29] and bladder cancer [26]. Thus, TBX2 and TBX3 may also exert an anti-tumor activity depending on the context and cellular origin of cancers.

In this study, the role of TBX2 was investigated to determine whether other mechanisms than miR-375-induced E6 mRNA degradation could be involved in the repression of E6 expression following 5azadC treatment of HPV16 cervical cancer cells.

Results

5azadC treatment induces HPV16 E6 downregulation and p53 and p21 upregulation

As we previously published, 5azadC treatment of SiHa cells induced a time-dependent decrease of E6 expression at both mRNA and protein levels (Fig1a-f). The effect of 5azadC on E6 repression was observed starting 24 h after treatment, with a maximal decrease in transcripts reaching 60% at 96 h of treatment (Fig1f), a result consistent with the decreased expression of E6 observed at the protein level (Fig1a-e). In contrast, the effect of 5azadC on E6 expression, either proteins or transcripts, did not appear dependent on the concentration used to treat SiHa cells. Indeed, the E6 mRNA relative expression decreased with the same ranges according to the duration of treatment whatever the concentrations of 5azadC were, from 0.25 μ M to 5 μ M. As expected, the decreased level of E6 was accompanied by an increased expression of p53 and an up-regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p21.

E6 expression was also investigated in Ca Ski cells treated with the lowest (0.25 μ M) and the highest (5 μ M) concentrations of 5azadC up to 96 h (Fig1g-i). As in SiHa cells, E6

expression was downregulated at both protein and mRNA levels. The downregulation of E6 in Ca Ski cells was also accompanied by the restoration of p53 and p21 expression.

5azadC treatment promotes blockade in G2/M phase, cell accumulation in Sub-G1 and PARP cleavage in Ca Ski but not in SiHa cells

The previous observations prompted us to determine whether the decreased E6 expression was related to cell cycle deregulation and apoptosis.

Cell cycle progression was not modified in SiHa cells treated with low or high concentration of 5azadC for 96 h compared with untreated cells (Fig2a). On the contrary, the Ca Ski cell amount was significantly increased in the G2/M phase at the expense of cells in the G0/G1 phase with no significant change in S Phase (Fig2a)

Then we examined whether 5azadC induced apoptosis in HPV16 cervical cancer cells. As shown in Fig2b, a slight and non-significant accumulation of SiHa cells in SubG1 peak was observed in cells treated 96 h with the highest concentration of 5azadC (11% vs 6 % in non-treated cells) (Fig2b and c). In contrast, the percentage of cells in SubG1 peak significantly increased in a dose dependent manner in Ca Ski cells treated 96 h with 0.25 (2.7-fold) and 5 μ M (3.8-fold) of 5azadC (Fig2b and c).

We confirmed cell death by examining PARP cleavage. As shown in Fig2d, 5azadC treatment induce PARP cleavage in Ca Ski but not in SiHa cells. This combination of results suggests that 5azadC treatment induces apoptosis in Ca Ski but not in SiHa cells.

5azadC treatment induces TBX2 mRNA expression

A recent report has shown that TBX2 is able to bind and repress the HPV16 LCR [18]. We therefore studied the expression of TBX2 in 5azadC-treated SiHa and Ca Ski cells. In a first set of experiments, the specificity of TBX2 primers and anti-TBX2 antibody was confirmed in MCF-7 cells, known to express TBX2, treated by TBX2 siRNA (FigS1). As shown in Fig3a and b, a clear increase of TBX2 RNA level was observed in a time- and dose-

dependent manner. This was especially meaningful in both cell lines for the highest concentrations of 5azadC. Indeed, the TBX2 mRNA relative expression at 96 h was upregulated 2.1-fold, 2.8-fold and 3.5-fold at 1 μ M, 2.5 μ M and 5 μ M respectively in SiHa cells. The increase reached 3.8-fold in Ca Ski cells treated 96 h with 5 μ M. It is interesting to note that the pattern of variation of E6 mRNA (Fig1f and i) was not strictly inversely related to that of TBX2.

The endogenous expression of TBX2 was then analyzed by western blotting. The TBX2 protein was not detected in SiHa and Ca Ski cells either treated or not with the highest concentration of 5azadC during 96 h (Fig3c). Furthermore, TBX2 was neither detected in Hela (HPV18 positive) cells and C-33 A (HPV negative) cervical cancer cell lines (Fig3d). In contrast, a strong signal was observed in MCF-7 cells (a positive control for TBX2 expression) or in SiHa cells transfected with pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag (Fig3c and d). It is noteworthy that TBX2 mRNA expression is 700-fold and 90-fold more important in MCF-7 compared to Ca Ski and SiHa cells, respectively (not shown). Thus, these data indicate that TBX2 is not expressed or at very low level in cervical cancer cell lines compared to MCF-7 cells.

Ectopic TBX2 expression does not repress endogenous E6 expression

We next tested whether ectopically expressing TBX2 in SiHa and Ca Ski cells would result in E6 repression. For these experiments, the pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag was co-transfected with pGL3-Luc-16LCR plasmid in U-2 OS cells and the p97 promoter activity was measured. As shown in Fig4a, the overexpression of TBX2 induced a reduction of the relative luciferase activity of 40 % compared to cells transfected with the empty vector, confirming that the HPV16 LCR can be repressed by TBX2 [18]. Then, we investigated whether ectopic TBX2 expression could downregulate endogenous E6 expression in SiHa and Ca Ski cells transfected with pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag. As shown in Fig4b, TBX2 was

readily detected in transfected SiHa and Ca Ski cells. But any changes were observed in E6 protein (Fig4b and c) and mRNA (Fig4d) expression following ectopic TBX2 expression. In keeping with this observation, TBX2 unlikely downregulates endogenous E6 expression in cervical cancer cell lines.

Discussion

In this study, we confirmed that the treatment of HPV16 positive cancer cell lines with 5azadC leads to the downregulation of E6 at both mRNA and protein levels [14–16]. As expected, a p53 and p21 restoration was observed in treated cells confirming the functional loss of E6. Interestingly, the treatment of the tongue HPV16-positive cancer cell line UPCI:SCC090 with 5azadC also leads to the decrease of E6 and to the increase of p53 and p21 expression (FigS2). These results, in line with those obtained by Stich *et al.* with two other head and neck cancer-derived cell lines (UM-SCC-47 and UM-SCC-104) [15], suggest that the effect of 5azadC treatment on E6 repression is independent of the tumor origin.

Concomitantly to E6 repression, Ca Ski cells but not SiHa cells treated by 5azadC underwent growth arrest in G2/M phase. Such a blockade in G2/M phase, likely due to p21 accumulation, has already been described in HeLa (HPV18 positive), CC1 (HPV16 positive), and C-33 A (HPV negative), cervical cancer cell lines treated by 50 μ M of 5azadC [30]. In addition, Zhang *et al.* showed a blockade in G2/M phase and apoptosis induction in Ca Ski and UM-SCC47 (HPV16+ head and neck cancer cells) cells but no change was reported in SiHa cells [14].

E6 repression was also accompanied by sub-G1 accumulation and PARP cleavage which were especially meaningful in Ca Ski cells compared to SiHa cells. Apoptosis induction by 5azadC has also been reported by Zhang *et al.* in Ca Ski and UM-SCC47 (HPV16+ head and neck cancer cells) cells and not in SiHa cells [14]. Thus, SiHa cells are probably more resistant to 5azadC-induced apoptosis than other HPV+ cancer cells but the reasons for such

difference are not clear. Several other studies reported that SiHa cells are more resistant to cell death than Ca Ski cells [31–33]. However, Stich *et al.* showed that 5azadC presented anti-proliferative effect on SiHa cells in proliferation and colony formation assays [15]. Since 5azadC (decitabine) is already used to treat myelodysplastic syndromes [34] and acute myeloid leukemia [35] its usefulness in the treatment of HPV-associated cancers probably deserves to be addressed. In this line, Biktasova *et al.* recently reported that the treatment of patients presenting HPV-positive head and neck cancers treated with 5-azacytidine, a 5azadC analogue, induced E6 and E7 RNA repression in their tumors accompanied by reactivation of the p53 pathway and apoptosis induction [36]. This is the first study presenting the potential effects of a demethylating treatment against human HPV+ tumors in a clinical trial

In SiHa cells, the effect of 5azadC on E6 repression was not dependent on the concentration used since E6 downregulation was similar whatever the concentration was (from 0.25 μ M up to 5 μ M) at each time point over 96 h. Similarly, Stich *et al.* showed no dose effect of 5azadC treatment on E6*/E7 mRNA downregulation even with a concentration as low as 100 nM [15]. In contrast, a clear time-dependent effect of 5azadC treatment was observed on E6 downregulation with a maximum achieved at 96 h. This may reflect the 5azadC mechanism of action that requires successive cell divisions to passively demethylate DNA leading to the progressive upregulation of factor(s) involved in direct or indirect E6 repression. However, such a time dependent effect was not reproduced in Ca Ski cells treated with 5 μ M of 5azadC. At this concentration, a cut-off effect was observed starting at 24 h of treatment, an observation consistent with a more sensitive phenotype of Ca Ski cells regarding 5azadC effects on E6 downregulation.

In order to highlight the mechanism involved in E6 downregulation following 5azadC treatment, we explored the role of the transcription factor TBX2. Indeed, Schneider and collaborators have recently proposed that TBX2 might decrease the HPV gene expression

through LCR inhibition [18]. Furthermore, they mapped the minimal sequence required for TBX2 inhibition from nt 7564 to nt 7756 on the LCR. A first series of experiments permitted to confirm in an *in vitro* assay that the overexpression of TBX2 downregulated HPV16 LCR activity.

In both SiHa and Ca Ski cells, TBX2 mRNA expression was up-regulated following 5azadC exposure in a time and dose dependent manner. However, this regulation pattern differed substantially from the one observed for E6. This was especially true for the lowest concentrations of 5azadC that had weak effects on TBX2 mRNA upregulation while E6 mRNA was clearly downregulated. Surprisingly, the TBX2 protein was undetectable in SiHa and Ca Ski cells as well as in two other cervical cancer cell lines infected by HPV18 (HeLa cells) or not infected by HPV (C-33 A cells). In contrast TBX2 protein was clearly detected in MCF-7 cells and in SiHa cells transfected with pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag that served as positive controls. While we can hypothesize that TBX2 protein is not expressed in cervical cancer we cannot rule out that its expression is very low in cervical cancer cells (under the limit of detection of the western blotting assay). Indeed, Schneider *et al.* reported only a very faint band for TBX2 in their western blotting experiments performed with SiHa cell protein extracts. In the present study, TBX2 protein was not detected even after the treatment of cervical cancer cell lines with 5 μ M of 5azadC during 96 h, whereas the relative expression of the corresponding mRNA was increased more than 3-fold. Thus, we provide no evidence that the downregulation of E6 expression following 5azadC treatment is mediated through an increased expression of endogenous TBX2.

The increased expression of TBX2 mRNA transcripts without effective translation could be explained by the fact that Ca Ski and SiHa cells expressed at extremely low level TBX2 mRNA (700-fold less in Ca Ski and 90-fold less in SiHa cells, compared to TBX2 mRNA levels in MCF-7 cells as determined by RT-qPCR (data not shown). These results are in line

with the Human Protein Atlas data, that report no TBX2 mRNA expression in SiHa cells (0.0 TPM) while TBX2 is expressed at 62.0 TPM in MCF-7 cells). Another explanation could be the inhibition of translation due to mRNA sequestration in the nucleus, or due to miRNA interference.

Because TBX2 protein was shown to inhibit the activity of a cloned HPV16 LCR in overexpression experiments [18] and present study), we wondered to assess whether it could also repress the endogenous HPV16 LCR in Ca Ski and SiHa cells. While TBX2 was readily detected in both transfected cell lines, no variation in E6 expression at both protein and mRNA expression was evidenced. These observations again reinforce the idea that TBX2 is unlikely involved in the regulation of E6 expression in both cell lines.

Conclusions

Epigenetic regulation of HPV16 oncogene expression is very likely since the use of a DNA demethylating agent leads to E6 mRNA and protein repression. Indirect effects linked to the re-expression of miR-375, that targets HPV16 early transcripts has been well documented [15, 16]. By contrast, the involvement of TBX2 in E6 repression is very unlikely in SiHa and Ca Ski cells treated by 5azadC even if this transcription factor may exert inhibitory effect on HPV16 LCR cloned upstream a reporter gene. Despite the fact that TBX2 is probably not expressed in cervical cancer cells (or at too low level to be detected by western blotting), the structure of chromatin may affect the accessibility of TBX2 to occupy its binding site in the native HPV16 LCR, even when this transcription factor is overexpressed. Thus, further studies are needed to confirm the involvement of T-Box family proteins in HPV16 LCR regulation.

Methods

Cell lines and cell culture

MCF-7 cells [mammary cancer cells, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA], SiHa cells (cervical cancer cells, ATCC) and U-2 OS cells (bone osteosarcoma cells, ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Ca Ski cells (cervical cancer cells, ATCC) were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium while C-33 A and HeLa cells (both cervical cancer cells, ATCC) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM). All media were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Lonza, Basel, Switzerland) but not with antibiotics. Cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Drug treatment

SiHa and Ca Ski cells were treated by 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) (Epigentek, Farmingdale, NY, USA). This demethylating agent was dissolved in DMSO at 220 mM and then diluted in appropriate medium at 0.25, 0.50, 1.0, 2.5 and 5.0 µM to treat SiHa cells (10,000 cells/cm²) and at 0.25 and 5 µM to treat Ca Ski cells (10,000 cells/cm²) for 24, 48, 72 and 96 h. The treatment medium was renewed every day. Untreated HeLa, C-33 A and MCF-7 cells were harvested as controls for western blotting studies.

U-2 OS, SiHa and Ca Ski cells were transfected as described below.

Plasmid transfection and luciferase assay

U-2 OS cells were plated in 96-well microplates at a density of 15,000 cells per well. They were transfected for 24 h with either pT-REx-DEST30/empty or pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag plus a mixture of pGL3-Luc-16LCR (obtained by cloning the HPV16 DNA sequence from nt 7135 to nt 105 into the pGL3 plasmid) with JetPEI® transfection reagent (Polyplus transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were lysed by 1X Lysis reagent of Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega, Charbonnières les bains, France). The luciferase assay reagent was mixed with lysates and the luminescence was recorded.

Deuxième partie : Travaux personnels

SiHa and Ca Ski cells were plated in 6-well plates at a density of 350,000 cells per well and transfected with pT-REx-DEST30/empty or pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag using JetPEI® transfection reagent according to the manufacturer's recommendations. At 48 h after plasmid transfection, cells were harvested for checking overexpression efficiency and subsequent analyses *via* RTqPCR and western-blotting.

RNA extraction and reverse transcription

Total cellular RNAs were isolated by RiboZol™-chloroform method (VWR, Strasbourg, France). Briefly, cells were lysed in 500 µL of RiboZol and 100 µL of chloroform were added. After a centrifugation at 12 000 g (15 min, 4°C), aqueous phase was harvested and incubated 10 min with 500 µL of isopropanol. Then, total RNAs were pelleted by centrifugation at 12 000 g, (10 min, 4°C), washed with cold ethanol and dissolved in molecular biology grade water. cDNAs were synthesized using 500 ng of total RNA with the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations.

Quantitative RT-PCR

The specific primer sequences used for PCR are listed in Table 1. Primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Real-time quantitative PCR was performed using SYBR Green real time PCR master mix (Life Technologies, Saint Aubin, France) in the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The cDNAs were amplified using the following cycling parameters: 95°C for 5 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. Transcript levels for E6 and TBX2 were normalized to β 2M using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Western blotting

Following different conditions, cells were harvested by scrapping in PBS and stored in dry pellets at -80°C until use. Proteins were extracted with radio immunoprecipitation assay

(RIPA) lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % (v/w) Nonidet P-40, 0.5 % (w/w) Na deoxycholate, 1 mM EDTA, 30 µg/mL protease inhibitor) (Roche Diagnostics, Meylan, France). After sonication, protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's recommendations. Each sample was resolved on SDS-PAGE gels and then transferred to Hybond® polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Amersham, England). The membranes were blocked with 5% nonfat milk overnight at 4°C under constant shaking and then incubated for 2h at room temperature under constant agitation with primary antibodies: 2E3F8 anti-E6HPV16, 1/1,000 (Euromedex, Souffelweyersheim, France); DO7 anti-p53, 1/2,000 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France); 6B6 anti-p21, 1/2,000 (BD Biosciences); AC15 anti-β-actin, 1/20,000 (Sigma-Aldrich); C-17 anti-TBX2, 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 4C10-5 anti-PARP, 1/500 (BD Biosciences). After several washes, membranes were incubated with goat anti-mouse, goat anti-rabbit (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) or rabbit anti-goat (Agilent, Santa Clara, USA) immunoglobulin antibodies conjugated with horseradish-peroxidase. The immune complexes were revealed using an enhanced chemiluminescence detection system with Pierce ECL2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) using ChemiDoc XRS+. The band densities were normalized against the β-actin internal control and analyzed by Image Lab software (Bio-Rad).

Flow Cytometry

Flow cytometry was performed to analyze the cell cycle distribution and sub-G1 peak. After being treated by 5azadC (0.25 µM and 5 µM for 96 h), cells were harvested using trypsin/EDTA (Lonza) then washed in PBS 1X and centrifuged at 300 g for 5 min. Cells were fixed overnight at 4 °C by cold 70% ethanol. After washes with PBS 1X, cells were stained with 1 mg/mL propidium iodide in 50 µL PBS 1X complemented with 1 mg/mL DNase-free

Deuxième partie : Travaux personnels

RNase A (Sigma). After 15 min at room temperature, the DNA content was analyzed by flow cytometry on a Fortessa cytometer (Becton Dickinson). A minimum of 100,000 events were analyzed for each sample. The percentage of cells in G0/G1, S and G2/M was quantified using ModFiT LT software (Becton Dickinson) and the percentage of cells with sub-G1 DNA was determined using FlowJo software (Becton Dickinson).

Statistical analysis

A two-tailed unpaired Student's t-test was used to assess differences between groups. All data were obtained from at least three independent experiments or as specified for each figure and are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). P-value < 0.05 was considered to be significant.

Acknowledgements

Dr. Schneider is gratefully acknowledged for providing us with the pT-REX-DEST30/TBX2-3XFlag and Dr. Caroline Demeret for providing us with pGL3-Luc-16LCR. J. Perrard and A. Morel were recipients of a predoctoral scholarship from the Conseil Régional de Franche-Comté and K. Meznad was the recipient of a predoctoral scholarship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. We thank Julie Durel and Anne Peigney for excellent technical assistance.

Funding

This work was supported by research grants from La Ligue Contre le Cancer (CCIR-GE) and the Conseil Régional de Franche-Comté.

Availability of data and materials

381 The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its
382 additional file.

383 **Authors' Contributions**

384 JP, AM, ChM, VD, CC and JLP conceived and designed the experiments; JP, KM, CeM and
385 PPB performed the experiments; JP, AB, SF, VD and CC analyzed the data; JP, AB, DG,
386 ChM and JLP wrote the paper.

387 **Ethics approval and consent to participate**

388 Not applicable.

389 **Consent for publication**

390 Not applicable.

391 **Competing interests**

392 The authors declare no conflict of interest

393 **References**

- 394 1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular
395 biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015;25 Suppl 1:2–23.
- 396 2. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein
397 encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.*
398 1990;63:1129–36.
- 399 3. Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7
400 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv.* 1992;12:197–217.
- 401 4. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho J-Y, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus
402 type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which
403 contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007;81:9737–47.
- 404 5. zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.*
405 1991;184:9–13.
- 406 6. Hoppe-Seyler F, Butz K. Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription.
407 *Mol Carcinog.* 1994;10:134–41.
- 408 7. Lace MJ, Yamakawa Y, Ushikai M, Anson JR, Haugen TH, Turek LP. Cellular factor YY1
409 downregulates the human papillomavirus 16 E6/E7 promoter, P97, in vivo and in vitro from a
410 negative element overlapping the transcription-initiation site. *J Gen Virol.* 2009;90 Pt
411 10:2402–12.

- 412 8. Tan SH, Gloss B, Bernard HU. During negative regulation of the human papillomavirus-16
413 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element.
414 *Nucleic Acids Res.* 1992;20:251–6.
- 415 9. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of
416 human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U*
417 *S A.* 1992;89:3159–63.
- 418 10. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al.
419 Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for
420 identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J*
421 *Clin Microbiol.* 2008;46:3678–85.
- 422 11. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, et al. The
423 dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer.
424 *Genome Res.* 2009;19:438–51.
- 425 12. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of
426 papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol.*
427 2003;77:12450–9.
- 428 13. Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, Carcopino X, Morel A, Valmary-Degano S, et al.
429 Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1),
430 E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution
431 melting analysis-PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3207–15.
- 432 14. Zhang C, Deng Z, Pan X, Uehara T, Suzuki M, Xie M. Effects of Methylation Status of
433 CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck
434 Cancer Cells. *PLOS ONE.* 2015;10:e0141245.
- 435 15. Stich M, Ganss L, Puschhof J, Prigge E-S, Reuschenbach M, Guiterrez A, et al. 5-aza-2'-
436 deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and
437 blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget.* 2016.
- 438 16. Morel A, Baguet A, Perrard J, Demeret C, Jacquin E, Guenat D, et al. 5azadC treatment
439 upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression. *Oncotarget.* 2017.
- 440 17. Jung HM, Phillips BL, Chan EK. miR-375 activates p21 and suppresses telomerase
441 activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3ζ. *Mol Cancer.*
442 2014;13:80.
- 443 18. Schneider MA, Scheffer KD, Bund T, Boukhallouk F, Lambert C, Cotarelo C, et al. The
444 Transcription Factors TBX2 and TBX3 Interact with Human Papillomavirus 16 (HPV16) L2
445 and Repress the Long Control Region of HPVs. *J Virol.* 2013;87:4461–74.
- 446 19. Wansleben S, Peres J, Hare S, Goding CR, Prince S. T-box transcription factors in cancer
447 biology. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846:380–91.
- 448 20. Abrahams A, Parker MI, Prince S. The T-box transcription factor Tbx2: its role in
449 development and possible implication in cancer. *IUBMB Life.* 2010;62:92–102.

21. Du W-L, Fang Q, Chen Y, Teng J-W, Xiao Y-S, Xie P, et al. Effect of silencing the T-Box transcription factor TBX2 in prostate cancer PC3 and LNCaP cells. *Mol Med Rep.* 2017;16:6050–8.
22. Liu W-K, Jiang X-Y, Zhang Z-X. Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol.* 2010;155:657–63.
23. Lyng H, Brøvig RS, Svendsrud DH, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K, et al. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics.* 2006;7:268.
24. Khalil AA, Sivakumar S, Lucas FAS, McDowell T, Lang W, Tabata K, et al. TBX2 subfamily suppression in lung cancer pathogenesis: a high-potential marker for early detection. *Oncotarget.* 2017;8:68230–41.
25. Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, Vauleon E, Boniface R, Guenot F, et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics.* 2010;11:701.
26. Kandimalla R, van Tilborg AAG, Kompier LC, Stumpel DJPM, Stam RW, Bangma CH, et al. Genome-wide Analysis of CpG Island Methylation in Bladder Cancer Identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-Specific Prognostic Markers. *Eur Urol.* 2012;61:1245–56.
27. Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 2006;97:64–71.
28. Rani L, Mathur N, Gupta R, Gogia A, Kaur G, Dhanjal JK, et al. Genome-wide DNA methylation profiling integrated with gene expression profiling identifies PAX9 as a novel prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Epigenetics.* 2017;9:57.
29. Farkas SA, Sorbe BG, Nilsson TK. Epigenetic changes as prognostic predictors in endometrial carcinomas. *Epigenetics.* 2017;12:19–26.
30. Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, Natarajan G, Mills WK, Benbrook DM, et al. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene.* 2012;31:2725–37.
31. Hougardy BMT, van der Zee AGJ, van den Heuvel FAJ, Timmer T, de Vries EGE, de Jong S. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecol Oncol.* 2005;97:353–64.
32. Ding B, Chi SG, Kim SH, Kang S, Cho JH, Kim DS, et al. Role of p53 in antioxidant defense of HPV-positive cervical carcinoma cells following H2O2 exposure. *J Cell Sci.* 2007;120 Pt 13:2284–94.
33. Filippova M, Filippov VA, Kagoda M, Garnett T, Fodor N, Duerksen-Hughes PJ. Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J Virol.* 2009;83:210–27.

Deuxième partie : Travaux personnels

34. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol*. 2016;91:76–89.

35. Nieto M, Demolis P, Béhanzin E, Moreau A, Hudson I, Flores B, et al. The European Medicines Agency Review of Decitabine (Dacogen) for the Treatment of Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *The Oncologist*. 2016;21:692–700.

36. Biktasova A, Hajek M, Sewell A, Gary C, Bellinger G, Deshpande HA, et al. Demethylation Therapy as a Targeted Treatment for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017;23:7276–87.

Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

Target	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Amplicon size
E6	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC	81 bp
TBX2	CTCTGACAAGCACGGCTTCA	TGTCGTTGGCTCGCACTATG	80 bp
β2M	GATGAGTATGCCGTGTG	CAATCCAAATGCGGCATCT	114 bp

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

Figure 1

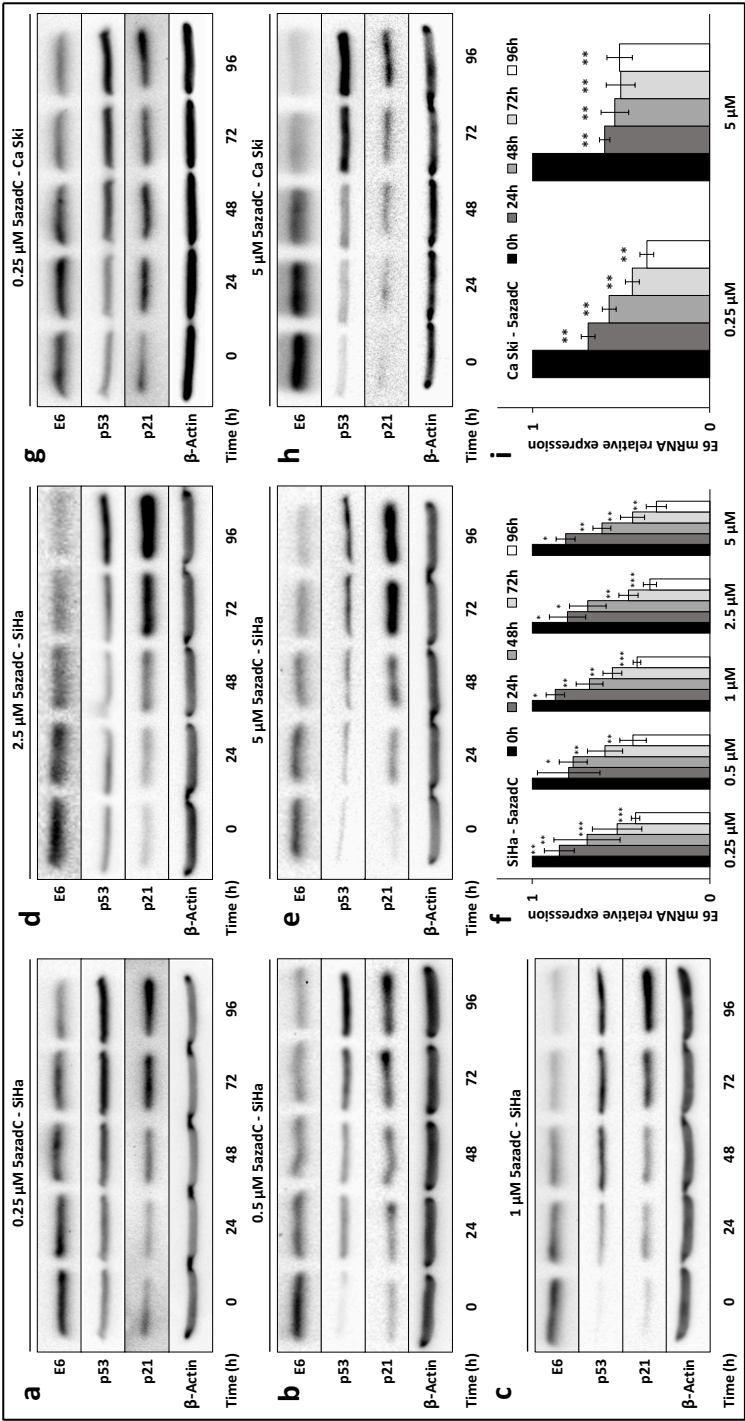


Fig.1 5azadC treatment downregulates E6 expression. E6, p53, p21 and β -actin protein expression was analyzed by western blotting in SiHa (a-e) and Ca Ski (g, h) cells treated with 0.25 to 5 μ M of 5azadC. E6 mRNA relative expression was quantified by RT-qPCR in SiHa (f) and Ca Ski (i) cells treated with 0.25 to 5 μ M of 5azadC. The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and p values were calculated by performing Student's t-test using non-treated cells as reference control: *p < 0.05, **p < 0.01.

Figure 2

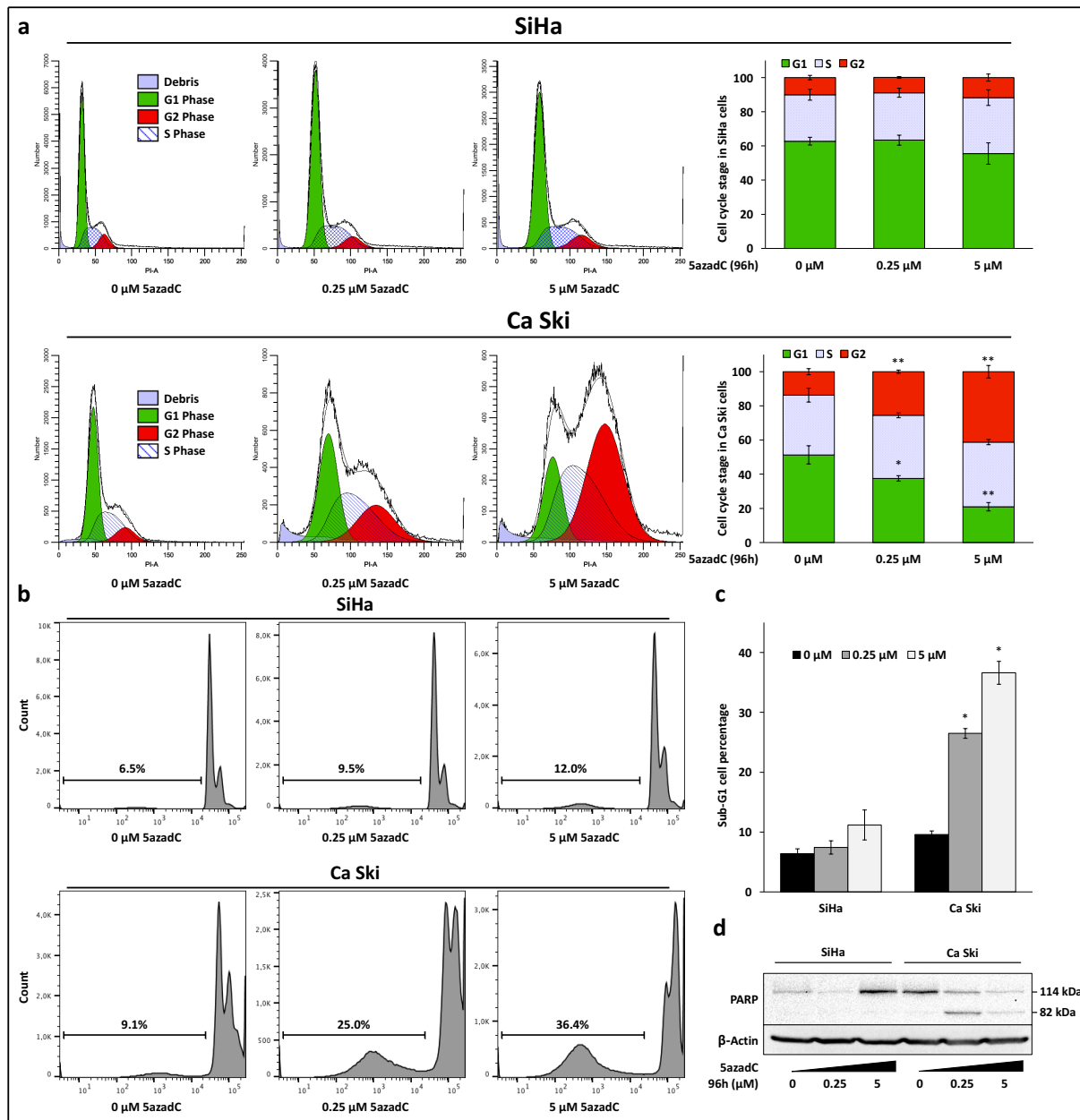


Fig.2 5azadC induces an apoptotic phenotype in Ca Ski cells but not in SiHa cells. Cell cycle (a) and sub-G1 (b, c) were analyzed by flow cytometry in SiHa and Ca Ski cells treated or not with 5azadC. Representative histogram plots (b) and Sub-G1 peak quantifications (c) are shown. PARP cleavage was analyzed by western blotting in SiHa and Ca Ski cells treated or not with 5azadC (d). The data are presented as mean values from at least two independent experiments. Error bars represent the standard deviation and p values were calculated by performing Student's t-test using non-treated cells as a reference control: *p < 0.05 and **p < 0.01.

Figure 3

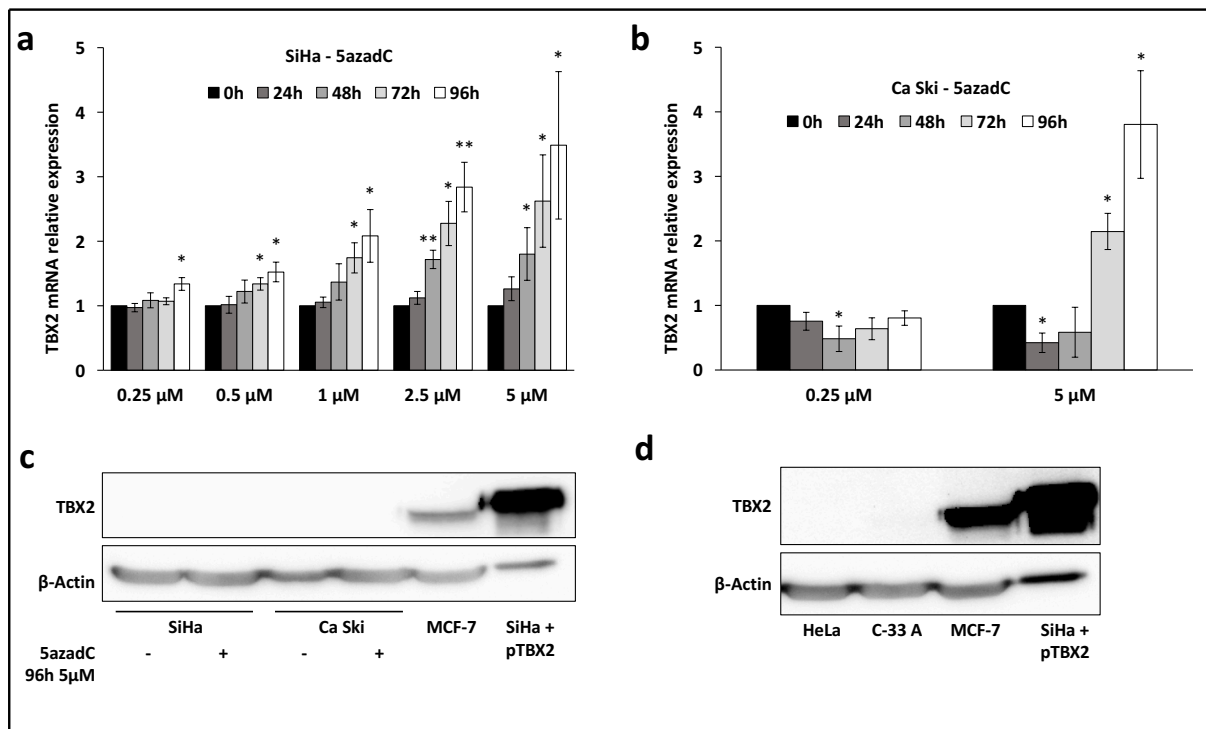


Fig.3 TBX2 mRNA but not TBX2 protein are expressed in cervical cancer cell lines. TBX2 mRNA relative expression was analyzed by RT-qPCR in SiHa cells (a) treated from 0.25 to 5 μM of 5azadC and in Ca Ski cells (b) treated with 0.25 or 5 μM of 5azadC, during 24, 48, 72, or 96 h. TBX2 protein expression was analyzed by western blotting in SiHa and Ca Ski cells treated or not with 5 μM of 5azadC during 96 h (c), as well as in non-treated HeLa and C-33 A cervical cancer cell lines (d) and in MCF-7 breast cancer cells or SiHa cells transfected with pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag (SiHa + pTBX2) that served as positive controls (c, d). The data are presented as mean values from at least three independent experiments. Error bars represent the standard deviation and p values were calculated by performing Student's t-test using non-treated cells as a reference control: *p < 0.05 and **p < 0.01.

Figure 4

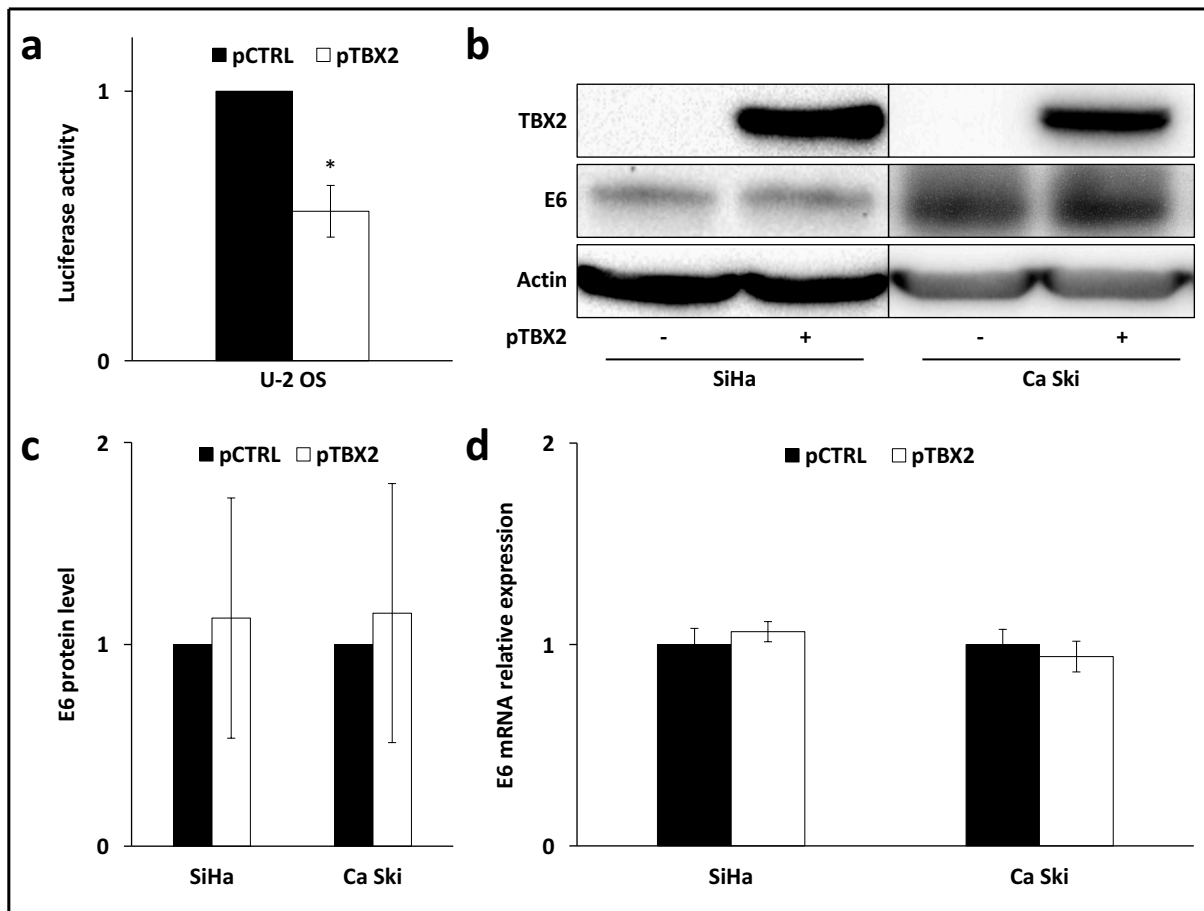


Fig.4 TBX2 is not involved in E6 repression *in cellulo*. Luciferase activity of the reporter plasmid was measured in U-2 OS cells transfected or not with the pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag (pTBX2) for 48 h. The data are presented as mean values from two independent experiments and p value was calculated by performing Student's t-test. Statistically significant change is indicated: * $p < 0.05$ (a). E6 protein (b, c) and mRNA (d) expression in SiHa and Ca Ski cells transfected 48 h with the pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag (pTBX2). The detection of TBX2 by western blotting confirmed the efficiency of transfection (b). Quantification of E6 protein levels in Ca Ski and SiHa cells transfected with pT-REx-DEST30/TBX2-3XFlag (pTBX2) is shown (c). The data are presented as mean values from at least three independent experiments (c, d). Error bars represent the standard deviation. Changes were not statistically significant (c, d).

Figure S1

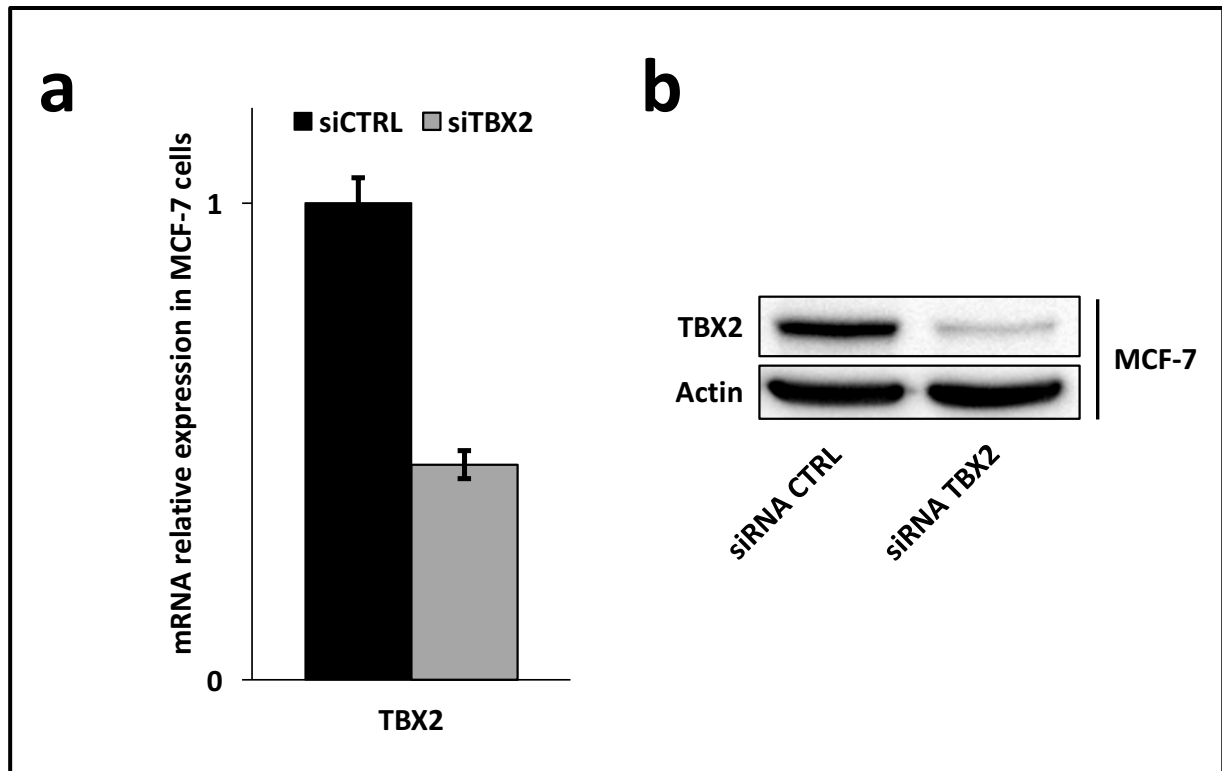


Fig.S1 TBX2 primers and anti-TBX2 antibody are specific. MCF-7 cells were transfected by 20nM of siRNA targeting TBX2 (5'-GGA-GCU-GUG-GGA-CCA-GUU-CTT-3') using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (ratio siRNA/Lipofectamine of 1:3). TBX2 silencing was confirmed by RT-qPCR (a) and western blotting (b).

Figure S2

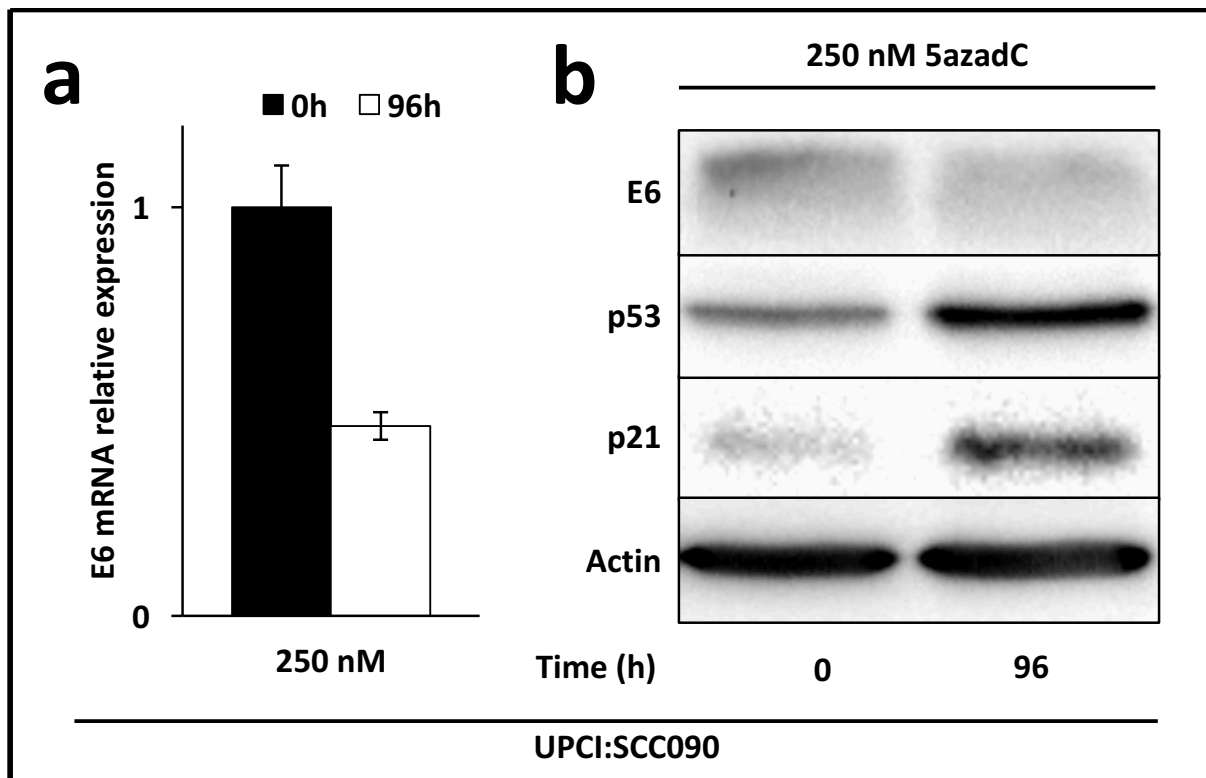


Fig.S2 5azadC treatment downregulates E6 expression in the UPCI:SCC090 HPV-positive tongue cancer cells. a/ E6 mRNA relative expression in UPCI:SCC090 cells treated with 250 nM of 5azadC during 96 h. b/ E6, p53, p21 and actin protein expression in the UPCI:SCC090 cells treated with 250 nM of 5azadC during 96 h.

2.2 Travaux complémentaires non publiés

2.2.1 Méthodologie

Culture des cellules et traitements : les cellules SiHa ont été cultivées et traitées au 5azadC 96 h à 5 μ M dans les conditions décrites dans l'article de Perrard et collaborateurs. De plus, 48 h après le début du traitement au 5azadC, les cellules ont été transfectées par 20 nM de siARN CTRL ou siARN TBX2, en présence de Lipofectamine 2000, suivant le protocole du fournisseur. Les cellules ont donc été récoltées 48 h et 96 h après traitement par siARN et 5azadC, respectivement. Le siARN CTRL est commercialisé par Eurogentec (Seraing, Belgique, SR-CL000-005). Le siARN TBX2 dont la séquence est GGAGCUGUGGGACCAGUUCUU a déjà été utilisé par Prince et collaborateurs (Prince *et al*, 2004). Les cellules UPCI:SCC090 (SCC090) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine, et ont été traitées au 5azadC 96 h à 0,25 μ M dans les conditions décrites dans l'article de Perrard et collaborateurs.

Extraction et rétro-transcription des ARN puis quantification des ADNc : les ARN ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés dans les conditions décrites dans l'article de Perrard et collaborateurs. Brièvement, les ARN totaux ont été extraits avec la méthode du phénol-chloroforme, puis rétro-transcrits (500 ng) avec le kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase* (ThermoFisher Scientific) avec une quantité de 500 ng, et les ADNc ont été quantifiés par qPCR avec le kit *SYBR Green real time PCR master mix* (Life Technologies), avec les amorces citées dans la publication et avec les amorces p21 sens TGTCCGTCAGAACCCATGC et p21 antisens TGTCCGTCAGAACCCATGC.

Extraction, rétro-transcription et quantification du miR-375 : Les miR-375 ont été extraits, rétro-transcrits puis quantifiés par qPCR comme décrit précédemment (voir : 1.2.1 : "Méthodologie").

Extraction de l'ADN, conversion au bisulfite de sodium et qPCR-HRM : l'ADN des cellules SCC090 a été extrait en utilisant le kit *QIAamp DNA minikit* (Qiagen, Courtaboeuf, France), suivant le protocole du fournisseur. L'ADN (500 ng) a été converti au bisulfite de sodium en utilisant le kit *MethylEdge™ Bisulfite Conversion System* (Promega, Charbonnières, France), suivant le protocole du fournisseur. L'ADN converti (50 ng) a été amplifié par qPCR en utilisant le thermocycleur *7500 Fast real-time PCR system* et le mix *MeltDoctor HRM master mix* (ThermoFisher Scientific) avec les amorces sens AATAATTTATGTATAAAATTAAGGG et antisens ATCCTAAACATTACAATTCTCTTT ciblant des séquences non méthylées converties au bisulfite encadrant les E2BS proximaux et le SP1BS de la LCR d'HPV16. Les amorces sens YGTAATYGAAATYGGTTGAATYGAAATYGGTT et antisens ATCGTGACTCGTATCGTGTATCGTATCG ont été utilisées comme contrôles de l'efficacité de la conversion de l'ADN au bisulfite (Jacquin *et al*, 2013).

Analyses statistiques : Les données sont présentées comme des moyennes d'au moins trois expérimentations indépendantes avec un écart-type (sauf précision contraire). Le test de Student a été utilisé pour établir des différences ($p < 0,05$) entre les groupes (bilatéral avec des échantillons de variances différentes). Les différences significatives sont représentées par *, ** ou *** lorsque $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$, respectivement.

2.2.2 Utilisation de siARN TBX2 lors du traitement au 5azadC

D'après la deuxième publication, TBX2 n'est pas impliqué dans la répression de E6 au cours du traitement des cellules par le 5azadC. La protéine TBX2 endogène n'est pas détectée par western blotting dans les deux modèles cellulaires traités par 5 μ M de 5azadC pendant 96 h, alors que l'expression transcriptionnelle est plus que triplée à 96 h avec des doses de 5 μ M de 5azadC, quel que soit le modèle utilisé. Cette surexpression transcriptionnelle, sans détection protéique, pourrait provenir du fait que l'ARN est très peu exprimé dans l'absolu, même après traitement. Il n'est cependant pas exclu qu'une quantité minime de protéine, produite au cours du traitement, puisse avoir un impact sur l'activité du promoteur viral et donc un impact sur l'expression de E6. C'est pourquoi, afin d'approfondir l'étude de TBX2 dans les modèles cellulaires de cancers du col de l'utérus traités par 5azadC, l'inhibition de l'augmentation transcriptionnelle de TBX2 au cours du traitement 5azadC a été évaluée en co-transfectant des siARN TBX2. Dans l'hypothèse qu'une quantité infime de protéine TBX2 soit produite lors du traitement et réprime E6, l'inhibition de l'expression et surtout de la traduction des ARNm TBX2 durant ce traitement devrait rétablir partiellement l'expression de E6.

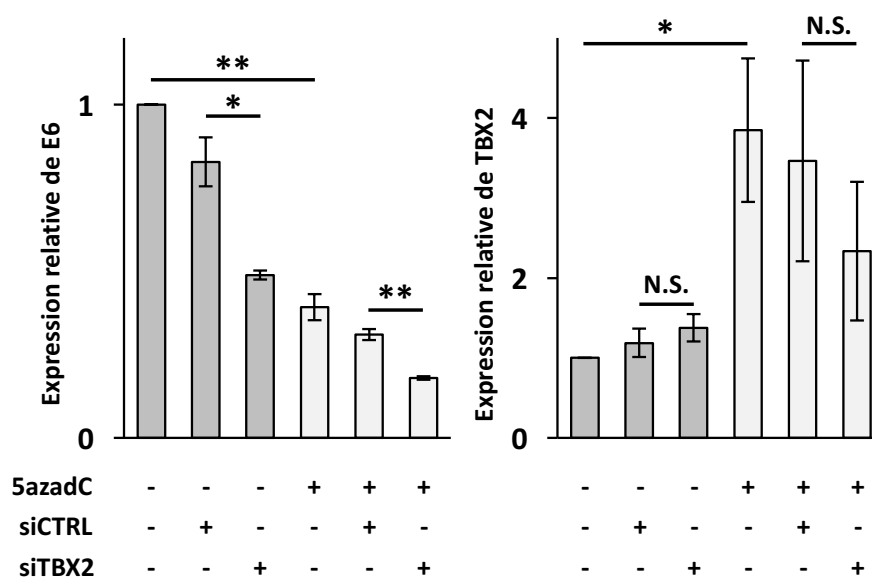


Figure 23 : Inhibition de TBX2 lors du traitement au 5azadC dans les cellules SiHa.

Expression transcriptionnelle de E6 et TBX2 avec (gris clair) ou sans (gris foncé) traitement au 5azadC (96 h à 5 μ M), avec ou sans transfection de siARN TBX2 (siTBX2) et avec ou sans siARN contrôle (siCTRL)

Deuxième partie : Travaux personnels

L'expression transcriptionnelle de E6, TBX2 et p21 a été quantifiée par qPCR dans les cellules SiHa traitées ou non par 5azadC et/ou siARN CTRL ou TBX2. Les résultats présentés ici confirment des résultats de la publication, à savoir une inhibition de E6 et une surexpression de TBX2 lorsque les cellules sont traitées par le 5azadC.

L'inhibition de TBX2 par traitement des cellules SiHa avec des siARN pendant 48 h ne provoque pas de baisse significative du taux d'ARNm TBX2 comparé au traitement contrôle, que les cellules soient co-traitées avec du 5azadC ou non. En revanche, l'utilisation du siARN réprime E6 par rapport au contrôle de manière significative, passant de 0,8 à 0,5 sans 5azadC, et même de 0,3 à 0,2 en co-traitement avec le 5azadC. Finalement, l'utilisation du siARN TBX2 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des ARNm de p21, comparé au siARN contrôle (non montré).

En conclusion, l'utilisation d'un siARN TBX2 ne réduit pas significativement l'expression transcriptionnelle de TBX2, probablement parce que le taux basal est déjà particulièrement faible dans ce modèle cellulaire. Il n'est en revanche pas exclu que ces siARN réduisent davantage la quantité de protéine, si elles sont effectivement traduites, dans ce modèle cellulaire, même s'il n'est pas possible de détecter la protéine par western blotting. Dans tous les cas, l'ajout de siARN TBX2 dans les cellules ne provoque pas de réexpression de E6, mais au contraire son inhibition. Ces observations jouent donc en défaveur de l'hypothèse que TBX2 serait impliqué dans la répression de E6 durant le traitement des cellules par 5azadC.

2.2.3 Résultats complémentaires sur les cellules UPCI:SCC090

Dans la deuxième publication, les résultats obtenus Figure S2 après traitement des cellules UPCI:SCC090 (SCC090) avec le 5azadC montrent une répression de E6 similaire à celle obtenue dans les cellules SiHa et Ca Ski, ce qui suggère que les mécanismes à la base de cette répression sont similaires dans les trois modèles, et donc qu'ils seraient indépendants de l'origine tissulaire du modèle. En effet, les cellules SCC090 proviennent d'une tumeur de la base de la langue, les cellules SiHa proviennent d'une tumeur du col de l'utérus et les cellules Ca Ski sont issues de métastases mésentériques d'une tumeur primaire du col de l'utérus. Les expériences sur l'expression de TBX2, p21 et le miR-375, et sur le taux de méthylation des E2BS proximaux de la LCR réalisées dans les cellules Ca Ski et SiHa ont donc été reproduites dans les cellules SCC090.

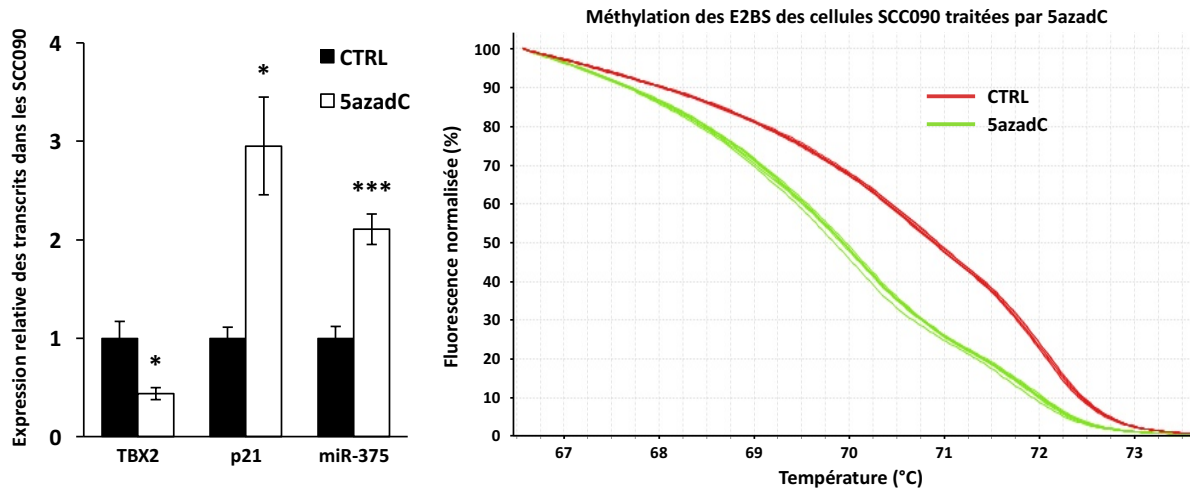


Figure 24 : Effet du traitement au 5azadC dans les cellules UPCI-SCC090.

Expression transcriptionnelle (à gauche) de TBX2, p21 et du miR-375 avec (blanc) ou sans (noir) traitement au 5azadC (96 h à 0,25 μ M). Détermination du niveau de méthylation des E2BS proximaux de la LCR par qPCR-HRM (à droite). Les courbes de fusion représentent la fluorescence normalisée en fonction de la température et ont été réalisées à partir de l'ADN des cellules SCC090 traitées (vert) ou non (rouge).

L'expression transcriptionnelle de TBX2, p21 et du miR-375 a été quantifiée par qPCR dans les cellules SCC090 traitées ou non par 5azadC. Le traitement des cellules provoque une surexpression de p21 de 2,9 fois et du miR-375 de 2,1 fois. Ces niveaux d'augmentation sont similaires à ceux observés dans les cellules SiHa. La diminution significative de l'expression relative de TBX2 à 0,4 lors du traitement des cellules SCC090 par 0,25 μ M de 5azadC pendant 96 h n'est en revanche pas similaire aux résultats obtenus dans les autres lignées. En effet, le traitement des cellules SiHa et Ca Ski à cette concentration induit une augmentation significative de TBX2 (à 1,3) dans les cellules SiHa et une tendance à la baisse dans les cellules Ca Ski (0,8), non significative.

Finalement, la quantification de la méthylation des E2BS proximaux et SP1BS de la LCR des copies virales intégrées au génome des cellules SCC090 révèle un taux basal de méthylation de 90%. L'utilisation du 5azadC provoque une déméthylation des séquences jusqu'à 10%. Cet état basal ainsi que la diminution de la méthylation sont aussi observés dans les cellules Ca Ski.

Bien que l'origine tissulaire des cellules SCC090 diffère des cellules Ca Ski et SiHa, le profil de réponse au traitement par le 5azadC apparaît similaire : les cellules traitées présentent en effet une diminution de l'expression de E6, une augmentation de l'expression de p53, p21, et du miR-375 et une déméthylation des E2BS proximaux et du SP1BS. Les cellules présentent d'ailleurs une intégration du génome d'HPV16 de type II, environ 500 copies en concatémères, ce qui pourrait expliquer un niveau de méthylation basal élevé pour réguler l'expression des oncogènes viraux. De manière plus surprenante, la répression de TBX2 après traitement (96 h et 0,25 μ M) est exclusive à ces cellules, même si les cellules Ca Ski présentent aussi une inhibition de TBX2 (0,5) à 48h de traitement. Ces

Deuxième partie : Travaux personnels

résultats suggèrent donc que la répression de E6 par le 5azadC est indépendante de l'origine tissulaire du modèle cellulaire, qu'il est probable que cette répression soit provoquée par une déstabilisation des transcrits viraux par le miR-375, mais il est peu probable que la répression soit due à TBX2. Il est cependant nécessaire de poursuivre les investigations pour confirmer cette hypothèse.

Troisième partie : Discussions et perspectives

1 Régulation de E6 lors du traitement par un agent déméthylant

Le développement d'un cancer est associé à des dérégulations majeures de l'homéostasie cellulaire, et notamment dans leur profil épigénétique. Dans les cancers associés aux HPV, le profil de méthylation de l'ADN est modifié à la fois par des événements aléatoires dus à l'instabilité génomique caractéristique des cancers, mais aussi par la dérégulation des DNMT par E6 et E7, et particulièrement de la DNMT1. Le génome d'HPV peut lui-même être méthylé, et le taux de méthylation au niveau des E2BS proximaux est progressivement accru en fonction de la sévérité des lésions. Comme la méthylation des E2BS diminue l'affinité de la liaison entre E2 et sa séquence cible, il a été émis l'hypothèse que cette méthylation favorisait la surexpression des oncoprotéines virales E6 et E7 et donc le processus de carcinogenèse, y compris lorsque la séquence de E2 n'apparaît pas délétée et potentiellement à même de coder la protéine E2 fonctionnelle. En prenant en compte qu'il existe aussi des hyperméthylations ponctuelles de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *CDH1*, *CADM1* ou encore *DAPK1*, l'utilisation d'agents déméthylants représente une stratégie thérapeutique potentielle pour supprimer cet "état épigénétique" propice au développement du cancer et donc pour réprimer la croissance tumorale.

1.1 Effet d'un DNMTi sur l'expression de E6

1.1.1 Caractéristiques de la répression de E6

Quelques études scientifiques ont étudié les effets d'un traitement de cellules HPV positives par un agent déméthylant. La plupart rapporte que le traitement des cellules par 5azaC ou 5azadC provoque une répression des transcrits viraux, alors qu'une seule rapporte une surexpression après traitement.

Déjà en 1988, Rösl et collaborateurs ont remarqué que l'ajout de 5azaC (24 heures à 5, 10 ou 20 μ M) sur des hybrides non tumorigènes HeLa/fibroblastes provoquait la répression des transcrits HPV18. De même, les kératinocytes humains non tumorigéniques immortalisés par HPV16 traités par 5azaC (5 jours à 1,25 ou 2,5 μ M) présentaient une expression plus faible des transcrits viraux. Par contre, dans les cellules HeLa ou SiHa, l'expression des transcrits viraux n'était pas impactée par le traitement d'après les auteurs (Rösl *et al*, 1988).

Dans les cellules Ca Ski traitée par 5azadC, l'expression de E6 et de E7 est réprimée au niveau transcriptionnel et traductionnel (Fernandez *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2015a; Stich *et al*, 2016; Morel *et al*, 2017). Toutefois, dans les cellules SiHa, l'expression de E6 et E7 ne varie pas après traitement d'après Zhang et collaborateurs (Zhang *et al*, 2015a), alors que les transcrits viraux (soit E6, soit E7 suivant l'étude) sont significativement réprimés dans les deux publications présentées dans les

Troisième partie : Discussions et perspectives

résultats (voir 1.1 : "Première publication de Morel et collaborateurs" et 2.1 : "Deuxième publication de Perrard et collaborateurs") et celle de Stich et collaborateurs (Stich *et al*, 2016). Ni les doses utilisées, ni les conditions de culture ne permettent d'expliquer cette différence d'observations. Les concentrations de DNMTi utilisées dans les études varient de 0,1 μ M à 10 μ M pour des temps de 48 à 120 heures.

Dans nos travaux, le traitement au 5azadC des trois modèles cellulaires abritant des copies d'HPV16 (SiHa, Ca Ski et SCC090) provoque une répression des transcrits codant la protéine E6. Les cellules ont été traitées jusqu'à 96 heures et avec des concentrations allant de 0,25 à 5 μ M. Dans les cellules SiHa, la répression de E6 est d'autant plus importante que le temps de traitement est long. La répression de E6 est par contre indépendante de la concentration de 5azadC utilisée, pour un intervalle de 0,25 à 5 μ M. Dans l'étude de Stich et collaborateurs, les trois doses utilisées (0,1, 0,5 et 1 μ M) réprime aussi les transcrits E6*I et E7 dans le même ordre de grandeur. Il est intéressant de noter que la réponse au traitement semble similaire entre les cellules dérivées de cancers du col de l'utérus et celles dérivées de cancers des VADS.

1.1.2 Hypothèses formulées sur les causes de la répression

Le fait que le génome d'HPV puisse être méthylé est connue depuis des dizaines années. Des agents déméthylants ont donc été utilisés pour comprendre le rôle de cette marque. Plusieurs hypothèses avaient été émises quant à l'effet de l'utilisation d'un DNMTi sur l'expression des oncoprotéines virales produites à partir de la LCR méthylée et intégrée dans le génome cellulaire de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Les cellules Ca Ski ont souvent été utilisées dans les études ; elles possèdent de 400 à 600 copies du génome d'HPV16 intégrées en concatémères, et les sites E2BS proximaux et SP1BS présentent un taux de méthylation d'environ 75%.

La méthylation de l'ADN est généralement une marque répressive de la transcription. La méthylation complète du génome d'HPV18 *in vitro* conduit d'ailleurs à l'inactivation transcriptionnelle du promoteur (Rösl *et al*, 1993), et une des premières hypothèses prévoyait que la déméthylation de la LCR provoquée par le DNMTi conduirait à une augmentation importante de l'expression de E6 et E7 (Van Tine *et al*, 2004). Par exemple, Van Tine et collaborateurs ont traité au 5azaC les cellules Ca Ski à 10 μ M pendant 48 heures et ont observé par northern blotting une expression accrue des ARN d'HPV16. Ils en ont conclu que la transcription à partir des génomes intégrés inactifs dans les cellules Ca Ski peut être réactivée par la déméthylation causée par le 5azaC, la méthylation étant une marque d'inactivation sur le long terme selon les auteurs. Bien que ces résultats ne soutiennent pas la thèse d'une répression de E6 lors du traitement par un agent déméthylant des cellules HPV positives, ils ne contredisent pas non plus les résultats que nous avons publiés. En effet, il existe plusieurs faits à

prendre en compte : d'abord, les sondes utilisées pour le northern blotting ciblent l'ensemble des transcrits HPV16, et pas uniquement la POL de E6/E7. Les transcrits contenant la POL de E5 sont d'ailleurs une vingtaine de fois plus exprimés dans les cellules Ca Ski traitées au 5azadC que dans les cellules non traitées (Morel, 2016), ce qui pourrait expliquer en partie la surexpression des transcrits viraux observée par Van Tine et collaborateurs, et masquer une éventuelle diminution d'un facteur 2 des transcrits E6/E7. Finalement, il est aussi raisonnable de penser que le 5azaC pourrait être moins spécifique que le 5azadC, puisqu'il est aussi capable d'inhiber d'autres mécanismes que la méthylation de l'ADN, comme le NMD (*non-sens mRNA decay*), mécanisme de dégradation des ARNm (Bhuvanagiri *et al*, 2014). Ainsi, le 5azaC pourrait avoir des effets indépendants de son action d'inhibiteur des DNMT, et des variations d'expression non liées à la déméthylation, qui ne sont pas retrouvées avec le 5azadC, ne sont pas à exclure.

Le fait que E2 soit sensible à l'état de méthylation de son site de liaison (Thain *et al*, 1996; Kim *et al*, 2003) a donné lieu à une autre hypothèse : la déméthylation des E2BS favoriserait la liaison de E2 à la LCR, et ce répresseur inhiberait l'expression de E6 et E7 (Fernandez *et al*, 2009). Fernandez et collaborateurs ont d'ailleurs constaté que l'induction d'une hypométhylation des E2BS de la LCR par un agent déméthylant, le 5azadC, induit le recrutement de E2 à ses sites de liaison et une réduction marquée de l'expression de E6 et E7. Ces constatations sont basées sur le fait que :

- le traitement des cellules Ca Ski au 5azadC à 1 μ M pendant trois jours induit une répression de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de E6 et E7, observée par qPCR et western blotting,
- le traitement induit un enrichissement des ADN des E2BS de la LCR immuno-précipités par un anticorps dirigé contre la protéine E2.

Cependant, cette hypothèse est controversée. En effet, bien que Fernandez et collaborateurs rapportent la présence de la protéine E2 par western blotting, plusieurs études montrent que la protéine E2 n'est pas exprimée ou n'est pas fonctionnelle dans les cellules Ca Ski, et ce alors que les transcrits E2 sont présents. Ainsi, Xue et collaborateur affirment que les cellules Ca Ski n'expriment pas la protéine E2, puisqu'aucune bande à 40 kDa n'est détectée par western blotting. Par contre, les transcrits E2 sont bien détectés (par technologie NanoString) (Xue *et al*, 2012). De plus, notre étude montre qu'aucune luminescence n'est émise par les cellules transfectées par un plasmide permettant l'expression de la luciférase sous la dépendance de E2 (figure 1D de l'article de Morel et collaborateurs). L'activité luciférase est observée uniquement dans les cellules Ca Ski transfectées par ce plasmide et surexprimant E2 (Morel *et al*, 2017). Enfin, le mécanisme réprimant les oncogènes viraux semble identique quel que soit le statut transcriptionnel de E2 (absence de transcrits E2, comme dans les cellules SiHa, ou présence, comme dans les cellules Ca Ski), ce qui suggère que la répression de E6 est indépendante de E2 dans tous les modèles. Cette observation n'est cependant pas une

Troisième partie : Discussions et perspectives

preuve, et il est impossible d'exclure l'hypothèse que le traitement au 5azadC des cellules Ca Ski puisse provoquer une expression fonctionnelle de E2 et que la protéine puisse réprimer le promoteur précoce. Cette réexpression seulement après traitement pourrait même expliquer la différence de sensibilité entre les cellules Ca Ski et les cellules SiHa (voir 1.2 : "Sensibilité des cellules infectées par HPV après traitement"). Mais dans tous les cas, la répression observée dans les cellules SiHa ne peut pas être due à l'action de la protéine E2 (qui est absente), donc cette hypothèse ne peut pas expliquer la répression dans ce modèle.

Finalement, les deux premières hypothèses ne prennent en compte que l'effet potentiel du 5azadC sur l'état de méthylation de la LCR et ses conséquences. Pourtant, l'inhibition des DNMT impacte l'état de méthylation de nombreux gènes cellulaires. La variation d'expression d'un gène peut avoir des effets systémiques sur l'expression d'autres gènes, ce qui laisse penser que le 5azadC peut potentiellement modifier l'expression de n'importe quel gène méthylé ou non, directement ou indirectement. Dans notre étude, le traitement des cellules Ca Ski et SiHa provoque clairement une répression de E6. Pour étudier le phénomène responsable de cette répression, nous avons analysé les effets du 5azadC sur l'expression de facteurs de transcription se fixant à la LCR, ainsi que l'épissage et la stabilité des transcrits viraux. Seul le temps de demi-vie des ARNm d'E6 varie, de 40 à 20 minutes dans les cellules Ca Ski et de 65 à 51 minutes dans les cellules SiHa, non traitées ou traitées (respectivement) au 5azadC pendant 96 heures. Comme la réexpression d'un miARN était probablement la cause de cette déstabilisation, l'implication du miR-375 dans cette répression a été évalué. Le miR-375 était un bon candidat puisque : (i) il se lie aux transcrits précoces d'HPV16, (ii) son taux de méthylation augmente avec la sévérité des lésions et (iii) le traitement des cellules SiHa avec le 5azadC induit sa surexpression. D'après nos résultats, il s'avère que le miR-375 est effectivement déméthylé et surexprimé dans les cellules traitées au 5azadC. L'inhibition du miR-375 réduit d'ailleurs l'importance de la répression de E6 lors du traitement, ce qui confirme son rôle dans cette répression. A ce titre, une autre étude récente a rapporté des résultats similaires (Stich *et al*, 2016). Ainsi, dans six modèles cellulaires de tumeurs des VADS et du col de l'utérus, dont les cellules Ca Ski et SiHa, traités au 5azadC (0,1 à 1 μ M) pendant 72 heures :

- L'expression transcriptionnelle de E6*I et E7 est réprimée.
- L'expression protéique de E7 est diminuée.
- Le taux de méthylation du promoteur du *MIR375* est diminué.
- L'expression du miR-375 augmente.
- La prolifération et la formation de colonies sont diminuées.

L'implication d'autres miARN liant les transcrits E6/E7 est discuté dans le chapitre 4.1 : "Hypothèse d'une interférence à l'ARN".

1.2 Sensibilité des cellules infectées par HPV après traitement

1.2.1 Effet des agents déméthylants sur l'activité tumorale

Les deux agents déméthylants 5azadC et 5azaC sont déjà utilisés en clinique comme traitement innovant de certaines leucémies. Ils possèdent des effets anti-tumoraux dans des hémopathies, mais ne sont pas encore utilisés pour traiter des tumeurs solides. Pourtant, il existe de nombreuses preuves précliniques de leur efficacité anti-tumorale dans ces cancers, et en particulier dans les cancers HPV positifs.

Dans notre étude, le traitement des cellules Ca Ski avec le 5azadC entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M et une mort cellulaire, probablement par apoptose puisque que la PARP est clivée après traitement. L'effet anti-tumoral du 5azadC sur les cellules Ca Ski est confirmé par d'autres études. En effet, Zhang et collaborateurs ont montré que le 5azadC à 0,5 μ M provoque une inhibition de la prolifération cellulaire, un blocage du cycle cellulaire en phase S et G2/M et une induction de l'apoptose (augmentation du pourcentage de cellules PE et AAD positives) à partir du cinquième jour de traitement (Zhang *et al*, 2015a). D'après Stich et collaborateurs, le traitement (0,5 μ M pendant 72 heures) réprime la prolifération et la formation de colonies (Stich *et al*, 2016). Dans notre étude, les cellules SiHa semblent moins sensibles au traitement que les cellules Ca Ski, car nous n'observons pas de blocage du cycle cellulaire, ni de clivage de la PARP, mais seulement une augmentation non significative du nombre de débris cellulaires (observés par cytométrie). Zhang et collaborateurs observent eux aussi que le traitement avec le 5azadC n'induit ni apoptose ni blocage du cycle dans les cellules SiHa, mais réduit la prolifération à partir du cinquième jour de traitement. De plus, le traitement des cellules SiHa inhibe la formation de colonies (Stich *et al*, 2016). En parallèle, le traitement d'autres modèles cellulaires contenant des copies d'HPV16 ou 18 et issus de tumeurs des VADS ou du col de l'utérus entraîne une inhibition de la prolifération et de la formation de colonies, ainsi qu'une induction de l'apoptose et un blocage du cycle cellulaire en phase S et G2/M (Stich *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2015). Concernant l'analogue 5azaC, des études confirment que l'utilisation des DNMTi sur des modèles cellulaires aurait un effet anti-tumoral. En effet, sur des modèles cellulaires HPV positifs et issus de tumeurs des VADS (SCC47 et SCC90), le traitement (3 μ M, 7 jours) avec du 5azaC provoque une diminution de la survie des cellules. Le 5azaC réduit aussi l'expression de MMP1 et MMP10 dans ces cellules, suggérant une inhibition du pouvoir invasif des cellules (Biktasova *et al*, 2017). Les deux DNMTi 5azadC et son analogue 5azaC présentent donc des effets anti-tumoraux dans les modèles cellulaires HPV positifs.

Il a aussi été montré que le 5azaC avait des effets anti-tumoraux *in vivo*. En effet, les souris porteuses de tumeurs UMSCC47 et SCC090 traitées avec le 5azadC (2 mg/kg) présentent une

Troisième partie : Discussions et perspectives

croissance significativement réduite de la tumeur, confirmé par une diminution du volume tumoral et du pourcentage de cellules tumorales exprimant Ki-67. Lors d'une étude préclinique chez des patients atteints de cancers des VADS HPV positifs, l'administration de 5azaC seul induit une diminution de l'expression transcriptionnelle de E6 et de E7, une augmentation de l'activité des caspases et de l'expression de p53 après une semaine de traitement (observé sur biopsie de la tumeur avant et après traitement) (Biktasova *et al*, 2017). Ces résultats suggèrent donc que les deux agents déméthylants possèdent des effets anti-tumoraux sur les cellules tumorales infectées par HPV.

1.2.2 Mécanismes moléculaires de l'activité anti-tumorale du 5azadC

Dans les cancers induits par HPV, les effets anti-tumoraux des deux inhibiteurs de DNMT pourraient résulter d'au moins trois causes différentes (Stich *et al*, 2016).

D'abord, les inhibiteurs nucléosidiques sont cytotoxiques parce qu'ils s'incorporent dans l'ADN et piègent par liaison covalente les DNMT sur le génome cellulaire, provoquant des dommages à l'ADN. Parmi les trois DNMT pouvant être piégées, la DNMT1 pourrait être la principale cause de la cytotoxicité du 5azadC, selon Jüttermann et collaborateurs (Jüttermann *et al*, 1994). En effet, des cellules souches embryonnaires exprimant deux fois moins de DNMT1, mais maintenant un niveau de méthylation du génome équivalent à celui des cellules contrôles, sont plus résistantes aux effets cytotoxiques du 5azadC (Jüttermann *et al*, 1994). Palii et collaborateurs ont confirmé ces résultats en rapportant que le traitement des cellules tumorales déficientes en DNMT1 sont moins sensibles à la cytotoxicité du traitement. L'inhibition de la cytotoxicité proviendrait d'une mauvaise localisation des formes actives de CHK1, empêchant d'exercer leurs fonctions dans la réponse aux dommages à l'ADN (Palii *et al*, 2008). Ce DNMTi serait donc plus susceptible d'avoir un effet anti-tumoral avec des cellules possédant un taux important de DNMT qu'avec des cellules possédant un taux faible, en théorie plus résistantes. Puisque les oncoprotéines d'HPV provoquent une surexpression des DNMT, et particulièrement de la DNMT1, ce mécanisme d'action du 5azadC pourrait renforcer la cytotoxicité du traitement sur les tumeurs du col de l'utérus ou des VADS HPV positives. Mais même si la DNMT1 joue elle aussi un rôle important (Jüttermann *et al*, 1994), la cytotoxicité du 5azadC serait principalement due aux DNMT3a et DNMT3b selon Oka et collaborateurs (Oka *et al*, 2005). En fait, la DNMT1 est localisée au niveau de la fourche de réplication durant la phase S, pour maintenir le profil de méthylation pendant la réplication de l'ADN (Chuang *et al*, 1997; Leonhardt *et al*, 1992). Par conséquent, les liaisons covalentes ADN-DNMT1 (adduits) causées par le 5azadC pourraient principalement se former à la fourche de réplication, où les mécanismes de réparation de l'ADN sont très actifs. En plus, DNMT1 s'associe à PCNA, essentiel pour la réparation de l'ADN. Les DNMT3a et DNMT3b sont plutôt localisées au niveau de l'hétérochromatine péri-centrique, et donc formeraient

des adduits plus stables. Les adduits ADN-DNMT1 pourraient donc en théorie être plus facilement réparés que les adduits ADN-DNMT3a/b (Oka *et al*, 2005). Des études sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes induits par chaque DNMT, responsables de la cytotoxicité du 5azadC dans les cellules.

Un deuxième mécanisme impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules traitées par le 5azadC est la déméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui induit leur réexpression. De nombreuses études ont identifié des gènes hyperméthylés de façon aberrante dans les cancers du col de l'utérus comparé au tissu sain (Müller *et al*, 2004; Feng *et al*, 2005; Sova *et al*, 2006; Ongenaert *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Yao *et al*, 2013; Chen *et al*, 2014c; Lin *et al*, 2016). L'utilisation d'agents déméthylants pour traiter des lignées cellulaires dans le but d'identifier des gènes hyperméthylés est une approche utilisée dans plusieurs études (Sova *et al*, 2006; Ongenaert *et al*, 2008; Chen *et al*, 2014c).

En favorisant la réexpression de gènes hyperméthylés par utilisation de 5azadC et de trichostatine A (TSA), un HDACi, dans quatre lignées de cancers invasifs du col de l'utérus, une étude sur le génome complet a identifié 235 gènes surexprimés après traitement. Le statut de méthylation de 39 de ces gènes a été analysé, et 33 gènes sont méthylés dans au moins une des lignées cellulaires, 17 sont méthylés dans trois lignées sur quatre. Finalement, dans des échantillons cliniques de cancers invasifs, 9 gènes (*DKK3*, *HPCAL4*, *MT1G*, *NMES1*, *RRAD*, *SFRP1*, *SPARC*, *TFPI2*, *TPPP*) étaient plus souvent méthylés dans des échantillons de patients avec (22 échantillons) que sans cancers invasifs (Sova *et al*, 2006).

Dans une autre étude, toujours à l'aide d'un traitement de lignées cellulaires avec du 5azadC et de la TSA suivi d'analyses sur des échantillons cliniques, trois gènes ont été identifiés comme étant plus méthylés (*SST*, *HTRA3* et *NPTX1*) dans les tumeurs du col (9 échantillons) que dans les tissus sains (5 échantillons) (Ongenaert *et al*, 2008).

Dans une troisième étude, des résultats obtenus dans le traitement des lignées avec la même combinaison (5azadC et TSA) ont été recoupés avec la comparaison des taux de méthylation des gènes entre tissus de cancers du col de l'utérus (38 échantillons) et tissus sains. Ce recoupement a permis d'identifier 61 gènes candidats, parmi lesquels 14 sont significativement plus méthylés dans les tissus cancéreux comparé au tissu sain, dont *ADRA1D*, *AJAP1*, *COL6A2*, *EDN3*, *EPO*, *HS3ST2*, *MAGI2*, *POU4F3*, *PTGDR*, *SOX8*, *SOX17*, *ST6GAL2*, *SYT9*, et *ZNF614* (Chen *et al*, 2014c).

Il est intrigant de noter qu'il n'existe aucun marqueur potentiel en commun parmi ces trois études. La sélection de biomarqueurs hyperméthylés n'est donc pas reproductible entre les études, alors que la démarche était similaire (sélection de gènes sur des lignées traitées par un DNMTi et HDACi, puis validation sur des échantillons cliniques). Le manque de reproductibilité interroge sur la pertinence des cribles et de leur méthode de sélection. Il pourrait aussi être due à des différences dans

Troisième partie : Discussions et perspectives

les protocoles de traitement des cellules et les lignées cellulaires utilisés dans chaque étude, ainsi que le nombre d'échantillons utilisés dans chaque cohorte.

Par ailleurs, des lignées cellulaires ont été traitées par 5azadC pour identifier des miARN hyperméthylés dans les cancers du col de l'utérus. Les auteurs de l'étude ont ensuite sélectionné plusieurs miARN (miR-432, miR-1286, miR-641, miR-1290, miR-1287, miR-95 et let-7a) qui étaient surexprimés dans les trois lignées cellulaires après traitement, puis ont comparé leur taux de méthylation entre des tissus tumoraux et des tissus sains adjacents. De manière contradictoire, trois miARN (miR-1286, miR-641 et let-7a) avaient un taux de méthylation plus faible dans les tumeurs que dans les tissus sains adjacents, et le miR-95 avait un taux de méthylation plus élevé (Yao *et al*, 2013).

Les publications ci-dessus proposent des biomarqueurs dans les cancers du col de l'utérus. Le fait qu'ils soient hyperméthylés suggèrent qu'ils possèdent une activité défavorable au processus de carcinogenèse. Ainsi, la réexpression de ces gènes dans ces cancers grâce au 5azadC induirait potentiellement une inhibition de la croissance tumorale voire la mort des cellules cancéreuses.

Finalement, la surexpression de gènes suppresseurs de tumeurs induite par la déméthylation de leur promoteur s'accompagne aussi de la répression d'oncogènes, entre autres les oncoprotéines virales E6 et E7, ce qui renforce l'action cytotoxique du 5azadC. En effet, les cellules cancéreuses sont dépendantes des oncoprotéines virales pour leur survie. C'est pourquoi leur inhibition pourrait entraîner une diminution de la prolifération et l'apoptose des cellules. En lien avec cette répression, les protéines p53 et p21 sont surexprimées dans les deux modèles cellulaires traités avec le 5azadC, ce qui est cohérent avec l'observation de l'arrêt du cycle et l'induction de l'apoptose, au moins dans les cellules Ca Ski.

Dans nos expériences, nous avons montré qu'il existait une différence de sensibilité entre les cellules SiHa et Ca Ski, ce qui avait déjà été démontré dans d'autres études utilisant du 5azadC (Zhang *et al*, 2015a) ou d'autres traitements (Hougardy *et al*, 2005; Ding *et al*, 2007; Filippova *et al*, 2009). Par exemple, les cellules traitées avec un anticorps agoniste anti-Fas induit l'activation de la caspase 8, le clivage de Bid, l'activation de la caspase 9 et 3 et le clivage de la PARP et l'induction de l'apoptose dans les cellules Ca Ski, mais pas dans les cellules SiHa. D'après les auteurs, cette différence de sensibilité est probablement due à une faible expression de la caspase 8 et un niveau indétectable de Bid dans les cellules SiHa, ce qui réduit l'activation de la caspase 9 (Hougardy *et al*, 2005). Une autre hypothèse est que la différence de sensibilité des cellules proviendrait d'une différence de ratio entre le taux de E6 et de E6*I. En effet, d'après Filippova et collaborateurs, la protéine E6 accélère la dégradation de FADD et de la procaspase 8, alors qu'E6*I stabilise l'expression de la procaspase 8 (Filippova *et al*, 2007, 2009).

Une autre piste intéressante pour expliquer que les cellules Ca Ski soient plus sensibles au traitement par le 5azadC serait la réexpression de E2 dans ces cellules. En effet, il a été montré que les ARNm E2 étaient intacts dans ces cellules (Xue *et al*, 2012), mais que la protéine n'était pas présente, ou en tout cas pas capable d'activité transcriptionnelle (Xue *et al*, 2012; Morel *et al*, 2017). De plus, une majorité des 400 à 600 copies HPV16 intégrées dans le génome cellulaire est hyperméthylée afin de réguler le niveau d'oncoprotéines virales. Il est donc possible que le traitement au 5azadC favorise la déméthylation de toutes les copies, conduisant à une surexpression de E2 qui alors n'était pas produite de manière fonctionnelle. Les cellules SiHa ne possédant pas de POL entière de E2, le mécanisme de réexpression après traitement serait donc spécifique aux cellules Ca Ski, leur conférant une sensibilité plus grande au traitement. Afin de vérifier cette hypothèse, une mesure de l'activité luciférase sous la dépendance de E2 (comme réalisé Figure 1D de l'article de Morel et collaborateurs) dans les cellules Ca Ski pourrait être effectuée après leur traitement avec le 5azadC.

2 Rôle du miR-375 dans la régulation des oncogènes viraux

2.1 Variation de l'expression du miR-375 au cours du traitement au 5azadC

Le miR-375 est surexprimé dans les cellules Ca Ski et SiHa traitées au 5azadC. La surexpression est due à l'inhibition des DNMT par l'agent déméthylant, ce qui entraîne une déméthylation du promoteur du *MIR375* (Figure 20). Il n'est cependant pas possible de savoir avec la technique utilisée quel était le profil de méthylation exact (partiellement ou totalement méthylé ?) dans les cellules avant le traitement, et si toutes les cytosines du gène ont été déméthylées après le traitement. L'augmentation de l'expression du miR-375 est plutôt faible, de l'ordre de 2 fois, dans les cellules SiHa traitées avec 0,25 μ M de 5azadC et à 96 heures. Elle est en revanche beaucoup plus forte, presque 17 fois, dans les cellules Ca Ski traitées dans les mêmes conditions, ainsi que dans les cellules SiHa, environ 10 fois, traitées avec des doses de 5azadC de 5 μ M. Bien que surprenant, un tel différentiel de surexpression du miR-375 (2 à 10 fois dans les cellules Ca Ski) conduit à une répression équivalente (2 fois) des transcrits E6 et E7. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est qu'une augmentation minimale du niveau du miR-375 provoquerait une répression maximale des transcrits viraux. Il serait donc intéressant de quantifier en valeur absolue le nombre d'ARN de E6 et du miR-375 présents dans les cellules pour connaître le ratio entre les deux transcrits.

L'implication du miR-375 dans la répression de E6 est confirmée par plusieurs expériences. D'abord, Stich et collaborateurs ont montré que la transfection du miR-375 dans les cellules Ca Ski et SiHa inhibait l'expression des transcrits viraux. Ensuite, les cellules ont été co-traitées avec le 5azadC et un inhibiteur du miARN, sensé supprimer l'augmentation de l'expression (ou de l'activité) du miARN

induite par le 5azadC (Figure 5C, D et E de Morel et collaborateurs). Le co-traitement permet une réexpression partielle de E6 comparé au traitement au 5azadC seul, confirmant l'implication du miR-375 dans la répression de E6. Par contre, ces expériences ne prouvent pas que seul le miR-375 soit impliqué dans cette répression. L'utilisation de l'inhibiteur du miR-375 ne restaurant que partiellement l'expression transcriptionnelle de E6, les causes de cette restauration partielle sont (i) soit une inhibition partielle du miR-375 par l'anti-miARN, (ii) soit un autre mécanisme impliqué dans cette répression. Il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve d'un deuxième mécanisme impliqué, mais plusieurs hypothèses sont discutées dans le chapitre 3 : "Rôle de TBX2 dans la régulation des oncogènes viraux" et le chapitre 4 : "Autres hypothèses " de la discussion.

Il a été montré que le miR-375 pouvait réprimer les oncogènes viraux E6 et E7, mais aussi des oncogènes cellulaires comme SP1, impliqué dans le développement et la progression tumorale, E6AP impliqué dans la dégradation de p53 liée à E6, et CIP2A, qui prévient la dégradation par le protéasome de Myc, un répresseur transcriptionnel de *CDKN1A* (Stich *et al*, 2016). Le miR-375 peut aussi cibler d'autres oncogènes comme MTDH, YAP1, IGF1R et PDK1 (Yan *et al*, 2014). Cependant, la répression de ces cibles a été montrée dans des contextes particuliers, et n'a pas toujours été retrouvée dans nos modèles. Par exemple, SP1 n'est pas réprimé après traitement des cellules avec le 5azadC alors que le miR-375 est surexprimé. Il existe probablement d'autres mécanismes impliqués dans la régulation du gène ou des transcrits et qui sont modulés par le traitement au 5azadC, ne permettant pas de visualiser les effets de la répression de SP1 par le miR-375 (Figure 22).

2.2 Rétrocontrôle entre les oncogènes viraux et le miR-375

En 2016, une boucle de rétrocontrôle a été proposée entre E6 et le miR-375 (Figure 25). En effet, le miR-375 interagit avec les transcrits polycistroniques viraux précoces grâce à cinq sites de liaison, localisés au niveau de E7 et de E1 (Jung *et al*, 2014). Cette interaction provoque une inhibition de la traduction et une dégradation des ARN cibles. E6 quant à lui favorise l'inhibition de l'expression et la dégradation de p53. Alors que p53 forme des dimères répresseurs avec des facteurs de transcription (Beckerman & Prives, 2010), un de ses partenaires, SP1 est libéré dans le noyau et active des promoteurs de gènes, comme DNMT1 (Figure 18). MALAT1 est probablement surexprimé de la même manière dans les modèles cellulaires de cancers du col de l'utérus, plusieurs études ayant déjà montré le rôle de l'inhibition de p53 par E6 (Jeffers *et al*, 2013) et le rôle de SP1 (Li *et al*, 2015b; Huang *et al*, 2015; Hu *et al*, 2017) dans l'activation du promoteur de *MALAT1*. Après surexpression et/ou activation, DNMT1 et MALAT1 favorisent l'inhibition du miR-375 de deux manières différentes : DNMT1 augmente le taux de méthylation de l'ADN du gène, et MALAT1 interagit avec le miR-375 mature grâce à deux sites distincts (Liu *et al*, 2016a). MALAT1 est probablement une "éponge à miARN" puisqu'il interagit

aussi avec d'autres miARN (miR-200 et miR-124) (Xiao *et al*, 2015; Liu *et al*, 2016b). Le miR-375 et MALAT1 forment donc une boucle de rétroaction (Figure 25). Très récemment, une étude a été publiée sur l'implication de l'ARNnc TMPOP2 dans une boucle de rétroaction entre le miR-375 en combinaison avec le miR-139 et E6/E7 (He *et al*, 2019). En effet, les auteurs de l'étude ont montré que E6 et E7 favorisent la surexpression de TMPOP2, vraisemblablement suite à l'inhibition de p53. La protéine p53 possède deux sites de liaison au niveau du promoteur de *TMPOP2*, et leur mutation empêche l'inhibition de TMPOP2 par p53. *In silico*, les auteurs ont déterminé que TMPOP2 possède 3 sites de liaison avec le miR-375 et 5 sites avec le miR-139. Ce dernier miARN a aussi été décrit comme se liant aux transcrits viraux grâce à quatre sites potentiels de liaison dans la POL E1 (Sannigrahi *et al*, 2017). La surexpression de TMPOP2 inhibe donc l'expression des deux miARN. Finalement, le traitement des cellules avec le 5azadC modifie l'équilibre entre E6 et le miR-375. En effet, le 5azadC favorise l'hypométhylation du *MIR375* et son expression en inhibant toutes les DNMT (dont DNMT1). Le miR-375 peut alors interagir avec MALAT1 et surtout avec les ARN de E6 et E7, ce qui renforce l'inhibition de DNMT1 et MALAT1. Cette hypothèse est principalement supportée par les résultats publiés par Liu et collaborateurs (Liu *et al*, 2016a).

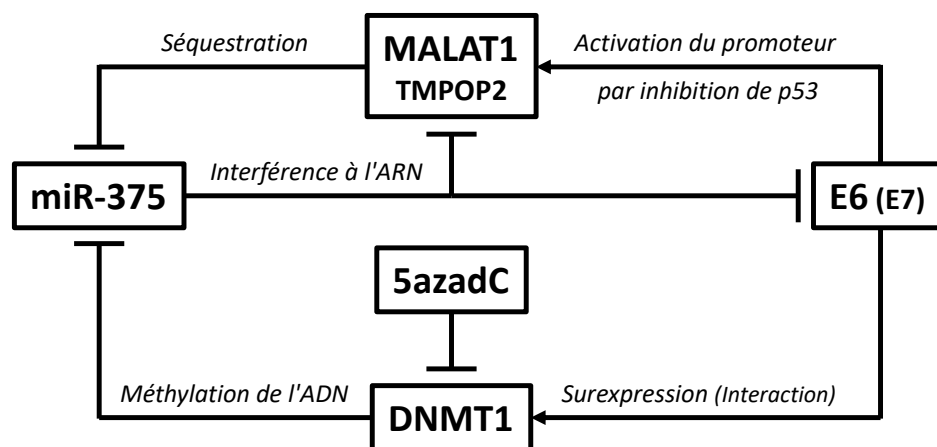


Figure 25 : Boucle de rétroaction entre le miR-375 et E6.

Schéma représentant la boucle de rétroaction entre le miR-375 et E6. Le miR-375 inhibe directement l'expression des transcrits polycistroniques E6/E7 en se liant aux ARN et l'expression de MALAT1. E6 favorise la surexpression de DNMT1 et MALAT1, probablement en favorisant la dégradation de la protéine p53 par l'intermédiaire de E6AP. E7 joue aussi un rôle dans la surexpression de DNMT1 et son activation, en favorisant la dégradation de pRb et le relargage des facteurs E2F et en modifiant la conformation de DNMT1 par interaction. DNMT1 et MALAT1 inhibent l'expression du miR-375, respectivement en méthylant le gène et en interagissant avec l'ARN. MALAT1 est considéré comme un ARN endogène concurrent. Récemment, une étude a montré que l'ARNnc TMPOP2 est surexprimé par les oncoprotéines virales et régule négativement le miR-375 et le miR-139 (non montré), liant les transcrits viraux. Le 5azadC inhibe l'expression et l'activité de DNMT1, favorisant la réexpression du miR-375 et ainsi la répression de E6. Flèche : active/favorise l'expression/l'activité. Trait avec une base : inactive/inhibe l'expression/l'activité. Elaboré à partir de (Liu *et al*, 2016a; Morel *et al*, 2017; Jeffers *et al*, 2013; Jiménez-Wences *et al*, 2014; He *et al*, 2019)

Troisième partie : Discussions et perspectives

D'après nos travaux, la surexpression de E6 dans un modèle d'ostéosarcome, les cellules U2-OS, favorise l'inhibition du miR-375 (Figure 21). Cependant, l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de DNMT1 n'est pas modifiée après transfection de E6 dans les cellules U2-OS (non montré). De plus, une surexpression de MALAT1 n'a pas été observée (non montré). Il est possible que le modèle utilisé, des cellules d'ostéosarcome mésenchymateux, ne soit pas adapté à cette étude car les HPV infectent spécifiquement des tissus épithéliaux. L'inhibition de E6 dans des expériences complémentaires, validée au niveau ARN et protéique et par la réexpression de p53, ne diminue pas l'expression du miR-375 dans les cellules Ca Ski et SiHa, dérivées de cancer du col de l'utérus. Après inhibition de E6, l'expression protéique de DNMT1 est diminuée dans les cellules Ca Ski, mais augmentée dans les cellules SiHa. Liu et collaborateurs avaient eux aussi inhibé l'expression de E6 par siARN, et avaient montré une diminution de l'expression protéique de DNMT1 et du miR-375 dans les cellules Ca Ski et les SiHa. Les siARN qu'ils ont utilisé dans les expériences sont un mélange de 3 à 5 oligonucléotides ciblant E6 d'après le fournisseur (Santa-Cruz), sans pour autant indiquer si les ARN codant E7 sont aussi susceptibles d'être inhibés. Leur concentration finale est de 100 nM. Nous n'avons utilisé qu'un seul oligonucléotide, à 20 nM, ne ciblant pas E7, qui interagit avec des séquences contenues dans E6 et dans l'intron des ARN polycistroniques E6*1. Il serait intéressant de vérifier l'implication de E7 dans les mécanismes de contrôle transcriptionnel de DNMT1 et du miR-375, et des mécanismes complémentaires qui pourraient expliquer le rétrocontrôle entre E6 et le miR-375. Li et collaborateurs ont d'ailleurs montré que l'inhibition de l'une ou l'autre des oncoprotéines virales diminuait l'expression transcriptionnelle et traductionnelle des trois DNMT dans les cellules SiHa (Li *et al*, 2015a).

Concernant le rôle du miR-375 dans la répression de E6, nos travaux, en accord avec ceux de la littérature, confirment que le miR-375 est impliqué dans la répression de E6 lors du traitement des cellules avec le 5azadC. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'un autre mécanisme soit impliqué dans cette répression. C'est pourquoi il serait intéressant de réaliser une délétion du gène *MIR375* (*MIR375*^{-/-}) dans les deux modèles cellulaires pour vérifier si le traitement avec le 5azadC des cellules *knock-out MIR375* entraîne toujours une répression de E6 et de E7. Des délétions de gènes codant des microARN sont envisageables et ont déjà été réalisées grâce à l'outil CRISPR/CAS9 (Chang *et al*, 2016). Si la répression est entièrement due à la liaison du miR-375 sur les transcrits viraux, l'expression de E6/E7 dans les cellules *MIR375*^{-/-} ne devrait pas varier.

3 Rôle de TBX2 dans la régulation des oncogènes viraux

3.1 Variation de l'expression de TBX2 au cours du traitement au 5azadC

Dans la publication 1, l'expression de la plupart des transcrits codant des FT régulant la LCR a été mesurée. Cette évaluation n'a pas permis de mettre en évidence une modification de leur expression transcriptionnelle. Bien que cette observation ne soit pas une preuve formelle, elle suggère que ces FT ne sont pas impliqués dans la répression de E6 lors du traitement des cellules avec le 5azadC. Les études sur l'implication des FT dans cette répression ont été complétées par des expériences concernant TBX2, présentées dans la publication 2. L'intérêt pour ce FT a été suscité par une publication de Schneider et collaborateurs, montrant qu'il pouvait avoir une activité répresseur sur l'expression de E6. TBX2 est un FT répresseur, contrairement à la plupart des membres de sa famille, et il est régulé par méthylation dans certaines tumeurs.

L'expression transcriptionnelle de TBX2 est modifiée par le traitement des cellules SiHa et Ca Ski avec le 5azadC. Dans les cellules SiHa, une augmentation progressive au cours du temps et en fonction de la concentration utilisée est visualisée, avec une surexpression à 96 h entre 1,3 à 0,25 μ M et 3,5 à 5 μ M. Il est intéressant de noter que les faibles différences d'expression entre 24 h et 72 h à 0,25 μ M ne sont pas significatives, contrairement à celles observées pour l'expression transcriptionnelle de E6. Dans les cellules Ca Ski, l'expression transcriptionnelle de TBX2 n'augmente pas à 0,25 μ M quel que soit le temps, et diminue même à 48 h de manière significative. Il est intéressant de noter que pour cette lignée, le dosage des ARN de TBX2 en qPCR était moins aisé qu'avec les cellules SiHa. En effet, les mesures effectuées pour chaque condition étaient moins reproductibles, à cause des faibles quantités des transcrits, se traduisant par des Ct élevés. Pour des concentrations de 5 μ M en 5azadC, l'expression de TBX2 diminue significativement dans un premier temps, avant d'augmenter fortement jusqu'à 3,8 fois à 96 h. Concernant l'expression de la protéine en revanche, nous n'avons pas visualisé de bandes en western blotting pour aucune des deux lignées, même après traitement avec le 5azadC à 5 μ M. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Schneider et collaborateurs, qui ont observé une très faible expression de la protéine dans les cellules SiHa. Fait intéressant, TBX2 semble être exprimé uniquement dans la couche la plus superficielle de l'épithélium malpighien, et Schneider et collaborateurs émettent l'hypothèse que le niveau de TBX2 pourrait être accru après la différenciation des cellules. Puisque les conditions de cultures modulent l'état de différenciation des cellules, par exemple la concentration de calcium dans le milieu (Kalantari *et al*, 2008), ou encore l'utilisation d'antibiotiques (Llobet *et al*, 2015), il n'est pas exclu que nos conditions de culture diffèrent des conditions de culture d'autres laboratoires, inhibant ainsi l'expression de TBX2. Quoi qu'il en soit, nous avons utilisé plusieurs contrôles pour nous assurer de la spécificité des amorces et des anticorps

Troisième partie : Discussions et perspectives

utilisés. La surexpression de TBX2 par transfection d'un plasmide codant TBX2 induit une surexpression des transcrits (non montré) et de la protéine. L'inhibition de TBX2 par transfection de siARN dirigés contre les transcrits TBX2 induit une diminution du taux d'ARN TBX2 (dans les cellules MCF-7) et de la protéine.

Pour déterminer si la surexpression des transcrits TBX2 dans les cellules SiHa traitées était dépendante de la méthylation du gène, le niveau de méthylation de *TBX2* a été évalué sur deux zones (promoteur et exon 2) par séquençage de l'ADN converti au bisulfite de cellules SiHa traitées ou non avec 5 μ M de 5azadC (non montré, Figure 26). La première zone est localisée au niveau du promoteur de *TBX2* et d'un îlot CpG, et comprend 30 cytosines méthylables sur environ 370 pb. La matrice ADN a été amplifiée par PCR puis clonée dans un plasmide avant d'être séquencée. D'après le séquençage de 4 clones, la zone étudiée du promoteur est très largement non méthylée (deux cytosines dans un clone sur les quatre séquencés) dans les cellules SiHa non traitées. Cette absence de méthylation est étonnante vu la faible quantité de transcrits présents dans les cellules, ce qui suggère au contraire une forte méthylation du promoteur, et c'est pourquoi une deuxième zone a été étudiée. Elle n'est pas localisée sur un îlot CpG mais dans l'exon 2 du gène et comprend 13 cytosines méthylables. Une étude a été publiée avec des amorces ciblant cette zone sur de l'ADN converti au bisulfite et a montré que la méthylation d'une cytosine de cette zone était associée à la progression des cancers de la vessie (Kandimalla *et al*, 2012). Le séquençage a été effectué directement sur les produits de PCR, et révèle que 100% des cytosines des CpG séquencées (10/13) étaient méthylées. Les trois sites CpG non séquencés étaient situés aux extrémités des amplicons, ce qui rend le séquençage de Sanger inefficace ou imprécis. Après traitement des cellules avec le 5azadC, toutes les cytosines des CpG séquencées (10/13) étaient encore méthylées. Ce résultat est étonnant puisque le 5azadC inhibe toutes les DNMT catalysant cette marque épigénétique, suggérant que des zones du génome sont moins sensibles à la déméthylation que d'autres zones. Finalement, il n'est pas possible de conclure quant à l'implication de la déméthylation du gène *TBX2* dans la surexpression des transcrits, lors du traitement des cellules SiHa avec le 5azadC. Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant de connaître l'état de méthylation du gène *TBX2* complet ainsi que de son environnement proche (par exemple les 8 îlots CpG présentés Figure 26) pour savoir si une partie du génome est effectivement déméthylée après traitement des cellules avec le 5azadC.

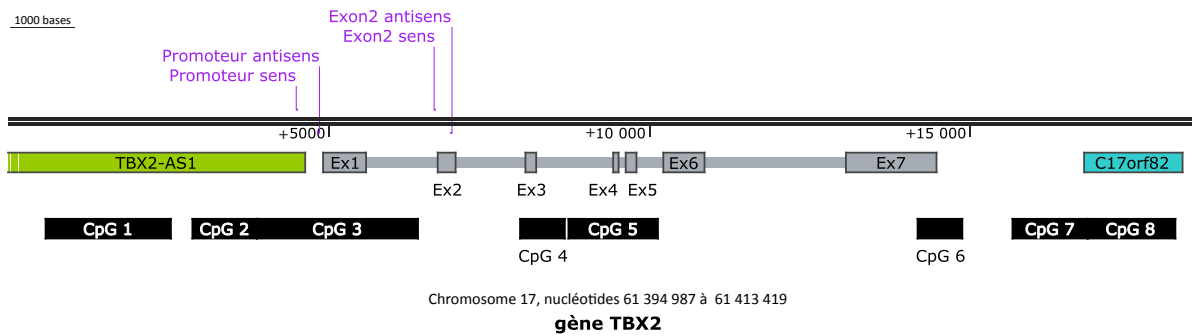


Figure 26 : Schéma du gène TBX2 humain.

Schéma représentant le gène TBX2 humain (en gris), avec les différents exons (boîtes grises Ex1 à Ex7) et les îlots CpG (CpG 1 à CpG 8) en noir. Sont placés sur le schéma les amorces (en violet) reconnaissant l'ADN converti au bisulfite du promoteur de TBX2 (Promoteur sens et antisens) et de l'exon 2 (Exon2 sens et antisens). TBX2-AS1 (en vert, montré non complet) est le prochain gène en amont de TBX2, et C17orf82 (en bleu) est le prochain gène en aval de TBX2. La séquence ADN est symbolisée par un double trait noir et représente une partie du chromosome 17 comprise entre les nucléotides n°61 394 987 et n°61 413 419. Le trait en haut à gauche représente 1000 bases. Données tirées de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.2 Répression de E6 par TBX2 au cours du traitement ?

L'implication de TBX2 dans la répression de E6 au cours du traitement des cellules avec le 5azadC a ensuite été étudiée. Dans un premier temps, la surexpression transcriptionnelle de TBX2 dans les deux modèles cellulaires (à 96 h avec 5 μ M de 5azadC) a été bloquée par la transfection de siARN TBX2. Si TBX2 était impliqué dans la répression de E6 à cause de la surexpression transcriptionnelle, l'inhibition de l'ARN TBX2 aurait dû induire une réexpression de E6. Nos résultats, présentés Figure 23, montrent que l'utilisation de siARN TBX2 lors du traitement des cellules SiHa avec 5 μ M de 5azadC ne réduit pas significativement le taux d'ARN de TBX2, mais en plus inhibe l'expression de E6. Dans les cellules MCF-7, l'inhibition de TBX2 par ces mêmes siARN est très efficace (Figure S1 de la publication 2 de Perrard et collaborateurs), réduisant fortement le taux ARN (de plus de 50%) et le taux de protéine. Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de TBX2 est nettement plus élevée dans les cellules MCF-7 que dans les cellules SiHa. La faible quantité dans ces dernières pourrait donc augmenter le risque d'inhibition non désirée du siARN avec d'autres transcrits cellulaires. Par exemple, le siARN possède 18 nucléotides complémentaires avec le transcrit FNBP1L. L'utilisation de ces siARN pour inhiber TBX2 n'est donc pas forcément la stratégie adéquate dans ce modèle cellulaire. Comme avec le miR-375, il serait intéressant de réaliser une délétion du gène *TBX2* dans les deux lignées de cellules Ca Ski et SiHa. L'utilisation de la technique CRISPR/CAS9 pour l'inhibition de l'expression de TBX2 serait alors plus spécifique que l'utilisation de siARN TBX2.

Dans une deuxième série d'expérience, TBX2 a été transfecté dans des modèles cellulaires pour étudier son implication dans la répression de E6 au cours du traitement avec le 5azadC. A partir des expériences de transfection dans les cellules U2-OS, TBX2 est bien capable de réprimer l'activité luciférase dont l'expression est dépendante de la LCR d'HPV16. Les résultats sont similaires à ceux de

Troisième partie : Discussions et perspectives

Schneider et collaborateurs (Schneider *et al*, 2013), qui ont utilisé des cellules HeLa, HaCaT et NHEK. Il est intéressant de noter que TBX2 réprime aussi fortement l'activité de la renilla, utilisé pour la normalisation, dont l'expression est dépendante du promoteur du CMV. En utilisant des constructions exogènes, les deux promoteurs viraux sont donc réprimés par TBX2, le fait ayant été aussi documenté par Schneider et collaborateurs (Schneider *et al*, 2013). Ils ont aussi documenté que TBX2 se liait à la LCR entre les nucléotides 7564 et 7756, région qui ne comprend pas de site de liaison à TBX2 canonique. Il existe en revanche un site de liaison consensus GGGTGA à la position 7781, qui ne semble pas requis pour la répression de TBX2.

Enfin, la surexpression de TBX2 dans les deux modèles cellulaires SiHa et Ca ski n'induit pas de répression de E6. Si l'efficacité de la transfection n'a pas été mesurée, l'augmentation importante des taux transcriptionnel et protéique de TBX2 confirme que la protéine est bien surexprimée dans les cellules. Nous n'avons cependant pas pu confirmer que la protéine transfectée était fonctionnelle. En effet, les deux cibles testées (*CDKN2A* et *PTEN*) ne sont pas réprimées après transfection alors qu'il a été montré que TBX2, dans certains contextes, réprimait ces gènes (Prince *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2016). Ces résultats n'indiquent toutefois pas que la protéine n'est pas fonctionnelle car la surexpression ou l'inhibition de TBX2 ne modifie pas systématiquement l'expression des deux cibles (Wansleben *et al*, 2013; Zhu *et al*, 2016). Il serait donc intéressant de trouver un marqueur de la fonctionnalité de TBX2 comme répresseur transcriptionnel dans nos modèles cellulaires.

Les expériences sont très reproductibles concernant les transcrits E6. En effet, les variations de l'expression de E6 après transfection sont minimales (<10%) et non significatives. La quantification de la protéine TBX2 est en revanche moins reproductible, mais n'apporte néanmoins pas de variation significative. Quoi qu'il en soit, une répression de la LCR des copies d'HPV intégrées au génome cellulaire devrait se traduire par une diminution du taux ARN de E6. Or, la surexpression de TBX2 dans les deux modèles cellulaires n'induit aucune variation transcriptionnelle, ce qui nous amène à conclure que dans ces conditions TBX2 ne contrôle pas l'expression des oncogènes viraux. Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux obtenus sur des constructions luciférase sous la dépendance de la LCR. Pour confirmer cette différence entre les deux modèles, il pourrait être intéressant de transfecter les plasmides exprimant la luciférase sous la dépendance de la LCR directement dans les cellules SiHa et Ca Ski. La quantification dans la même expérience des taux de transcrits luciférase et E6 permettrait de mettre en évidence une différence, si elle existe, entre le contrôle de la LCR endogène et intégrée, et la LCR exogène non intégrée.

Une hypothèse pour expliquer cette différence serait que l'environnement épigénétique présent sur la LCR intégrée n'est pas le même que pour la LCR transfectée (Figure 27). En effet, de façon apparentée au génome cellulaire, le génome viral est soumis à des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN mais aussi à des modifications post-traductionnelles des histones,

susceptibles de modifier la conformation de la chromatine et donc l'accessibilité des FT à leurs sites de liaison. L'ADN transfecté dans les cellules et codant la luciférase ne présente pas le même contexte épigénétique, expliquant que deux séquences ADN identiques ne subissent pas la même répression par TBX2.

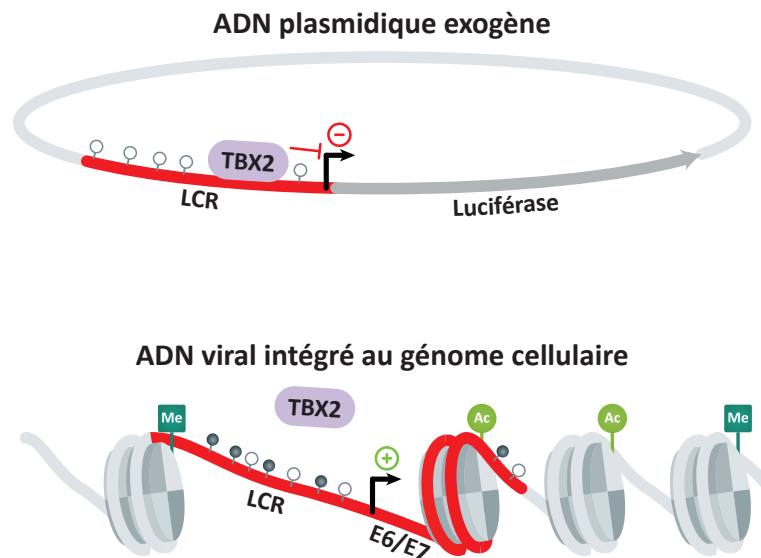


Figure 27 : Hypothèse sur la régulation de la LCR par TBX2.

La présence de modifications épigénétiques sur le génome cellulaire pourrait expliquer la différence de régulation de la LCR par TBX2 selon qu'elle est transfectée ou intégrée au génome cellulaire. En haut : l'ADN circulaire (gris clair, gris foncé et rouge) d'un plasmide transfecté dans la cellule, qui ne possède ni méthylation de l'ADN (rond blanc) ni nucléosomes portant des modifications post-traductionnelles. TBX2 (violet) est recruté sur la LCR (en rouge, l'ADN viral) réprimant l'expression de la luciférase (gris foncé). L'activité du promoteur (flèche cassée noire) est inhibée. En bas : l'ADN viral (en rouge) est intégré au génome cellulaire, soumis à des méthylations de l'ADN (rond gris foncé) et des modifications post-traductionnelles des histones (Me : méthylation, Ac : acétylation). La liaison de TBX2 à la LCR est perturbée par ces marques épigénétiques. L'activité du promoteur viral n'est pas inhibée. Les nucléosomes et la méthylation de l'ADN sont placés arbitrairement, ainsi que la liaison de TBX2 à la LCR. Les échelles ne sont pas respectées.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pourraient être réalisées dans les cellules traitées avec le 5azadC pour définitivement conclure sur l'absence d'un rôle répressif de TBX2 sur les oncogènes viraux.

4 Autres hypothèses concernant la répression des oncogènes viraux

4.1 Hypothèse d'une interférence à l'ARN

La répression de E6 lors du traitement des cellules HPV positives avec le 5azadC est principalement due à la déstabilisation des transcrits viraux par un miARN, ciblant l'ARNm E6. A notre connaissance, seuls six miARN ont été décrits comme pouvant se fixer aux transcrits d'HPV16, les miR-

122, -139, -187, -375, -875, et -3144. De façon intéressante, les gènes codant le miR-375 et le miR-139 (contenu dans *PDE2A*) sont méthylés dans des échantillons de tumeurs du col de l'utérus. A part le *MIR122* qui est hyperméthylé dans les carcinomes hépatiques, à notre connaissance, il n'existe pas d'articles ayant étudié l'état de méthylation des autres miARN. L'expression des *MIR139* et *MIR375* est inhibée dans les cancers du col de l'utérus comparé au tissu sain (Huang *et al*, 2016; Wang *et al*, 2011). Finalement, l'expression des deux gènes augmente dans les cellules contenant des copies intégrées d'HPV16 traitées par le 5azadC (cellules UPCI:SCC090 pour le *MIR139* et SiHa pour le *MIR375*). Les études sur les miR-139 ayant été publiées récemment, seul l'impact du miR-375 sur E6 dans nos modèles cellulaires a été analysée en détail. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication du miR-139 dans la déstabilisation des transcrits E6/E7 au cours du traitement des cellules SiHa et Ca Ski avec le 5azadC, puisqu'il possède les mêmes attributs que le miR-375.

4.2 Hypothèse d'une modification de l'activité du promoteur viral

Finalement, nous ignorons si la répression de E6 au cours du traitement avec le 5azadC est uniquement due à la déstabilisation des ARN ou s'il existe d'autres mécanismes. Parmi les mécanismes possibles, la modification de l'activité du promoteur p97 pourrait être vérifiée par plusieurs méthodes ; d'abord en réalisant une immunoprécipitation de la chromatine grâce à un anticorps dirigé contre la protéine ARN polymérase II, suivie d'une quantification du taux d'ADN de la LCR avant et après traitement des cellules avec le 5azadC ; ensuite en déterminant le taux de néo-transcrits E6/E7 formés après le blocage de la transcription par l'actinomycine D. La variation du taux de néo-transcrits après traitement avec le 5azadC indiquerait une modulation de la synthèse des ARN. Enfin la transfection, dans les cellules traitées ou non, du promoteur viral contrôlant l'expression de la luciférase serait une approche possible, bien que comportant des biais (voir Figure 27).

L'activité des facteurs de transcription se fixant à la LCR pourrait être modulée sans modification de l'expression transcriptionnelle, ni protéique. En effet, une hypothèse intéressante est que p53 serait ré-exprimée suite au traitement, par exemple par la déméthylation d'un gène suppresseur de tumeur. La protéine SP1, qui normalement active l'expression des gènes cibles, comme DNMT1 (Figure 18) ou encore E6, interagirait alors avec p53 et formerait un dimère réprimant les cibles de SP1 (Beckerman & Prives, 2010). En plus, l'inhibition par le dimère de p97 diminuerait le taux de protéines E6 dans la cellule, ce qui favoriserait la réexpression de p53, accentuant d'autant la séquestration de SP1 par p53. Au cours du traitement, l'expression de SP1 ne varierait donc pas, mais son activité transcriptionnelle serait altérée par la réexpression de p53.

5 Conclusion générale

Les cancers du col de l'utérus sont virtuellement tous induits par HPV. La transformation des cellules survient généralement des dizaines d'années après l'infection. En effet, le génome viral produit deux oncoprotéines, E6 et E7, qui interagissent avec plus de 150 partenaires et dérèglent l'homéostasie cellulaire, dont les mécanismes épigénétiques. Fait intéressant, les marques épigénétiques contrôlent l'expression des gènes, dont l'expression des oncogènes viraux. Au laboratoire, nous avons montré que le taux de méthylation de l'ADN au niveau des E2BS proximaux augmentait avec la sévérité des lésions du col de l'utérus, suggérant que la dérégulation de la méthylation de l'ADN par E6/E7 favorise leur propre expression. Comme la viabilité des cellules cancéreuses est dépendante de l'expression des deux oncoprotéines virales E6 et E7, réprimer ces oncoprotéines en dérégulant les mécanismes épigénétiques semble être une stratégie intéressante et innovante pour traiter efficacement les cancers du col de l'utérus.

Deux lignées cancéreuses du col de l'utérus (Ca Ski et SiHa) ont été traitées avec le 5azadC, ce qui induit une répression des transcrits et des protéines viraux. Nous avons montré dans une première publication que la réexpression d'un miARN, le miR-375, qui interagit avec les ARN E6/E7, induisait une déstabilisation des transcrits viraux. Bien que nous ayons confirmé l'implication du miR-375 dans cette répression lors du traitement des cellules avec le 5azadC, il n'est pas sûr que ce soit le seul mécanisme d'inhibition mis en jeu. C'est pourquoi, dans une deuxième publication, nous avons étudié la possible implication de TBX2. Finalement, nos résultats suggèrent que ce facteur de transcription n'intervient pas puisqu'il présente un profil d'expression après traitement différent de celui de E6, et surtout parce que son expression ectopique ne permet pas d'inhiber l'expression de E6.

Le traitement des cellules par l'agent déméthylant entraîne aussi une perte de viabilité en particulier des cellules Ca Ski. En effet, le 5azadC induit un blocage du cycle en G2/M dans ces cellules, une augmentation du pourcentage de cellules en Sub-G1 et un clivage de la PARP. D'autres études ont aussi noté une sensibilité similaire des cellules cancéreuses HPV positives traitées avec l'agent déméthylant ou l'un de ses analogues. En plus, dans des études cliniques, les tumeurs des VADS des patients traités par 5azaC présentent une expression réduite des transcrits E6 et E7 et une réexpression de p53. Si le 5azadC est déjà utilisé en clinique pour le traitement d'autres cancers, nos données apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes moléculaires du 5azadC dans les cancers induits par HPV, qui pourraient ainsi être traités par cette molécule.

Bibliographie

- Aarthy M, Kumar D, Giri R & Singh SK (2018) E7 oncoprotein of human papillomavirus: Structural dynamics and inhibitor screening study. *Gene* **658**: 159–177
- Abrahams A, Mowla S, Parker MI, Goding CR & Prince S (2008) UV-mediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2. *J. Biol. Chem.* **283**: 2223–2230
- Abrahams A, Parker MI & Prince S (2010) The T-box transcription factor Tbx2: its role in development and possible implication in cancer. *IUBMB Life* **62**: 92–102
- Abulafia O, Pezzullo JC & Sherer DM (2003) Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol. Oncol.* **90**: 137–144
- Adams BD, Kasinski AL & Slack FJ (2014) Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr. Biol. CB* **24**: R762-776
- Agrawal K, Das V, Vyas P & Hajdúch M (2018) Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacol. Ther.* **188**: 45–79
- Ahn J, Urist M & Prives C (2004) The Chk2 protein kinase. *DNA Repair* **3**: 1039–1047
- Aksoy P, Gottschalk EY & Meneses PI (2017) HPV entry into cells. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **772**: 13–22
- Albero G, Castellsagué X, Giuliano AR & Bosch FX (2012) Male circumcision and genital human papillomavirus: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Dis.* **39**: 104–113
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale A-L, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, et al (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**: 415–421
- Alizon S, Murall CL & Bravo IG (2017) Why Human Papillomavirus Acute Infections Matter. *Viruses* **9**:
- Aranda S, Mas G & Di Croce L (2015) Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci. Adv.* **1**: e1500737
- Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG & Bulten J (2008) Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* **111**: 167–177
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJLM, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucner P, Sankaranarayanan R & Peto J (2012) Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* **30 Suppl 5**: F88-99
- Arnaudo AM & Garcia BA (2013) Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin* **6**: 24
- Asadurian Y, Kurilin H, Lichtig H, Jackman A, Gonen P, Tommasino M, Zehbe I & Sherman L (2007) Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes. *J. Med. Virol.*

Bibliographie

79: 1751–1760

Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B & Campo MS (2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int. J. Cancer* **119**: 2105–2112

Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, Co NN, Yau PL & Kwok TT (2010) HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol. Rep.* **24**: 1599–1604

Auclair G & Weber M (2012) Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* **94**: 2202–2211

Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH & Dhe-Paganon S (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**: 822–825

Avvakumov N, Torchia J & Mymryk JS (2003) Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* **22**: 3833–3841

Baldwin A, Huh K-W & Munger K (2006) Human papillomavirus E7 oncoprotein dysregulates steroid receptor coactivator 1 localization and function. *J. Virol.* **80**: 6669–6677

Baldwin A, Hypes MK, Pirisi L & Creek KE (2007) NF1 is an essential positive transcription factor for human papillomavirus type 16 early gene expression. *Open Virol. J.* **1**: 33–38

Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR & Vousden KH (1990) The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**: 153–160

Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD & Berger SL (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol. Cell* **8**: 1243–1254

Barlund M, Monni O, Kononen J, Cornelison R, Torhorst J, Sauter G, Kallioniemi O & Kallioniemi A (2000) Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* **60**: 5340–5344

Bauknecht T, Angel P, Royer HD & zur Hausen H (1992) Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* **11**: 4607–4617

Beckerman R & Prives C (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a000935

Bello JOM, Nieva LO, Paredes AC, Gonzalez AMF, Zavaleta LR & Lizano M (2015) Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. *Viruses* **7**: 4734–4755

Bernard H-U (2002) Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir. Ther.* **7**: 219–237

Bernard H-U (2013a) Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **18**: 357–361

- Bernard H-U (2013b) Regulatory elements in the viral genome. *Virology* **445**: 197–204
- Bernstein C, R. A, Nfonsam V & Bernstei H (2013) DNA Damage, DNA Repair and Cancer. In *New Research Directions in DNA Repair*, Chen C (ed) InTech Available at: <http://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/dna-damage-dna-repair-and-cancer> [Accessed June 21, 2018]
- Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY & Blau HM (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**: 1042–1047
- Bhuvanagiri M, Lewis J, Putzker K, Becker JP, Leicht S, Krijgsveld J, Batra R, Turnwald B, Jovanovic B, Hauer C, Sieber J, Hentze MW & Kulozik AE (2014) 5-azacytidine inhibits nonsense-mediated decay in a MYC-dependent fashion. *EMBO Mol. Med.* **6**: 1593–1609
- Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL & Sapp M (2012) Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J. Virol.* **86**: 9875–9887
- Bierkens M, Krijgsman O, Wilting SM, Bosch L, Jaspers A, Meijer GA, Meijer CJLM, Snijders PJF, Ylstra B & Steenbergen RDM (2013) Focal aberrations indicate *EYA2* and *hsa-miR-375* as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* **52**: 56–68
- Biktasova A, Hajek M, Sewell A, Gary C, Bellinger G, Deshpande HA, Bhatia A, Burtneess B, Judson B, Mehra S, Yarbrough WG & Issaeva N (2017) Demethylation Therapy as a Targeted Treatment for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**: 7276–7287
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6–21
- Bischof O, Dejean A & Pineau P (2009) Une re-vue de la sénescence cellulaire : Ami ou ennemi de la promotion tumorale ? *MS Médecine Sci. ISSN Pap. 0767-0974 ISSN Numér. 1958-5381 2009 Vol 25 N° 2 P 153-160* Available at: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/6578> [Accessed November 13, 2018]
- Black APB, Ardern-Jones MR, Kasprowicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS & Ogg GS (2007) Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**: 1485–1493
- Borbély AA, Murvai M, Kónya J, Beck Z, Gergely L, Li F & Veress G (2006) Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J. Gen. Virol.* **87**: 287–294
- Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, Forné T & Weber M (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat. Genet.* **42**: 1093–1100
- Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S & Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**: 1760–1764
- Bousarghin L, Touzé A, Sizaret P-Y & Coursaget P (2003) Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* **77**: 3846–3850
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha

Bibliographie

N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V & WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2009) A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* **10**: 321–322

Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ & ter Schegget J (1997) Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J. Invest. Dermatol.* **108**: 712–715

Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Mariani L, Ruutu M, Syrjänen S, Favalli C & Syrjänen K (2006) Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn. Cytopathol.* **34**: 739–748

Bravo IG & Féllez-Sánchez M (2015) Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol. Med. Public Health* **2015**: 32–51

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ & Kouzarides T (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* **18**: 2449–2458

Bronnimann MP, Chapman JA, Park CK & Campos SK (2013) A transmembrane domain and GxxxG motifs within L2 are essential for papillomavirus infection. *J. Virol.* **87**: 464–473

Brueckner B & Lyko F (2004) DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 551–554

Bruggink SC, de Koning MNC, Gussekloo J, Egberts PF, Ter Schegget J, Feltkamp MCW, Bavinck JNB, Quint WGV, Assendelft WJJ & Eekhof JAH (2012) Cutaneous wart-associated HPV types: prevalence and relation with patient characteristics. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **55**: 250–255

Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX & de Sanjosé S (2010) Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.* **202**: 1789–1799

Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT & Trus BL (2008) Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* **82**: 5190–5197

Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T & Fuks F (2007) Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* **26**: 1650–1655

Butz K & Hoppe-Seyler F (1993) Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* **67**: 6476–6486

Cai C-L, Zhou W, Yang L, Bu L, Qyang Y, Zhang X, Li X, Rosenfeld MG, Chen J & Evans S

(2005) T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **132**: 2475–2487

Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X & Dian A (2013) Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch. Gynecol. Obstet.* **287**: 541–548

Caldeira S, de Villiers EM & Tommasino M (2000) Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* **19**: 821–826

Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, Williamson A-L, Chung L-P, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldaña HA, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL & Bernard H-U (2005) Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *J. Virol.* **79**: 6565–6569

Calvanese V, Fernández AF, Urdinguio RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, Pérez-García V, Bueno C, Montes R, Ramos-Mejía V, Martínez-Camblor P, Ferrero C, Assenov Y, Bock C, Menendez P, Carrera AC, Lopez-Larrea C & Fraga MF (2012) A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Res.* **40**: 116–131

Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C & Man S (2010) HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* **407**: 137–142

Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Chumworathayi B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M & von Knebel Doeberitz M (2013) Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int. J. Cancer* **132**: 2087–2094

Chalertpet K, Pakdeechaidan W, Patel V, Mutirangura A & Yanatatsaneejit P (2015) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. *Cancer Sci.* **106**: 1333–1340

Chan WK, Chong T, Bernard HU & Klock G (1990) Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* **18**: 763–769

Chan WK, Klock G & Bernard HU (1989) Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* **63**: 3261–3269

Chang H, Yi B, Ma R, Zhang X, Zhao H & Xi Y (2016) CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* **6**: 22312

Chen J, Xue Y, Poidinger M, Lim T, Chew SH, Pang CL, Abastado J-P & Thierry F (2014a) Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* **462–463**: 14–24

Chen J & Zhao K-N (2015) HPV-p53-miR-34a axis in HPV-associated cancers. *Ann. Transl. Med.* **3**: 331

Bibliographie

- Chen JJ (2010) Genomic Instability Induced By Human Papillomavirus Oncogenes. *North Am. J. Med. Sci.* **3**: 43–47
- Chen P-M, Cheng Y-W, Wang Y-C, Wu T-C, Chen C-Y & Lee H (2014b) Up-regulation of FOXM1 by E6 oncoprotein through the MZF1/NKX2-1 axis is required for human papillomavirus-associated tumorigenesis. *Neoplasia N. Y. N* **16**: 961–971
- Chen Y-C, Huang R-L, Huang Y-K, Liao Y-P, Su P-H, Wang H-C, Chang C-C, Lin Y-W, Yu M-H, Chu T-Y & Lai H-C (2014c) Methyloomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of β -catenin signaling in cervical cancer. *Int. J. Cancer* **135**: 117–127
- Cheray M, Nadaradjane A, Bonnet P, Routier S, Vallette FM & Cartron P-F (2014) Specific inhibition of DNMT1/CFP1 reduces cancer phenotypes and enhances chemotherapy effectiveness. *Epigenomics* **6**: 267–275
- Childs BG, Durik M, Baker DJ & van Deursen JM (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* **21**: 1424–1435
- Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M & Bernard HU (1991) The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virol.* **65**: 5933–5943
- Chong T, Chan WK & Bernard HU (1990) Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 465–470
- Christoffels VM, Hoogaars WMH, Tessari A, Clout DEW, Moorman AFM & Campione M (2004) T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **229**: 763–770
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G & Li BF (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**: 1996–2000
- Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, Plissonnier M-L & Mougin C (2007) The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp. Cell Res.* **313**: 3239–3250
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ & Reddel RR (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**: 1850–1853
- Connerty P, Ahadi A & Hutvagner G (2015) RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **17**:
- Cornelissen MT, Smits HL, Briët MA, van den Tweel JG, Struyk AP, van der Noordaa J & ter Schegget J (1990) Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *J. Gen. Virol.* **71 (Pt 5)**: 1243–1246
- Coronel J, Cetina L, Pacheco I, Trejo-Becerril C, González-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Arias-Bofill D, Candelaria M, Vidal S & Dueñas-González A (2011)

A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **28 Suppl 1**: S540-546

Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, et al (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**: 67–79

Crow JM (2012) HPV: The global burden. *Nature* **488**: S2-3

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H & Alonso A (1998) The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp. Cell Res.* **241**: 76–83

Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, González-García MC, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Valverde M, Rojas E, Rodríguez-Sastre MA, García-Cuellar CM & Lizano M (2018) Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage. *Int. J. Biol. Sci.* **14**: 21–35

Cuthill S, Sibbet GJ & Campo MS (1993) Characterization of a nuclear factor, papilloma enhancer binding factor-1, that binds the long control region of human papillomavirus type 16 and contributes to enhancer activity. *Mol. Carcinog.* **8**: 96–104

Dachez R (2008) Le cancer du col de l'utérus Presses Universitaires de France

Dalstein V, Riethmuller D, Prétet J-L, Le Bail Carval K, Sautière J-L, Carbillet J-P, Kantelip B, Schaal J-P & Mougin C (2003) Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int. J. Cancer* **106**: 396–403

Davis AJ, Gelmon KA, Siu LL, Moore MJ, Britten CD, Mistry N, Klamut H, D'Aloisio S, MacLean M, Wainman N, Ayers D, Firby P, Besterman JM, Reid GK & Eisenhauer EA (2003) Phase I and pharmacologic study of the human DNA methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks. *Invest. New Drugs* **21**: 85–97

Davis E, Teng H, Bilican B, Parker MI, Liu B, Carriera S, Goding CR & Prince S (2008) Ectopic Tbx2 expression results in polyploidy and cisplatin resistance. *Oncogene* **27**: 976–984

Day PM, Thompson CD, Schowalter RM, Lowy DR & Schiller JT (2013) Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *J. Virol.* **87**: 3862–3870

D'Costa ZJ, Jolly C, Androphy EJ, Mercer A, Matthews CM & Hibma MH (2012) Transcriptional repression of E-cadherin by human papillomavirus type 16 E6. *PLoS One* **7**: e48954

De Vincenzo R, Conte C, Ricci C, Scambia G & Capelli G (2014) Long-term efficacy and safety of human papillomavirus vaccination. *Int. J. Womens Health* **6**: 999–1010

Dean W (2016) Pathways of DNA Demethylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **945**: 247–274

Denis H, Ndlovu 'Matladi N & Fuks F (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* **12**: 647–656

Denny LA, Franceschi S, de Sanjosé S, Heard I, Moscicki AB & Palefsky J (2012) Human

Bibliographie

papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. *Vaccine* **30 Suppl 5**: F168-174

Derissen EJB, Beijnen JH & Schellens JHM (2013) Concise drug review: azacitidine and decitabine. *The Oncologist* **18**: 619–624

Dhiman VK, Attwood K, Campbell MJ & Smiraglia DJ (2015) Hormone stimulation of androgen receptor mediates dynamic changes in DNA methylation patterns at regulatory elements. *Oncotarget* **6**: 42575–42589

DiMaio D & Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* **445**: 99–114

Ding B, Chi SG, Kim SH, Kang S, Cho JH, Kim DS & Cho NH (2007) Role of p53 in antioxidant defense of HPV-positive cervical carcinoma cells following H₂O₂ exposure. *J. Cell Sci.* **120**: 2284–2294

Disbrow GL, Hanover JA & Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J. Virol.* **79**: 5839–5846

Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS & Ren B (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**: 376–380

Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E & Pfister H (1994) Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **58**: 803–808

Doorbar J (2013) Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr. Opin. Virol.* **3**: 416–421

Doorbar J (2018) Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **47**: 27–41

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Naphine S, Sterling J, Winter G & Griffin H (1997) Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* **238**: 40–52

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR & Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **30 Suppl 5**: F55-70

Dotta L, Tassone L & Badolato R (2011) Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr. Mol. Med.* **11**: 317–325

Drolet M, Bénard É, Boily M-C, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JML, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliwer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, et al (2015) Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **15**: 565–580

Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PKS, Tsang RKY & van Hasselt CA (2004) Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett.* **205**: 81–88

Duensing A, Liu Y, Perdreau SA, Kleylein-Sohn J, Nigg EA & Duensing S (2007) Centriole

overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* **26**: 6280–6288

Durzynska J, Lesniewicz K & Poreba E (2017) Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **772**: 36–50

Dyson N, Guida P, Münger K & Harlow E (1992) Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* **66**: 6893–6902

Egawa N & Doorbar J (2017) The low-risk papillomaviruses. *Virus Res.* **231**: 119–127

El-Araby AM, Fouad AA, Hanbal AM, Abdelwahab SM, Qassem OM & El-Araby ME (2016) Epigenetic Pathways of Oncogenic Viruses: Therapeutic Promises. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **349**: 73–90

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**: 495–516

Facciuto F, Bugnon Valdano M, Marzali F, Massimi P, Banks L, Cavatorta AL & Gardiol D (2014) Human papillomavirus (HPV)-18 E6 oncoprotein interferes with the epithelial cell polarity Par3 protein. *Mol. Oncol.* **8**: 533–543

Fang J, Zhang H & Jin S (2014) Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**: 5083–5093

Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, Toure P, Sow PS, Dem A, Dembele B, Critchlow CW, Xi L, Lu H, McIntosh MW, Young AM & Kiviat NB (2005) Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**: 273–282

Ferenczy A & Franco E (2002) Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* **3**: 11–16

Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, Pino I, Javierre B, Carmona FJ, Acquadro F, Steenbergen RDM, Snijders PJF, Meijer CJ, Pineau P, Dejean A, Lloveras B, et al (2009) The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res.* **19**: 438–451

Filippova M, Filippov VA, Kagoda M, Garnett T, Fodor N & Duerksen-Hughes PJ (2009) Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Virol.* **83**: 210–227

Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K & Duerksen-Hughes PJ (2007) The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J. Virol.* **81**: 4116–4129

Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS & Duerksen-Hughes PJ (2002) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**: 21730–21739

Fischer M, Quaas M, Steiner L & Engeland K (2016) The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **44**: 164–174

Fischer M, Quaas M, Wintsche A, Müller GA & Engeland K (2014) Polo-like kinase 4

Bibliographie

transcription is activated via CRE and NRF1 elements, repressed by DREAM through CDE/CHR sites and deregulated by HPV E7 protein. *Nucleic Acids Res.* **42**: 163–180

Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM & Engeland K (2017) Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. *Sci. Rep.* **7**: 2603

Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM & Lübbert M (2009) The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**: 1019–1028

Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M & Franceschi S (2012) Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* **30 Suppl 5**: F12-23

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B & Galloway DA (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**: 2090–2100

Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaić V & Banks L (2015) The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* **7**: 3530–3551

García-Vallvé S, Alonso A & Bravo IG (2005) Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends Microbiol.* **13**: 514–521

Gargano JW, Nisenbaum R, Lee DR, Ruffin MT, Steinau M, Horowitz IR, Flowers LC, Tadros TS, Birdsong G & Unger ER (2012) Age-group differences in human papillomavirus types and cofactors for cervical intraepithelial neoplasia 3 among women referred to colposcopy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **21**: 111–121

Garland SM, Kjaer SK, Muñoz N, Block SL, Brown DR, DiNubile MJ, Lindsay BR, Kuter BJ, Perez G, Dominiak-Felden G, Saah AJ, Drury R, Das R & Velicer C (2016) Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-world Experience. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **63**: 519–527

Garnett TO, Filippova M & Duerksen-Hughes PJ (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**: 1915–1926

Georgopoulos NT, Proffitt JL & Blair GE (2000) Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19**: 4930–4935

Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, Tommasino M & Kjaer SK (2011) Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **20**: 1315–1321

Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S & Tommasino M (2015) Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience* **9**: 526

- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B & Tommasino M (2010) The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* **40**: 1–13
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T & Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 4727–4741
- Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L & Javier R (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* **19**: 5270–5280
- Gloss B & Bernard HU (1990) The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J. Virol.* **64**: 5577–5584
- Gloss B, Bernard HU, Seedorf K & Klock G (1987) The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* **6**: 3735–3743
- Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterenst M, Rogge L, Winnacker EL & Bernard HU (1989) Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3519–3533
- Goll MG & Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 481–514
- Gorkin DU, Leung D & Ren B (2014) The 3D genome in transcriptional regulation and pluripotency. *Cell Stem Cell* **14**: 762–775
- Graham SV (2017) Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses* **9**:
- Graham SV & Faizo AAA (2017) Control of human papillomavirus gene expression by alternative splicing. *Virus Res.* **231**: 83–95
- Gray E, Pett MR, Ward D, Winder DM, Stanley MA, Roberts I, Scarpini CG & Coleman N (2010) In vitro progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis. *Cancer Res.* **70**: 4081–4091
- Green DR, Galluzzi L & Kroemer G (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* **345**: 1250256
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E & Gross A (2002) tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**: 12237–12245
- Groves IJ & Coleman N (2015) Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.* **235**: 527–538
- Groves IJ, Knight ELA, Ang QY, Scarpini CG & Coleman N (2016) HPV16 oncogene expression levels during early cervical carcinogenesis are determined by the balance of epigenetic chromatin modifications at the integrated virus genome. *Oncogene* **35**: 4773–4786

Bibliographie

- Gruener M, Bravo IG, Momburg F, Alonso A & Tomakidi P (2007) The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Viol. J.* **4**: 116
- Gu W & Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595–606
- Guess JC & McCance DJ (2005) Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *J. Virol.* **79**: 14852–14862
- Guibert S, Forné T & Weber M (2012) Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* **22**: 633–641
- Gunasekharan V & Laimins LA (2013) Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. *J. Virol.* **87**: 6037–6043
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G & Song H (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**: 423–434
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H & Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**: 3016–3027
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674
- Harden ME & Munger K (2017) Perturbation of DROSHA and DICER expression by human papillomavirus 16 oncoproteins. *Virology* **507**: 192–198
- Harrelson Z, Kelly RG, Goldin SN, Gibson-Brown JJ, Bollag RJ, Silver LM & Papaioannou VE (2004) Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Dev. Camb. Engl.* **131**: 5041–5052
- Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, Carreira C, Hussain I, Müller M, Taylor-Papadimitriou J, Picard D, Sylla BS, Trinchieri G, Medzhitov R & Tommasino M (2013) The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J. Exp. Med.* **210**: 1369–1387
- Hata A & Lieberman J (2015) Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Sci. Signal.* **8**: re3
- He H, Liu X, Liu Y, Zhang M, Lai Y, Hao Y, Wang Q, Shi D, Wang N, Luo X-G, Ma W & Zhang T-C (2019) Human papillomavirus E6/E7 and lncRNA TMPOP2 mutually upregulated gene expression in cervical cancer cells. *J. Virol.*
- He J, Ji Y, Li A, Zhang Q, Song W, Li Y, Huang H, Qian J, Zhai A, Yu X, Zhao J, Shang Q, Wei L & Zhang F (2014) MiR-122 directly inhibits human papillomavirus E6 gene and enhances interferon signaling through blocking suppressor of cytokine signaling 1 in SiHa cells. *PloS One* **9**: e108410
- He S & Sharpless NE (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**: 1000–1011
- He W, Staples D, Smith C & Fisher C (2003) Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J. Virol.* **77**: 10566–10574

- He Y, Lin J, Ding Y, Liu G, Luo Y, Huang M, Xu C, Kim T-K, Etheridge A, Lin M, Kong D & Wang K (2016) A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. *Int. J. Cancer* **138**: 1312–1327
- He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C-X, Zhang K, He C & Xu G-L (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**: 1303–1307
- Heard I, Galloway A, Fihman V, Duport N, Dachez R, Lévy-Bruhl D & Favre M (2011) Caractéristiques de l'infection par les papillomavirus humains dans des frottis cervicaux normaux en France en 2009. Available at: http://opac.invs.sante.fr/index.php?lvl=notice_display&id=9580
- Heilman SA, Nordberg JJ, Liu Y, Sluder G & Chen JJ (2009) Abrogation of the postmitotic checkpoint contributes to polyploidization in human papillomavirus E7-expressing cells. *J. Virol.* **83**: 2756–2764
- Hellman K, Hellström A-C & Pettersson BF (2014) Uterine cervix cancer treatment at Radiumhemmet: 90 years' experience. Time trends of age, stage, and histopathology distribution. *Cancer Med.* **3**: 284–292
- Hellner K, Mar J, Fang F, Quackenbush J & Münger K (2009) HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* **391**: 57–63
- Herfs M, Parra-Herran C, Howitt BE, Laury AR, Nucci MR, Feldman S, Jimenez CA, McKeon FD, Xian W & Crum CP (2013) Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**: 1311–1318
- Herfs M, Somja J, Howitt BE, Suarez-Carmona M, Kustermans G, Hubert P, Doyen J, Goffin F, Kridelka F, Crum CP & Delvenne P (2015) Unique recurrence patterns of cervical intraepithelial neoplasia after excision of the squamocolumnar junction. *Int. J. Cancer* **136**: 1043–1052
- Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W & Crum CP (2012) A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 10516–10521
- Hermann A, Goyal R & Jeltsch A (2004) The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* **279**: 48350–48359
- Hermeking H (2012) MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 613–626
- Heselmeyer K, du Manoir S, Blegen H, Friberg B, Svensson C, Schröck E, Veldman T, Shah K, Auer G & Ried T (1997) A recurrent pattern of chromosomal aberrations and immunophenotypic appearance defines anal squamous cell carcinomas. *Br. J. Cancer* **76**: 1271–1278
- Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P & Raj K (2006) Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J. Virol.* **80**: 4431–4439

Bibliographie

- Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Durst M & Hoppe-Seyler F (2008) Activation of the Enhancer of Zeste Homologue 2 Gene by the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Cancer Res.* **68**: 9964–9972
- Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen Y-F, D'Argenio DZ & Egorin MJ (2005) Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**: 3862–3868
- Hon C-C, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJL, Gough J, Denisenko E, Schmeier S, Poulsen TM, Severin J, Lizio M, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Burroughs AM, Noma S, Djebali S, Alam T, Medvedeva YA, Testa AC, et al (2017) An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature* **543**: 199–204
- Hopcraft SE & Damania B (2017) Tumour viruses and innate immunity. *Phil Trans R Soc B* **372**: 20160267
- Hoppe-Seyler F & Butz K (1994) Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol. Carcinog.* **10**: 134–141
- Hougardy BMT, van der Zee AGJ, van den Heuvel FAJ, Timmer T, de Vries EGE & de Jong S (2005) Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecol. Oncol.* **97**: 353–364
- Howie HL, Katzenellenbogen RA & Galloway DA (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology* **384**: 324–334
- Hsu C-H, Peng K-L, Jhang H-C, Lin C-H, Wu S-Y, Chiang C-M, Lee S-C, Yu WCY & Juan L-J (2012) The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. *Oncogene* **31**: 2335–2349
- Hu L, Plafker K, Vorozhko V, Zuna RE, Hanigan MH, Gorbsky GJ, Plafker SM, Angeletti PC & Ceresa BP (2009) Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* **384**: 125–134
- Hu L, Potapova TA, Li S, Rankin S, Gorbsky GJ, Angeletti PC & Ceresa BP (2010) Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication. *Virology* **405**: 342–351
- Hu Q, Li S, Chen C, Zhu M, Chen Y & Zhao Z (2017) 17 β -Estradiol treatment drives Sp1 to upregulate MALAT-1 expression and epigenetically affects physiological processes in U2OS cells. *Mol. Med. Rep.* **15**: 1335–1342
- Huang P, Xi J & Liu S (2016) MiR-139-3p induces cell apoptosis and inhibits metastasis of cervical cancer by targeting NOB1. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **83**: 850–856
- Huang S-M & McCance DJ (2002) Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J. Virol.* **76**: 8710–8721
- Huang Z, Huang L, Shen S, Li J, Lu H, Mo W, Dang Y, Luo D, Chen G & Feng Z (2015) Sp1 cooperates with Sp3 to upregulate MALAT1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncol.*

Rep. **34**: 2403–2412

Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho J-Y, Libermann TA, Jin J, Harper JW & Munger K (2007) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol.* **81**: 9737–9747

Huh K-W, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM & Münger K (2005) Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 11492–11497

Huh WK, Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, de Andrade RP, Ault KA, Bartholomew D, Cestero RM, Fedrizzi EN, Hirschberg AL, Mayrand M-H, Ruiz-Sternberg AM, Stapleton JT, Wiley DJ, Ferenczy A, Kurman R, Ronnett BM, Stoler MH, Cuzick J, Garland SM, et al (2017) Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16–26 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet Lond. Engl.* **390**: 2143–2159

Huibregtse JM, Scheffner M & Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129–4135

Huibregtse JM, Scheffner M & Howley PM (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 775–784

Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T & Choe J (2002) Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J. Biol. Chem.* **277**: 2923–2930

Hyland PL, McDade SS, McCloskey R, Dickson GJ, Arthur K, McCance DJ & Patel D (2011) Evidence for Alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and Epigenetic Reprogramming in Human Papillomavirus Type 16 E6/E7-Expressing Keratinocytes. *J. Virol.* **85**: 10999–11006

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW & Stubenrauch F (2002) Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* **21**: 4741–4748

Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P & Turek LP (1992) Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* **11**: 2271–2281

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC & Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**: 1129–1133

Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C & Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**: 1300–1303

Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, van Welsem T, van de Vijver MJ, Koh EY, Daley GQ & van Lohuizen M (2000) Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat.*

Bibliographie

Genet. **26**: 291–299

Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, Carcopino X, Morel A, Valmary-Degano S, Bravo IG, de Sanjosé S, Riethmuller D, Mougin C & Prétet J-L (2013) Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 3207–3215

Jacquin É, Guenat D, Riethmuller D, Mougin C & Prétet J-L (2014) Nouveaux biomarqueurs viraux des lésions du col de l'utérus associées aux papillomavirus humains. *Virologie* **18**: 211–228

James MA, Lee JH & Klingelutz AJ (2006) Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* **80**: 5301–5307

Jansma AL, Martinez-Yamout MA, Liao R, Sun P, Dyson HJ & Wright PE (2014) The high-risk HPV16 E7 oncoprotein mediates interaction between the transcriptional coactivator CBP and the retinoblastoma protein pRb. *J. Mol. Biol.* **426**: 4030–4048

Jeffers LK, Duan K, Ellies LG, Seaman WT, Burger-Calderon RA, Diatchenko LB & Webster-Cyriaque J (2013) Correlation of transcription of MALAT-1, a novel noncoding RNA, with deregulated expression of tumor suppressor p53 in small DNA tumor virus models. *J. Cancer Ther.* **4**:

Jeon S, Allen-Hoffmann BL & Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* **69**: 2989–2997

Jeon S & Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 1654–1658

Jha S, Vande Pol S, Banerjee NS, Dutta AB, Chow LT & Dutta A (2010) Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway. *Mol. Cell* **38**: 700–711

Jiang J, Zhao L-J, Zhao C, Zhang G, Zhao Y, Li J-R, Li X-P & Wei L-H (2012) Hypomethylated CpG around the transcription start site enables TERT expression and HPV16 E6 regulates TERT methylation in cervical cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **124**: 534–541

Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O & Fernández-Tilapa G (2014) Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol. Rep.* **31**: 2467–2476

Jing M, Bohl J, Brimer N, Kinter M & Vande Pol SB (2007) Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **81**: 2231–2239

Johansson C & Schwartz S (2013) Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 239–251

Johnson WD, Harder JB, Naylor J, McCormick DL, Detrisac CJ, Glaze ER & Tomaszewski JE (2006) A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to evaluating the safety of zebularine in non-human primates. *Cancer Res.* **66**: 309–310

Jones DL, Alani RM & Münger K (1997a) The human papillomavirus E7 oncoprotein can

uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**: 2101–2111

Jones DL, Thompson DA & Münger K (1997b) Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* **239**: 97–107

Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, Abecassis J, Clavel C & Wasylyk B (2010) Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **126**: 1882–1894

Jung HM, Phillips BL & Chan EK (2014) miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 ζ . *Mol. Cancer* **13**: 80

Jung Y-S, Kato I & Kim H-RC (2013) A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **435**: 339–344

Jüttermann R, Li E & Jaenisch R (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 11797–11801

Kabsch K & Alonso A (2002) The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J. Virol.* **76**: 12162–12172

Kalantari M, Lee D, Calleja-Macias IE, Lambert PF & Bernard H-U (2008) Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology* **374**: 292–303

Kandimalla R, van Tilborg AAG, Kompier LC, Stumpel DJPM, Stam RW, Bangma CH & Zwarthoff EC (2012) Genome-wide Analysis of CpG Island Methylation in Bladder Cancer Identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-Specific Prognostic Markers. *Eur. Urol.* **61**: 1245–1256

Kanodia S, Fahey LM & Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr. Cancer Drug Targets* **7**: 79–89

Katich SC, Zerfass-Thome K & Hoffmann I (2001) Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *Oncogene* **20**: 543–550

Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR & Galloway DA (2007) NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J. Virol.* **81**: 3786–3796

Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M & Galloway DA (2009) NFX1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes. *J. Virol.* **83**: 6446–6456

Keefe M, al-Ghamdi A, Coggon D, Maitland NJ, Egger P, Keefe CJ, Carey A & Sanders CM (1994) Cutaneous warts in butchers. *Br. J. Dermatol.* **130**: 9–14

Khalil A, Dekmak B, Boulos F, Kantrowitz J, Spira A, Fujimoto J, Kadara H, El-Hachem N & Nemer G (2018) Transcriptomic Alterations in Lung Adenocarcinoma Unveil New Mechanisms Targeted by the TBX2 Subfamily of Tumor Suppressor Genes. *Front. Oncol.* **8**: Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00482/full> [Accessed February 20, 2019]

Bibliographie

- Khalil AA, Sivakumar S, Lucas FAS, McDowell T, Lang W, Tabata K, Fujimoto J, Yatabe Y, Spira A, Scheet P, Nemer G & Kadara H (2017) TBX2 subfamily suppression in lung cancer pathogenesis: a high-potential marker for early detection. *Oncotarget* **8**: 68230–68241
- Kim G-D, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ & Pradhan S (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* **21**: 4183–4195
- Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D & Lambert PF (2003) Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J. Virol.* **77**: 12450–12459
- Kimura H & Shiota K (2003) Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J. Biol. Chem.* **278**: 4806–4812
- Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, Phokaew C, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Niruthisard S & Mutirangura A (2006) Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer* **6**: 55
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T & Ishibashi M (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 11612–11616
- Kjær SK, Frederiksen K, Munk C & Iftner T (2010) Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**: 1478–1488
- Klingelutz AJ & Roman A (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology* **424**: 77–98
- Korzeniewski N, Treat B & Duensing S (2011) The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol. Cancer* **10**: 61
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705
- Kozak M (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**: 1–34
- Kozomara A & Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**: D68–73
- Kühn U & Wahle E (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**: 67–84
- Kühne C & Banks L (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J. Biol. Chem.* **273**: 34302–34309
- Kukimoto I, Aihara S, Yoshiike K & Kanda T (1998) Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 258–262
- Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H & Band V (2002) Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the

transcriptional coactivator human ADA3. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5801–5812

Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T & Laimins LA (1997) Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 2)**: 401–411

Lam JUH, Rebolj M, Dugué P-A, Bonde J, von Euler-Chelpin M & Lynge E (2014) Condom use in prevention of Human Papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies. *J. Med. Screen.* **21**: 38–50

Lamouille S, Xu J & Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 178–196

Laniosz V, Dabydeen SA, Havens MA & Meneses PI (2009) Human papillomavirus type 16 infection of human keratinocytes requires clathrin and caveolin-1 and is brefeldin A sensitive. *J. Virol.* **83**: 8221–8232

Lau L, Gray EE, Brunette RL & Stetson DB (2015) DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science* **350**: 568–571

Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K & Raj K (2010) Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* **31**: 918–926

Lechner MS & Laimins LA (1994) Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **68**: 4262–4273

Lee D, Lim C, Seo T, Kwon H, Min H & Choe J (2002) The viral oncogene human papillomavirus E7 deregulates transcriptional silencing by Brm-related gene 1 via molecular interactions. *J. Biol. Chem.* **277**: 48842–48848

Lee RC, Feinbaum RL & Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843–854

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L & Javier RT (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **74**: 9680–9693

Lee SS, Weiss RS & Javier RT (1997) Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6670–6675

Lee WJ, Shim J-Y & Zhu BT (2005) Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* **68**: 1018–1030

Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, Young LS, Roberts S & Woodman CB (2012) Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis* **33**: 1286–1293

Leonhardt H, Page AW, Weier HU & Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**: 865–873

Li B, Hu Y, Ye F, Li Y, Lv W & Xie X (2010) Reduced miR-34a expression in normal cervical

Bibliographie

tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **20**: 597–604

Li H, Zhu H, Xu CJ & Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491–501

Li J, Bonifati S, Hristov G, Marttila T, Valmary-Degano S, Stanzel S, Schnölzer M, Mouglin C, Aprahamian M, Grekova SP, Raykov Z, Rommelaere J & Marchini A (2013) Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas. *EMBO Mol. Med.* **5**: 1537–1555

Li L, Xu C, Long J, Shen D, Zhou W, Zhou Q, Yang J & Jiang M (2015a) E6 and E7 gene silencing results in decreased methylation of tumor suppressor genes and induces phenotype transformation of human cervical carcinoma cell lines. *Oncotarget* **6**: 23930–23943

Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, Matlashewski GJ & Koromilas AE (1999) The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* **18**: 5727–5737

Li S, Wang Q, Qiang Q, Shan H, Shi M, Chen B, Zhao S & Yuan L (2015b) Sp1-mediated transcriptional regulation of MALAT1 plays a critical role in tumor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**: 1909–1920

Liang G & Weisenberger DJ (2017) DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics* **12**: 416–432

Liang Y-J, Chang H-S, Wang C-Y & Yu WCY (2008) DYRK1A stabilizes HPV16E7 oncoprotein through phosphorylation of the threonine 5 and threonine 7 residues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**: 2431–2441

Lichtig H, Gilboa DA, Jackman A, Gonen P, Levav-Cohen Y, Haupt Y & Sherman L (2010) HPV16 E6 augments Wnt signaling in an E6AP-dependent manner. *Virology* **396**: 47–58

Lin H, Ma Y, Wei Y & Shang H (2016) Genome-wide analysis of aberrant gene expression and methylation profiles reveals susceptibility genes and underlying mechanism of cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **207**: 147–152

Lin L, Cai Q, Zhang X, Zhang H, Zhong Y, Xu C & Li Y (2015) Two less common human microRNAs miR-875 and miR-3144 target a conserved site of E6 oncogene in most high-risk human papillomavirus subtypes. *Protein Cell* **6**: 575–588

Lin M, Xue X-Y, Liang S-Z, Li Y-X, Lv Y-Y, He L-H, Xu K-C, Zhang L-F, Chen J-B & Niu L-Z (2017) MiR-187 overexpression inhibits cervical cancer progression by targeting HPV16 E6. *Oncotarget* **8**: 62914–62926

Lin R-K, Wu C-Y, Chang J-W, Juan L-J, Hsu H-S, Chen C-Y, Lu Y-Y, Tang Y-A, Yang Y-C, Yang P-C & Wang Y-C (2010) Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res.* **70**: 5807–5817

Linnekamp JF, Butter R, Spijker R, Medema JP & van Laarhoven HWM (2017) Clinical and biological effects of demethylating agents on solid tumours - A systematic review. *Cancer Treat. Rev.*

54: 10–23

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B & Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**: 315–322

Litwin TR, Clarke MA, Dean M & Wentzensen N (2017) Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses* **9**:

Liu S, Song L, Yao H, Zhang L, Xu D, Gao F & Li Q (2016a) MiR-375 Is Epigenetically Downregulated by HPV-16 E6 Mediated DNMT1 Upregulation and Modulates EMT of Cervical Cancer Cells by Suppressing lncRNA MALAT1. *PloS One* **11**: e0163460

Liu S, Song L, Zeng S & Zhang L (2016b) MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**: 633–640

Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R & Schlegel R (2009) HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 18780–18785

Liu Y, Liu T, Bao X, He M, Li L & Yang X (2014) Increased EZH2 expression is associated with proliferation and progression of cervical cancer and indicates a poor prognosis. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **33**: 218–224

Liutkevičiūtė Z, Kriukienė E, Ličytė J, Rudytė M, Urbanavičiūtė G & Klimašauskas S (2014) Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **136**: 5884–5887

Liyanage VRB, Jarmasz JS, Murugesan N, Del Bigio MR, Rastegar M & Davie JR (2014) DNA modifications: function and applications in normal and disease States. *Biology* **3**: 670–723

Llobet L, Montoya J, López-Gallardo E & Ruiz-Pesini E (2015) Side Effects of Culture Media Antibiotics on Cell Differentiation. *Tissue Eng. Part C Methods* **21**: 1143–1147

Loncarek J, Hergert P, Magidson V & Khodjakov A (2008) Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* **10**: 322–328

Longworth MS & Laimins LA (2004) The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **78**: 3533–3541

López-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J & Kerbel RS (2000) Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* **19**: 4611–4620

Lu H, Qi Z, Lin L, Ma L, Li L, Zhang H, Feng L & Su Y (2016) The E6-TAp63β-Dicer feedback loop involves in miR-375 downregulation and epithelial-to-mesenchymal transition in HR-HPV+ cervical cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*

Bibliographie

- Lu Q, Ma D & Zhao S (2012) DNA methylation changes in cervical cancers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **863**: 155–176
- Macaluso M, Montanari M & Giordano A (2006) Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene* **25**: 5263–5267
- Magal SS, Jackman A, Ish-Shalom S, Botzer LE, Gonen P, Schlegel R & Sherman L (2005) Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J. Gen. Virol.* **86**: 611–621
- Maglennon GA, McIntosh PB & Doorbar J (2014) Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections. *J. Virol.* **88**: 710–716
- Mahlamäki EH, Bärlund M, Tanner M, Gorunova L, Höglund M, Karhu R & Kallioniemi A (2002) Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **35**: 353–358
- Manning L, Ohyama K, Saeger B, Hatano O, Wilson SA, Logan M & Placzek M (2006) Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev. Cell* **11**: 873–885
- Mantovani F & Banks L (1999) Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* **18**: 3309–3315
- Mantovani F & Banks L (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**: 7874–7887
- Marquina G, Manzano A & Casado A (2018) Targeted Agents in Cervical Cancer: Beyond Bevacizumab. *Curr. Oncol. Rep.* **20**: 40
- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D & Plummer M (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* **13**: 607–615
- de Martel C, Shiels MS, Franceschi S, Simard EP, Vignat J, Hall HI, Engels EA & Plummer M (2015) Cancers attributable to infections among adults with HIV in the United States. *AIDS Lond. Engl.* **29**: 2173–2181
- Martínez-Ramírez I, Del-Castillo-Falconi V, Mitre-Aguilar IB, Amador-Molina A, Carrillo-García A, Langley E, Zentella-Dehesa A, Soto-Reyes E, García-Carrancá A, Herrera LA & Lizano M (2017) SOX2 as a New Regulator of HPV16 Transcription. *Viruses* **9**:
- Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Vande Pol S, Podjarny A, Travé G & Zanier K (2016) Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* **529**: 541–545
- Marullo R, Werner E, Zhang H, Chen GZ, Shin DM & Doetsch PW (2015) HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* **36**: 1397–1406
- Massimi P & Banks L (1997) Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins.

Virology **227**: 255–259

Massimi P, Gammoh N, Thomas M & Banks L (2004) HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 8033–8039

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J & Hibma M (2003) Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J. Virol.* **77**: 8378–8385

Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF & Garcia-Closas M (2010) Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol. Oncol.* **4**: 174–191

May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG & Pfister H (1994) The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* **13**: 1460–1466

McBride AA (2017) Oncogenic human papillomaviruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372**:

McCredie MRE, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW & Skegg DCG (2008) Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* **9**: 425–434

McLaughlin-Drubin ME, Crum CP & Münger K (2011) Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2130–2135

McLaughlin-Drubin ME, Huh K-W & Münger K (2008) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J. Virol.* **82**: 8695–8705

McMurray HR & McCance DJ (2003) Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J. Virol.* **77**: 9852–9861

Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK & Howell LP (1998) Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* **92**: 727–735

Mergui J-L, Polena V, David-Montefiore E & Uzan S (2008) [Guidelines for the follow-up of women treated for high-grade cervical neoplasia]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* **37 Suppl 1**: S121-130

Mesri EA, Feitelson MA & Munger K (2014) Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* **15**: 266–282

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N & Doorbar J (2003) Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* **77**: 10186–10201

Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM & Howley PM (1992) The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO*

Bibliographie

J. 11: 5013–5020

Mirghani H & Blanchard P (2018) Treatment de-escalation for HPV-driven oropharyngeal cancer: Where do we stand? *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* **8**: 4–11

Mittal R, Tsutsumi K, Pater A & Pater MM (1993) Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstet. Gynecol.* **81**: 5–12

Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S & Taketani Y (2010) CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J. Virol.* **84**: 11614–11623

Moerman-Herzog A & Nakagawa M (2015) Early Defensive Mechanisms against Human Papillomavirus Infection. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **22**: 850–857

Molano M, Moreno-Acosta P, Morales N, Burgos M, Buitrago L, Gamboa O, Alvarez R, Garland SM, Tabrizi SN, Steenbergen RDM & Mejía JC (2016) Association Between Type-specific HPV Infections and hTERT DNA Methylation in Patients with Invasive Cervical Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* **13**: 483–491

Mompalmer RL (2005) Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* **42**: S9-16

Moody CA & Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 550–560

Moore LD, Le T & Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **38**: 23–38

Morel A (2016) Régulation épigénétique des gènes précoces d'HPV16. Available at: <http://www.theses.fr/2016BESA3005> [Accessed January 30, 2019]

Morel A, Baguet A, Perrard J, Demeret C, Jacquin E, Guenat D, Mougin C & Prétet J-L (2017) 5azadC treatment upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression. *Oncotarget*

Moscicki A-B, Ma Y, Farhat S, Jay J, Hanson E, Benningfield S, Jonte J, Godwin-Medina C, Wilson R & Shiboski S (2014) Natural history of anal human papillomavirus infection in heterosexual women and risks associated with persistence. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **58**: 804–811

Moscicki A-B, Schiffman M, Kjaer S & Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/42-51

Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Goebel G, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Marth C & Widschwendter M (2004) A DNA methylation pattern similar to normal tissue is associated with better prognosis in human cervical cancer. *Cancer Lett.* **209**: 231–236

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M & Huh K (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* **78**: 11451–11460

Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E & Howley PM (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product.

EMBO J. **8**: 4099–4105

Muralidhar B, Winder D, Murray M, Palmer R, Barbosa-Morais N, Saini H, Roberts I, Pett M & Coleman N (2011) Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *J. Pathol.* **224**: 496–507

Murray-Zmijewski F, Slee EA & Lu X (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 702–712

Nakagawa S & Huibregtse JM (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8244–8253

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN & Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386–389

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D & Bird A (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* **23**: 58–61

Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML & Münger K (2007) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J. Virol.* **81**: 13533–13543

Nguyen DX, Westbrook TF & McCance DJ (2002) Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *J. Virol.* **76**: 619–632

Niccoli S, Abraham S, Richard C & Zehbe I (2012) The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J. Virol.* **86**: 12384–12396

O'Connor M & Bernard HU (1995) Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* **207**: 77–88

O'Connor MJ, Stünkel W, Koh CH, Zimmermann H & Bernard HU (2000) The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J. Virol.* **74**: 401–410

O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH & Bernard HU (1996) YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* **70**: 6529–6539

Oh HY, Kim MK, Seo S, Lee DO, Chung YK, Lim MC, Kim J, Lee CW & Park S (2015) Alcohol consumption and persistent infection of high-risk human papillomavirus. *Epidemiol. Infect.* **143**: 1442–1450

Oh J-M, Kim S-H, Cho E-A, Song Y-S, Kim W-H & Juhnn Y-S (2010) Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* **31**: 402–410

Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, Cherniack

Bibliographie

AD, Ambrogio L, Cibulskis K, Bertelsen B, Romero-Cordoba S, Treviño V, Vazquez-Santillan K, Guadarrama AS, Wright AA, Rosenberg MW, Duke F, Kaplan B, Wang R, Nickerson E, et al (2014) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature* **506**: 371–375

Oka M, Meacham AM, Hamazaki T, Rodić N, Chang L-J & Terada N (2005) De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* **24**: 3091–3099

Okamoto Y, Yoshida N, Suzuki T, Shimozaawa N, Asami M, Matsuda T, Kojima N, Perry ACF & Takada T (2016) DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry. *Sci. Rep.* **6**: 19134

Ongenaert M, Wisman GBA, Volders HH, Koning AJ, Zee AG van der, van Criekinge W & Schuurin E (2008) Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking. *BMC Med. Genomics* **1**: 57

Orth G (2008) Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **321**: 59–83

Ostör AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **12**: 186–192

Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD & Robertson KD (2008) DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 752–771

Pan H & Griep AE (1995) Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev.* **9**: 2157–2169

Papaioannou VE (2014) The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Dev. Camb. Engl.* **141**: 3819–3833

Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE & Um SJ (2000) Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 6764–6769

Patel D, Huang SM, Baglia LA & McCance DJ (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* **18**: 5061–5072

Pechalrieu D, Etievant C & Arimondo PB (2017) DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochem. Pharmacol.* **129**: 1–13

Peng L, Wang L, Zhang Y, Dong A, Shen W-H & Huang Y (2018) Structural Analysis of the Arabidopsis AL2-PAL and PRC1 Complex Provides Mechanistic Insight into Active-to-Repressive Chromatin State Switch. *J. Mol. Biol.*

Peng L, Yuan X, Jiang B, Tang Z & Li G-C (2016) LncRNAs: key players and novel insights into cervical cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**: 2779–2788

Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D & Mummery C (2004) Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J. Cell Sci.* **117**: 1269–1280

- Pett M & Coleman N (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J. Pathol.* **212**: 356–367
- Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkao P, Kongyingyoes B, Siriaunkgul S, Tungsinnunkong K & Suthipintawong C (2013) Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Viol. J.* **10**: 30
- Pim D, Collins M & Banks L (1992) Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* **7**: 27–32
- Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F & Franceschi S (2016) Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health* **4**: e609-616
- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE & Reik W (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **463**: 1101–1105
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD & Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 33002–33010
- Prince S, Carreira S, Vance KW, Abrahams A & Goding CR (2004) Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res.* **64**: 1669–1674
- Rawls JA, Puszta R & Green M (1990) Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation. *J. Virol.* **64**: 6121–6129
- Regan JA & Laimins LA (2008) Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J. Virol.* **82**: 10042–10051
- Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF & Zehbe I (2010) The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene* **29**: 3435–3445
- Richart RM & Barron BA (1969) A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **105**: 386–393
- Roboz GJ, Kantarjian HM, Yee KWL, Kropf PL, O’Connell CL, Griffiths EA, Stock W, Daver NG, Jabbour E, Ritchie EK, Walsh KJ, Rizzieri D, Lunin SD, Curio T, Chung W, Hao Y, Lowder JN, Azab M & Issa J-PJ (2018) Dose, schedule, safety, and efficacy of guadecitabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Cancer* **124**: 325–334
- Rogstad DK, Herring JL, Theruvathu JA, Burdzy A, Perry CC, Neidigh JW & Sowers LC (2009) Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **22**: 1194–1204
- Roman A & Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* **445**: 138–168
- Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJLM & International HPV screening working group (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of

Bibliographie

four European randomised controlled trials. *Lancet Lond. Engl.* **383**: 524–532

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M & Howley PM (1998) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**: 2061–2072

Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, Franco EL, Poole C & Smith JS (2013) Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* **133**: 1271–1285

Rösl F, Arab A, Klevenz B & zur Hausen H (1993) The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* **74** (Pt 5): 791–801

Rösl F, Dürst M & zur Hausen H (1988) Selective suppression of human papillomavirus transcription in non-tumorigenic cells by 5-azacytidine. *EMBO J.* **7**: 1321–1328

Safaeian M & Solomon D (2007) Cervical Cancer Prevention - Cervical Screening: Science in Evolution. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **34**: 739–ix

Sakabe M, Kokubo H, Nakajima Y & Saga Y (2012) Ectopic retinoic acid signaling affects outflow tract cushion development through suppression of the myocardial Tbx2-Tgfb2 pathway. *Dev. Camb. Engl.* **139**: 385–395

Sankovski E, Männik A, Geimanen J, Ustav E & Ustav M (2014) Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function. *J. Virol.* **88**: 961–973

Sannigrahi MK, Sharma R, Singh V, Panda NK, Rattan V & Khullar M (2017) Role of Host miRNA Hsa-miR-139-3p in HPV-16-Induced Carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**: 3884–3895

Sarraf SA & Stancheva I (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell* **15**: 595–605

Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mougin C & Prétet J-L (2008) Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3678–3685

Saxonov S, Berg P & Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1412–1417

Scantamburlo G, Vanoni S, Dossena S, Soyal SM, Bernardinelli E, Civello DA, Patsch W, Paulmichl M & Nofziger C (2017) Interleukin-4 Induces CpG Site-Specific Demethylation of the Pendrin Promoter in Primary Human Bronchial Epithelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **41**: 1491–1502

Scarpini CG, Groves IJ, Pett MR, Ward D & Coleman N (2014) Virus transcript levels and cell growth rates after naturally occurring HPV16 integration events in basal cervical keratinocytes. *J.*

Pathol. **233**: 281–293

Schapira M & Arrowsmith CH (2016) Methyltransferase inhibitors for modulation of the epigenome and beyond. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **33**: 81–87

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD & Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**: 495–505

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ & Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129–1136

Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT & Helenius A (2012) Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.* **8**: e1002657

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA & Franceschi S (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**: 16086

Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaiean M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE & Burk RD (2010) A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res.* **70**: 3159–3169

Schiller W (1928) Über Frühstadien des Portiocarcinoms und ihre Diagnose. *Arch. Für Gynäkol.* **133**: 211–283

Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L & Pawlita M (2011) The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Mol. Cell. Probes* **25**: 260–265

Schmitz K-M, Mayer C, Postepska A & Grummt I (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev.* **24**: 2264–2269

Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB & Dürst M (2012) Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PloS One* **7**: e39632

Schneider MA, Scheffer KD, Bund T, Boukhallouk F, Lambert C, Cotarello C, Pflugfelder GO, Florin L & Spoden GA (2013) The Transcription Factors TBX2 and TBX3 Interact with Human Papillomavirus 16 (HPV16) L2 and Repress the Long Control Region of HPVs. *J. Virol.* **87**: 4461–4474

Schütze DM, Kooter JM, Wilting SM, Meijer CJLM, Quint W, Snijders PJF & Steenbergen RDM (2015) Longitudinal assessment of DNA methylation changes during HPVE6E7-induced immortalization of primary keratinocytes. *Epigenetics* **10**: 73–81

Scotto L, Narayan G, Nandula SV, Subramaniam S, Kaufmann AM, Wright JD, Pothuri B, Mansukhani M, Schneider A, Arias-Pulido H & Murty VV (2008) Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha. *Mol. Cancer* **7**: 58

Sebé-Pedrós A & Ruiz-Trillo I (2017) Evolution and Classification of the T-Box Transcription Factor Family. *Curr. Top. Dev. Biol.* **122**: 1–26

Bibliographie

- Sekaric P, Shamanin VA, Luo J & Androphy EJ (2007) hAda3 regulates p14ARF-induced p53 acetylation and senescence. *Oncogene* **26**: 6261–6268
- Sen P, Ganguly P & Ganguly N (2018) Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncol. Lett.* **15**: 11–22
- Shah SD, Doorbar J & Goldstein RA (2010) Analysis of host-parasite incongruence in papillomavirus evolution using importance sampling. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 1301–1314
- Shamanin VA & Androphy EJ (2004) immortalization of human mammary epithelial cells is associated with inactivation of the p14ARF-p53 pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 2144–2152
- Shamanin VA, Sekaric P & Androphy EJ (2008) hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J. Virol.* **82**: 3912–3920
- Shanmugasundaram S & You J (2017) Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses* **9**:
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M & Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**: 908–912
- Sharma S, Mandal P, Sadhukhan T, Roy Chowdhury R, Ranjan Mondal N, Chakravarty B, Chatterjee T, Roy S & Sengupta S (2015) Bridging Links between Long Noncoding RNA HOTAIR and HPV Oncoprotein E7 in Cervical Cancer Pathogenesis. *Sci. Rep.* **5**: 11724
- Sharma S & Munger K (2018) Expression of the cervical carcinoma expressed PCNA regulatory (CCEPR) long noncoding RNA is driven by the human papillomavirus E6 protein and modulates cell proliferation independent of PCNA. *Virology* **518**: 8–13
- Shaw PA (2000) The History of Cervical Screening I: The Pap. Test. *J. SOGC* **22**: 110–114
- Shope RE & Hurst EW (1933) INFECTIOUS PAPILLOMATOSIS OF RABBITS : WITH A NOTE ON THE HISTOPATHOLOGY. *J. Exp. Med.* **58**: 607–624
- Sichero L, Sobrinho JS & Villa LL (2012) Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16. *J. Infect. Dis.* **206**: 867–874
- Siebers AG, Klinkhamer PJM, Arbyn M, Raifu AO, Massuger LFAG & Bulten J (2008) Cytologic detection of cervical abnormalities using liquid-based compared with conventional cytology: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* **112**: 1327–1334
- Sinclair CS, Adem C, Naderi A, Soderberg CL, Johnson M, Wu K, Wadum L, Couch VL, Sellers TA, Schaid D, Slezak J, Fredericksen Z, Ingle JN, Hartmann L, Jenkins RB & Couch FJ (2002) TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors. *Cancer Res.* **62**: 3587–3591
- Smith JL, Campos SK & Ozbun MA (2007) Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J. Virol.* **81**: 9922–9931
- Smotkin D, Prokoph H & Wettstein FO (1989) Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* **63**: 1441–1447
- Snellenberg S, Schütze DM, Claassen-Kramer D, Meijer CJLM, Snijders PJF & Steenbergen

RDM (2012) Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex® xMAP™ system. *Virology* **422**: 357–365

Solomon MJ & Kaldis P (1998) Regulation of CDKs by phosphorylation. *Results Probl. Cell Differ.* **22**: 79–109

Sominsky S, Shterzer N, Jackman A, Shapiro B, Yaniv A & Sherman L (2017) E6 proteins of α and β cutaneous HPV types differ in their ability to potentiate Wnt signaling. *Virology* **509**: 11–22

Song S-H, Han S-W & Bang PY-J (2012) Epigenetic-Based Therapies in Cancer. *Drugs* **71**: 2391–2403

Songcock WK, Scott ML & Bodily JM (2017) Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by transcriptional elongation. *Virology* **507**: 179–191

Sorm F, Pískala A, Cihák A & Veselý J (1964) 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **20**: 202–203

Soto D, Song C & McLaughlin-Drubin ME (2017a) Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. *Viruses* **9**:

Soto DR, Barton C, Munger K & McLaughlin-Drubin ME (2017b) KDM6A addiction of cervical carcinoma cell lines is triggered by E7 and mediated by p21CIP1 suppression of replication stress. *PLoS Pathog.* **13**: e1006661

Southern SA, Lewis MH & Herrington CS (2004) Induction of tetrasomy by human papillomavirus type 16 E7 protein is independent of pRb binding and disruption of differentiation. *Br. J. Cancer* **90**: 1949–1954

Sova P, Feng Q, Geiss G, Wood T, Strauss R, Rudolf V, Lieber A & Kiviat N (2006) Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **15**: 114–123

Srivenugopal KS & Ali-Osman F (2002) The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene* **21**: 5940–5945

Stanley MA & Sterling JC (2014) Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr. Probl. Dermatol.* **45**: 58–74

Steegenga WT, van Laar T, Riteco N, Mandarino A, Shvarts A, van der Eb AJ & Jochemsen AG (1996) Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2101–2109

Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM & Meijer CJLM (2014) Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* **14**: 395–405

Steinbach A & Riemer AB (2018) Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int. J. Cancer* **142**: 224–229

Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJP, Lai D, McDonald LPA, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM & Harvey RP (2003) Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts

Bibliographie

with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev. Biol.* **262**: 206–224

Stevens H, Rector A, Van Der Krogh K & Van Ranst M (2008) Isolation and cloning of two variant papillomaviruses from domestic pigs: *Sus scrofa* papillomaviruses type 1 variants a and b. *J. Gen. Virol.* **89**: 2475–2481

Stewart DJ, Donehower RC, Eisenhauer EA, Wainman N, Shah AK, Bonfils C, MacLeod AR, Besterman JM & Reid GK (2003) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **14**: 766–774

Stich M, Ganss L, Puschhof J, Prigge E-S, Reuschenbach M, Guterres A, Vinokurova S & von Knebel Doeberitz M (2016) 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) treatment downregulates the HPV E6 and E7 oncogene expression and blocks neoplastic growth of HPV-associated cancer cells. *Oncotarget*

Storrs CH & Silverstein SJ (2007) PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J. Virol.* **81**: 4080–4090

Straight SW, Herman B & McCance DJ (1995) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* **69**: 3185–3192

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ & McCance DJ (1993) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* **67**: 4521–4532

Struyk L, van der Meijden E, Minnaar R, Fontaine V, Meijer I & ter Schegget J (2000) Transcriptional regulation of human papillomavirus type 16 LCR by different C/EBPβ isoforms. *Mol. Carcinog.* **28**: 42–50

Subbaiah VK, Zhang Y, Rajagopalan D, Abdullah LN, Yeo-Teh NSL, Tomaić V, Banks L, Myers MP, Chow EK & Jha S (2016) E3 ligase EDD1/UBR5 is utilized by the HPV E6 oncogene to destabilize tumor suppressor TIP60. *Oncogene* **35**: 2062–2074

Sun C, Reimers LL & Burk RD (2011) Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol. Oncol.* **121**: 59–63

Sun Z, Lu Z, Liu J, Wang G, Zhou W, Yang L, Liu C, Wang B & Ruan Q (2013) Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning, China. *BMC Cancer* **13**: 459

Supryniewicz FA, Krawczyk E, Hebert JD, Sudarshan SR, Simic V, Kamonjoh CM & Schlegel R (2010) The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. *J. Virol.* **84**: 10619–10629

Syrjänen KJ (1996) Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **65**: 45–53

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L & Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in

mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**: 930–935

Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Yasugi T, Takeuchi T, Kanda T, Huibregtse JM, Akiyama T & Taketani Y (2006) Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **11**: 453–464

Tan SH, Gloss B & Bernard HU (1992) During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.* **20**: 251–256

Tang S, Tao M, McCoy JP & Zheng Z-M (2006) The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J. Virol.* **80**: 4249–4263

Tewari KS, Sill MW, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, Landrum LM, Oaknin A, Reid TJ, Leitao MM, Michael HE, DiSaia PJ, Copeland LJ, Creasman WT, Stehman FB, Brady MF, Burger RA, Thigpen JT, Birrer MJ, Waggoner SE, Moore DH, et al (2017) Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). *Lancet Lond. Engl.* **390**: 1654–1663

Thain A, Jenkins O, Clarke AR & Gaston K (1996) CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J. Virol.* **70**: 7233–7235

Thierry F (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* **384**: 375–379

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M & Howley P (1992) Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.* **66**: 3740–3748

Thigpen T, Shingleton H, Homesley H, Lagasse L & Blessing J (1981) Cis-platinum in treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* **48**: 899–903

Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L & Banks L (2002) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**: 5088–5096

Thomas M, Massimi P, Jenkins J & Banks L (1995) HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* **10**: 261–268

Thomas M, Massimi P, Navarro C, Borg J-P & Banks L (2005) The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene* **24**: 6222–6230

Tommasino M (2017) The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res.* **231**: 128–138

Tong X & Howley PM (1997) The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 4412–4417

Traut HF & Papanicolaou GN (1943) Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Calif. West. Med.* **59**: 121–122

Bibliographie

- Tsuda N, Watari H & Ushijima K (2016) Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. *Chin. J. Cancer Res.* **28**: 241–253
- Uberoi A, Yoshida S, Frazer IH, Pitot HC & Lambert PF (2016) Role of Ultraviolet Radiation in Papillomavirus-Induced Disease. *PLoS Pathog.* **12**: e1005664
- Van Doorslaer K (2013) Evolution of the papillomaviridae. *Virology* **445**: 11–20
- Van Doorslaer K, Sidi AOMO, Zanier K, Rybin V, Deryckère F, Rector A, Burk RD, Lienau EK, van Ranst M & Travé G (2009) Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis. *J. Virol.* **83**: 8759–8770
- Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RDM, Meijer CLJM, Snijders PJF, Chatis P, Broker TR, Moen PT & Chow LT (2004) Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J. Virol.* **78**: 11172–11186
- Vance KW, Shaw HM, Rodriguez M, Ott S & Goding CR (2010) The retinoblastoma protein modulates Tbx2 functional specificity. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2770–2779
- Vande Pol SB & Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* **445**: 115–137
- Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L & Pfister H (1999) Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 4): 1035–1043
- Vieira VC, Leonard B, White EA, Starrett GJ, Temiz NA, Lorenz LD, Lee D, Soares MA, Lambert PF, Howley PM & Harris RS (2014) Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *mBio* **5**:
- de Villiers E-M (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**: 2–10
- Virgin HW, Wherry EJ & Ahmed R (2009) Redefining chronic viral infection. *Cell* **138**: 30–50
- Vliet-Gregg PA, Hamilton JR & Katzenellenbogen RA (2013) NFX1-123 and human papillomavirus 16E6 increase Notch expression in keratinocytes. *J. Virol.* **87**: 13741–13750
- Vliet-Gregg PA, Hamilton JR & Katzenellenbogen RA (2015) Human papillomavirus 16E6 and NFX1-123 potentiate Notch signaling and differentiation without activating cellular arrest. *Virology* **478**: 50–60
- Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J & Hoppe-Seyler F (2006) Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* **25**: 4009–4015
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ & Muñoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**: 12–19
- Wallace NA & Galloway DA (2015) Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu. Rev. Virol.* **2**: 403–423
- Wang B, Lindley LE, Fernandez-Vega V, Rieger ME, Sims AH & Briegel KJ (2012) The T box transcription factor TBX2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of normal and

malignant breast epithelial cells. *PloS One* **7**: e41355

Wang F, Li Y, Zhou J, Xu J, Peng C, Ye F, Shen Y, Lu W, Wan X & Xie X (2011) miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. *Am. J. Pathol.* **179**: 2580–2588

Wang H, Liu K, Yuan F, Berdichevsky L, Taichman LB & Auborn K (1996) C/EBPbeta is a negative regulator of human papillomavirus type 11 in keratinocytes. *J. Virol.* **70**: 4839–4844

Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D & Hannon GJ (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev.* **12**: 1769–1774

Wang P, Zhai G & Bai Y (2018) Values of miR-34a and miR-218 expression in the diagnosis of cervical cancer and the prediction of prognosis. *Oncol. Lett.* **15**: 3580–3585

Wang SS, Smiraglia DJ, Wu Y-Z, Ghosh S, Rader JS, Cho KR, Bonfiglio TA, Nayar R, Plass C & Sherman ME (2008) Identification of novel methylation markers in cervical cancer using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Res.* **68**: 2489–2497

Wansleben S, Davis E, Peres J & Prince S (2013) A novel role for the anti-senescence factor TBX2 in DNA repair and cisplatin resistance. *Cell Death Dis.* **4**: e846

Wansleben S, Peres J, Hare S, Goding CR & Prince S (2014) T-box transcription factors in cancer biology. *Biochim. Biophys. Acta* **1846**: 380–391

Watanabe D, Suetake I, Tada T & Tajima S (2002) Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech. Dev.* **118**: 187–190

Watson RA, Thomas M, Banks L & Roberts S (2003) Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J. Cell Sci.* **116**: 4925–4934

Westrich JA, Warren CJ & Pyeon D (2017) Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res.* **231**: 21–33

Wetherill LF, Holmes KK, Verow M, Müller M, Howell G, Harris M, Fishwick C, Stonehouse N, Foster R, Blair GE, Griffin S & Macdonald A (2012) High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J. Virol.* **86**: 5341–5351

Wieland U, Kreuter A & Pfister H (2014) Human papillomavirus and immunosuppression. *Curr. Probl. Dermatol.* **45**: 154–165

de Wilde J, Kooter JM, Overmeer RM, Claassen-Kramer D, Meijer CJLM, Snijders PJF & Steenbergen RDM (2010) hTERT promoter activity and CpG methylation in HPV-induced carcinogenesis. *BMC Cancer* **10**: 271

Wilson V & Conlon FL (2002) The T-box family. *Genome Biol.* **3**: REVIEWS3008

Wilson VG, West M, Woytek K & Rangasamy D (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* **24**: 275–290

Wilting SM, Snijders PJF, Verlaet W, Jaspers A, van de Wiel MA, van Wieringen WN, Meijer GA, Kenter GG, Yi Y, le Sage C, Agami R, Meijer CJLM & Steenbergen RDM (2013a) Altered

Bibliographie

microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene* **32**: 106–116

Wilting SM, Verlaet W, Jaspers A, Makazaji NA, Agami R, Meijer CJLM, Snijders PJF & Steenbergen RDM (2013b) Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis. *Epigenetics* **8**: 220–228

Woo YL, Sterling J, Damay I, Coleman N, Crawford R, van der Burg SH & Stanley M (2008) Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **115**: 1616–1621; discussion 1621-1622

Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J & Dalla-Favera R (1999) Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* **21**: 220–224

Xiao H, Tang K, Liu P, Chen K, Hu J, Zeng J, Xiao W, Yu G, Yao W, Zhou H, Li H, Pan Y, Li A, Ye Z, Wang J, Xu H & Huang Q (2015) LncRNA MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to regulate ZEB2 expression by sponging miR-200s in clear cell kidney carcinoma. *Oncotarget* **6**: 38005–38015

Xu M, Katzenellenbogen RA, Grandori C & Galloway DA (2013a) An unbiased in vivo screen reveals multiple transcription factors that control HPV E6-regulated hTERT in keratinocytes. *Virology* **446**: 17–24

Xu M, Luo W, Elzi DJ, Grandori C & Galloway DA (2008) NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 4819–4828

Xu S, Li W, Zhu J, Wang R, Li Z, Xu G-L & Ding J (2013b) Crystal structures of isoorotate decarboxylases reveal a novel catalytic mechanism of 5-carboxyl-uracil decarboxylation and shed light on the search for DNA decarboxylase. *Cell Res.* **23**: 1296–1309

Xu Y-M, Du J-Y & Lau ATY (2014) Posttranslational modifications of human histone H3: an update. *Proteomics* **14**: 2047–2060

Xue Y, Lim D, Zhi L, He P, Abastado J-P & Thierry F (2012) Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *Open Virol. J.* **6**: 163–172

Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Barron M & Schwartz RJ (2000) Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev. Biol.* **228**: 95–105

Yan J-W, Lin J-S & He X-X (2014) The emerging role of miR-375 in cancer. *Int. J. Cancer* **135**: 1011–1018

Yang L, Cai C-L, Lin L, Qyang Y, Chung C, Monteiro RM, Mummery CL, Fishman GI, Cogen A & Evans S (2006) Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Dev. Camb. Engl.* **133**: 1575–1585

Yao T, Rao Q, Liu L, Zheng C, Xie Q, Liang J & Lin Z (2013) Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer. *Virol. J.* **10**: 175

Yasuda H, Mizukami K, Hayashi M, Kamiya T, Hara H & Adachi T (2016) Exendin-4 promotes

extracellular-superoxide dismutase expression in A549 cells through DNA demethylation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **58**: 34–39

Yew CW, Lee P, Chan WK, Lim VKJ, Tay SK, Tan TMC & Deng L-W (2011) A novel MLL5 isoform that is essential to activate E6 and E7 transcription in HPV16/18-associated cervical cancers. *Cancer Res.* **71**: 6696–6707

Yi R, Qin Y, Macara IG & Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**: 3011–3016

Yim E-K, Lee K-H, Myeong J, Tong S-Y, Um S-J & Park J-S (2007) Novel interaction between HPV E6 and BARD1 (BRCA1-associated ring domain 1) and its biologic roles. *DNA Cell Biol.* **26**: 753–761

Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen ISY & Liu X (2005) Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* **24**: 5069–5078

Zanier K, Charbonnier S, Sidi AOMO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontagne P, Cura V, Brimer N, Babah KO, Ansari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S & Travé G (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* **339**: 694–698

Zannini L, Delia D & Buscemi G (2014) CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J. Mol. Cell Biol.* **6**: 442–457

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW & Jansen-Dürr P (1996) Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**: 2323–2330

Zhang B, Laribee RN, Klemsz MJ & Roman A (2004) Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* **329**: 189–198

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS & Roman A (2003) The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* **310**: 100–108

Zhang C, Deng Z, Pan X, Uehara T, Suzuki M & Xie M (2015a) Effects of Methylation Status of CpG Sites within the HPV16 Long Control Region on HPV16-Positive Head and Neck Cancer Cells. *PLOS ONE* **10**: e0141245

Zhang G & Pradhan S (2014) Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* **66**: 240–256

Zhang J, Yao T, Wang Y, Yu J, Liu Y & Lin Z (2016a) Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21. *Cancer Biol. Ther.* **17**: 104–113

Zhang S, Zhang G & Liu J (2016b) Long noncoding RNA PVT1 promotes cervical cancer progression through epigenetically silencing miR-200b. *APMIS* **124**: 649–658

Zhang T, Cooper S & Brockdorff N (2015b) The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* **16**: 1467–1481

Bibliographie

Zhang W, Kazakov T, Popa A & DiMaio D (2014) Vesicular trafficking of incoming human papillomavirus 16 to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum requires γ -secretase activity. *mBio* **5**: e01777-01714

Zhang Y, Fan S, Meng Q, Ma Y, Katiyar P, Schlegel R & Rosen EM (2005) BRCA1 interaction with human papillomavirus oncoproteins. *J. Biol. Chem.* **280**: 33165–33177

Zhang Y, Yang X, Gui B, Xie G, Zhang D, Shang Y & Liang J (2011) Corepressor protein CDYL functions as a molecular bridge between polycomb repressor complex 2 and repressive chromatin mark trimethylated histone lysine 27. *J. Biol. Chem.* **286**: 42414–42425

Zheng Z-M & Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **11**: 2286–2302

Zhou X & Münger K (2009) Expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces an autophagy-related process and sensitizes normal human keratinocytes to cell death in response to growth factor deprivation. *Virology* **385**: 192–197

Zhu B, Zhang M, Williams EM, Keller C, Mansoor A & Davie JK (2016) TBX2 represses PTEN in rhabdomyosarcoma and skeletal muscle. *Oncogene* **35**: 4212–4224

Zhu Y, Han Y, Tian T, Su P, Jin G, Chen J & Cao Y (2018) MiR-21-5p, miR-34a, and human telomerase RNA component as surrogate markers for cervical cancer progression. *Pathol. Res. Pract.* **214**: 374–379

Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Müller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E & Bernard HU (2000) Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J. Gen. Virol.* **81**: 2617–2623

Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB & Herman JG (2007) hTERT Is Expressed in Cancer Cell Lines Despite Promoter DNA Methylation by Preservation of Unmethylated DNA and Active Chromatin around the Transcription Start Site. *Cancer Res.* **67**: 194–201

Annexes

1 Communications orales

- **Perrard J**, Morel A, Gassmann F, Baguet A, Guenat D, Mougin C, Prétet JL. *Répression des oncogènes d'HPV16 lors d'un traitement par un agent déméthylant*. 24^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 15 Juin 2018, Besançon, France
- **Perrard J**, Morel A, Prétet JL. *Mécanisme d'action d'un agent déméthylant sur la répression des oncogènes viraux d'HPV16 grâce au miR-375*. 10^{ème} Journées Scientifiques de l'AFIPP, 29 Septembre 2017, Sainte-Foy-Lès-Lyon, France.
- **Perrard J**, Morel A, Gassmann F, Meznad K, Baguet A, Guenat D, Mougin C, Prétet JL. *HPV16 E6 expression is regulated through miR-375 after DNA demethylating treatment*. DNA Tumour Virus, 19 Juillet 2017, Birmingham, Royaume-Uni.
- **Perrard J**, Morel A, Prétet JL. *Régulation épigénétique des oncogènes des papillomavirus humains (HPV)*. 22^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 16 Juin 2016, Besançon, France.
- Prétet JL, Morel A, Baguet A, **Perrard J**, Demeret C, Aubin F, Riethmuller D, Mougin C. *Régulation épigénétique de l'oncogène viral E6 d'HPV16*. Journée Scientifique de la SFR FED 4234, 10 Juin 2016, Besançon, France.
- **Perrard J**, Morel A, Prétet JL. *T-Box : Régulation épigénétique des oncogènes viraux d'HPV*. 9^{ème} Journées Scientifiques de l'AFIPP, 28 Septembre 2016, Loches, France.

2 Communications affichées

- **Perrard J**, Morel A, Gassmann F, Meznad K, Baguet A, Guenat D, Mougin C, Prétet JL. *HPV16 oncogene downregulation after DNA demethylating treatment*. 23^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 15 Juin 2017, Dijon, France.

3 Articles scientifiques

- Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, **Perrard J**, Hendrick E, Delage-Mourroux R, Mosser J, Borg C, Feugeas JP, Herfs M, Boyer-Guittaut M, Hervouet E (2019) *EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes*. Cell Death & Disease.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1397-4>
- Asgarova A, Asgarov K, Godet Y, Peixoto P, Nadarajane A, Boyer-Guittaut M, Galaine J, Guenat D, Mougey V, **Perrard J**, Pallandre J, Bouard A, Balland J, Tirole C, Adotevi O, Hendrick E, Herfs M, Cartron PF, Borg C, Hervouet E. (2018) *PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma*. OncoImmunology.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423170>
- Morel A, Baguet A, **Perrard J**, Demeret C, Jacquin E, Guenat D, Mougin C, Prétet JL. (2017) *5azadC treatment upregulates miR-375 level and represses HPV16 E6 expression*. Oncotarget.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17575>
- Paget-Bailly P, Meznad K, Bruyère D, **Perrard J**, Herfs M, Jung A, Mougin C, Prétet JL, Baguet A. (2019) *Comparative RNA sequencing reveals that HPV16 E6 abrogates the effect of E6*1 on ROS metabolism*. Scientific Reports.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42393-6>
- (Soumis) **Perrard J**, Morel A, Meznad K, Paget-Bailly P, Dalstein V, Guenat D, Mourareau C, Clavel C, Fauconnet S, Baguet A, Mougin C, Prétet JL. (2019) *DNA demethylation agent 5azadC downregulates HPV16 E6 expression in cervical cancer cell lines independently of TBX2 expression*. Oncology Letters
- (En   criture) Meznad K, **Perrard J**, Paget-Bailly P, Morel A, Anne P, Aubin F, Mougin C, Prétet JL, Tomasetto C, Baguet A. *Polycistronic transcripts from the HPV16 DNA virus are subjected to the RNA surveillance pathway, NMD*.
- (En r  vision) Prétet JL, **Perrard J**, Soret C, Averous G, Vuitton L, Carcopino X, Badoual C, Guenat D, Aubin F, Mougin C, Ramanah R, Riethmuller D. (2019) *Les infections    papillomavirus*. EMC

ORIGINAL RESEARCH



PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma

A. Asgarova^a, K. Asgarov^a, Y. Godet^{a,b}, P. Peixoto^{a,g}, A. Nadaradjane^{d,e,f}, M. Boyer-Guittaut^a, J. Galaine^a, D. Guenat^a, V. Mougey^a, J. Perrard^{a,1}, J. R. Pallandre^a, A. Bouard^a, J. Balland^a, C. Tirole^a, O. Adotevi^{a,b}, E. Hendrick^a, M. Herfs^h, P. F. Cartron^{d,e,f}, C. Borg^{a,b,c,*}, and E. Hervouet^{a,g,*}

^aUniv. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000, Besançon, France; ^bUniversity Hospital of Besançon, Medical Oncology Department, Besançon, France; ^cClinical Investigation center-Biotherapy 1431, Besançon, France; ^dINSERM unit S1232, University of Nantes, Nantes, France; ^eInstitut de cancérologie de l'Ouest, Nantes, France; ^fmember of the REpiCGO (Cancéropole Grand-Ouest, France) and EpiSAVVEN (Région Pays de la Loire, France) networks, France; ^gEPIGENExp (EPIgenetics and GENe EXPression Technical Platform), Besançon, France; ^hLaboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, Liege, Belgium

ABSTRACT

Tumor cells, which undergo Epithelial-mesenchymal transition (EMT) acquire increased capacities of proliferation, invasion and have the ability to generate metastases by escaping the immune system during their systemic migration. To escape the immune system, cancer cells may induce tolerance or resist elimination by immune effectors *via* multiple mechanisms and we hypothesized that EMT may control the expression of immune checkpoint inhibitors, then promoting immune evasion. PD-L1 (programmed cell death ligand 1) but not PD-L2 nor Galectin 9 or Death receptor (DR4, DR5 and Fas) and ligands (FasL and TRAIL) expression was up-regulated during cytokine-driven EMT in a reversible manner. Moreover PD-L1 is overexpressed in VIMENTIN positive NSCLC tissues. We also demonstrated that the expression of PD-L1 required both TNF α and TGF β 1. Indeed, TGF β 1 decreased DNMT1 content and that resulted in *PD-L1* promoter demethylation whereas TNF α induced the NF- κ B pathway that promoted expression of demethylated *PD-L1* promoter.

ARTICLE HISTORY

Received 28 September 2017
Revised 21 December 2017
Accepted 22 December 2017

KEYWORDS

death receptors; DNA methylation; epithelial-mesenchymal transition; lung cancer, cancer; NF- κ B; PD-L1

Introduction

EMT is a highly conserved cellular process which allows epithelial cells to convert to mesenchymal cells.¹ The loss of E-CADHERIN expression is a crucial step in EMT and a hallmark of mesenchymal phenotype, whereas VIMENTIN is a canonical marker used to detect fully transitioned epithelial cells and the acquisition of fibroblastic-like phenotype. EMT is involved in different physio-pathological contexts including: embryonic and organ development (type 1 EMT), tissue regeneration and fibrosis (type 2 EMT), or carcinoma progression (type 3 EMT). Oncogenesis, hypoxia or exposure to chronic inflammation are the main environmental conditions promoting the ability of tumor cells to undergo EMT.² TGF- β 1, TNF α , HGF, EGF, PDGF, Wnt or NOTCH ligands are soluble factors which have been described to control mesenchymal phenotype acquisition during cancer progression.³ Mesenchymal program relies on the expression of specific transcription factors such as ZEB, SNAIL and TWIST families, which repress E-CADHERIN, induce the expression of molecules involved in cytoskeleton regulation and promote the secretion of metalloproteinases involved in invasion.⁴ Tumor cells, which undergo EMT, show increase proliferation, migration and resistance to apoptosis.

By co-opting a program involved in embryonic development, carcinoma cells are able to invade normal tissues and induce metastases. EMT also confers to carcinoma cells, stem cell like properties indispensable to clonal expansion and initiation of metastases.⁵ Altogether, EMT is one of the major molecular mechanisms carried out during oncogenesis to promote cancer progression. One other crucial step of oncogenesis is the acquisition by cancer cells of the ability to evade the immune system.⁶ Recent clinical advances in immunotherapy demonstrated that some cancers, with established lymphocyte infiltrates, express immune checkpoint inhibitory molecules, such as PD-L1. Several studies suggested that PD-1/PD-L1 status may be a new indicator of poor prognosis for patients with lung cancers, head and neck or melanoma.⁷⁻¹⁰ In these patients, treatment with anti-PD-L1/PD-1 restored effective antitumor immunity and induced long lasting objective responses, demonstrating the pivotal role of such immune inhibitory signaling in oncogenesis. However, the understanding of the mechanisms governing PD-L1 expression in cancer may improve the medical approaches to restore immunosurveillance. We therefore hypothesized that the expression of immune checkpoint inhibitors such as PD-L1, might be specifically regulated during EMT

CONTACT C. Borg  christophe.borg@efs.sante.fr  8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod BP 1937 25020 Besançon Cedex, France; E. Hervouet  France.eric.hervouet@univ-fcomte.fr  16 route de Gray, 25360 Besançon cedex.

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#).

¹Present address: EA3181 University of Bourgogne Franche Comté, Besançon.

*These authors contributed equally to this work.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

to allow invasion and immune escape. Indeed, the role of ZEB-1 and miR200 on PD-L1 in EMT was recently showed in breast cancer models.¹¹ To investigate this issue, we selected a model of reversible EMT based on a TNF- α /TGF- β 1 treatment of the NSCLC cell line A549. Expression of death receptors or ligands, NK cell activating or inhibitory molecules, as well as immune checkpoint inhibitors were analyzed together with the EMT status and we observed that induced EMT in NSCLC does not modify the expression of NK cell receptor ligands or inhibitory molecules as well as death receptors or ligands. By contrast, we demonstrated that PD-L1 was strongly up-regulated in *in vitro* EMT cell models and in NSCLC EMT tissues. Nevertheless, PD-L1 expression was not correlated to EMT specific transcription factors but we evidenced for the first time that the control of PD-L1 expression is coordinated by two processes during EMT. Indeed, PD-L1 expression required both the demethylation of its promoter that was induced by TGF β treatment and the activation of the NF- κ B/IKK ϵ pathway and the recruitment of NF- κ B on PD-L1 promoter following TNF α treatment. In summary, our results clearly reported that tumoral microenvironment and EMT that control PD-L1 expression are key points that have to be appreciated in the future for anti-cancer therapies and to limit risks of metastasis.

Results

Effects of cytokine-induced EMT in immune checkpoint inhibitor expression

In order to assess how EMT influences the recognition of tumor cells by lymphocytes during invasion, we developed a reversible model of EMT (cytokines (TNF- α /TGF- β 1)-induced EMT).¹²⁻¹⁴ For this purpose, A549 cell line was exposed for 5 days to TNF- α and TGF- β 1 (Fig. 1A). This treatment allowed this epithelial cell line to acquire mesenchymal tumor cells features (Fig. 1B and Supp. Fig. 1). Removal of cytokines led to the restoration of an epithelial phenotype within 5 days (Fig. 1A and 1B). EMT status was confirmed by western-blotting showing that TNF- α and TGF- β 1 treatment repressed epithelial marker E-CADHERIN expression but induced overexpression of mesenchymal marker VIMENTIN (Fig. 1C). Similarly, TNF- α and TGF- β 1 induced a reversible loss of EPCAM (Fig. 1D). EMT phenotype conferred by exposition to cytokine combination was also associated with a lengthening of cells as observed by F-ACTIN staining (Fig. 1E) and an enhanced invasive capacity of A549 cells (Fig. 1F).

Effector immune cells can eliminate carcinoma cells throughout different mechanisms: one of which is the production of pro-apoptotic ligands, such as TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas ligand (FasL). These compounds can trigger extrinsic apoptosis through the activation of death receptors, Death Receptor 4 (DR4) / Death Receptor (DR5) and Fas. We then first assessed the expression of DR4, DR5 and Fas in A549 cells exposed or not to TNF- α and TGF- β 1. We observed that death receptor expressions were not significantly modified during the acquisition of mesenchymal phenotype by A549 (Supp. Fig. 2A). Moreover, EMT did not

induce the production of TRAIL or FasL (data not shown) nor HLA-G expression (supp. Fig. 2B). Another mechanism involved in the eradication of tumor cells during immunosurveillance is the recognition of NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1-3) by CD8 T lymphocytes or NK cells.¹⁵⁻¹⁷ TNF- α /TGF- β 1 treatment did not influence the expression of the NKG2D ligands (Supp. Fig. 2C). Similarly, EMT did not regulate NKp30-Fc, NKp46-Fc and DNAM-Fc expression. Of note, we did not observe in these experiments any significant modification in MHC class I (Supp. Fig. 2C). Altogether, these experiments showed that the modulation of molecules regulating the recognition of tumor cells by NK was unlikely. Indeed, a 5 days TNF- α and TGF- β 1 treatment of A549 did not hamper the capacity of activated NK to recognize and induce A549 cell death nor to produce IFN- γ following co-cultures with this cell line (Supp. Fig. 3A and 3B).

The next set of experiments was performed to investigate the modulation of immune-checkpoint ligands according to EMT status. Using flow cytometry experiments we showed that TNF- α / TGF- β 1 co-treatment did not influence the expression of the TIM3 ligands Galectine 9 or CEACAM1 (CD66). PD-L2, Vista were not expressed in this model (Fig. 2A). On the opposite, EMT induction, (monitored by the loss of EPCAM), led to the up-regulation of PD-L1 (Fig. 2A). Interestingly, PD-L1 expression disappeared following removal of TNF- α and TGF- β 1 and induction of MET (Fig. 2B). Finally, we used a specific inhibitor of TGF- β receptor to block TNF- α /TGF- β 1-induced EMT (Supp. Fig. 4A and 4B). TGF- β receptor inhibition blocked PD-L1 expression (Supp. Fig. 4C). These results indicated that cytokine-mediated EMT promoted the expression of PD-L1. We next sought to determine which cytokine, TNF- α or TGF- β 1 was responsible of the induction of PD-L1. For this purpose, A549 cells were treated with TNF- α , TGF- β 1 or with the combination during 5 days. As previously described,^{13,14,18} TNF- α or TGF- β 1 treatment alone failed to drive an efficient mesenchymal transformation of A549 cells in short term cultures (data not shown). Nonetheless a decrease of EPCAM expression was observed following treatment with TGF- β 1 and at a lower level with TNF- α alone and was more important with the combined TNF- α /TGF- β 1 treatment (Fig. 2C). In addition, treatment with each cytokine alone, was not able to induce PD-L1 expression but cytokine combination promoted significant up-regulation of PD-L1 (Fig. 2C). The up-regulation of PD-L1 by exposition to TNF- α and TGF- β 1 was also confirmed using ELISA (Fig. 2D) and qRT-PCR (Fig. 2E).

Expression of PDL1 is dependent of EMT

The increased transcription of PD-L1 during cytokine-induced EMT, prompted us to characterize the expression of EMT-related transcriptional regulators in A549 cells. Western blotting experiments showed an increased expression of ZEB-1 and SNAIL1 in cells treated with TNF- α /TGF- β 1, while GLI, SNAIL2/SLUG, TWIST levels were not modified by the treatment (Fig. 3A). qRT-PCR analyses confirmed the induced expression of *SNAIL1* (coding SNAIL1) and *ZEB-1* mRNA during EMT (Fig. 3B). Of note, TNF- α alone increased ZEB-1

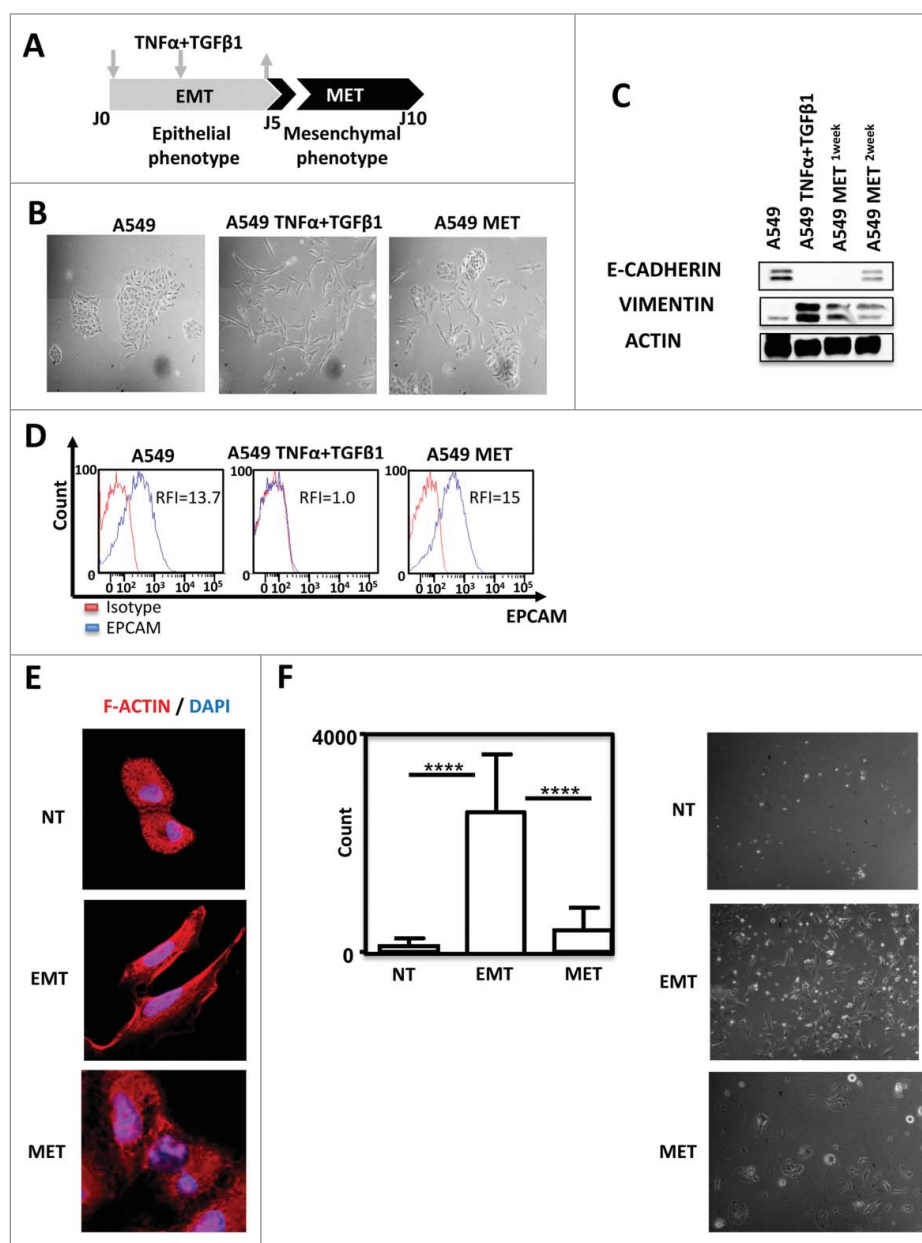


Figure 1. TNF- α and TGF- β 1 combination induced A549 EMT in a reversible manner. (A) Pipeline of EMT induction and reversion (MET) in A549 cells. Cells were treated for 5 days with TNF α /TGF- β 1 and then the cytokines were removed during the 5 next days (arrows) (B) Lung cancer cells A549 were observed on the fifth day of adherence with or without TNF α /TGF- β 1 treatment under the microscope (40X magnification). To observe the cells undergoing MET (mesenchymal epithelial transition), the cytokines TNF- α and TGF- β 1 were removed during the next 5 days. (C) Expression of epithelial marker E-CADHERIN and mesenchymal marker VIMENTIN in A549 after treatment with TNF- α and TGF- β 1 were measured by Western-Blotting. One or two weeks after the removal of cytokines, expressions of E-CADHERIN and VIMENTIN were tested again. (D) EPCAM staining measured by FACS after treatment with TNF- α and TGF- β 1, as well as, after the removal of cytokines during the next five days. The experiments in panels B, C and D were realized 4 times with similar results. (E) Representative staining of F-Actin using Rhodamine Phalloidin in A549 treated or not with TNF- α /TGF- β 1. Nuclei were stained with DAPI. (F) The change in the invasive capacity of A549 with or without TNF α /TGF- β 1 treatment was measured using Matrigel system. This experiment was performed in duplicate, and repeated 3 times (left: quantification; right: representative pictures).

while TGF- β 1 exposition enhanced SNAIL1 expression ruling out a direct role of these transcriptional modulators in PD-L1 regulation. Moreover, SNAIL1 stable transfection in A549 cells (Fig. 3C), did not increase the expression of PD-L1 expression, even when this cell line was exposed to TNF- α and TGF- β 1 compared to control cells (Fig. 3D). Finally, we inhibited the SMAD pathway using a chemical inhibitor (SIS3) and once again this treatment did not block PD-L1 induction (Supp. Fig. 4B). These data strongly suggested that PD-L1 regulation is, at least in part, independent of classical EMT transcriptional factors.

In order to understand whether PD-L1 induction is really associated to EMT, we stably expressed E-CADHERIN in A549 cells (Fig. 4A). As expected, both β -CATENIN and E-CADHERIN stainings were increased in E-CADHERIN expressing cells compared to control cells (Fig. 4B). We next quantified PD-L1 expression in these cells and we observed a non-significant decrease of PD-L1 mRNA in E-CADHERIN expressing cells but as mentioned above, basal PD-L1 expression is already low in A549 cells (Fig. 4C). Moreover, the overexpression of E-CADHERIN strongly blocked the TNF- α /TGF- β 1-mediated PD-L1

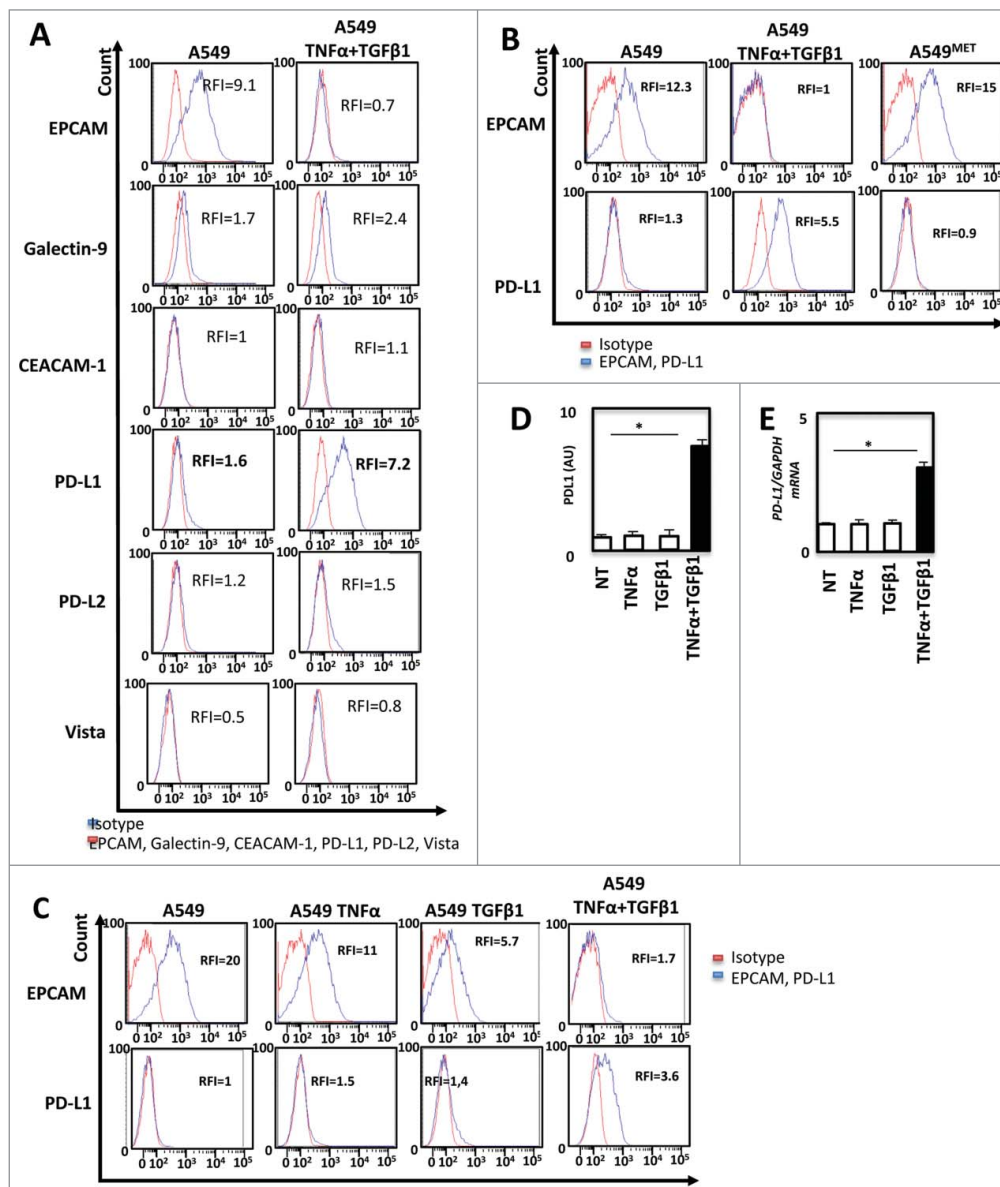


Figure 2. TNF- α and TGF- β 1 cooperate to promote PD-L1 expression during EMT (A) The expression of immune-checkpoint inhibitors as Galectin-9, CEACAM1, PD-L1, PD-L2, Vista before and after induction of EMT on A549 cells was measured by FACS and measurements were independently repeated at least three times. (B) By FACS the changes in the expression of PD-L1 and EPCAM were also confirmed with 5 days of treatment and after the removal of cytokines during the next five days. (C) At last, the changes in the expression of PD-L1 with TNF- α or TGF- β 1 alone, as well as with the combination of these cytokines were measured by FACS. (D and E) Expression of PD-L1 protein and mRNA were measured following TNF- α /TGF- β 1 treatment by ELISA or qRT-PCR. These experiments were repeated three times with similar results.

induction (Fig. 4D). These data clearly showed that PD-L1 expression in A549 cells is dependent of TNF- α , TGF- β 1 and EMT.

TNF- α is required for PD-L1 expression via NF- κ B signaling during EMT

In order to decipher the mechanisms implicated in the control of PD-L1 expression during cytokine-induced EMT, we first analyzed the transcription factor binding sites within the PD-L1 promoter. NF- κ B was the main transcription factor, previously described as promoting EMT.¹⁹⁻²² and presenting a binding site in the PD-L1 promoter. A strong increase of NF- κ B activity was observed following treatment with TNF- α alone or

TNF- α combined with TGF- β 1 but not with TGF- β 1 alone (Fig. 5A). Consequently, we next decided to investigate the role of NF- κ B subunits in the control of PD-L1 expression during EMT. JSH23, a pharmacological inhibitor of NF- κ B, was used to prevent NF- κ B expression and nuclear translocation of NF- κ B subunits in A549 cells treated with both TNF- α /TGF- β 1. JSH-23 selectively blocked nuclear translocation of active NF- κ B without affecting the process of I κ B degradation and suppress its binding to its target DNA consensus sequence.^{23,24} As previously described, JSH23 inhibited the induction of NF- κ B subunit in A549 following cytokine-induced EMT (Fig. 5B). Indeed, JSH23 only slightly prevented PD-L1 expression in these cells (Fig. 5C). Interestingly, any effect of JSH23 on PD-L1 expression could also be observed in the epithelial HT29 cells whose basal (without EMT induction) PD-L1 expression

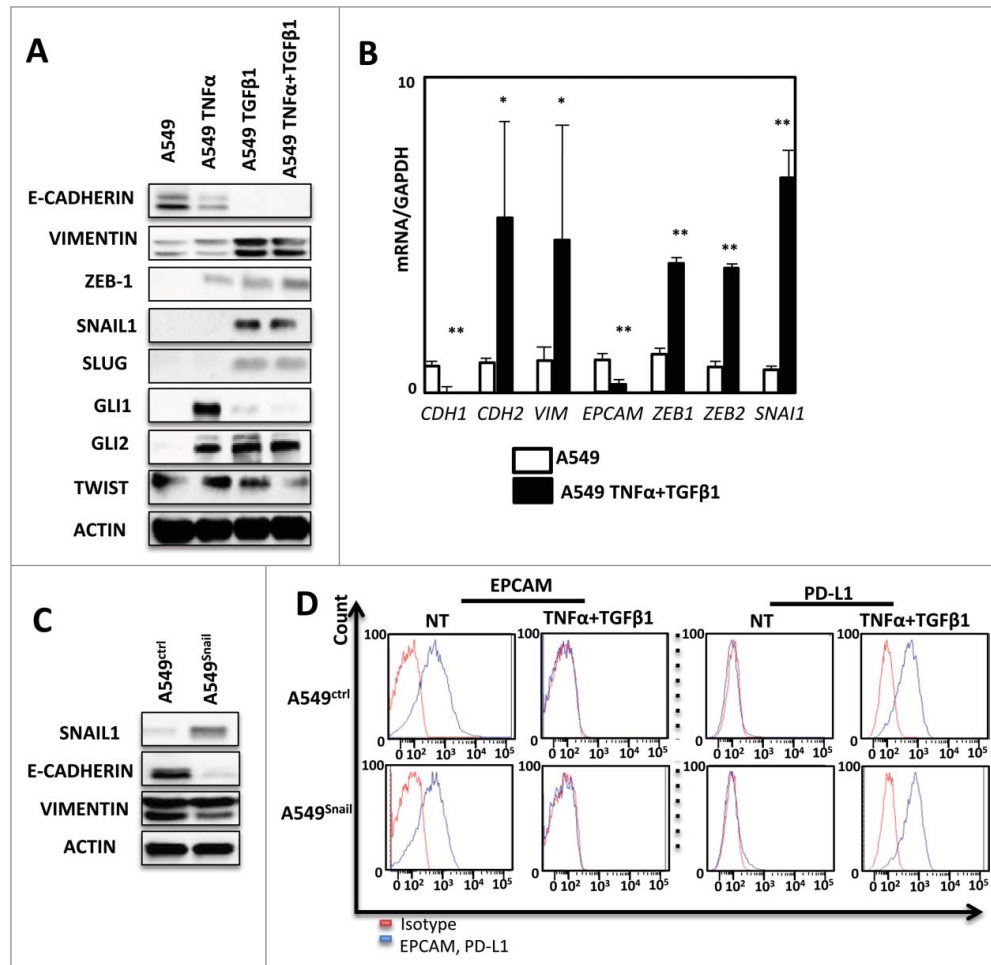


Figure 3. PD-L1 expression is not regulated by conventional EMT transcriptional factors in A549. (A) Expression of several transcription factors of EMT as: ZEB-1, SNAIL-1, SLUG, GLI1, GLI2, TWIST in protein levels was measured by Western Blotting after 5 days of treatment of A549 cells with TNF- α and TGF β . This experiment was realized 3 times. (B) qRT-PCR analysis was realized to test the expression of different transcription factors of EMT mRNA levels after treatment with cytokines. GAPDH was used as a housekeeping gene. (C) The expression of VIMENTIN and E-CADHERIN were measured using Western-blotting in A549 cells after transfection with SNAIL-1 or control vector. (D) expression of EPCAM and PD-L1 was measured by FACS analysis during treatment with TNF- α and TGF β on A549 cancer cells transfected with SNAIL-1 or control vector. Results from Fig. 3A and 3C and 3D are representative examples from at least 3 independent experiments.

is very low and comparable to A549 cells, whereas JSH23 strongly blocked PD-L1 expression in the mesenchymal MDA-MB-231 cells expressing high levels of VIMENTIN and PD-L1 (Supp Fig. 5A–C) suggesting the implication of NF- κ B in PD-L1 expression. As expected p52 NF- κ B subunit overexpression alone could not restore PD-L1 expression in A549 cells (Supp Fig. 6).

We next analyzed the direct role of the non canonical kinase IKK ϵ on PD-L1 regulation since IKK ϵ expression was strongly induced by TNF- α /TGF- β 1 treatment (Supp. Fig. 7A). To determine whether IKK ϵ was also involved in the NF- κ B-dependent PD-L1 induction, IKK ϵ was genetically expressed in A549 cells (Supp Fig. 7B). According to our previous results obtained with NF- κ Bp52, IKK ϵ overexpression alone was not able to significantly promote PD-L1 expression. (Supp Fig. 7C and 7D). However, pharmacological inhibition using three different inhibitors (Bx795, IKK3 and Amlexanox) (Supp. Fig. 8A–8C) and siRNA mediated transcription blockade (Fig. 5D) were used to prevent IKK ϵ activity during cytokine-induced EMT and significantly decreased PD-L1 induction. Altogether, these results highlight the involvement of NF- κ B/IKK ϵ signaling in EMT-induced PD-L1 expression on tumor cells but suggest that the NF- κ B pathway is only one parameter.

DNA methylation control of the PD-L1 expression by TGF- β 1 during EMT

As EMT is a highly plastic process, we next analyzed whether DNA methylation, could be involved in the control of PD-L1 expression. Indeed, a modification of global DNA methylation has already been reported during EMT.²⁵ Moreover, DNMTs have also been directly involved in EMT process.²⁶ We indeed observed a small decrease of DNA methylation and a significant decrease of the 5hmcC following TNF- α /TGF- β 1 treatment in A549 cells (Fig. 6A). These modifications were also confirmed in another model, the ACHN cells in which EMT was also induced by TNF- α /TGF- β 1 and associated with a moderate increase of PD-L1 expression (Supp. Figure 9A and 9B). We next quantified the expression of genes coding enzymes involved in DNA methylation (Fig. 6B). We found that all DNMTs (DNA methyl transferase) and TET (ten eleven translocation) genes were downregulated by TNF- α /TGF- β 1 treatment suggesting that global DNA methylation modification is due to a decline of DNA methylation related proteins. These data were confirmed at

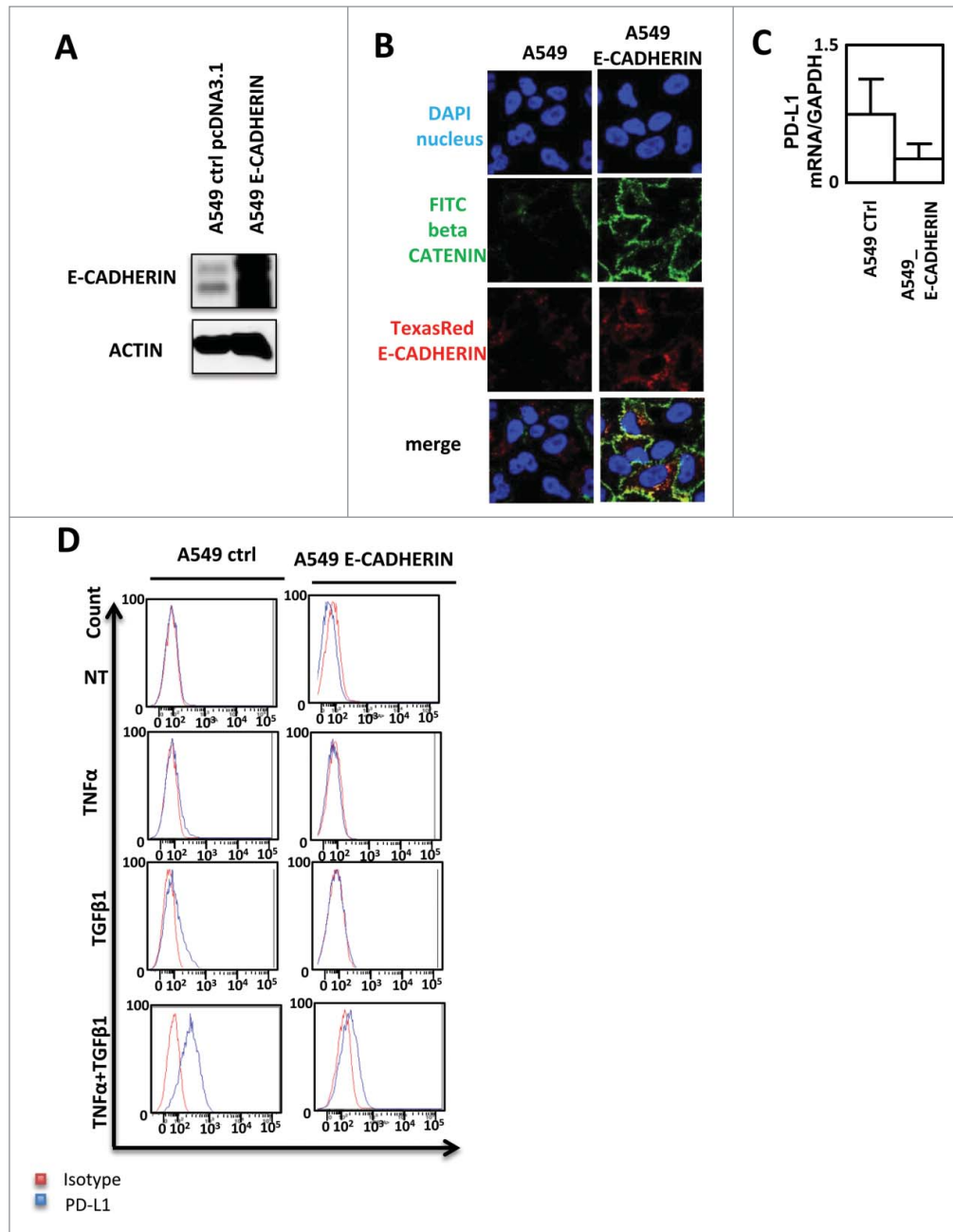


Figure 4. PD-L1 expression blockade by E-CADHERIN overexpression during EMT in A549 cells. (A) Expression of E-CADHERIN was controlled by western blotting in A549 transfected by a pcDNA3.1 void vector or expressing E-CADHERIN. (B) Reversion of mesenchymal to epithelial phenotype was measured using immunofluorescence in A549 transfected by a pcDNA3.1 void vector or expressing E-CADHERIN. Nuclei were stained by DAPI (blue), beta CATENIN by FITC (green) and E-CADHERIN by TexasRed (Red). (C) expression of *PD-L1* mRNA was measured by qRT-PCR in A549 control or A549 cells transfected with a plasmid expressing E-CADHERIN (D) Expression of PD-L1 was measured by cytometry in A549 transfected by a pcDNA3.1 void vector or expressing E-CADHERIN treated or not with TNF α /TGF β 1.

the protein level as we showed a decrease of DNMT1 content, the main protein known to process the maintenance of DNA methylation following TNF- α /TGF- β 1 treatment in A549 cells (Fig. 6C). A similar decrease of both *DNMT1* mRNA and protein were also observed in the ACHN model (Supp. Figures 9C and D). In light of these elements, we wondered whether *PD-L1* expression could be regulated by DNA methylation. As shown in Fig. 6D, TNF- α /TGF- β 1 effectively reduced the methylation status of *PD-L1* promoter. A similar demethylation was also observed using TGF- β 1 alone but not with TNF- α alone suggesting that *PD-L1* promoter methylation is rather

controlled by TGF- β 1 than TNF- α (Fig. 6D). Since earlier showed that NF- κ B was partially involved in PD-L1 regulation (Fig. 5), and that a synergistic expression of PD-L1 was observed with the combined TNF- α /TGF- β 1 treatment (Fig. 2), we asked whether PD-L1 expression could be controlled simultaneously by DNA methylation and NF- κ B signaling. Indeed, inhibition of NF- κ B, using a specific inhibitor (BAY11), strongly reduced the *PD-L1* expression of cells treated with TNF- α /TGF- β 1 (Fig. 6E). Inhibition of DNA methylation using procainamide, a specific inhibitor of DNMT1 had no effect suggesting that inhibition of DNA methylation alone could not restore *PD-L1*

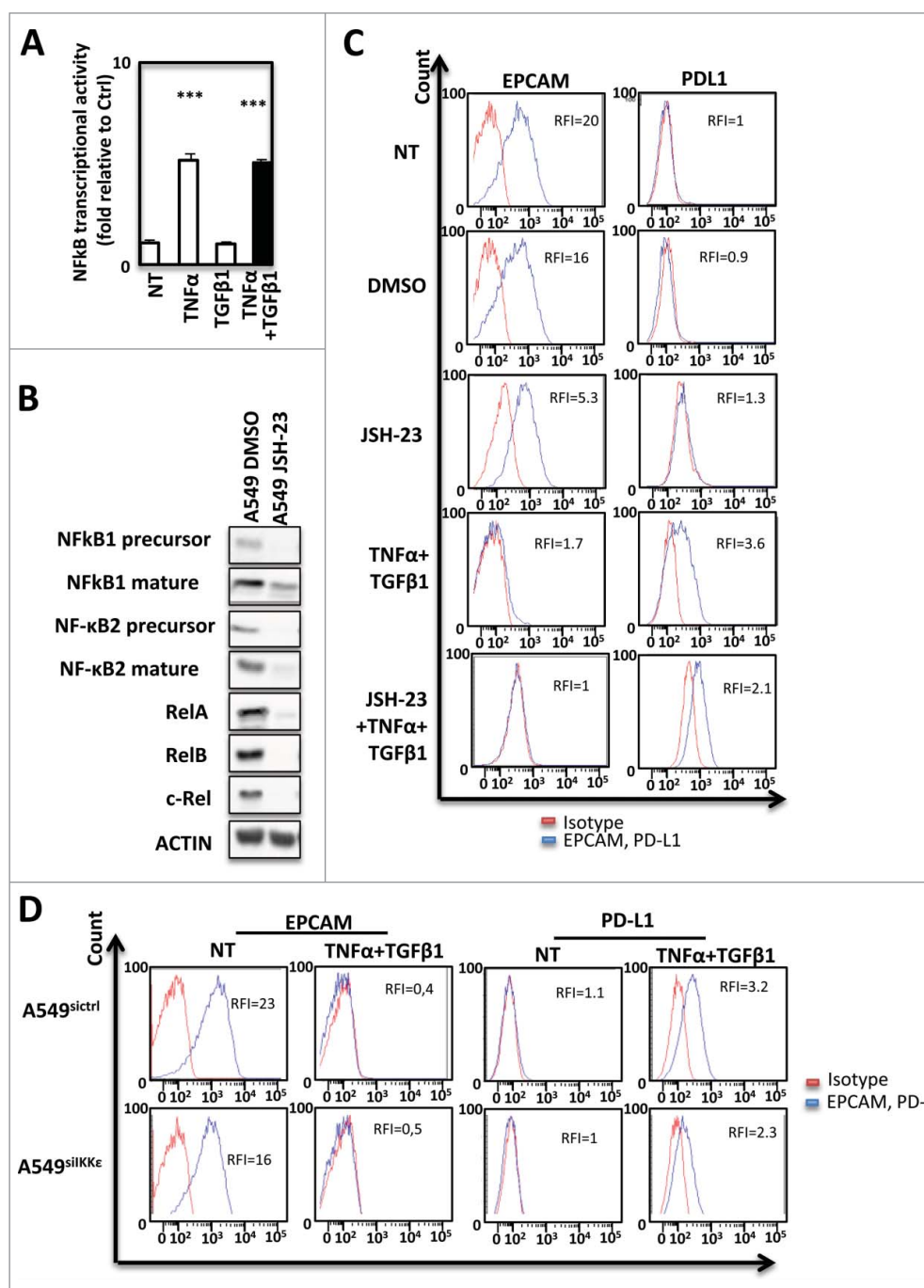


Figure 5. PD-L1 expression during EMT is dependent from NF-κB in signaling in A549 cells. (A) Activity of NF-κB was measured in A549 cells treated or not with TNF-α and TGFβ1. (B) The expression of NF-κB subunits was measured by Western Blotting after treatment with NF-κB inhibitor. (C) The expression of PD-L1 was measured using cytometry following NF-κB inhibition with JSH-23. (D) Expression of EPCAM and PD-L1 was measured using cytometry in A549 treated or not with TNF-α and TGFβ1 and transfected or not with si IKKε. These experiments were repeated three times with similar results.

expression. Single treatment of A549 cells with 5-aza-deoxycytidine, another DNA demethylation agent, also failed to restore PD-L1 expression (data not shown). Moreover, inhibition of DNA methylation in presence of TNF-α is sufficient to induce PD-L1 expression while addition of the NF-κB inhibitor blocked this induction (Fig. 6E). We next confirmed that procainamide induced the demethylation of PD-L1 promoter but that the inhibitor of NF-κB had not effect on this methylation (Fig. 6F). Moreover, the mesenchymal MDA-MB-231 cells expressing a high level of PD-L1 in basal conditions (Supp. Fig. 5), also presented an

unmethylated PD-L1 promoter (Supp. Figure 10). To confirm that both DNA methylation and NF-κB signaling are required for PD-L1 regulation, we finally analyzed the recruitment of both NF-κB /p65 and DNMT1 on the PD-L1 promoter of A549 cells. We showed that TNF-α/TGFβ1 treatment induced an increase of NF-κB/p65 recruitment concomitant with a loss of DNMT1 recruitment on the PD-L1 promoter (Fig. 6G and 6H).

Finally, to confirm that PD-L1 expression is associated with EMT *in vivo*, we quantified PD-L1 expression in tumor cells by IHC staining in a cohort of 40 NSCLC

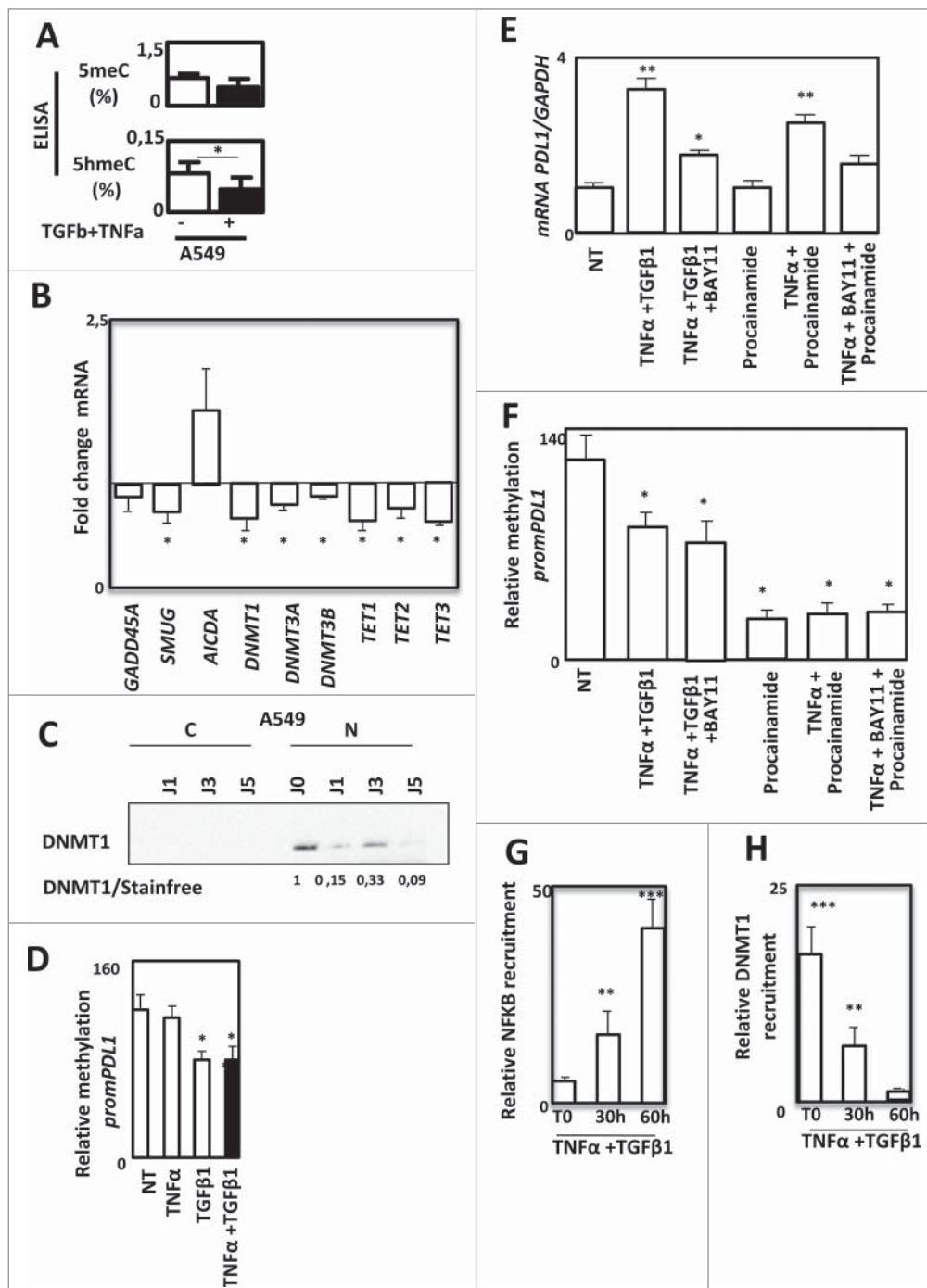


Figure 6. PD-L1 expression is regulated by DNA methylation during EMT in A549 cells. Quantification of 5meC and 5hmeC content using ELISA in A549 cells treated or not with TNF-α and TGFβ1. (B) Quantification of *GADD45A*, *SMUG*, *AICA*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* and *TET3* gene expression using qRT-PCR in A549 treated or not with TNF-α and TGFβ1. (C) Expression of DNMT1 using Western blotting in cytosolic or nuclear fractions of A549 cells treated or not with TNF-α and TGFβ1. (D) Methylation of *PD-L1* promoter was quantified in A549 cells treated or not with TNF-α and/or TGFβ1. (E and F) Expression of *PD-L1* mRNA using qRT-PCR and methylation of *PD-L1* promoter were quantified in A549 cells treated or not with TNF-α and TGFβ1 in presence or not of BAY11, or cells treated with procainamide or treated with procainamide, TNF-α and BAY11. (G and H) Recruitment of NF-κB and recruitment of DNMT1 were quantified by ChIP in A549 cells treated or not with TNF-α and TGFβ1.

patients. These latter were subclassified into two groups based on VIMENTIN expression [EMT-negative (n = 20) versus EMT-positive tumors (n = 20)] (Fig. 7). According to our *in vitro* experiments, the reported results strongly indicate that PD-L1 expression is correlated to EMT-like phenotype (p = 0.03). Moreover, 6 out of 7 tumors displaying a strong PD-L1 immunoreactivity are in the EMT-positive category. In summary, all our data contribute to show for the first time that PD-L1 expression is regulated

by the tumoral microenvironment and is coordinated particularly by the cytokines TNF-α and TGF-β1 involved in EMT induction.

Discussion

EMT is a complex reprogramming of epithelial cells playing a pivotal role in tumor invasion, acquisition of stemness properties and metastasis development. In the present study, we

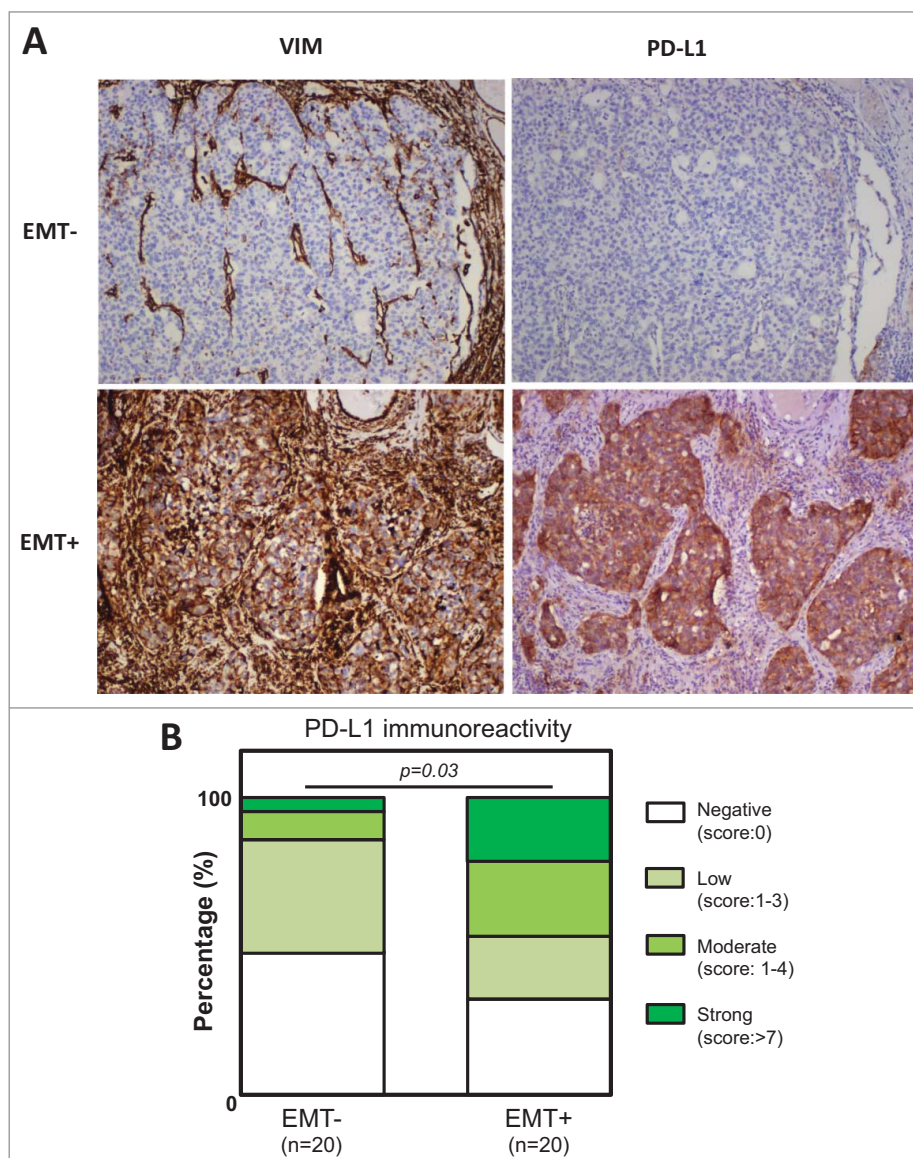


Figure 7. PD-L1 expression is correlated to EMT-like phenotype. PD-L1 and VIMENTIN expression was quantified using IHC in a cohort of 40 non small cell lung carcinoma. (A) Examples of anti-VIMENTIN and anti-PD-L1 immunostainings in EMT- and EMT+ tumors. (B) Quantification of PD-L1 staining in EMT- and EMT+ tumors.

questioned the influence of EMT in immunosurveillance through the study of PD-L1 expression regulation.

We selected a model where EMT can be induced in a reversible manner in order to mimic the invasion phase leading to metastasis formation. As previously described, we observed that $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{TGF-}\beta 1$ synergized to promote EMT of A549. In this model,²² SNAIL was overexpressed in A549 following $\text{TGF-}\beta 1$ used alone or in combination with $\text{TNF-}\alpha$ (Fig. 3A). In the present study, we showed that EMT phenotype conferred by $\text{TGF-}\beta 1$ and $\text{TNF-}\alpha$ to A549 was associated with the upregulation of PD-L1, in line with the requirement for an invading tumor cell to evade the immune system. Of note, exposition to $\text{TNF-}\alpha$ or $\text{TGF-}\beta 1$ alone did not induce a significant expression of PD-L1. Moreover, SNAIL transfection did not promote PD-L1 on A549 (Fig. 3D), suggesting for the first time that a synergism between $\text{TGF-}\beta 1$ and $\text{TNF-}\alpha$ signaling is required to control PD-L1 in this setting.

Hypoxia as well as interactions with stromal cells such as cancer associated fibroblasts and mesenchymal stem cells, or inflammation are elements of the tumor microenvironment fostering EMT.³ We reported that the PD-L1 expression was particularly expressed in VIMENTIN positive NSCL tumors (Fig. 7). $\text{TGF-}\beta 1$ was shown to be of particular importance, among growth-factors and cytokines involved in this dedifferentiation process.^{27,28} Indeed, $\text{TGF-}\beta 1$ controls the expression of EMT-related transcription factors such as SNAIL, ZEB and TWIST1.²⁷ $\text{TNF-}\alpha$ is another cytokine produced within tumor microenvironment by hematopoietic cells such as M2 macrophages and exerting a promoting role on EMT.^{29,30} $\text{TNF-}\alpha$ stimulates $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in cancer cells and increases the ability of $\text{TGF-}\beta 1$ to induce EMT.^{30,31}

5 subunits forms the $\text{NF-}\kappa\text{B}$ transcription factor family: RelA, RelB, c-Rel, $\text{NF-}\kappa\text{B1}$ (p105/p50), $\text{NF-}\kappa\text{B2}$ (p100/p52). $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling is an important component of the molecular network generated by inflammation in cancer cells.³² Huber MA et al. showed that $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling is required

for initiation and maintenance of TGF- β 1 driven EMT in breast carcinoma.¹⁹ It was also previously reported in the A549 model, that mesenchymal NSCLC displays an actively constitutive NF- κ B signaling.²² Thus, NF- κ B's role in PD-L1 regulation has been addressed. The inhibition of the NF- κ B signaling and of the non canonical subunit IKK ϵ blocked PD-L1 expression during EMT induction in A549 cells (Fig. 5). Strikingly, inhibition of the NF- κ B pathway, in the MDA-MB-231 cells (associated with a high basal expression of PD-L1), resulted in the abolition of PD-L1 expression (Supp. Fig. 7). On the opposite, ectopic expression of IKK ϵ or NF- κ Bp52 had minor effects on PD-L1 expression in the A549 cells (Supp. Fig. 6–8). These data revealed the essential role played by the NF- κ B/ IKK ϵ signaling in PD-L1 expression. It also highlighted that PD-L1 upregulation during EMT is not only due to this one parameter.

Since epigenetics, has already been involved in EMT, we next wondered whether DNA methylation could also regulate *PD-L1* gene expression. We showed that TNF- α /TGF- β 1 induced a global DNA demethylation associated with a loss of DNMT1 content and a demethylation of *PD-L1* promoter (Fig. 6). Moreover, inhibition of DNA methylation combined with TNF- α treatment restored *PD-L1* expression in A549 cells. This observation was explained by a loss of DNMT1 recruitment on the *PD-L1* promoter in benefits to NF- κ B (Fig. 6G and 6H). According to these observations, we showed that the mesenchymal MDA-MB-231 cells associated with a high expression of PD-L1 presented an unmethylated *PD-L1* promoter (Supp. Figure 10). Finally, all these data demonstrate that PD-L1 expression is regulated by a double process: i) it requires the demethylation of its promoter following a loss of DNMT1 in a TGF- β 1 dependent manner, ii) it requires the activation of the IKK ϵ / NF- κ B signaling pathway in a TNF- α dependent manner (Supp. Figure 11). It has also been recently reported that the expression of PD-L1 in NSLCC or breast cancers was controlled by ZEB-1 which blocked the expression of the *miR200*, an inhibitor of PD-L1 expression. These observations confirmed that PD-L1 expression is thinly orchestrated during EMT.^{11,33} Moreover, the stability of PD-L1 on membranes is also regulated by CMTM6.³⁴ All these data suggest that PD-L1 is an important immune checkpoint and that its expression and stability are thinly controlled by several processes

The regulation of PD-L1 expression became an issue of growing importance regarding the clinical results achieved with anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy.^{35,36} Although PD-L2 expression was observed in cancer cells, This protein is mostly expressed on dendritic cells and macrophages, while PD-L1 expression was mainly reported on tumor cells,^{37–39} but also on myeloid cells infiltrating cancer microenvironment in particular in tumor associated macrophages.^{40,41}

Medical Strategies to block the action of TGF β and TNF α in the tumoral microenvironment could help to limit EMT and PD-L1 expression. However, the dual role of TGF β , depending of cell context, which balances between tumor suppressor gene functions (decrease of proliferation, increase of differentiation and apoptosis) and oncogenic functions (increase of invasion and metastasis) makes this approach difficult (for a review.⁴²).

Recently, using array-based analyses, an increase expression of PD1 was also associated with a demethylation of its promoter in NSCLC tumors compared to tumor-free samples.⁴³ According to previous reports showing that anti-cancer therapies using DNA demethylating agents (DDA) (for a review.⁴⁴) favor expression of pro-invasiveness genes and metastasis.^{45,46} our present data suggest that DDA could promote PD1/PD-L1 expression and may contribute to immune escape. On the opposite, an alternative strategy using remethylating agents (e.g. donor of methyl such as folate enriched diets.^{47,48}) might be useful to limit immune escape.

Mesenchymal cells are endowed with properties of proliferation and invasion. Few studies.^{49–51} have already suggested that EMT foster cancer progression also by acting on mechanisms allowing tumors to evade immune surveillance. A previous work has demonstrated that EMT is involved in the induction of immunosuppression.⁵⁰ Mesenchymal cells were shown to be able to induce regulatory T cells, to impair dendritic cells *in vitro* and *in vivo* partly through TSP1 production and to escape from T-cell mediated lysis.⁵² Inversely, elements of the immune system can act as inducers of EMT.⁵¹ CD8 T cells can stimulate mammary epithelial tumor cells to undergo EMT. In the present study, we established another link between EMT and immune escape through the regulation of PD-L1 and our results strongly suggest that epidrugs could be used in the future to modulate PD-L1 expression and improve immune checkpoints in NSCLC patients.

Materials and methods

Cell culture

The lung cancer cell line A549 was obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC) and was cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Paris, France) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Absence of mycoplasma was tested periodically. Cell culture was incubated in 5% CO₂ at 37°C. Identification of A549 after transfections is controlled by analyzing the short tandem repeat following to recommendations of ATCC. The cytokines TNF- α and TGF β were purchased from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France) and were used at the concentration of 20 ng/ml and 4 ng/ml, respectively. JSH-23 (catalog #481408) was obtained from Calbiochem (Lezennes, France) and was used at 25 μ M. All experiments with cytokines TNF- α and TGF β were realized at fifth day of treatment if not specified. The IKK ϵ inhibitors Bx795 (catalog #702675-74-9) were used at 1 μ M, which was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Procaïnamide (Euromedex) was used at 0.5 mM and BAY11 (Calbiochem) was used at 5 μ M.

Plasmids and transfections

A549 cells were transfected by plasmids encoding SNAIL-1-pBabe puro (plasmid 23347, Addgene, Cambridge, USA), NFkB2-p52-cFlag-pcDNA3 (plasmid 20019, Addgene, Cambridge, USA), pBabe-Puro-Flag-IKBKE (plasmid 15292, Addgene, Cambridge, USA), psiRNA-h7SKGFPzeo (plasmid ksirn4-

gz21, Invivogen, San Diego, USA), to obtain stable cells A549^{Snail-pBabe}, A549^{NFKBp52-pcDNA3}, A549^{IKKε-pBabe}, A549^{siIKKε-h7SK} respectively. In parallel transfections with the empty vectors were realized as a control. All transfections were performed using the Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, Saint Aubin, France) following the manufacturer's instructions and four days after transfection the cells undergo selection by geneticin at 1 mg/mL (# 10131-027, Life Technologies, New York, USA), by puromycin (#ant-pr-1, Invivogen, San Diego, USA) at 2 μg/ml or by Zeocyne (#P/N46-0509, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) at 500 μg/ml according to vector.

Flow cytometer

For membrane staining, cells were incubated with corresponding antibody for 30 min at 4°C then washed with PBS (phosphate buffered saline) and centrifuged for 10 minutes at 300 g. Ten thousands cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using BD FACSCanto cytometer. (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and analysed in FACS Diva software. The overlay graphs are made with the Flow Jo software. Mouse IgG1, κ Isotype Control-APC, EpCAM-APC, MHC-I (HLA A,B,C) -APC, Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE, PD-L1 (CD274)-PE, PD-L2 (CD273)-PE (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), Mouse IgG1, Isotype Control-PE, DR4-PE, DR5-PE, MICB-PE, Mouse IgG1, Isotype Control-PE, TRAIL (B-S23)-PE, Mouse IgG2 a, Isotype Control-PE, Fas-PE, Negativ control IgG1 (Diacclone Gen-Probe, Besançon, France), Mouse IgG1, κ Isotype Control-PE, Fas-L (CD178)-PE, Galectin-9-PE (BioLegend, San Diego, USA), Mouse IgG2B, Isotype Control-AF488, MICA -AF488, Mouse IgG2 a, Isotype Control-AF488, ULBP1-AF488, Mouse IgG2 a, Isotype Control-PE, ULBP3-PE (RD Systems, Lille, France), Mouse IgG2 a, κ Isotype Control-PE, HLA-G-PE (eBiosciences, Paris, France) and CD66 (produced in our Lab) were used for flow cytometer analysis (Sigma Aldrich, Saint Quentin, France).

Antibody used for Flow Cytometer: EpCAM, PD-L1, PD-L2 were obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), DR4, DR5, MICB, TRAIL, Fas from Dicalone (Gen-Probe, Besançon, France), Fas-L, Galectin-9 from Biolegend (San Diego, USA), MICA, ULBP1, ULBP3 from RD Systems (Lille, France), HLA-G from eBiosciences, (Paris, France) and CD66 was produced in our laboratory.

Western blotting

Cellular proteins were separated by electrophoresis (SDS-PAGE) in a polyacrylamide gel in presence of sodium dodecyl-sulfate (SDS) according to their molecular weight, then transferred to a polyvinylidene difluoride film (PVDF) for staining by specific antibody and then detection by secondary antibody coupled to peroxidase. Antibodies used are listed in Supp. Table 1.

Confocal microscopy

Cells were cultured in Labteck slides (Sigma-Aldrich, France). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.1% Triton X100. Cells were stained with

appropriate antibodies (Beta-CATENIN and E-CADHERIN (OZYME, Montigny-le-Bretonneux, France) or ACTIN was stained with Phalloidin-Rhodamin (P1951, Sigma-Aldrich, France). Nuclei were stained with DAPI. Images were collected with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope.

qRT-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription were performed using M-MLV (Sigma-Aldrich, M-1302 according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR (qPCR) were done in duplicate using the StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems), Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4367659), according to manufacturer's instructions. Expression level was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Primers for *CDH1*, *CDH2*, *VIMENTIN*, *EPCAM*, *ZEB-1*, *ZEB-2* and *SNAIL* were obtained from⁵³ *GADD45 A*, *SMUG*, *AICA*, *DNMT1*, *DNMT3 A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2* and *TET3* primers were obtained from QuantiTect Primer Assays.

Invasion test

Cell invasion assay was performed using cell culture inserts with 8 μm pore size coated with Matrigel. A549 cells (180.000 cells/well) suspended with 100 μl DMEM were seeded in the upper side of the chamber. In the lower side of the chamber, 500 μl DMEM was added. TGFβ and/or TNF-α were added into both sides of the chamber. After 24 h, cells on the lower surface of the chamber were trypsinized, suspended in DMEM and counted with a trypan blue. The experiments were performed with duplicate, and repeated 3 times.

Epigenetics

The ChIP were performed using ChIP-IT kit (Active Motif) as preconized by the manufacturer and chromatin was obtained from cells sonicated with the Bioruptor (Diagenode). For the DNA methylation experiments, gDNA was extracted using the Nucleospin tissue kit (Macherey Nagel) or using the QiaCube (Qiagen) and global DNA methylation or global 5hmC content were measured by ELISA on 100 ng gDNA using the MethylFlash methylated DNA quantification kit (Epigentek) or the MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation (5-hmC) ELISA Easy Kit (Epigentek). PD-L1 promoter methylation was quantified by qMSRE with the OneStep qMethyl (ZYMOresearch) on the region -173/-68 with the primers 5'-TCCTAG-GACACCAACACTAGATACCTAAAC-3' and 5'-TCTGCCC AAGGCAGCAA-3'. Antibodies used are listed in Table 1.

Tissue samples, immunohistochemistry and immunostaining assessment

Paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer were collected [in collaboration with the Tissue Biobank of the University of Liege (Liege, Belgium)] and stained with both anti-vimentin (clone V9, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) and anti-PD-L1 (knockout validated clone 28-8,

Abcam, Cambridge, MA, USA) antibodies. The original diagnosis of each case was confirmed by experienced histopathologists. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Liege. Immunohistochemical analysis was performed with a standard protocol detailed previously.⁵⁴ Based on epithelial vimentin expression, the tissue samples were classified into two groups: EMT-positive *versus* EMT-negative. Regarding PD-L1 immunoreactivity in epithelial (tumor) cells, a semi-quantitative score of the intensity (0: negative; 1: low; 2: moderate; 3: strong) and extent (0: <5% of positive cells; 1: 6–33%; 2: 34–66%; 3: >67%) of the staining according to an arbitrary scale was used. As previously described,⁵⁵ the results obtained with the two scales were multiplied and a global score ranged between 0 and 9 was obtained. All immunolabelled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

ELISA assay and NFkB activity

Cells were cultured in 25 cm² dishes and treated with TNF α , TGF β or combination of these two cytokines. IFN γ production was measured by using IFN γ ELISA kit (Diacclone, France) with 100 μ l of supernatant of treated cells in according to manufacturer's instructions. PD-L1 was measured using the Human PD-L1 ELISA kit (Abcam ab214565). NFkB activity was measured using the TransAM[®] NFkB kit (Active Motif).

Conflict of interest

"The authors declare no potential conflicts of interest."

Acknowledgments

"The PFC/AN's work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01". This work was also supported by the university of Franche-Comté and grants of "La Ligue contre le cancer #001AC.2015" and "la Région Franche-Comté".

Funding

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (001AC.2015), LabEX IGO, University of Franche-Comté, Région Franche-Comté and the ANR(ANR-11-LABX-0016-01).

Author contributions

AA, AK, GJ, GD, MV, PJR, BJ, TC, HM, HE, PP, HE, NA, CPF performed experiments; BC, HE, CPF analyzed results; AA, BC, HE wrote the manuscript; AO, GY, HE, GJ, CB, CPF, BGM, PP revised the manuscript; all authors provided final approval.

References

1. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–1428. doi:10.1172/JCI39104.
2. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6–7):303–314. doi:10.1002/emmm.200900043.
3. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):131–142. doi:10.1038/nrm1835.
4. Garg M: Epithelial-mesenchymal transition – activating transcription factors – multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*. 2013;5(4):188–195. doi:10.4252/wjsc.v5.i4.188.
5. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5–6):396–403. doi:10.1016/j.semcancer.2012.04.001.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
7. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A 5-year-follow-up study. *Tumori*. 2012;98(6):751–755.
8. Shi MH, Xing YF, Zhang ZL, Huang JA, Chen YJ. [Effect of soluble PD-L1 released by lung cancer cells in regulating the function of T lymphocytes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013;35(2):85–88.
9. Prat A, Navarro A, Pare L, Reguart N, Galvan P, Pascual T, Martinez A, Nuciforo P, Comerma L, Alos L, et al. Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. *Cancer Res*. 2017;77(13):3540–3550. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3556.
10. Ascierto PA, McArthur GA. Checkpoint inhibitors in melanoma and early phase development in solid tumors: what's the future? *J Transl Med*. 2017;15(1):173. doi:10.1186/s12967-017-1278-5.
11. Noman MZ, Janji B, Abdou A, Hasmim M, Terry S, Tan TZ, Mami-Chouaib F, Thiery JP, Chouaib S. The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1263412. doi:10.1080/2162402X.2016.1263412.
12. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. 2005;6:56. doi:10.1186/1465-9921-6-56.
13. Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T. Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp Lung Res*. 2010;36(1):12–24. doi:10.3109/01902140903042589.
14. Saito A, Suzuki HI, Horie M, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-beta and TNF-alpha possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56587. doi:10.1371/journal.pone.0056587.
15. Deng W, Gowen BG, Zhang L, Wang L, Lau S, Iannello A, Xu J, Rovis TL, Xiong N, Raulet DH. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science*. 2015;348(6230):136–139. doi:10.1126/science.1258867.
16. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001;413(6852):165–171. doi:10.1038/35093109.
17. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734–738. doi:10.1038/nature01112.
18. Liu X. Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008;65(12):935–944. doi:10.1002/cm.20315.
19. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004;114(4):569–581. doi:10.1172/JCI200421358.
20. Radisky DC, Bissell MJ. NF-kappaB links oestrogen receptor signalling and EMT. *Nat Cell Biol*. 2007;9(4):361–363. doi:10.1038/ncb0407-361.
21. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional

- upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 2012;72(5):1290–1300. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3123.
22. Kumar M, Allison DF, Baranova NN, Wamsley JJ, Katz AJ, Bekiranov S, Jones DR, Mayo MW. NF-kappaB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e68597. doi:10.1371/journal.pone.0068597.
 23. Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR, Kim Y. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett.* 2004;571(1–3):50–54. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.056.
 24. Kumar A, Negi G, Sharma SS. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13(8):750–758. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01402.x.
 25. Cardenas H, Vieth E, Lee J, Segar M, Liu Y, Nephew KP, Matei D. TGF-beta induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Epigenetics.* 2014;9(11):1461–1472. doi:10.4161/15592294.2014.971608.
 26. Chen LH, Hsu WL, Tseng YJ, Liu DW, Weng CF. Involvement of DNMT 3B promotes epithelial-mesenchymal transition and gene expression profile of invasive head and neck squamous cell carcinomas cell lines. *BMC Cancer.* 2016;16:431. doi:10.1186/s12885-016-2468-x.
 27. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156–172. doi:10.1038/cr.2009.5.
 28. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3804–3809. doi:10.1172/JCI57099.
 29. Gao D, Vahdat LT, Wong S, Chang JC, Mittal V. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(19):4883–4889. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1223.
 30. Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell.* 2011;145(6):926–940. doi:10.1016/j.cell.2011.04.029.
 31. Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K. TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J Biochem.* 2012;151(2):205–216. doi:10.1093/jb/mvr136.
 32. Karin M: Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441(7092):431–436. doi:10.1038/nature04870.
 33. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 2014;5:5241. doi:10.1038/ncomms6241.
 34. Burr ML, Sparbier CE, Chan YC, Williamson JC, Woods K, Beavis PA, Lam EYN, Henderson MA, Bell CC, Stolzenburg S, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature.* 2017;549(7670):101–105. doi:10.1038/nature23643.
 35. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–264. doi:10.1038/nrc3239.
 36. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3–potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):45–56. doi:10.1038/nri3790.
 37. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365–1369. doi:10.1038/70932.
 38. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261–268. doi:10.1038/85330.
 39. Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, Arthur CD, Lee SH, Hundal J, Selby MJ, Graziano RF, Mardis ER, Korman AJ, et al. Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(2):106–117. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0391.
 40. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med.* 2014;211(5):781–790. doi:10.1084/jem.20131916.
 41. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280 A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563–567. doi:10.1038/nature14011.
 42. Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(17):4514–4521. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3224.
 43. Marwitz S, Scheufele S, Perner S, Reck M, Ammerpohl O, Goldmann T. Epigenetic modifications of the immune-checkpoint genes CTLA4 and PDCD1 in non-small cell lung cancer results in increased expression. *Clin Epigenetics.* 2017;9:51. doi:10.1186/s13148-017-0354-2.
 44. Pechalrieu D, Etievant C, Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochem Pharmacol.* 2017; 129:1–13. doi:10.1016/j.bcp.2016.12.004.
 45. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(4):327–330. doi:10.1093/jnci/95.4.327.
 46. Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2008;10(3):266–278. doi:10.1593/neo.07947.
 47. Pufulete M, Al-Ghnanem R, Khushal A, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. *Gut.* 2005;54(5):648–653. doi:10.1136/gut.2004.054718.
 48. Hervouet E, Debieu E, Campion L, Charbord J, Menanteau J, Vallette FM, Cartron PF. Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3519–3529. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2062.
 49. Knutson KL, Lu H, Stone B, Reiman JM, Behrens MD, Prosperi CM, Gad EA, Smorlesi A, Disis ML. Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J Immunol.* 2006;177(3):1526–1533. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1526.
 50. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 2009; 15(3):195–206. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.023.
 51. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, et al. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2009;69(7):2887–2895. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3343.
 52. Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Andre F, De Cremoux P, Bertheau P, Badoual C, Vielh P, Larsen AK, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-cell-Mediated Lysis. *Cancer Res.* 2013;73(8):2418–2427. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2432.
 53. Gemmill RM, Roche J, Potiron VA, Nasarre P, Mitas M, Coldren CD, Helfrich BA, Garrett-Mayer E, Bunn PA, Drabkin HA. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2011;300(1):66–78. doi:10.1016/j.canlet.2010.09.007.
 54. Herfs M, Longuespee R, Quick CM, Roncarati P, Suarez-Carmona M, Hubert P, Lebeau A, Bruyere D, Mazzucchelli G, Smargiasso N, et al. Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *The Journal of pathology.* 2017;241(4):522–533. doi:10.1002/path.4858.
 55. Hubert P, Herman L, Roncarati P, Maillard C, Renoux V, Demoulin S, Ericum C, Foidart JM, Boniver J, Noel A, et al. Altered alpha-defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: Implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *The Journal of pathology.* 2014;234(4):464–477. doi:10.1002/path.4435.

ARTICLE

Open Access

EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes

Paul Peixoto^{1,2}, Amandine Etcheverry^{3,4,5,6,7}, Marc Aubry^{3,4,5,6,7}, Anaïs Missey¹, Camille Lachat¹, Jérôme Perrard¹, Elodie Hendrick⁸, Régis Delage-Mourroux¹, Jean Mosser^{3,4,5,6,7}, Christophe Borg^{1,9,10}, Jean-Paul Feugeas¹, Michaël Herfs⁸, Michaël Boyer-Guittaut^{1,2,11} and Eric Hervouet^{1,2,11}

Abstract

Type III epithelial–mesenchymal transition (EMT) has been previously associated with increased cell migration, invasion, metastasis, and therefore cancer aggressiveness. This reversible process is associated with an important gene expression reprogramming mainly due to epigenetic plasticity. Nevertheless, most of the studies describing the central role of epigenetic modifications during EMT were performed in a single-cell model and using only one mode of EMT induction. In our study, we studied the overall modulations of gene expression and epigenetic modifications in four different EMT-induced cell models issued from different tissues and using different inducers of EMT. Pangenomic analysis (transcriptome and ChIP–sequencing) validated our hypothesis that gene expression reprogramming during EMT is largely regulated by epigenetic modifications of a wide range of genes. Indeed, our results confirmed that each EMT model is unique and can be associated with a specific transcriptome profile and epigenetic program. However, we could select some genes or pathways that are similarly regulated in the different models and that could therefore be used as a common signature of all EMT models and become new biomarkers of the EMT phenotype. As an example, we can cite the regulation of gene-coding proteins involved in the degradation of the extracellular matrix (ECM), which are highly induced in all EMT models. Based on our investigations and results, we identified ADAM19 as a new biomarker of in vitro and in vivo EMT and we validated this biological new marker in a cohort of non-small lung carcinomas.

Introduction

Type III epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a reversible process that contributes to invasion and metastasis. EMT is characterized by a downregulation of epithelial markers and an increase in mesenchymal markers and in EMT-linked transcription factors¹, but the molecular mechanisms governing EMT remain poorly understood. For the past decade, the role of epigenetics in EMT regulation has clearly emerged. For example, the

histone methyl transferase (HMT) EZH2 was required to downregulate *miR211* and EMT induction in glioblastoma multiforme², but, on the opposite, the histone demethylase KDM6B induced SNAIL2 and EMT³. The interaction of the transcription factor TWIST with another HMT, KMT5/SET8, has also been associated with the repression of *CDH1*⁴. Although these publications strongly support a role for epigenetic modifications during EMT, they all have been described in the same subtype of cancer or a single EMT cell model. Moreover, the high number of EMT markers described from one model to another suggest that EMT is a complex mechanism linked to different signaling pathways⁵ that led us to the hypothesis of the existence of numerous tissue- or cell-specific EMT.

Correspondence: Eric Hervouet (eric.hervouet@univ-fcomte.fr)

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

²EPIGENEXP Platform, University of Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

Full list of author information is available at the end of the article.

Edited by D. Aberdam

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

To further characterize the epigenetic mechanisms regulating EMT, we decided to study overall gene expression and their associated epigenetic modifications in several EMT models. To do so, we used the A549 (non-small cell lung cancer (NSCLC)), the ACHN (renal cell carcinoma derived from pleural effusion), and the immortalized breast MCF10A cell lines treated, or not, with transforming growth factor beta (TGF β)/tumor necrosis factor alpha (TNF α) to induce EMT⁶. To confirm that the observed effects were not linked to the use of this combination of cytokines, we also used the breast cancer (BC) MDA-MB-468 cells treated, or not, with epidermal growth factor (EGF)⁷. As expected, using microarray and chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing (ChIP-seq) analyses, we showed that EMT-associated genes were largely regulated by epigenetic modifications. Our results also demonstrated, for the first time, that cell origin and EMT inducer were associated with a specific cellular response. However, the regulation of genes involved in the degradation of the extracellular matrix (ECM), in particular *ADAM19* (ADAM Metallopeptidase Domain 19) coding a metallopeptidase, was strongly regulated by epigenetics during EMT, independently of the EMT model, and we showed that epigenetic modifications were crucial for EMT in these cancer models.

Results

EMT-induced cell models

Our initial goal was to study the effects of EMT inducers on cells issued from different organs (lung, kidney, and breast). We then treated A549, ACHN, and MCF10A cells with TGF β /TNF α . TGF β is a well-admitted EMT inducer and TNF α has been described to potentiate EMT induction by stabilizing SNAIL in a nuclear factor- κ B-dependent manner^{8,9}. Following induction, a strong mesenchymal-like phenotype with the loss of cell–cell adhesion and an increase in cell elongation occurred (Fig. 1a). We next observed using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR) that EMT markers were induced in the three cell lines but the fold changes were dependent of the cell line (Fig. 1b). We indeed quantified a strong decrease in epithelial markers *CDH1* and *EPCAM* and an increase in mesenchymal markers *SNAIL1*, *VIM*, *ZEB1*, and *ZEB2* in the three models but the increase in *VIM*, *ZEB1*, and *ZEB2* expression was higher in A549 and MCF10A cells compared to the ones observed in the ACHN cells, suggesting that EMT induction is, at least partially, different in regard to cell origin. Regarding *MMP9* mRNA expression, an increase was observed in the three cell lines during EMT (Supp Fig. 1A/C). These data were confirmed at the protein level since we detected a strong decrease in *EPCAM* expression in these cell lines using flow cytometry (Fig. 1c) and a significant decrease in E-

CADHERIN levels together with an increase of VIMEN-TIN in A549 and ACHN cells using western blotting (WB) and immunofluorescence (IF) (Supp Fig. 1B; Supp Fig. 1C).

Transcriptome analysis of EMT-induced models

Next, we decided to compare the EMT-linked gene expression in A549, ACHN, and MCF10A cell lines using microarray. High (red) or low decreased (green) gene expression was classified in regard to the cell line model and TGF β /TNF α treatment (Fig. 2a) ($n = 4$). In the A549 cells, 3636 probes were differentially expressed (DE) in treated versus control conditions (1763 upregulated and 1873 downregulated). In the ACHN cells, 1141 probes were DE (624 upregulated and 517 downregulated). In the MCF10A cells, 4683 probes were DE (2092 upregulated and 2591 downregulated) (Supp Table 1). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) performed on the 258 TGF β /TNF α -regulated genes identified activated canonical pathways related to ECM organization and remodeling, Beta1 integrin cell surface interactions, and focal adhesion (Supp Table 1). A list of the 30 genes presenting the highest fold change expression within the three cell lines is reported in Table 1. Among these genes, the expression of *MMP1*, *MMP9*, *MMP10*, *ADAM19*, or *ADAMTS6*, a family of proteins involved in ECM remodeling¹⁰, presented a 126-, 114-, 43-, 27-, and 34-fold increase, respectively. On the opposite, the expression of *CDH1* (41-fold decrease) was 1 of the only 2 genes downregulated among our selected list of 30 (Table 1). The induction of matrix metalloproteinase (MMP) protein levels (intracellular MMP9 by WB) and its activity (zymography) were confirmed in the A549 model (significant increase in excreted MMP2 ($p = 0.002$) and MMP9 ($p = 0.016$); Supp Fig. 2). Altogether, these data validated our EMT models as well as our protocol design to search for new regulated genes during EMT.

We also confirmed (Fig. 1) that morphological modifications were related to EMT in our models, and then the differential expression of the 12 main EMT markers was quantified in each cell line (Table 2). As expected and described above, *CDH1* expression was highly significantly decreased in the three cell lines following TGF β /TNF α treatment and similar results were obtained for *EPCAM*, but the expression of other EMT markers was not consistent throughout the three cell lines. For example, *ZEB1* expression was increased in both A549 and MCF10A cells but stable in ACHN cells (Table 2). These data strongly suggested that different and independent molecular signaling pathways might regulate different model-linked EMT. We then established Venn diagrams describing the distribution of upregulated and downregulated genes and we observed that only 73 genes were concomitantly downregulated while 189 were

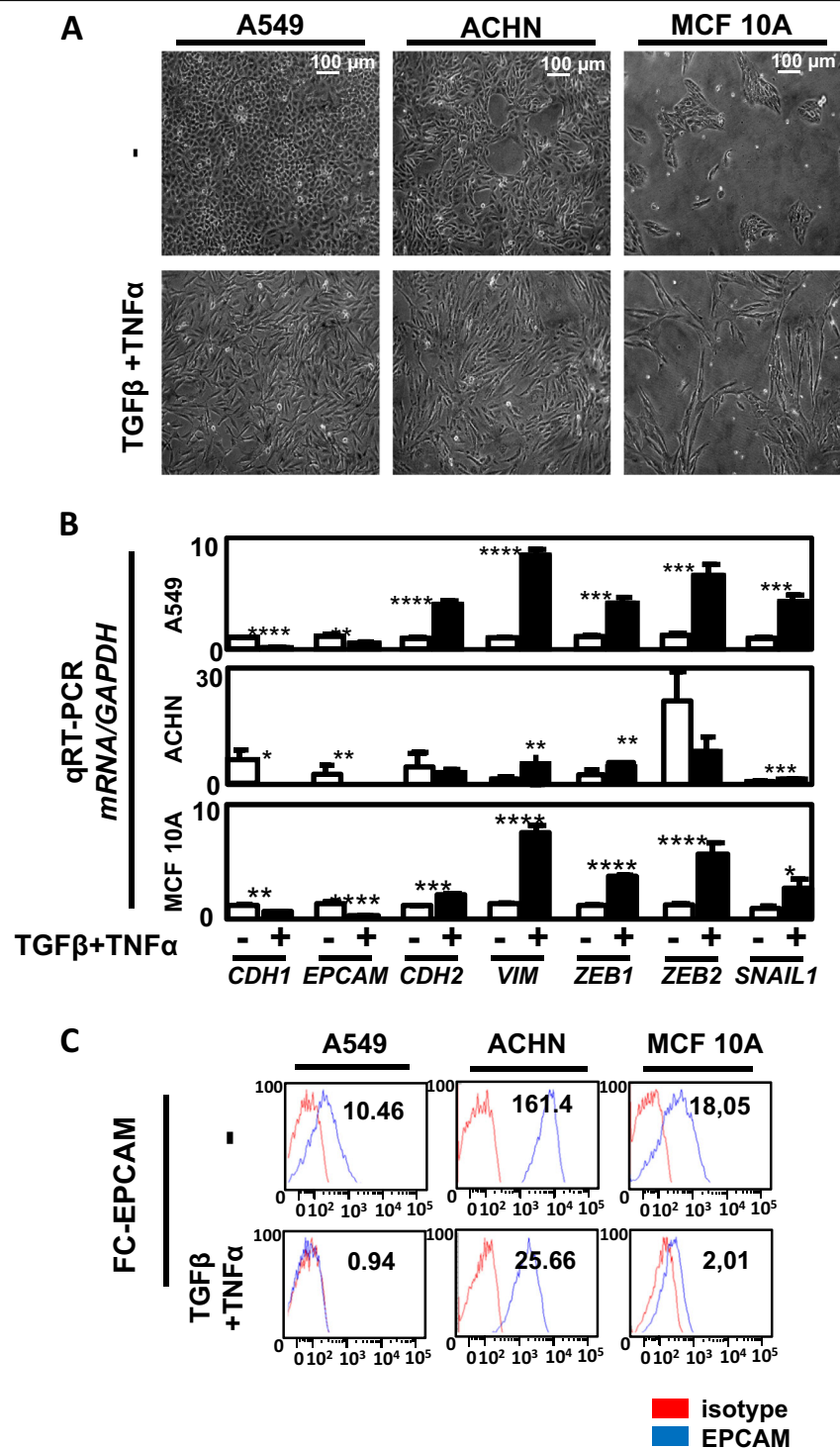


Fig. 1 Transforming growth factor beta (TGF β)/tumor necrosis factor alpha (TNF α) treatment induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the A549, ACHN, and MCF10A models. **a** A549, ACHN, and MCF10A cells were seeded in 6-multiwell dishes and treated for 5 days with TGF β and TNF α . The pictures presented are representative of at least three independent experiments. **b** Expression of epithelial gene markers (*CDH1* and *EPCAM*), mesenchymal gene markers (*CDH2*, *VIMENTIN*) and EMT-linked transcription factors (*ZEB1*, *ZEB2*, and *SNAIL1*) were measured by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (independent triplicates) in cells treated with or without TGF β /TNF α for 5 days (white bars: untreated; black bars: TGF β /TNF α). **c** A decrease of the epithelial marker EPCAM was confirmed using flow cytometry in the 3 cell lines following treatment with TGF β /TNF α for 5 days

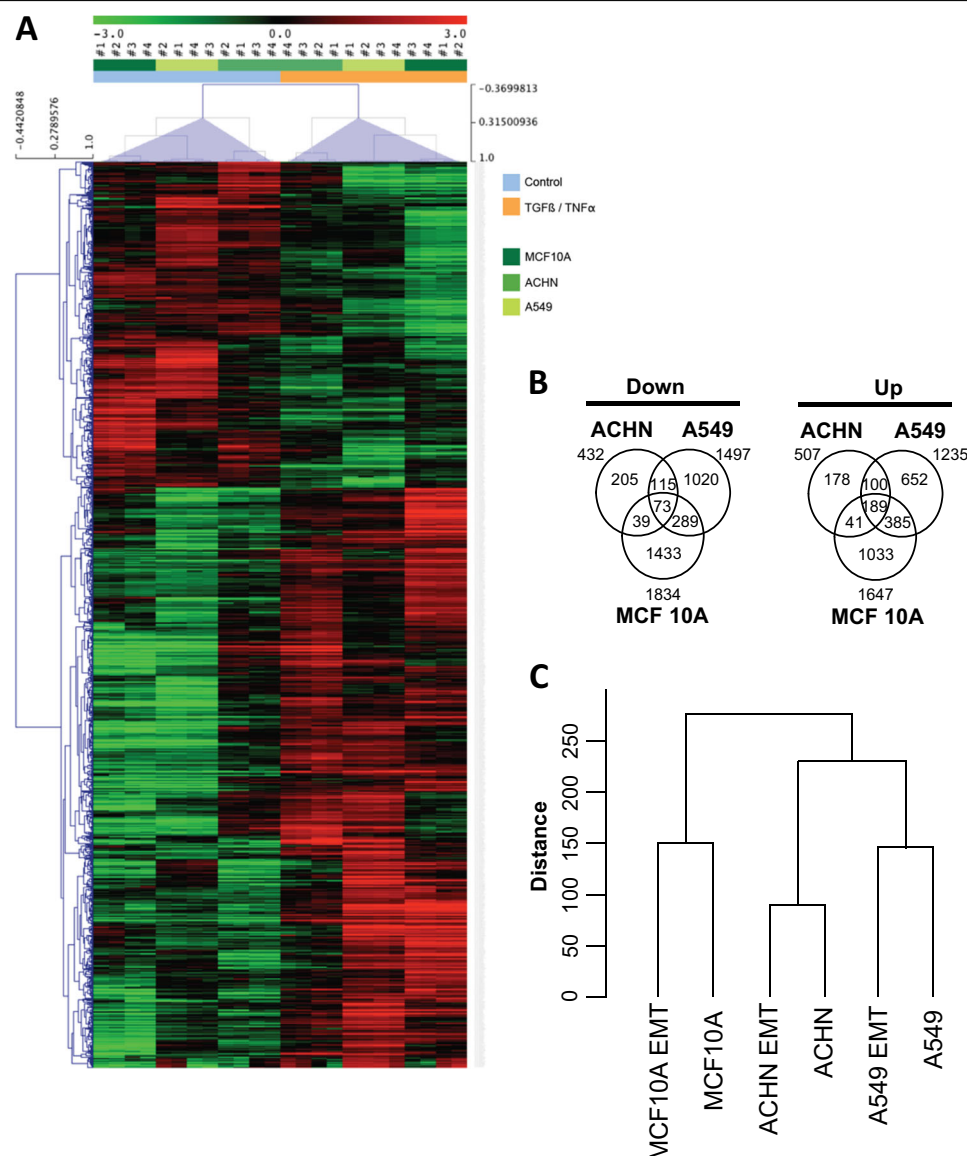


Fig. 2 Transcriptome analysis of genes regulated during epithelial-mesenchymal transition induction **a** Gene expression was quantified by microarray in A549, ACHN, and MCF10A cells treated with or without transforming growth factor beta/tumor necrosis factor alpha for 5 days ($n = 4$). **b** Venn diagrams showing the distribution of upregulated and downregulated genes in the three cell lines. **c** Cluster dendrogram of the different transcriptomes

concomitantly upregulated in the 3 cell lines during EMT (Fig. 2b), with most of the dysregulated genes (up or down) modified in only one or two models. Unsupervised hierarchical clustering analysis of the probes displaying the greatest variation among the samples (standard deviation) showed that transcriptomes were first clustered by cell line and then by TGFβ/TNFα treatment, confirming that differences in transcriptome profiles were primarily due to cell origin and secondarily to EMT induction (Fig. 2c).

To determine whether these different EMT phenotypes were dependent of the time of TGFβ/TNFα treatment, we

performed a kinetic analysis from 24 to 120 h treatment with TGFβ/TNFα or each cytokine alone in A549 and ACHN cells (Supp Fig. 3). As expected, a progressing mesenchymal-like phenotype was observed along the course of treatment (Supp Figs. 3A and 3B) but the phenotype was the most pronounced with both cytokines. A progressive increase in *VIMENTIN*, *ZEB1*, and *SNAIL* and decrease in *CDH1* and *EPCAM* gene expression levels were observed during the treatment and were further increased with TGFβ/TNFα compared to each cytokine alone (Supp Fig. 2C and Supp Fig. 4A). A *VIMENTIN* IF confirmed these data at the protein level and it was more

Table 1 List of the 30 genes with the most important modification of expression after TGFβ and TNFα treatment

Gene	p Value	Up/down	Fold	Protein type/RNA	Pathways
CCL5	4.2E−9	Up	131.8	Chemokine	Immunoregulation
IL7R	9.7E−10	Up	149.4	Interleukin receptor	Immunoregulation
MMP1	3.5E−1	Up	126	Matrix metalloproteinase	Invasion
MMP9	2.2E−4	Up	114.1	Matrix metalloproteinase	Invasion
C4orf26	1.0E−4	Up	100.1	Extracellular protein	Mineralization
UBD	1.4E−5	Up	105.8	Ubiquitin	Protein ubiquitination/TNF pathway
LCE3D	0.0039	Up	99.2	Late cornified envelope	Keratinization/development
INHBA	0.0040	Up	82.6	FSH secretion inhibitor	Growth/differentiation factor
CSF2	0.0070	Up	66.5	Cytokine	Immunoregulation
SLAMF8	3.9E−6	Up	60.4	Cell surface receptor	Immunoregulation
ROBO4	2.0E−7	Up	62.4	Cell surface receptor	Angiogenesis/migration
MROH3P	1.5E−6	Up	40.0	pseudogene	
CDH1	0.0011	Down	40.8	Cadherin	Cell adhesion
MMP10	1.5E−5	Up	42.6	Metalloproteinase	Invasion/metastasis
FAP	0.00389	Up	45.1	Cell surface protein	Invasion/immunoregulation/tumor growth
lnc-C15orf48-1	1.9E−6	Up	45.2	Non-coding RNA	
C15orf48	0.0012	Up	47.0		Metabolism
lnc-LRRC1-5	1.3E−5	Up	47.7	Non-coding RNA	
LAMC2	2.1E−5	Up	47.8	Extracellular protein	Adhesion/differentiation/migration/metastasis
FGFBP1	0.0014	Down	48.3	Extracellular protein	Cell proliferation/differentiation/migration
NLRP3	0.0039	Up	30.9	Cell signaling	Inflammation/apoptosis
BMP2	0.0013	Up	33.6	Cytokine	Differentiation
KANK4	0.0060	Up	34.0	Cell signaling	Cytoskeleton remodeling
ADAMTS6	9.3E−5	Up	34.2	Metalloproteinase	Migration/Invasion
DHRS2	2.0E−6	Up	38.9	Dehydrogenase/reductase	
DCN	7.0E−5	Up	39.7	Proteoglycan	Migration /TGFβ signaling
LCE3E	0.0016	Up	29.8	Late cornified envelope	Keratinization/development
CXCL8	7.3E−5	Up	29.6	Chemokine	Inflammation
LINC01583	6.2E−6	Up	28.1	Non-coding RNA	
ADAM19	9.3E−7	Up	27.4	Metalloproteinase	Adhesion

List of 30 genes issued from microarrays analysis with the most important fold increase or decrease expression. All transcriptome profiles were simultaneously analyzed (16 NT (A549 NT $n = 4$, ACHN NT $n = 4$, MCF10A cells NT $n = 4$) versus 16 TGFβ/TNFα treated 16 NT (A549 treated $n = 4$, ACHN treated $n = 4$, MCF10A cells treated $n = 4$). Name of the gene, p value, fold change, and molecular-associated mechanisms (except for genes with unknown functions) are indicated. TGFβ transforming growth factor beta, TNFα tumor necrosis factor alpha

pronounced in A549 cells compared to ACHN (Supp Fig. 4B) and with the double treatment (data not shown).

Global modulation of epigenetic marks during EMT

We next wondered whether epigenetic modifications occurred in these cells and whether the epigenetic mechanisms were similar in these different models. To do so, we used an enzyme-linked immunosorbent assay protocol to quantify 21 posttranslational H3 modifications

in ACHN cells treated, or not, with TGFβ/TNFα (Fig. 3a). This experiment suggested that global histone methylation of H3K4, H3K9, and H3K27 were highly modified during EMT, while only low changes were observed for acetylation or phosphorylation of H3, apart from H3K14ac. We then performed IF (Fig. 3b, c) and flow cytometric (Fig. 3d) analyses of global H3K4me2, H3K9me3, and H3K27me3 in the three cell lines following TGFβ/TNFα treatment and indeed confirmed an

Table 2 Expression of genes related to EMT after TGF β and TNF α treatment

Gene	Protein	Cells	<i>p</i> Value	Up/down	Fold	Marker
CDH1	E-CADHERIN	A549	1.6E−6	Down	250	Epithelial
		ACHN	0.007	Down	105	
		MCF10A	8.1E−4	Down	2.6	
EPCAM	EPCAM	A549	0.001	Down	14	Epithelial
		ACHN	0.001	Down	2.8	
		MCF10A	1.7E−4	Down	32	
CDH2	N-CADHERIN	A549	3.9E−4	Up	5.2	Mesenchymal
		ACHN	0.001	Up	2.0	
		MCF10A	1.8E−4	Up	6.3	
VIM	VIMENTIN	A549	0.003	Up	2.0	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
ZEB1	ZEB1	A549	1.6E−4	Up	2.6	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	0.001	Up	3.8	
ZEB2	ZEB1	A549	6.3E−4	Up	2.8	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	0.001	Up	2.8	
SNAI1	SNAIL1	A549	3.1E−5	Up	2.8	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	2.0E−4	Up	7.0	
OCLN	OCCUDIN	A549	0.0010	Down	2.4	Epithelial
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
ETS1	ETS1	A549	2.1E−5	Up	3.2	Mesenchymal
		ACHN	0.0024	Up	2.5	
		MCF10A	2.7E−5	Up	11.85	
FN1	FIBRONECTIN	A549	2.2E−4	Up	11.7	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	0.0091	Up	68.4	
SDC1	SYNDECAN-1	A549	3.0E−5	Up	2.8	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
SNAI2	SLUG	A549	3.5E−6	Up	17.6	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	—			

List of genes issued from microarrays analysis ($n = 4$) in A549, ACHN, or MCF10A cells. *p* Value and fold change are indicated for each cell line. Epithelial markers (*CDH1*, *EPCAM*, *OCLN*, *SDC1*), mesenchymal markers (*CDH2*, *VIMENTIN*, *ETS1*, *FN1*), and EMT-ATFs (*ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*) were analyzed. EMT epithelial–mesenchymal transition, TGF β transforming growth factor beta, TNF α tumor necrosis factor alpha.

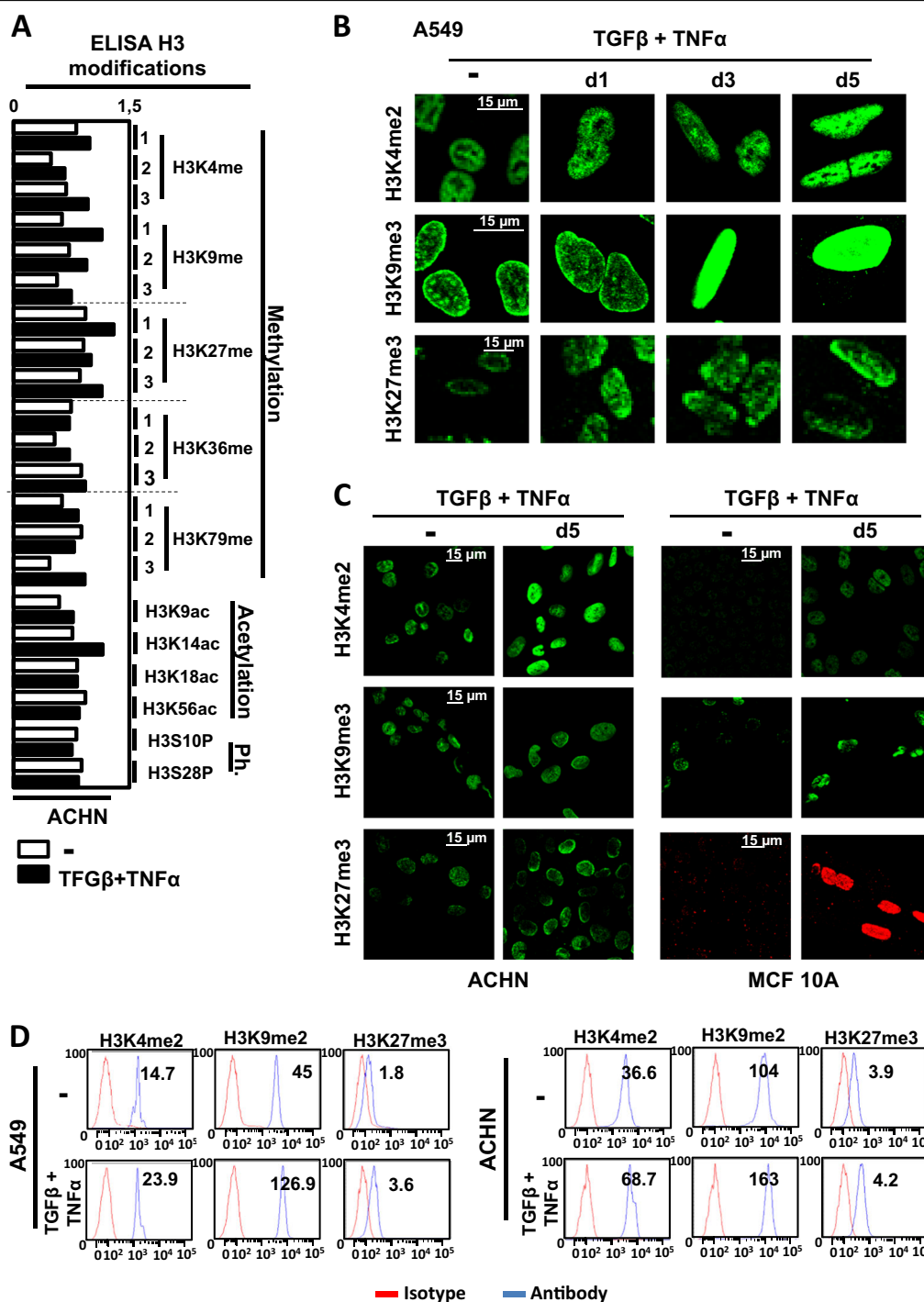


Fig. 3 Transforming growth factor beta (TGFβ)/tumor necrosis factor alpha (TGFβ/TNFα) treatment regulates histone H3 modifications.

a Histones were purified from ACHN cells treated with or without TGFβ/TNFα for 5 days. Twenty-one posttranslational modifications of histone H3 (acetylation: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K56ac; methylation: H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3, H3K79me1, H3K79me2, H3K79me3; and phosphorylation: H3S10P, H3S28P) were quantified using a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay. Values were normalized to total H3 content in the same measurement. Each bar represents the mean of two independent measurements and each one was obtained from a mix of two independent histone extractions.

b, c Increase staining of H3K4me2, H3K9me3, and H3K27me3 marks observed using immunofluorescence in A549, ACHN, and MCF10A cells treated with or without TGFβ/TNFα for 5 days. Each picture is representative of a typical result from at least three independent experiments. **d** Increased staining in H3K4me2, H3K9me3, and H3K27me3 marks quantified using flow cytometry in A549, ACHN, and MCF10A cells treated with or without TGFβ/TNFα for 5 days (representative results of at least 3 independent experiments)

important increase in these different marks during EMT. These strong global histone modifications observed during EMT suggested that epigenetics might play a pivotal role in transcription reprogramming during EMT.

Genes involved in ECM degradation were regulated by epigenetics in TGF β -/TNF α -treated cells

Since >90% of the most DE genes in our models were overexpressed during EMT, we decided to conduct ChIP-seq analyses in A549 cells treated, or not, with TGF β /TNF α to target the H3K4me2 mark. Then we crossed our ChIP-seq data with the transcriptomes (Fig. 4). We detected 1952 H3K4me2 regions that were significantly enriched in TGF β -/TNF α -treated cells versus non-treated cells (1740 upregulated and 212 downregulated) (Fig. 4a and Supp Table 3), with most of these H3K4me2 regions located in introns (46%) (Supp Fig. 5). BETA analysis predicted an activating function of the H3K4me2 mark with a cumulative fraction of genes significantly above background for upregulated genes (Fig. 4b) and indeed identified 614 upregulated genes potentially activated by the H3K4me2 mark (Fig. 4a, Supp Table 4). Regarding these genes, the H3K4me2 mark was predominantly enriched in introns (81%) (Supp Fig. 5). Among the most significantly activated canonical pathways, identified by GSEA, we once again found genes linked to ECM organization, Beta1 integrin cell surface interactions, and focal adhesion (Supp Table 3). Among the overexpressed genes identified in the transcriptome analysis, 23% were found in the 614 genes potentially activated by the H3K4me2 mark.

To confirm that the expression of genes involved in ECM were indeed linked to epigenetic modifications during EMT, we selected *ADAM19* (22.6-, 4.5-, and 30.7-fold increase in A549, ACHN, and MCF10A, respectively) and *MMP9* (187- and 1000-fold increase in A549 and MCF10A, respectively, but no change in ACHN). The *SCNN1A* gene (12- and 4.5-fold decrease in A549 and MCF10A, respectively, but no change in ACHN cells) was used as a negative control. First, we confirmed a progressive modulation of *ADAM19*, *MMP9* and *SCNN1A* expression during EMT (Fig. 4d and Supp Fig. 6A). Next, we confirmed the epigenetic regulation during EMT using ChIP analysis (Fig. 4e). TGF β /TNF α -induced EMT was clearly associated with an increase in the H3K4me2 mark on the promoters of *ADAM19* and *MMP9* and a decrease on the *SCNN1A* promoter. Moreover, ChIP targeting the repressive mark H3K27me3 showed opposite profiles on these promoters (Fig. 4e). We also established the progressive modification of these epigenetic marks during TGF β /TNF α treatment as illustrated by kinetic ChIP experiments (Supp Fig. 6B). Since MCF10A cells are unable to form tumors in vivo, we also confirmed the induction of *MMP9* and *ADAM19* expression in MDA-

MB-157 induced in EMT (Supp Figs. 7A and 7B). Moreover, no induction of these genes was observed in MCF-7, which failed to initiate EMT, whereas a strong expression of both *MMP9* and *ADAM19* was quantified in the mesenchymal MDA-MB-231 cells.

The epigenetic regulation of genes involved in ECM degradation was independent of the EMT inducer

Even if we already used three different EMT models, we next wondered whether these results could be reproduced in a different and independent model to answer the fact that our observations might only be dependent of the TGF β /TNF α treatment. We chose the epithelial MDA-MB-468 breast cells in which EMT can be induced using EGF⁷. After 2 days of EGF treatment, an important proportion of cells presented an increased tubular shape (Fig. 5a) together with an increase in the expression of *VIMENTIN* and *SNAIL1* and a decrease in *CDH1* (Fig. 5b). EMT was also confirmed by increased VIMENTIN staining in IF (Fig. 5c) and increased SNAIL-1 levels in WB (Fig. 5d). We also confirmed a global increase in H3K4me2 and H3K27me3 in MDA-MB-468 treated with EGF (Fig. 5e). We next quantified the expression of our ECM remodeling genes in this new model and described that *ADAM19* expression was upregulated following EGF treatment (Fig. 5f). Moreover, this upregulation was correlated to an increase in the H3K4me2 mark on the *ADAM19* promoter together with a decrease in the H3K27me3 mark (Fig. 5g).

In vivo confirmation of the regulation of genes involved in ECM degradation in EMT

To address the question whether the genes involved in the degradation of the ECM degradation was associated with EMT and aggressive subtypes in vivo, we performed a retrospective analysis using previously published transcriptomes issued from NSCLC microarrays (Fig. 6a). We also added the expression of EMT markers as well as the expression of the genes of the ECM degradation signature identified in A549 (upregulated: *ADAM19*, *ADAMTS6*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-10*, *MMP-9*, *IL32*, downregulated: *SCNN1A*) on this graph. (Fig. 6a, c). As expected, large ADK or squamous lung cancers, which are associated with higher risks of metastasis compared to adenocarcinoma, presented a high expression of the ECM degradation genes and a low expression of epithelial markers compared to normal tissues. These data confirmed that ECM degradation biomarkers induced in our EMT models were associated with EMT and aggressiveness in vivo. Since we also confirmed the ECM degradation signature in our BC models, we analyzed 2627 transcriptomes from BC (Fig. 6b, d). The different subtypes, Luminal A, Her2, Basal, or normal breast tissues, were plotted on a three-dimensional diagram based on the

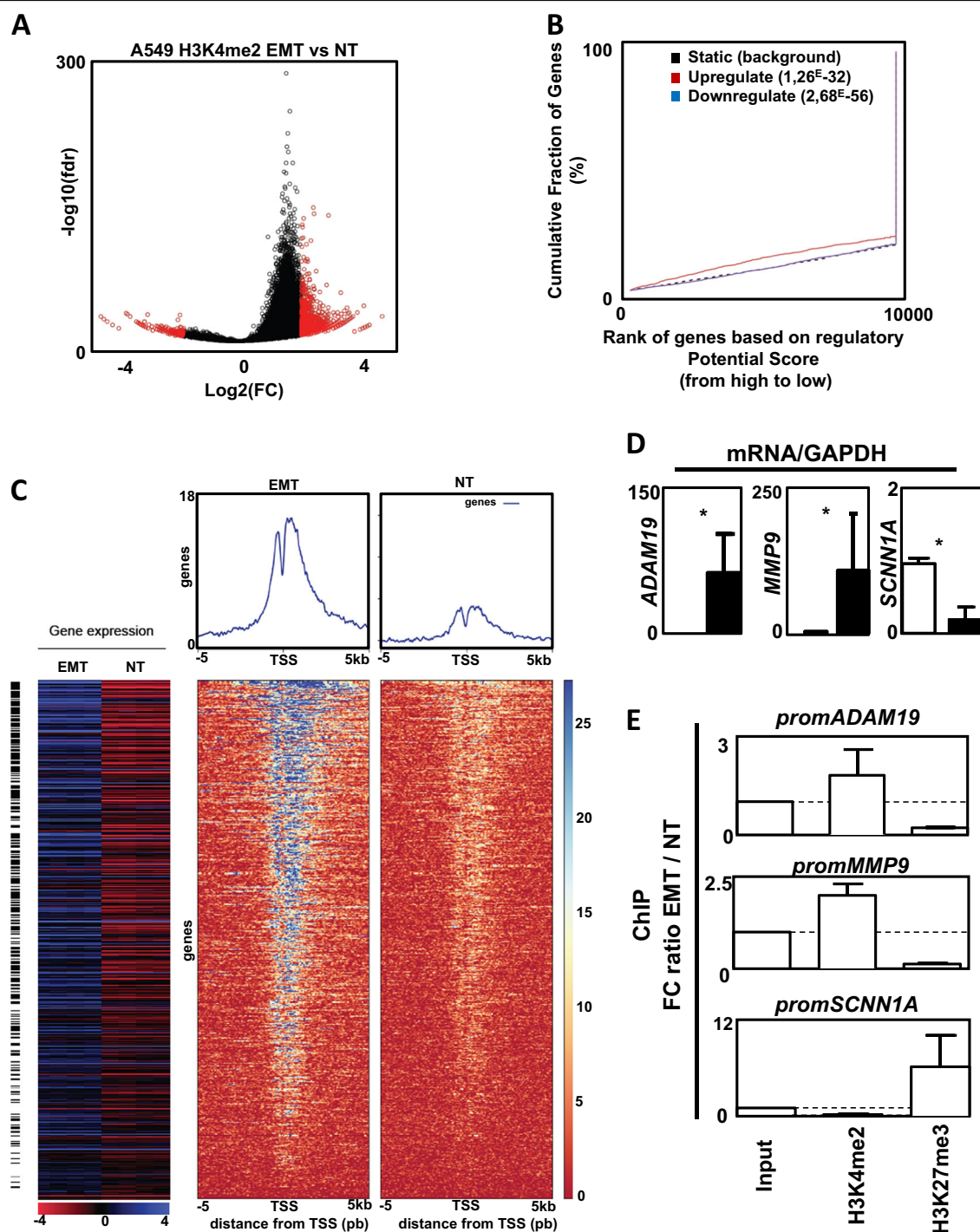


Fig. 4 (See legend on next page.)

Prediction Analysis of Microarray 50 (PAM50) classification using *ESR1*, *HER2*, and *KI67* gene expression¹¹. Interestingly, all genes found to be overexpressed (ECM degradation signature) were correlated to mesenchymal markers and to basal-like/mesenchymal subtypes (triple-negative BC), which are associated with a higher risk of

metastasis and poor prognosis. On the opposite, the *SCNN1A* gene was associated with normal breast or Luminal A BC and to the expression of epithelial markers. Moreover, we confirmed, in a cohort of 47 BC, an increased expression of *MMP9* and *ADAM19* in aggressive tumors as well as a decreased expression of *SCNN1A*

(see figure on previous page)

Fig. 4 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and ChIP-seq analysis on the H3K4me2 mark following transforming growth factor beta (TGFβ)/tumor necrosis factor alpha (TGFβ/TNFα) treatment. **a** Volcano plot of the 42,076 H3K4me2 merged islands. In red, the regions significantly enriched in TGFβ-/TNFα-treated cells versus non-treated cells. FC: fold change treated versus non-treated. fdr: false discovery rate treated versus non-treated. **b** Activating and/or repressive function prediction of H3K4me2 in A549 cells. BETA-basic integrates H3K4me2 differentially enriched regions and transcriptome data on TGFβ/TNFα treated cells and non-treated conditions to identify upregulated (red) and downregulated (purple) genes. The dashed line indicates the non-differentially expressed genes as background. Genes are cumulated by the rank on the basis of the regulatory potential score from high to low. *p* Values represent the significance of difference in the upregulated or downregulated groups compared with the non-differentially expressed group by Kolmogorov–Smirnov test. **c** Integration of transcriptome and ChIP-seq data for the A549 cell line. Top: heat maps of read coverage from –5 kb to +5 kb around the transcription start site for TGFβ-/TNFα-treated (left) and non-treated (right) conditions. Each line represents an upregulated gene identified by BETA. Genes are ordered according to their increasing rank product. Upper panels: read coverage density plots. Bottom: Corresponding gene expression heat map for treated (*n* = 4) and non-treated conditions (*n* = 4). Black lines indicate differentially expressed genes. **d** Increase expression of ADAM19 and MMP9 and decrease expression of SCNN1A in A549 cells treated with TGFβ/TNFα (mean ± SD of at least 3 independent experiments). **e** Ratio of fold change (epithelial–mesenchymal transition: TGFβ/TNFα treated A549 versus NT: untreated A549 cells) following ChIP against H3K4me2 and H3K27me3 marks on *MMP9*, *ADAM19*, and *SCNN1A* promoters. Dotted line = 1 (mean ± SEM of at least 3 independent experiments) **p* < 0.05

(Supp Fig. 9A). Finally, a positive correlation could be established between *ADAM19* and *VIMENTIN* or *MMP9* and *VIMENTIN* in these samples (Supp Fig. 9B). These data confirmed that the regulation of genes involved in the degradation of ECM was not specific of a particular model, tissue, or pathology but seemed to be a reliable biomarker of EMT in different cancers in vivo.

Characterization of ADAM19 as a new EMT marker in vivo

To investigate ADAM19 expression in vivo in EMT, we quantified the expression of ADAM19 and SCNN1A in NSCLCs by immunohistochemistry (IHC) (Fig. 7). Biopsies were stained for VIMENTIN and 30 patients were sorted according to their levels of VIMENTIN: high (EMT+) or low (EMT–) VIMENTIN staining. These data confirmed that ADAM19 was overexpressed in EMT+ tissues and repressed in EMT– while SCNN1A expression was repressed in the EMT+ tissues and increased in EMT–.

Discussion

Although epigenetic modifications have already been associated with EMT¹², most of the studies were based on only one EMT model and one inducer. In order to characterize the global role of epigenetics during EMT, we performed an extended study on different EMT cell models (A549, ACHN, MCF10A). The transcriptome analysis revealed that most of the genes upregulated or downregulated in EMT were different in these models (downregulated in A549 alone: 1020/1497, in ACHN alone: 205/432, in MCF10A alone: 1433/1834 and upregulated in A549 alone: 652/1235, in ACHN alone: 178/507, in MCF10A alone: 1033/1647, Fig. 2b). The lower number of DE genes and the lower fold change of expression in the EMT-induced ACHN model compared to A549 and MCF10A suggested that TGFβ/TNFα signaling was less pronounced in ACHN.

These data suggested that EMT signaling could be, at least partially, cell-specific despite going through the same

pathway of EMT induction. Indeed, ChIP-seq analysis in non-EMT models previously revealed that TGFβ-induced specific recruitment of SMAD3 on target genes was dependent of the cell type¹³. However, among these EMT-modulated genes, some seemed to be similarly regulated in our models (Supp Table 4 and Supp Table 5) and, in particular, the previously identified EMT markers *CDH1*, *EPCAM*, *VIMENTIN*, and *MMPs*. When comparing the list of the ten most upregulated genes in MCF10A and H358 treated with TGFβ/OSM (Oncostatin M) with our data, we observed that four genes (*GPR68*, *SERPINE1*, *ADAM19*, *SLAMF8*) were also found to be upregulated in our models and three additional genes (*FAP*, *MMP9*, *SCG5*) were upregulated in two out of three of our models following TGFβ/TNFα treatment¹⁴. Moreover, 9/10 of these genes were also previously reported as upregulated in the EMT-induced A549 model¹⁵. These data strongly suggested that few genes were similarly regulated in different EMT models. Moreover, *ADAM19* and *MMP9* were also highly expressed in the mesenchymal MDA-MB-231 cells and strongly increased in the EMT-induced MDA-MB-157 cells (Supp Fig. 7).

We also described several genes with high differences of expression between control and EMT-induced cells in the three models but that have never been related to EMT. For example, the expression of the poorly described *C15orf48* lncRNA, which has already been associated with cancer, was overexpressed (about 45-fold)¹⁶. *DHRS2*, overexpressed in the 3 cell models (about 38.9-fold) and encoding a dehydrogenase/reductase, has recently been associated with gastric carcinogenesis and 5-FU resistance¹⁷. On the opposite, the expression of *PPFIBP2* was downregulated in all our models (about 10-fold). Although very few data are currently available, *PPFIBP2* loci has been recently associated with increased probability of prostate cancer¹⁸. Altogether these data showed that all these genes might be considered as new markers of EMT in cancer.

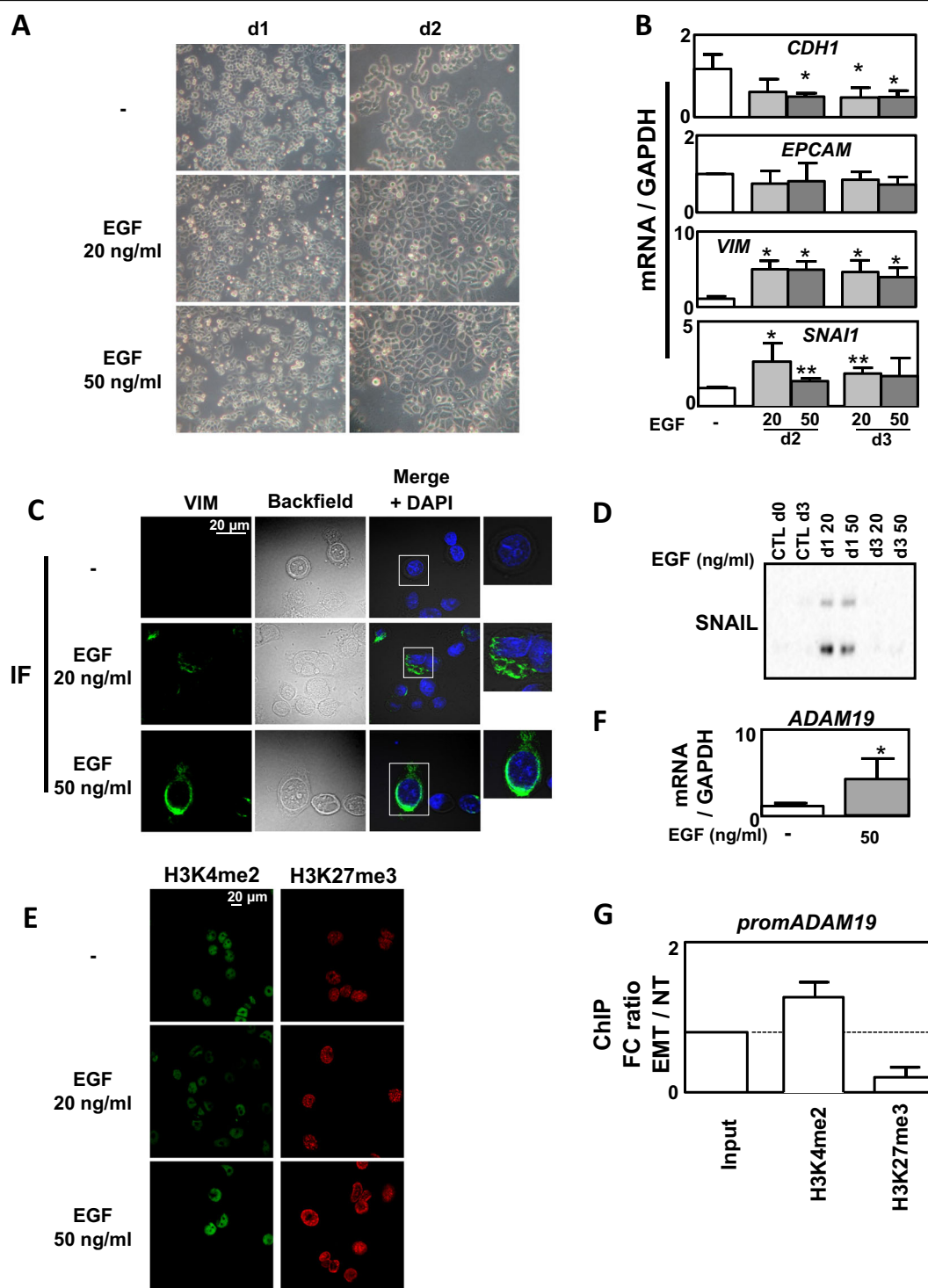
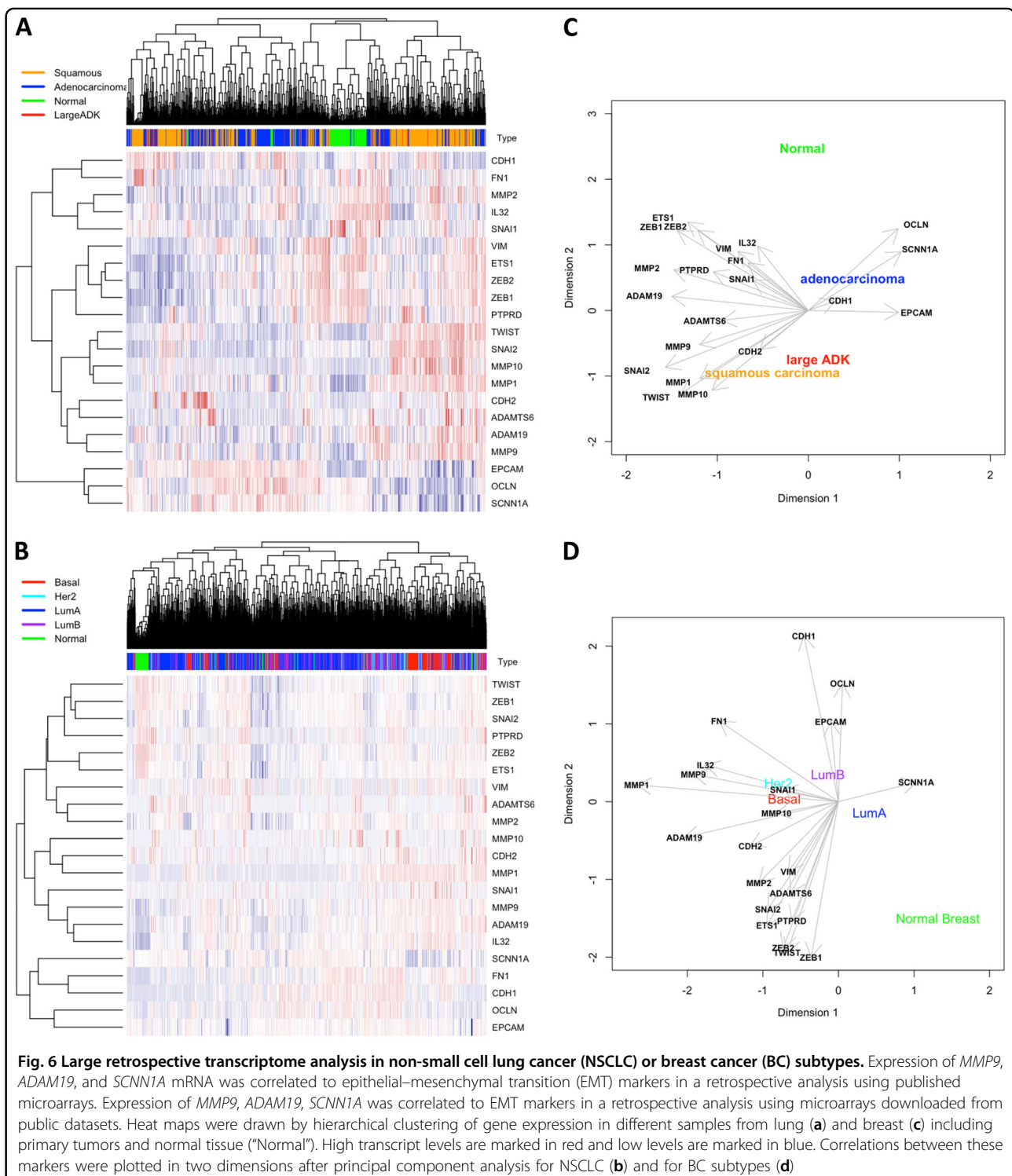


Fig. 5 Epigenetic regulation in epidermal growth factor (EGF)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in MDA-MB-468 cells. **a** Representative images showing a change in morphology of MDA-MB-468 cells following 1–5 days of treatment with EGF (20 or 50 ng/ml). **b** Validation of EMT markers by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR) in the MDA-MB-468 cell line treated or not with EGF (20 or 50 ng/ml) for 3 days (mean $\pm$ SD of at least 3 independent experiments). **c** Increased change of morphology and intensity of VIMENTIN staining using immunofluorescence (IF) in MDA-MB-468 cells treated or not with EGF (20 or 50 ng/ml) for 3 days. **d** Increased expression of SNAIL1 in MDA-MB-468 cells treated or not with EGF (20 or 50 ng/ml) for 3 days. **e** Increased staining in H3K4me2 and H3K27me3 marks using IF in MDA-MB-468 cells treated or not with EGF (20 or 50 ng/ml) for 3 days (representative pictures of 3 independent experiments). **f** Increased expression of *ADAM19* gene quantified by qRT-PCR in MDA-MB-468 cells treated or not with EGF (50 ng/ml) for 3 days. **g** Ratio of fold change (EMT: EGF treated versus NT: untreated MDA-MB-468 cells) following chromatin immunoprecipitation against H3K4me2 and H3K27me3 marks on the *ADAM19* promoter. Dotted line = 1 (mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments) * p < 0.05 and ** p < 0.01



We identified a specific and concomitant increase in positive, H3K4me2/3, and negative, H3K9me3 and H3K27me3, histone marks following TGF β /TNF α treatment and we performed a ChIP-seq analysis targeting H3K4me2, with a profile similar to active genes in vertebrates¹⁹. We identified numerous genes whose regulation

could be explained by epigenetic modifications on their promoters and we highlighted an epigenetic signature on genes involved in ECM remodeling, such as *MMP9* and *ADAM19*, which was increased in A549, ACHN, and MCF10A and also previously reported in another study¹⁴. This was associated with an increase in the H3K4me2 mark

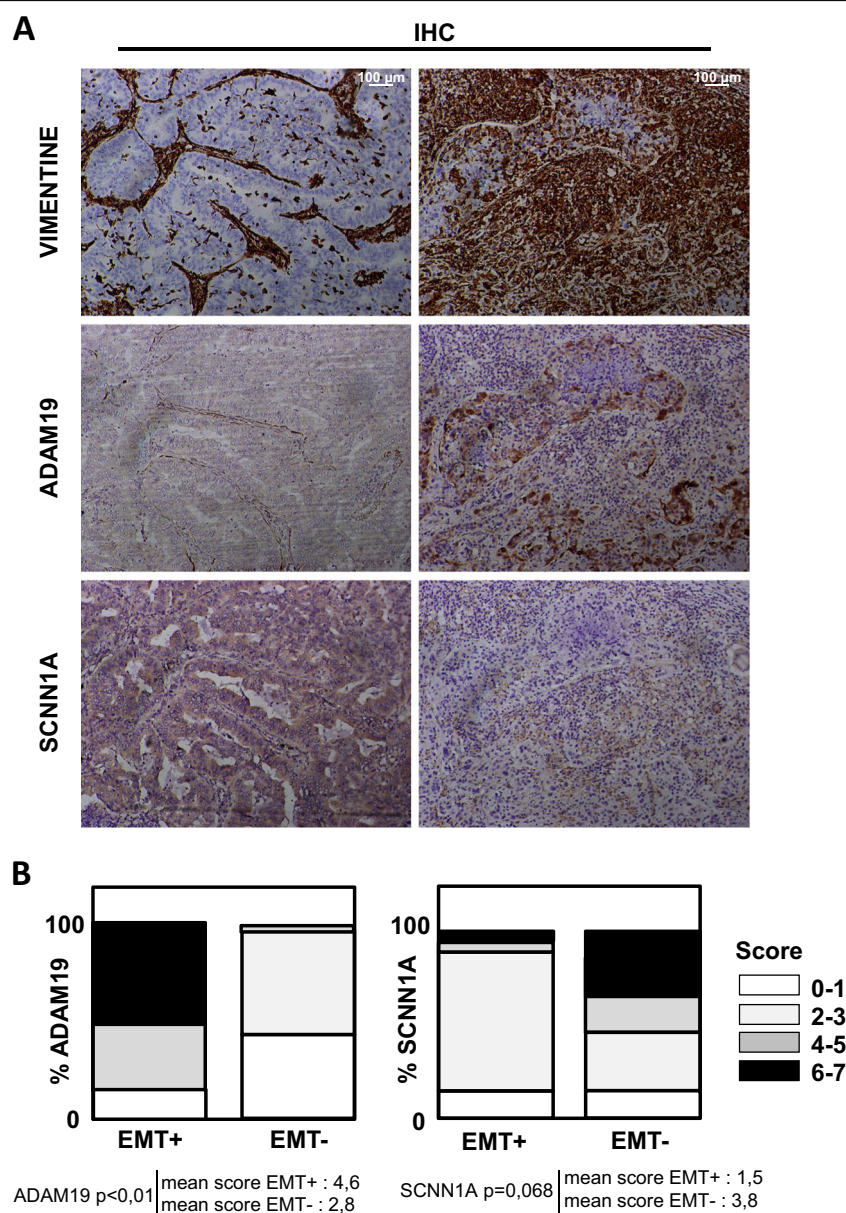


Fig. 7 Immunohistological (IHC) staining of ADAM19 and SCNN1A in non-small cell lung cancer is associated with epithelial–mesenchymal transition (EMT) status. **a** Representative staining of IHC against VIMENTIN, ADAM19, and SCNN1A showing a positive correlation between ADAM19 and VIMENTIN expression levels and an inverse correlation between VIM and SCNN1A in 30 patients tumors classified as EMT-positive. **b** Top: quantifications of ADAM19 and SCNN1A staining in regard to EMT status (percentage of patients). Bottom: mean of IHC score in VIM+ and VIM tumors

on their promoters during EMT. These results were consistent with a study showing that *MMP1/9/10* expression belonged to a gene cluster that overlaps an active enhancer¹⁵. We confirmed this analysis by showing a decrease of the H3K27me3 mark on the promoters of *MMP9* and *ADAM19*. Our data were in agreement with previously published results describing that the presence of these two latter marks were inversely correlated to one promoter²⁰. To determine whether the epigenetic signature observed on genes involved in ECM degradation was specific of EMT,

and not to TGF β /TNF α treatment, we performed the same set of experiments on an independent model (MDA-MB-468 cells in which EMT was induced using EGF^{21,22}). Indeed, we observed a progressive decrease in *CDH1* expression and an increase in *VIM* expression from day2. Similarly, a strong increase in expression of *SNAIL* was also observed at day 2 and then progressively decreased at day 3. The induction of SNAIL protein expression was only visible at day 1, suggesting that SNAIL expression is thinly regulated during EMT.

EMT induction in this model also led to a large overall epigenetic reprogramming, in particular in genes involved in ECM remodeling. Indeed, we detected an enrichment in H3K4me2 on the *ADAM19* promoter. But, interestingly, some of the genes involved in the ECM degradation presented a different pattern in the MDA-MB-468 (Supp Fig. 8). These results demonstrated that epigenetic programs and expression profiles linked to EMT differed according to the model and the cytokine treatment.

We then established a list of seven new biomarkers of EMT that presented a similar regulation in our different models of EMT together with an enrichment of H3K4me2 on their promoter (Supp Fig. 8C and D). In this list, we highlighted *MYO10* and *ADAM19*, two genes linked to tumor aggressiveness. *MYO10* encodes a member of the myosin superfamily, which has been associated with metastasis²³. *ADAM19* encodes a metalloprotease that belongs to the ADAM family associated with cancer progression²⁴. This protein has been associated with EMT in a glioblastoma model where its silencing by the *miR-145* inhibited EMT²⁵. Interestingly, the epigenetic signature of these seven genes was identical whichever the cell model and the inducer used. We confirmed these in vitro data in a cohort of 100 NSCLCs. We first selected 30 EMT-positive tumors presenting a high VIMENTIN staining and confirmed that in vivo EMT was indeed correlated to an overexpression of the ADAM19 protein in NSCLCs. Interestingly, *ADAM19* was one of the few genes for which a strong upregulation was observed in our 5 different EMT models (5 different cell lines, 2 different EMT inducers) and also found in independent studies with similar or additional models^{14,15}. Altogether these data strongly supported the role of ADAM19 in EMT. Finally, survival analysis of lung cancer patients using the *kmplot.com* software showed that a high expression of genes involved in ECM degradation, such as *ADAM19* ($p = 3.3E-5$), *ADAMTS6* ($p = 0.00032$), or *MMP9* ($p = 0.04$), was associated with a poor prognosis (Supp Fig. 10).

In conclusion, our data demonstrated, for the first time, an epigenetic signature of genes involved in ECM remodeling during EMT. Our results suggested that *ADAM19* expression and its epigenetic regulation could be considered as a robust new biomarker of EMT in vitro and in vivo. Moreover, our work suggested that novel anticancer therapies combining conventional drugs with epidugs, targeting *ADAM19* expression, might be tested in future preclinical studies to reduce metastasis and aggressiveness.

Materials and methods

Transcriptome analysis and qRT-PCR

Total RNA was isolated from cells using the Tri Reagent (TR118, Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions and RNA quality was

controlled using the Experion Analysis kit (Biorad, France). Transcriptome analysis was performed on extracted RNA from A549, ACHN, and MCF10A cell lines treated or not (control) with TGF β /TNF α . This analysis was performed on four RNA preparations for each cell line and condition. RNA integrity (RNA Integrity Number ≥ 8) was confirmed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, France). Then transcriptome profiling was analyzed using the Agilent whole human genome 8 $\times$ 60 K microarray (kit G4851C, Agilent Technologies). Total RNA was labeled and hybridized according to the manufacturer's recommendations using the LowInput QuickAmp Labeling Kit One-Color (Agilent Technologies, 5190–2305), Gene expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, 5188–5242), RNA Spike-in one Color Kit (Agilent Technologies, 5188–5282), and washing buffer (Agilent Technologies, 5188–5327). Raw intensity data were log2-transformed and normalized (intra-array and inter-array scaling) using the GeneSpring GX software (Agilent Technologies), then gene expression were submitted to ArrayExpress repository under accession number "XXXXXX."

Probes were selected according to their level of expression (intensity above background in treated and/or control conditions) and to their absolute fold change ($FCA \geq 2$) between treated and control conditions. For each cell line, unequal variance t tests (Welch t test) were performed to identify DE probes between treated and control samples. Adjusted p values were calculated by controlling the false discovery rate according to the Benjamini and Hochberg procedure. Probes were considered as significantly DE if the adjusted p value was <0.01 . Venn diagrams were obtained using the http://biopuce.insa-toulouse.fr/ExperimentExplorer/venn/venn_graph.php software. Gene ontology was performed using the PANTHER software²⁶.

Reverse transcription was performed in a mix containing M-MLV (12 U, Sigma-Aldrich, M-1302) reverse transcriptase, oligodT (0.25 μ M, Eurogentec, Belgium), random hexamers (1.25 μ M, C118A Promega, France), and total RNA (1.5 μ g) according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR were performed as duplicate using the Step one Real-Time PCR system (Applied Biosystems, France) and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primers used in our study were designed using the primer 3 software or according to Gemmill et al.⁵ and are listed in the Supp Table 8.

Cell culture

The A549 (NSCLCC) cell line was obtained from Dr Christophe Borg (INSERM UMR1098, Besançon, France), the ACHN (metastatic renal cancer) cells were obtained

from Dr Viviane Gnemmi (INSERM UMRS995, Lille, France)²⁷, MCF10A (immortalized breast cells) cells were obtained from Philippe JUIIN (INSERM U1232, Nantes, France), and the MDA-MB-468 (metastatic BC) cell line were obtained from Dr Christine Gilles (Laboratory of Tumor and Developmental Biology, Liège, Belgium). A549 and ACHN cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1 g/l glucose (Dominique Dutscher, L0066, France) and MDA-MB-468 were cultured in RPMI 1640 medium. Both medium were supplemented with fetal bovine serum (5%) (Dominique Dutscher, S1810), penicillin-streptomycin (50 U/ml) (Dominique Dutscher, L0018), and amphotericin B (1.25 µg/ml) (PAA, P11-001, France). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂, and routinely used at 70–80% confluence. MCF10A were cultured in DMEM-F12 supplemented with 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, France), 100 ng/ml choleric toxin (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/ml hydrocortisone, and antibiotics as described above. Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ and routinely used at 70–80% confluence. When indicated, EMT was induced for 1–5 days using 4 ng/ml TGFβ (100–21, Peprotech, France) (ACHN, A549 and MCF10A) and 20 ng/ml TNFα (300–01 A, Peprotech) or 20–50 ng/ml EGF (MDA-MB-468).

Epigenetics

Quantification of histone modifications

Histones were prepared from fresh cell pellets using the EpiQuik Total Histone Extraction Kit (OP-0006, Euro-medex, France) and the protein were quantified using the Bradford Protein Assay (Biorad, 5000006). The efficiency of histone extraction was controlled using migration (see below) and detection of total histones by Coomassie staining and then WB using an anti-H3 antibody. Histone posttranslational modifications were quantified using the EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (P-3100, Epigentek) as per the manufacturer's instructions. Each histogram corresponds to the mean of 2 independent experiments and each measure was obtained using a pool of 100 ng of total histones issued from 2 independent extractions (50 ng + 50 ng).

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin was prepared using the truChIP™ Chromatin Shearing Kit (520154, Covaris, France) according to the manufacturer's instructions. Each sample was submitted to a 8 min sonicated using the M220 Covaris sonicator. ChIP were performed using the IP-Star Compact Automated System (Diagenode, Belgium) with the Auto iDeal ChIP-seq Kit for Histones (C01010171, Diagenode) and 1 µg of ChIP-grade antibody or IgG (IG07–2, P.A.R.I.S.). Libraries were prepared from 5 ng of ChIP DNA and Input DNA with the NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep

Kit for Illumina (E7370S, New England Biolabs, USA), according to the manufacturer's instructions. From each library, 50 bp single reads were sequenced using an Illumina HiSeq 1500 system (Illumina). Reads were filtered according to their quality (Q Score ≥ 30) and adapter sequences were removed using Cutadapt²⁸. Reads were aligned to the human genome (hg19) using the BWA (version 0.7.10). We obtained a mean of 21 million (min = 10 M, max = 48 M, sd = 6 M) uniquely mapped reads per sample. H3K4me2 differentially enriched regions (peaks) were identified using SICER-df ($g = w = 200$ bp). We considered two pairs of libraries: (1) TGFβ-/TNFα-treated condition versus its input control, (2) non-treated condition versus its input control. The basic strategy of SICER-df is to identify significant islands using SICER.sh in each of the two pairs, merge the two sets of significant islands, and then determine the significance of changes by comparing merged islands between the treated and the non-treated condition²⁹. A region was considered significantly enriched between treated and non-treated conditions if the adjusted p value (Benjamini and Hochberg) was <0.01 and the FCA ≥ 2. We used the PAVIS software to annotate the H3K4me2 marks with an upstream/downstream interval of ±5 Kb from transcription start site³⁰. Integration of transcriptome and ChIP-seq data was performed using BETA on the H3K4me2 differentially enriched regions³¹. A gene was considered as potentially regulated by the H3K4me3 mark if its rank product was <0.01. We then used the DeepTools suite to generate heat maps of read coverage³², and we used GSEA to search for enriched molecular signatures among genes³³. A gene set was considered as significantly enriched if the Fisher exact test q -value was <0.001. Primers used for the ChIP validations were designed using the primer 3 software and listed in the Supp Table 8 and antibodies are listed in Supp Table 9.

Western blotting

For the preparation of total protein extracts, cells were scraped, harvested and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0.5% DOCA, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) supplemented with protease inhibitors (104 mM AEBSF, 1.5 mM pepstatin A, 1.4 mM E-64, 4 mM bestatin, 2 mM leupeptin, and 80 µM aprotinin) for 30 min on ice, then sonicated for 15 s, and centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C. Proteins were quantified using the Bradford method and then proteins (25–40 µg) were separated on TGX acrylamide gels (1610172, Biorad) at 300 V for 30 min using and transferred onto Transblot turbo PVDF (1704157, Bio-Rad) membranes for 10–15 min with the Transblot turbo (1704150, Biorad) according to the manufacturer's recommendations. Membranes were saturated in TBS-Tween 20 0.1% supplemented with 5% milk for 1 h and

then incubated with primary antibodies (listed in Supp. Table 9) overnight at 4 °C. Membranes were washed 3 times with TBS-Tween 20 0.1% and incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase conjugate antibody according to the manufacturer's instructions (BI2407, BI2413C, P.A.R.I.S., France). The membrane was then washed 3 times with TBS-Tween 20 0.1% and incubated with Clarity Western Cl substrate (1705051, Biorad) and chemiluminescence was monitored using a Biorad ChemiDocTMXRS+.

Zymography

Cells were cultivated for 3 days in complete medium, with or without TGFβ/ TNFα, and then medium was replaced by serum-free medium containing or not the cytokines for 2 additional days. Five hundred µl of medium was concentrated using Pierce Concentrator, PES 30K MWCO (88502, Thermo Scientific) columns at 15,000 × g for 5 min. Samples were diluted in 1× non-reducing sample buffer (25 mM Tris-HCl, pH6.8, 0.8% SDS, 4% glycerol, 0.002% bromophenol blue) and separated in 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis containing 4 mg/ml Gelatin. The gel was washed 2 times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂) for 30 min, rinsed for 10 min at 37 °C in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂) with agitation, and then incubated for 24 h at 37 °C in the incubation buffer with agitation. The gel was stained for 1 h in 40% methanol, 10% acetic acid, and 0.5% Coomassie blue, rinsed with water, and destained in 40% methanol and 10% acetic acid before quantification.

Immunofluorescence

Cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed with cold methanol for 20 min at −20 °C and then blocked with Blocking solution (82007, Olinkbioscience) for 1 h at 37 °C. Incubations with primary antibodies were performed overnight at 4 °C, and then cells were rinsed 3 times with TBS-tween 0.1%. Incubations with secondary antibodies goat anti-rabbit and goat anti-mouse AlexaFluor 488 or 555 (Life technologies) for were performed 1 h at 37 °C, and then cells were rinsed 3 times with TBS-tween, stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), and mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (F4680, Sigma Aldrich). Images were acquired with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope (×63 objective).

Flow cytometry

For membrane staining, cells were incubated with the corresponding antibody for 30 min at 4 °C, then washed with phosphate-buffered saline and centrifuged for 10 min at 300 × g. Ten thousands cells from each sample were

evaluated for fluorescence detection using BD FACS-Canto cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with the FACS Diva software.

Tissue samples, IHC, and immunostaining assessment

Paraffin-embedded tissue biopsies of NSCLCs were collected in collaboration with the Tissue Biobank of the University of Liege (Liege, Belgium). This protocol was approved by the Ethics Committee of The University Hospital of Liège. The initial diagnosis of each case was confirmed by experienced histopathologists. IHC analysis was performed with a standard protocol detailed previously and the primary antibodies listed in Supp. Table 9³⁴. Following IHC, samples were classified into two groups: EMT-positive versus EMT-negative in regard to the intensity of VIMENTIN staining (score (0–3) and extent (0–3)). As previously described³⁵, the 2 scores were multiplied to obtain a global score ranged between 0 and 9. All immune-labeled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

Statistics

Mean comparison were analyzed using Student's *t* test with the GraphPad Prism5 software. Correlation indices were measured using Spearman test calculated with the ImageJ software. Significant values are highlighted in bold in each figure. Retrospective transcriptome analysis was performed using the R software version 3.3.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Transcriptomes were built from Affymetrix series (GPL570 platform) after GC-RMA normalization. For BCs, 2830 samples were used from the following GEO series: GSE12276, GSE12790, GSE18931, GSE2109, GSE22035, GSE23720, GSE23994, GSE25407, GSE26910, GSE30010, GSE3744, GSE5764, GSE17700, GSE26639, GSE16446, GSE18864, GSE22513, GSE19615, GSE20685, GSE21653, GSE23177, GSE9195, GSE6532. Samples were classified with PAM50 method using 50 genes (genefu R package). For lung cancers, 802 samples were normalized from the following GEO series: GSE101929, GSE10245, GSE18842, GSE22047, GSE30219, GSE32496, GSE37745, GSE43580, GSE77803.

Acknowledgements

We are most grateful to July Hémon from the Human & Environmental Genomics core facility of Rennes (Biosit/OSUR) for her technical support. This work is supported by institutional grants from INSERM, EFS, and Univ. Bourgogne Franche-Comté to the UMR1098 and by the "Ligue Contre le Cancer", "Région Bourgogne Franche-Comté," and "Canceropole Grand Est."

Author details

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France. ²EPIGENEXP Platform, University of Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France. ³CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, F-35033 Rennes, France. ⁴Plate-forme Génomique Environnementale et Humaine Biosit, Université Rennes1, F-35043 Rennes,

France. ⁵Cancéropole Grand-Ouest, Réseau Epigénétique (RepiCGO), Rennes, France. ⁶CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), F-35043 Rennes, France. ⁷Faculté de Médecine, Université Rennes1, UEB, UMS 3480 Biosit, F-35043 Rennes, France. ⁸Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000 Liege, Belgium. ⁹Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, F-25000 Besançon, France. ¹⁰INSERM CIC-1431, University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-25000 Besançon, France. ¹¹DimaCell Platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

Received: 18 July 2018 Revised: 13 December 2018 Accepted: 17 December 2018

Published online: 27 February 2019

References

- Prieto-Garcia, E., Diaz-Garcia, C. V., Garcia-Ruiz, I. & Agullo-Ortuno, M. T. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med. Oncol.* **34**, 122 (2017).
- Li, W. et al. Methylation-mediated silencing of microRNA-211 promotes cell growth and epithelial to mesenchymal transition through activation of the AKT/beta-catenin pathway in GBM. *Oncotarget* **8**, 25167–25176 (2017).
- Li, Q. et al. KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 6334–6344 (2015).
- Yang, F. et al. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* **31**, 110–123 (2012).
- Gemmill, R. M. et al. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **300**, 66–78 (2011).
- Yamauchi, Y. et al. Tumor necrosis factor- α enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1. *Exp. Lung Res.* **36**, 12–24 (2010).
- Kim, J., Kong, J., Chang, H., Kim, H. & Kim, A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* **7**, 85021–85032 (2016).
- Wu, Y. et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* **15**, 416–428 (2009).
- Asgarova, A. et al. PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncotarget* **7**, e1423170 (2018).
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. & Chiarugi, P. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett.* **341**, 80–96 (2013).
- Parker, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
- Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol. Cancer* **15**, 18 (2016).
- Mullen, A. C. et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* **147**, 565–576 (2011).
- Du, L. et al. Transcriptome profiling reveals novel gene expression signatures and regulating transcription factors of TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Med.* **5**, 1962–1972 (2016).
- Cieslik, M. et al. Epigenetic coordination of signaling pathways during the epithelial-mesenchymal transition. *Epigenetics Chromatin* **6**, 28 (2013).
- Lang, Z. Q., Wu, Y. Q., Pan, X. B., Qu, G. M. & Zhang, T. G. The identification of multifocal breast cancer-associated long non-coding RNAs. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 5648–5654 (2017).
- Han, Y. et al. HOXA13 contributes to gastric carcinogenesis through DHRS2 interacting with MDM2 and confers 5-FU resistance by a p53-dependent pathway. *Mol. Carcinog.* **57**, 722–734 (2018).
- Wang, M. et al. Large-scale association analysis in Asians identifies new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat. Commun.* **6**, 8469 (2015).
- Schneider, R. et al. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 73–77 (2004).
- Kim, D. H. et al. Histone H3K27 trimethylation inhibits H3 binding and function of SET1-like H3K4 methyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4936–4946 (2013).
- Lo, H. W. et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* **67**, 9066–9076 (2007).
- Bonnomet, A. et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* **31**, 3741–3753 (2012).
- Cao, R. et al. Elevated expression of myosin X in tumours contributes to breast cancer aggressiveness and metastasis. *Br. J. Cancer* **111**, 539–550 (2014).
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1140–1144 (2009).
- Wang, X. et al. MiR-145 inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition via targeting ADAM19 in human glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 92545–92554 (2017).
- Mi, H. et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
- Gnemmi, V. et al. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/beta-catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* **346**, 225–236 (2014).
- Chen, C., Khaleel, S. S., Huang, H. & Wu, C. H. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol. Med.* **9**, 8 (2014).
- Zang, C. et al. A clustering approach for identification of enriched domains from histone modification ChIP-Seq data. *Bioinformatics* **25**, 1952–1958 (2009).
- Huang, W., Loganathanaraj, R., Schroeder, B., Fargo, D. & Li, L. PAVIS: a tool for Peak Annotation and Visualization. *Bioinformatics* **29**, 3097–3099 (2013).
- Wang, S. et al. Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. *Nat. Protoc.* **8**, 2502–2515 (2013).
- Ramirez, F. et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **44**, W160–W165 (2016).
- Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
- Herfs, M. et al. Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J. Pathol.* **241**, 522–533 (2017).
- Hubert, P. et al. Altered alpha-defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J. Pathol.* **234**, 464–477 (2014).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Comparative RNA sequencing reveals that HPV16 E6 abrogates the effect of E6*I on ROS metabolism

Philippe Paget-Bailly^{1,2}, Koceila Meznad^{1,2}, Diane Bruyère⁴, Jérôme Perrard^{1,2}, Michael Herfs⁴, Alain C. Jung⁵, Christiane Mougin^{1,2,3}, Jean-Luc Prétet^{1,2,3} & Aurélie Baguet^{1,2}

High-risk Human Papillomavirus infections are responsible for anogenital and oropharyngeal cancers. Alternative splicing is an important mechanism controlling HPV16 gene expression. Modulation in the splice pattern leads to polycistronic HPV16 early transcripts encoding a full length E6 oncoprotein or truncated E6 proteins, commonly named E6*. Spliced E6*I transcripts are the most abundant RNAs produced in HPV-related cancers. To date, the biological function of the E6*I isoform remains controversial. In this study, we identified, by RNA sequencing, cellular targets deregulated by E6*I, among which genes related to ROS metabolism. Concomitantly, E6*I-overexpressing cells display high levels of ROS. However, co-overexpression of both E6 and E6*I has no effect on ROS production. In HPV16-infected cells expressing different E6/E6*I levels, we show that the newly identified targets CCL2 and RAC2 are increased by E6*I but decreased by E6 expression, suggesting that E6 abrogates the effect of E6*I. Taken together, these data support the idea that E6*I acts independently of E6 to increase ROS production and that E6 has the ability to counteract the effects of E6*I. This asks the question of how E6*I can be considered separately of E6 in the natural history of HPV16 infection.

Human papillomaviruses (HPVs) are small non-enveloped viruses that present a tropism for squamous epithelium. More than 200 types of HPVs have been described to infect humans¹. Based on their oncogenic potential, these viruses are classified in high-risk HPV (hrHPV), including HPV16 and HPV18, and low-risk HPV (lrHPV), including HPV6 and HPV11. HPV infections are responsible for cervical intraepithelial lesions that can progress to cancers, but they also cause a large fraction of anal, vulvar, vaginal, penile cancers, and a rising number of oropharyngeal cancers.

HPV16 is the most prevalent type in HPV-associated cancers². Its genome contains a long control region (LCR), 6 open reading frames (ORFs) encoding early (E) proteins under the control of p97 promoter located in the LCR, and 2 ORFs encoding late (L) proteins under the control of p670 promoter located within the E7 ORF³. Viral proteins are produced through the translation of at least 20 polycistronic transcripts obtained by alternative splicing. At least 10 of these transcripts allow the production of the 2 major viral oncoproteins, E6 and E7, but also E6-truncated proteins, E6*I, E6*II and E6^ΔE7^{4,5}. hrHPV E6 and E7 proteins are consistently expressed in HPV-associated cancers^{6,7} and interact with many host cellular proteins. Notably, E6 and E7 proteins target p53 and pRB, respectively, for proteasome-mediated degradation, and thus inactivate these tumor suppressors^{6,8,9}. More than 30 years ago, it was observed that the most abundant HPV16 transcript produced was spliced from the donor site 226 (SD 226) to the acceptor site 409 (SA409), both sites located in E6 ORF^{10,11}. Interestingly, only hrHPVs harbor these splice sites, indicating that E6 ORF splicing events could be relevant for HPV-driven carcinogenesis¹⁰. Several studies and unpublished data from our laboratory also reported increased levels of spliced E6*I mRNA correlating with the severity of cervical lesions^{5,12–14}. Concomitantly, it was proposed that the ratio

¹EA3181, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, UFR Santé, 19 rue Ambroise Paré, Besançon, France. ²Université Bourgogne Franche Comté, Besançon, France. ³Centre Hospitalier Régional Universitaire, CNR HPV, 3 Bvd Alexandre Fleming, Besançon, France. ⁴Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, Liege, Belgium. ⁵Université de Strasbourg, Inserm, UMR_S1113, Centre de lutte contre le cancer Paul STRAUSS, Strasbourg, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B. (email: aurelie.baguet@univ-fcomte.fr)

of E6*I/E6*II spliced variants can be used as a predictive marker of clinical outcome in HPV-related cervical lesions¹³ and oropharyngeal cancers¹⁵.

Even if HPV16 early transcripts detection is used as a tool in screening and investigating HPV-related neoplasia, the biological significance of E6 splicing and ensuing E6*I protein expression remains elusive. It has been proposed that E6 ORF splicing facilitates translation re-initiation of the E7 ORF by increasing the space between E6 and E7 ORF^{16,17}. However, other study showed that E7 is preferentially translated from the unspliced E6/E7 transcript rather than from the E6*I/E7 one, suggesting that this splicing event regulates E6 expression but not E7^{18,19}. Apart from HPV gene expression regulation, the roles of E6*I ORF product in HPV life cycle and carcinogenesis also remains unclear, although a variety of functions have been reported for the truncated isoform. E6*I inhibits E6-mediated degradation of p53²⁰, causes the degradation of some PDZ proteins, such as Dlg, PATJ and MAGI-1^{21,22}, and modulates the expression of a subset of cellular factors involved in stress response, such as aldo-keto reductase genes²³, superoxide dismutase isoform 2 (SOD2), and glutathione peroxidase 1 (GPX1), leading to the accumulation of reactive oxygen species (ROS)²⁴. *In vivo* studies have shown that ectopic E6*I reduces tumor growth of both HPV-positive and HPV-negative cells in a xenograft nude mouse model²⁵. Depending on the cellular context and especially the presence or absence of the E6 protein, E6*I seems implicated in different cellular pathways and its functions remain controversial²⁶.

To get a better understanding on the underlying molecular mechanisms driving HPV-related carcinogenesis, the present study used RNA sequencing technology to analyze the impact of HPV16 E6*I isoform on cellular gene expression.

Results

HPV16 E6 and E6*I expression in U-2 OS HPV-negative cell line. HPV-negative U-2 OS cell line was transfected with expression vectors encoding either all HPV16 E6 isoforms (pXJ40-E6All or pXJ40b-GloΔint-E6All) or E6 (pXJ40-E6 or pXJ40bGloΔint-E6) or E6*I (pXJ40-E6*I) exclusively or with empty vectors (pXJ40 or pXJ40bGloΔint) (Figs S1 and S2). We compared alternative splicing profiles of E6 transcripts obtained from these different E6-expression vectors. An accumulation of E6 unspliced transcripts produced from the pXJ40bGloΔint-E6All vectors is observed, indicating that the presence of the β-globin intron in the pXJ40 vector favor the splicing between SD226 and SA409 splice sites, and consequently the production of the E6*I RNAs (Fig. S2). Western blot analysis were performed with two E6-specific antibodies. The 6F4 antibody recognizes the N-terminal part of the E6 protein, while the 3F8 antibody targets the C-terminal part of E6 (Fig. 1A). Consequently, the 3F8 antibody does not recognize the E6*I protein and the 6F4 antibody recognizes both E6 isoforms. The full length E6 protein was detected with both E6-directed antibodies in cells transiently expressing the pXJ40-E6All and pXJ40-E6 vectors. No E6*I protein was observed in pXJ40-E6All or pXJ40-E6*I expressing cells. But consistently with its role as a potent E6 antagonist, we observed an increase of p53 protein level in pXJ40-E6*I transfected cells. (Figs 1B and S3A).

MG-132 treatment, a proteasome inhibitor, was used on transfected cells to reveal a specific band with the 6F4 antibody that corresponds to the E6*I isoform (Fig. 1C, lane 8 and Fig. S3B). This indicate that an E6*I protein can be produced from the pXJ40-E6*I vector but also suggest that low levels of E6*I protein can be explain, at least in part, by its rapid turnover in these cells.

Establishment of stable cell lines expressing HPV16 E6 isoforms. Stable cell lines expressing either all E6 isoforms or E6*I were generated from the U-2 OS cell line. Cellular clones were isolated upon selection of cells resistant to G418: U-CTL (clones #1 and #3, transfected with pXJ40-empty), U-E6All (clones #1, #6 and #7, transfected with pXJ40-E6All), and U-E6*I (clones #1, #6 and #14, transfected with pXJ40-E6*I). Then, these cellular clones were tested for E6 and E6*I expression. As expected, E6 protein was observed in U-E6All stable cell lines compared to U-CTL and U-E6*I. A decrease of the wild-type p53 protein level is observed in these cells, suggesting that U-E6All cells express of a functional E6 protein (Fig. 2A and S4A). Next, we compared E6 expression from U-E6All clones to naturally-infected HPV16 cell lines such as SiHa, Ca Ski and W12 clones. We observe a significantly higher expression of E6 in U-E6All clones. Interestingly, this high expression does not result in a greater degradation of p53 compared to SiHa and Ca Ski cells. We observe low amount of E6 in the three W12 clones tested but still managing variable levels of p53 between the three clones tested (Figs 2B and S4B). Because E6*I protein was hardly detectable, E6 and E6*I RNA levels were simultaneously monitored by RT-PCR. The RNA profile of U-E6All stable cell lines shows a low amount of full-length E6 RNA (unspliced) and E6*II RNA (SD226/SA556 spliced RNA) in comparison with the high amount of E6*I RNA (SD226/SA409 spliced RNA). As expected, U-E6*I stable cell lines express only E6*I RNA and U-CTL stable cell lines, like parental U-2 OS (U-CTL#par), did not express E6 or E6*I (Figs 2C and S5A). Similar splicing profiles of E6 transcripts are detected between U-E6All stable cell lines, HPV16-positive cancer cell lines (SCC90, SiHa, Ca Ski) and in most head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tumor samples tested (Figs 2D and S5B). Also, in the naturally HPV16-infected cervical keratinocyte cells (W12 cells), E6*I transcript is the most abundant splice product compared to E6 and E6*II transcripts (Figs 2E and S5C).

E6 and E6*I expression differentially alters phenotypic characteristics relevant to cancer cells.

To evaluate phenotypic characteristics relevant to cancer cells in our cellular models, functional assays were performed with U-CTL, U-E6All and U-E6*I cell lines. First, cell proliferation was assessed by measuring the number of cells once a day over 4 days. Results show that all cell lines had the same growth rate (Fig. 3A). In contrast, colony formation assays, performed to monitor the ability of a single cell to grow into a colony, show a significant decrease in the number of colonies for U-E6All compared with U-CTL. We observe that expression of E6*I alone has a stronger inhibitory effect on colony formation (Fig. 3B,C). E6 and E6*I from HPV16 have both been shown to induce oxidative stress in different cellular models^{24,27}. Relative production and release of H₂O₂ in medium

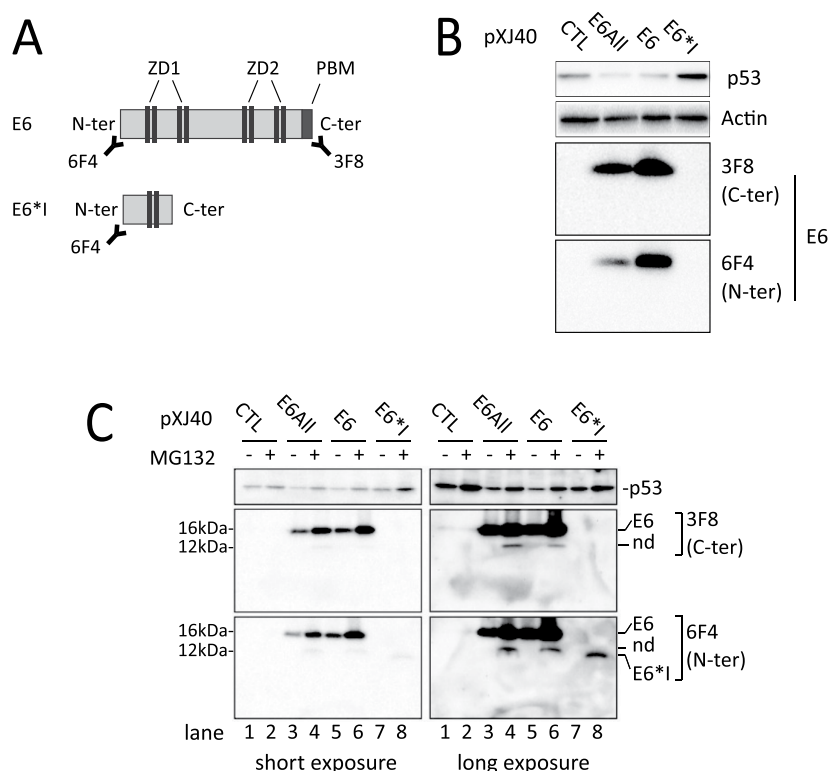


Figure 1. Transient transfection of E6 expression vectors in U-2 OS HPV-negative cell line. **(A)** Schematic representation of the E6 and E6*I protein isoforms with indicated regions recognized by the two E6-specific antibodies. The 6F4 antibody can recognize the N-terminal part of the E6 and E6*I proteins and the 3F8 antibody can target the C-terminal part of E6 protein. **(B)** Western blotting analysis showing p53, E6 and E6*I protein levels in U-2 OS cells transiently transfected with the pXJ40 empty vector (CTL), pXJ40-E6All vector (E6All), pXJ40-E6 vector (E6) or pXJ40-E6*I vector (E6*I). After 48-hour incubation, cells were treated either with DMSO or 10 μ M MG132 proteasome inhibitor for 16 hours. The membrane was then incubated with the two E6 antibodies. For the detection of E6*I (corresponding to the first 43 amino acids of E6 protein), only the 6F4 antibody can be used. “nd” referred to a band at 11 kDa corresponding to a cleavage product observed in U-E6All cells treated with MG132. Full-length blots are presented in Figure S3.

from cells, reported by the oxidation of amplex red reagent to fluorescent resorufin, was used as indicator of ROS production. We observe a 20% significant increase in H_2O_2 released from U-E6*I clones relative to control. However, no change in H_2O_2 release from U-E6All clones is observed (Fig. 3D). It was previously observed that HPV16 E6 increases the radio sensitivity of HPV-negative cancer cells²⁸. To confirm this in our cellular models, the radiation sensitivity was measured *via* clonogenicity assays following irradiation. In all cell lines, survival decreases with increasing irradiation dose (Fig. 3E). We observed that only U-E6All cell lines show a significant decrease of survival after irradiation compared to U-CTL and U-E6*I cell lines (Fig. 3F). These data suggest that E6 and E6*I can have isoform-specific functions in the cells.

Transcriptome profiles reveal that E6*I deregulates cellular targets independently of E6. To assess cellular targets potentially deregulated by E6*I, the whole transcriptome of stable cell lines – U-E6All (clones #1, #6 and #7), U-E6*I (clones #1, #6 and #14) and U-CTL (clones #1, #3 and #par) – were analyzed by RNA sequencing. First, unsupervised hierarchical clustering analysis based on RNA sequencing datasets reveals 2 clusters. One of these clusters contains the 3 clones of U-E6All cells (Fig. 4A and S6). Venn diagram representation of deregulated genes in U-E6All and U-E6*I compared with U-CTL show that 419 transcripts were significantly deregulated (FDR < 0.05) in U-E6All (Fig. 4B), of which 264 were upregulated and 155 were down-regulated (Fig. 4C and Table S1). The expression of 53 transcripts were deregulated in U-E6*I cell lines (Fig. 4B), of which 45 were up-regulated and 8 were down-regulated (Fig. 4C and Table S2). An overlap of 11 deregulated transcripts was observed between U-E6All and U-E6*I cell lines. These data suggest that E6*I modulates cellular gene expression independently of E6 but also indicate that the effect of E6*I on transcriptome is disrupted when co-expressed with E6.

GO terms and KEGG pathway analysis of deregulated transcripts in U-E6All and U-E6*I cells. Classification using GO (Gene Ontology) enrichment and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analysis showed an over-representation of U-E6All deregulated transcripts in enriched terms,

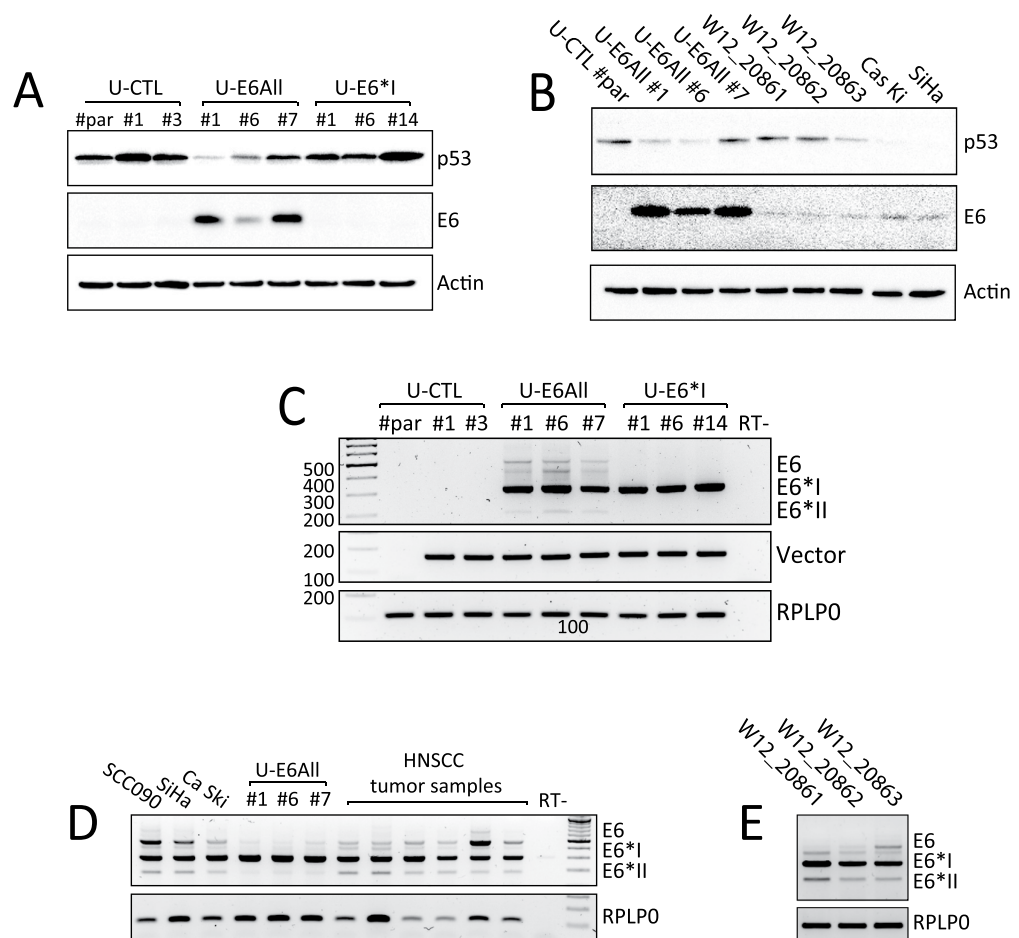


Figure 2. Expression profiles of HPV16 E6 and E6*I in stable cell lines. **(A)** Western blotting analysis showing p53, E6 and β -actin protein levels in U-2 OS parental cell line (U-CTL#par) and in stably transfected cells with pXJ40 empty vector (U-CTL #1 and #3) or pXJ40-E6All vector (U-E6All #1, #6 and #7) or pXJ40-E6*I vector (U-E6*I #1, #6 and #14). β -actin is used as loading control. Full-length blots are presented in Figure S4. **(B)** Western blotting analysis comparing protein levels of E6 and p53 between U-2 OS cellular clones (U-CTL#par, U-E6All #1, #6 and #7) and naturally HPV16-infected cells (W12_20861, W12_20862, W12_20863, SiHa and Ca Ski cell lines). β -actin is used as loading control. **(C)** RT-PCR analysis of alternatively spliced HPV16 E6 transcripts in U-E6All and U-E6*I stably transfected cells. As expected no E6 transcripts were observed in U-2 OS parental cell line (U-CTL#par) and in U-CTL #1 and #3 stably transfected cells. The detection of the vector in stably transfected cells was done by pXJ40 vector specific primers and RPLP0 was used as loading control. Full-length gels are presented in Figure S5. **(D)** RT-PCR analysis of alternatively spliced E6 transcripts in HPV16+ cell lines SCC090, SiHa, Ca Ski, in stable cell lines U-E6All #1, #6 and #7 and in HPV16+ HNSCC tumor samples. RPLP0 was used as loading control. Note that a band can be observed at 400 bp and could correspond to heteroduplexes between the different amplicons generated during PCR reaction. Full-length gels are presented in Figure S6. **(E)** RT-PCR showing alternatively spliced E6 transcripts in naturally HPV16-infected cells (W12_20861, W12_20862, W12_20863).

such as single-organism cellular process (GO: 0044763), protein-metabolic process (GO: 0019538), metabolic pathways (KEGG: hsa01100), ribosome (KEGG: hsa03010) and pathways in cancer (KEGG: hsa05200) (Fig. 5A). Based on protein-coding transcripts deregulated in U-E6All cells, a protein interaction network was constructed using the STRING database (Fig. 5B). Many of the deregulated transcripts identified in U-E6All cells have been previously identified in HPV-infected cells and tumor samples such as transcripts encoding ribosomal subunits, SYCP2, NUP210 and DICER1^{29–33}.

Gene ontology and KEGG pathway analysis of U-E6*I cell lines revealed 6 gene classes deregulated by ectopic expression of E6*I: Extracellular Matrix Organization (GO:0030198), Response to decreased oxygen levels (GO: 0036293), MAPK signaling pathway (KEGG: hsa04010), Focal adhesion (KEGG: hsa04510), Cytokine-cytokine receptor interaction (KEGG: hsa04060) and Pathway in cancer (KEGG: hsa05200) (Fig. 6A). In addition, the STRING database reported interactions between 10 protein-coding transcripts based on text mining, protein-protein interaction and co-expression data. Furthermore, these data show that the core interactors belong

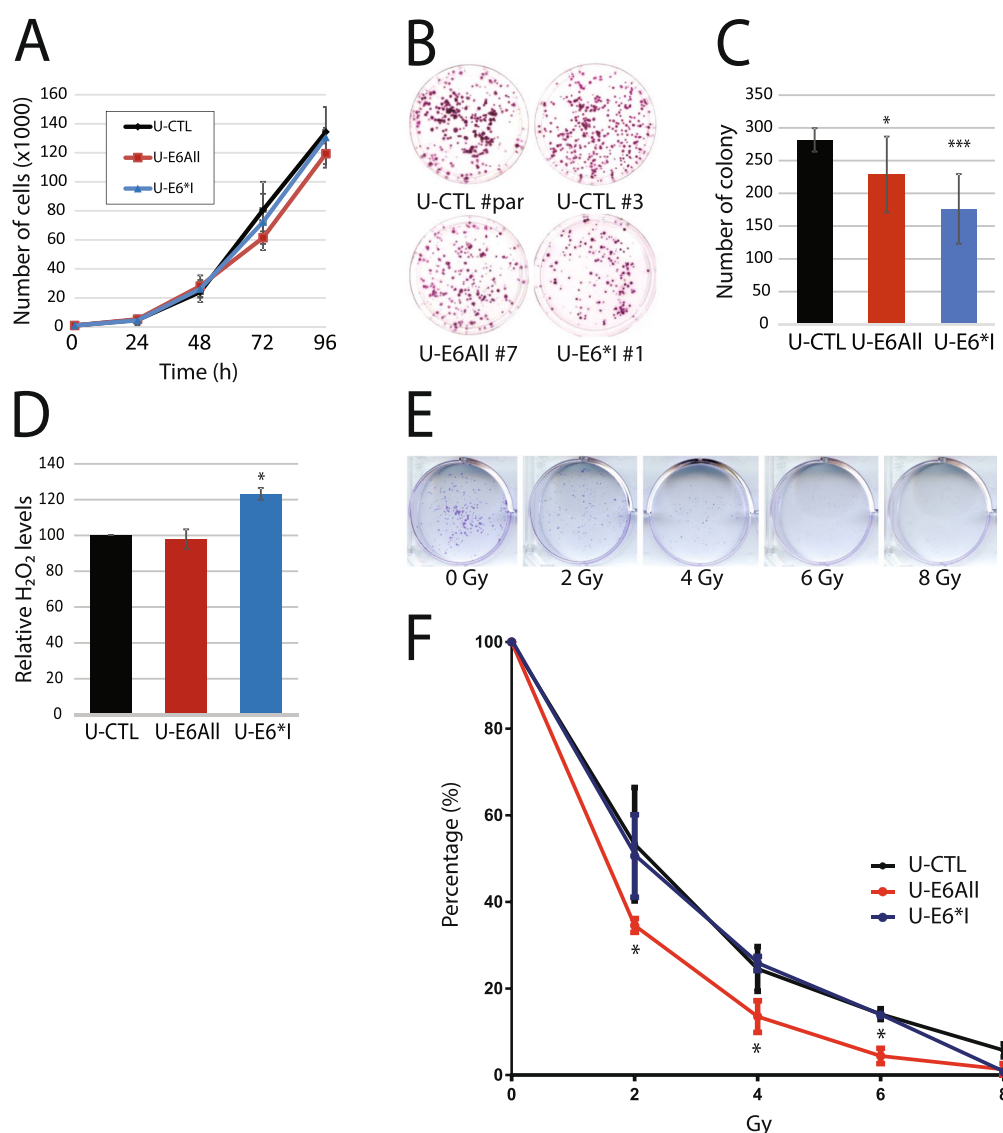


Figure 3. HPV16 E6 and E6*I expression differentially alters phenotypic characteristics relevant to cancer cells. (A) Cell proliferation assay with stably transfected cells U-CTL (black), U-E6All (red) and U-E6*I (blue) was performed to monitor daily live cells for 4 days. Cell counts are represented as mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments. (B) Representative images of the colony formation assay realized with U-CTL#par, U-CTL#3, U-E6All#7 and U-E6*I#1. (C) Quantification of the colony formation assay realized with U-CTL (#par, #1, #3), U-E6All (#1, #6 and #7) and U-E6*I (#1, #6 and #14) cell lines. Foci counts are represented as mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments. (D) Detection of H₂O₂ released from U-CTL (#par, #1, #3), U-E6All (#1, #6 and #7) and U-E6*I (#1, #6 and #14) cell lines in 1 h using the Amplex Red assay. H₂O₂ relative levels are represented as mean $\pm$ S.D. of 3 independent experiments. (E/F) Clonogenic radio sensitivity assay performed with U-CTL, U-E6All and U-E6*I cell lines. Cell colonies (>50 cells) were counted 10 days following irradiation (0 to 8 Gy). Mann-Whitney test were used to assess statistical significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

to the extracellular matrix organization and/or oxidative stress response pathways (Fig. 6B). These data reveal specific pathways deregulated by E6*I in an E6-independent manner.

RNA sequencing transcripts validation by RT-qPCR. To validate RNA-seq data, expression of several transcripts was confirmed by RT-qPCR. We selected SYCP2, NUP210 and DICER1 transcripts deregulated in U-E6All cells and already known to be modulated by E6 expression (Fig. 7A), the 11 transcripts deregulated in both U-E6All and U-E6*I cells (Fig. 7B) and 13 transcripts only deregulated in U-E6*I cells including the 6 transcripts assigned to “response to decreased oxygen levels” (GO: 0036293) (Fig. 7C). Except for the lincRNA (long intergenic non-coding RNA) named CH507-210p18.1, fold changes estimated by RT-qPCR and RNA-sequencing are consistent for all transcripts tested. Pearson correlation coefficients (R) were calculated. We found high

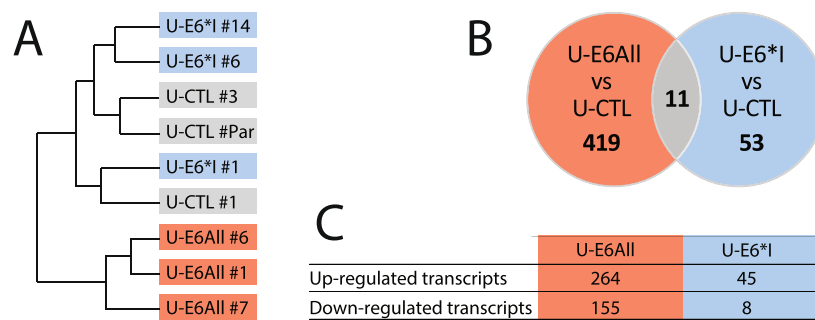


Figure 4. Transcriptome profiles reveal that E6*I deregulates cellular targets independently of E6.

(A) Unsupervised hierarchical clustering of RNA-seq data from the U-CTL, U-E6All and U-E6*I cell lines.

(B) Venn diagram showing the number of deregulated genes in the 2 pairwise comparisons U-E6All vs. U-CTL and U-E6*I vs. U-CTL. (C) Number of deregulated transcripts in U-E6All and U-E6*I cell lines compared to U-CTL.

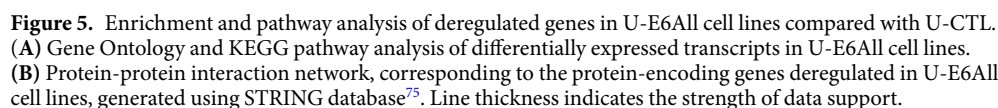
correlations ($R = 0.996$ for U-E6All-deregulated transcripts, $R = 0.853$ for both U-E6All- and U-E6*I-deregulated transcripts and $R = 0.993$ for U-E6*I-deregulated transcripts) indicating a strong concordance between RNA-seq and RT-qPCR data.

Expression pattern of E6 or E6*I deregulated transcripts in W12 cell line. To validate the biological significance of the cellular transcripts found deregulated by E6*I, we performed experiments on W12 cells, a naturally HPV16-infected cervical keratinocyte cell line. First, absolute quantification was done to measure the copy number of E6 and E6*I mRNAs in three undifferentiated W12 clones (W12_20861, W12_20862, W12_20863). The W12_20861 clone expresses the highest level of E6*I transcript (approximately 4.10^6 copies/ μ L) compared to W12_20862 and W12_20863 clones (approximately 500 000 copies/ μ L) (Fig. 8A). Unspliced E6 transcripts are highly expressed in the W12_20863 clone (approximately 1.10^6 copies/ μ L) compared to W12_20861 and W12_20862 clones (approximately 230 000 and 14 000 copies/ μ L, respectively). In each W12 clone tested, we observed a strong correlation between RNA and protein levels for E6 with high level of E6 protein and low level of p53 protein in W12_20863 clone compared to W12_20861 and W12_20862. The high levels of E6*I mRNA and E7 protein in W12_20861 clone is also consistent with the lowest level of pRB protein (Figs 8B and S7). Overall, each clone possesses a unique expression profile of HPV transcripts and proteins allowing us to correlate those profiles to the expression of cellular targets identify by RNA-seq. So, the expression levels of transcripts modulated by E6 such as SYCP2, p21 and TNFAIP6 was measured by RT-qPCR in each W12 clone. As expected, SYCP2 and TNFAIP6 transcripts are upregulated while p21, a p53 target gene, is downregulated in the W12_20863 clone expressing the highest level of E6 (Fig. 8C).

Next, we monitored the RNA levels of CCL2, RAC2 and PDGFB transcripts modulated by E6*I. These transcripts encode proteins implicated in the activation of the NADPH Oxidase complex-2 (Nox2), required for Nox-dependent ROS production. There were higher levels of CCL2 and RAC2 in W12 clone expressing high level of E6*I (W12_20861). Nevertheless, a decreased expression of these transcripts is observed in cells expressing high level of E6 (W12_20863) suggesting that E6 could have the ability to counteract the effects of E6*I. Altogether, these results show that E6*I expression could drive the expression of genes implicated in oxidative stress metabolism in the W12 cell lines but also indicate that E6 can abrogate the effect of E6*I on ROS metabolism.

Discussion

To our knowledge, this study is the first report assessing the impact of HPV16 E6*I on cellular gene expression using RNA sequencing. The aim of this study was to uncover target genes specifically modulated by E6*I independently of the full length E6 protein. To this end, stable cell lines expressing either all E6 protein isoforms (U-E6All) or E6*I (U-E6*I) exclusively, were generated from U-2 OS. The U-2 OS cell line represents an adequate model for studying HPV gene expression and HPV-associated carcinogenesis because it expresses a wild-type p53, which can be targeted by E6. Furthermore, it was shown that viral gene expression of both alpha and beta papillomaviruses in U-2 OS is very similar to that described in keratinocytes³⁴. Immunoblotting experiments allowed to confirm the expression of a functional E6 by loss of p53 in U-E6All cell lines³⁵. E6 early transcripts were also efficiently spliced in U-E6All cell lines, yielding high amount of E6*I transcripts as observed in HPV16-positive cell lines and HNSCC clinical samples³⁶. However, although the E6*I protein was detected in transient transfection, no protein was observed in stable cell lines, probably due to the extremely short half-life of the E6*I isoform. This was already documented in a previous study, which reported the detection of an HPV16 E6*I fusion protein following transient transfection but failed to detect E6*I in stable cell lines³⁷. In the present study, we observe an accumulation of endogenous p53 protein in the HPV16 E6*I-expressing U-2 OS cells, suggesting that E6*I could have opposite effect of E6 on p53 protein level. But, we also show that E6*I expression causes an accumulation of ROS, indicating that the increasing level of p53 observed can be mediated by the ROS production. Also, emerging roles of non-coding RNAs in gene expression regulation and the noticeable difficulties to detect the E6*I protein by western blotting encouraged us to consider that the transcriptome deregulation



To assess the biological characteristics of the stable cell lines, we carried out several functional assays. We confirm that E6 isoforms or E6*1 expression in HPV-negative cells had no impact on cell proliferation^{20,39}. A previous study⁴⁰ has observed that E6 expression inhibited colony formation. Here, we show that E6*1 had a stronger inhibitory effect on colony formation than E6. Congruent with a previous study using U-2 OS cells transiently

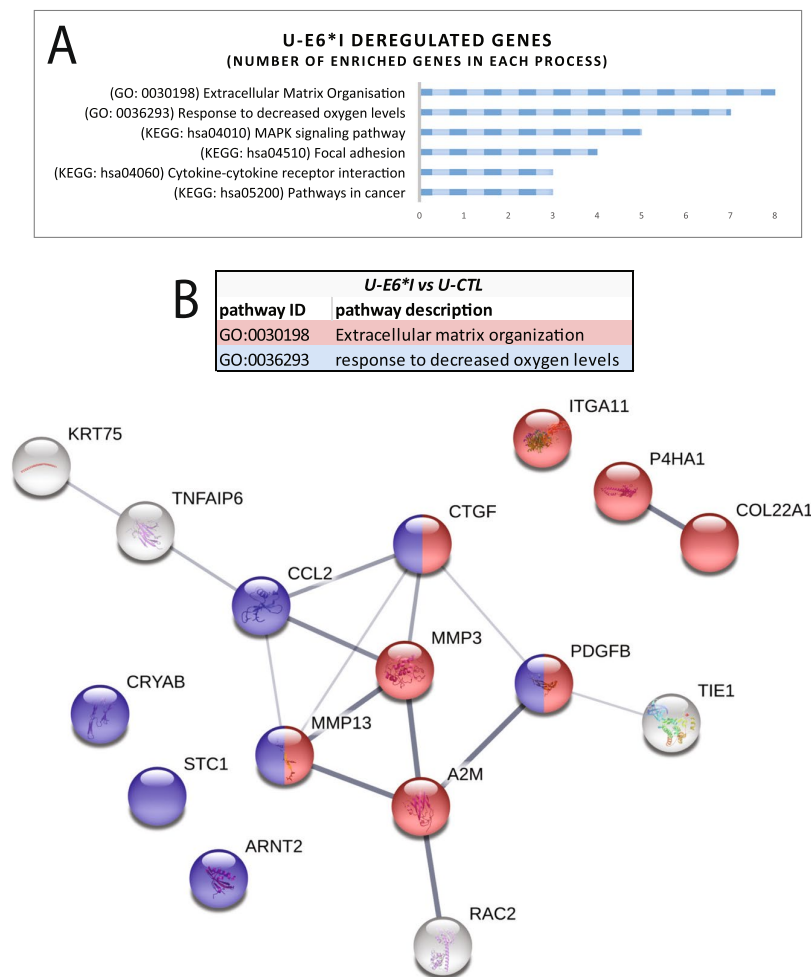


Figure 6. Enrichment and pathway analysis of deregulated genes in U-E6*I cell lines compared with U-CTL. **(A)** Gene Ontology and KEGG pathway analysis of differentially expressed transcripts in U-E6*I cell lines. **(B)** Protein-protein interaction network, corresponding to the protein-encoding genes deregulated in U-E6*I cell lines, generated using STRING database⁷⁵. Line thickness indicates the strength of data support. In blue and red are represented proteins involved in extracellular matrix organization and response to decreased oxygen levels, respectively.

expressing E6 isoforms or only E6*I²⁴, we report that stable expression of E6*I increases ROS production but no change is observed in cells co-expressing E6. Finally, radio sensitivity assays showed that U-E6All cells are more sensitive to radiation than both E6*I and control cells. These latter results could be partially explained by the TP53 wild-type status of our cellular model given the fact that E6 was shown to disrupt the p53-mediated cellular responses to DNA damage⁴¹. Altogether, these data suggest that E6 isoforms have a specific impact on cellular phenotype and that the impact of E6*I is modulated when co-expressed with E6.

Recently, a whole transcriptome study using differentiated keratinocytes showed that HPV16 infection modulates genes involved in the regulation of cellular matrix adhesion, ROS biosynthesis and inflammatory response⁴². In our study, RNA sequencing identified 419 transcripts significantly deregulated in HPV-negative cellular model expressing E6 isoforms. Among them, a substantial number was already described in the literature as deregulated in HPV16 cellular models or in HPV16-positive clinical samples such as the down-regulation of a large set of transcripts encoding ribosomal subunits²⁹. Hence, KEGG pathway and GO enrichment analysis showed viral gene expression and protein synthesis related terms enriched. Our HPV-negative U-2 OS cellular model highlights the implication of E6 in the downregulation of ribosomal subunits transcripts. In addition, we confirm the upregulation of SYCP2, Nup210 and DICER1 transcripts, which were previously shown to be increased in HPV16-positive clinical samples from cervical²⁹ and head and neck cancers, and HPV-negative cell lines expressing E6 and E7 proteins^{30,33}.

Comparative RNA sequencing analysis also revealed that E6*I expression was sufficient to modulate the cellular transcriptome. KEGG pathway and GO enrichment annotations showed that E6*I-deregulated transcripts were assigned to extracellular matrix organization, response to decreased oxygen levels, mitogen activated protein

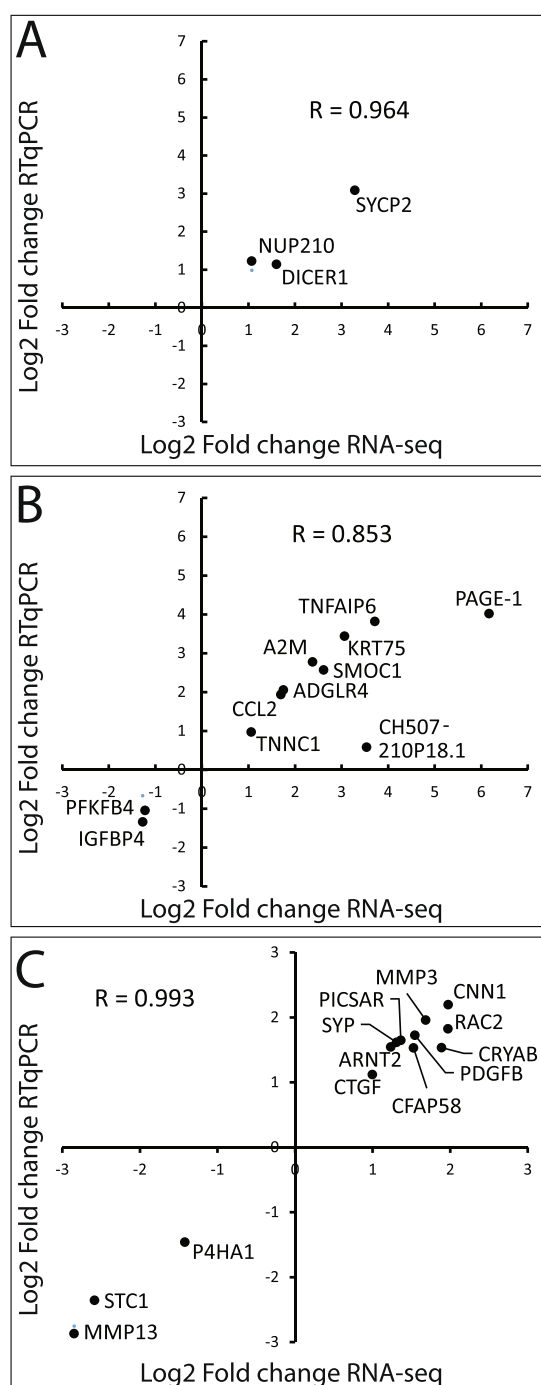


Figure 7. Correlation between RNA-sequencing and RT-qPCR results. RT-qPCR analyses of **(A)** 3 transcripts deregulated in U-E6All cell lines (U-CTL vs U-E6All), **(B)** the 11 transcripts deregulated in both U-E6All and U-E6*I cell lines (U-CTL vs U-E6*I) and **(C)** 13 transcripts deregulated in U-E6*I cell lines (U-CTL vs U-E6*I). Fold changes are represented in x- and y-axes for RNA-seq and RT-qPCR, respectively. For each condition, the data represent mean of the 3 clones. For RT-qPCR, RPLP0 was used as housekeeping gene.

kinase (MAPK), focal adhesion, cytokine-cytokine receptor interaction and cancer pathways. STRING analysis indicates that most transcripts implicated in extracellular matrix and response to decreased oxygen levels are predicted to form a significantly enriched core of interactors. A previous study, as well as ROS measurement in our model, indicate that E6*I increases levels of ROS²⁴. Thus, we focused downstream analyses on E6*I-deregulated

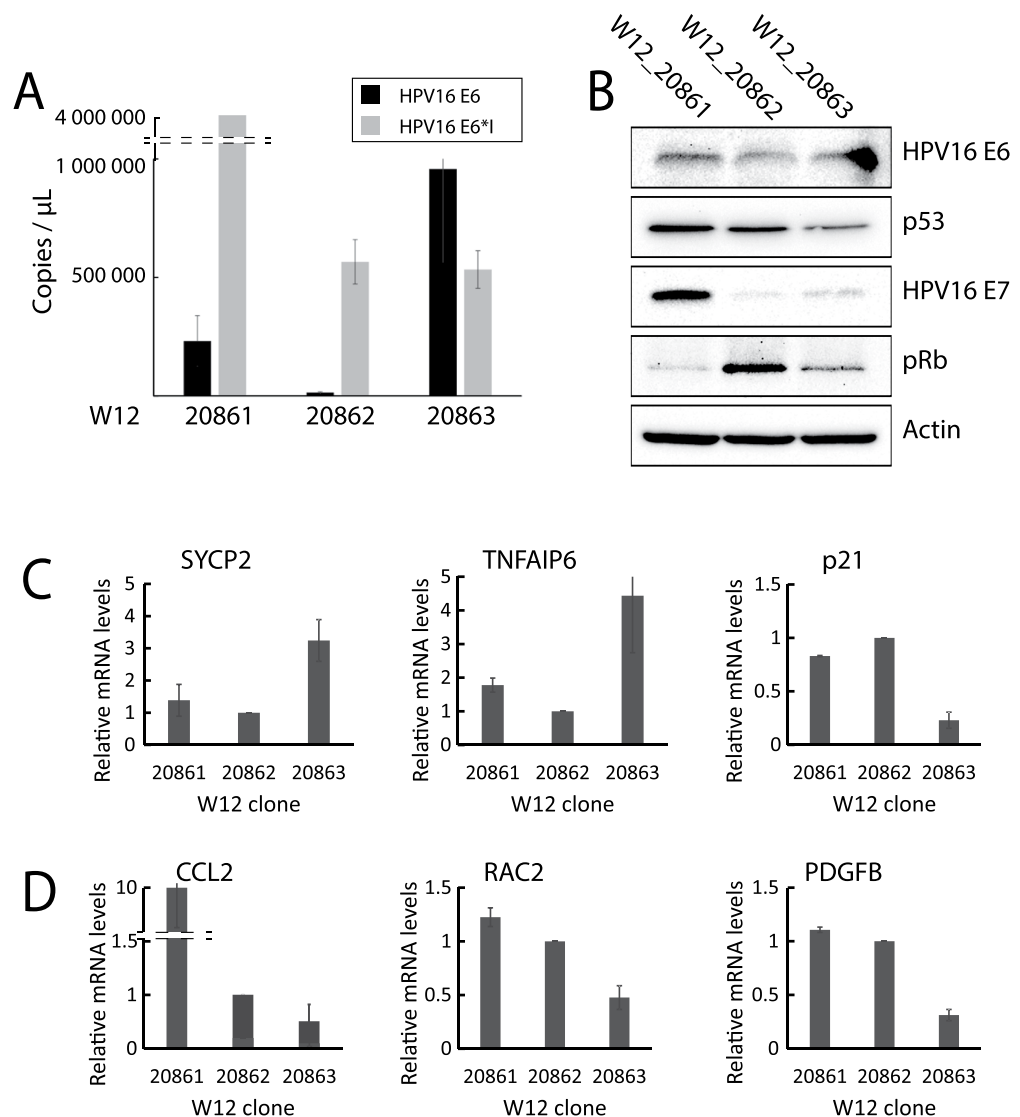


Figure 8. Expression levels of E6- and E6*I-deregulated transcripts in W12 clones. **(A)** RT-qPCR analysis showing E6 and E6*I absolute mRNA levels (copies per μL of pure cDNA) in W12_20861, W12_20862 and W12_20863 clones. pXJ40-E6 and pXJ40-E6*I diluted in salmon sperm DNA (50 ng/ μL) were used to generate standard curves. **(B)** Western blot analysis showing HPV16 E6 and E7, p53 and pRb protein levels in W12 clones. β -actin is used as loading control. RT-qPCR analyses showing. Full-length gels are presented in Figure S7. **(C)** SYCP2, TNFAIP6 and p21, and **(D)** CCL2, RAC2 and PDGFB relative mRNA expression in W12 clones. RPLP0 was used as housekeeping gene. RT-qPCR are represented as means $\pm$ S.D. of 3 independent experiments.

transcripts implicated in the latter ontology, namely CRYAB⁴³, CCL2⁴⁴, CTGF⁴⁵, PDGFB^{46,47}, STC1⁴⁸, ARNT2⁴⁹, MMP13^{50,51}, MMP3^{52,53}, RAC2^{54,55} and TNFAIP6^{56,57} were also found associated with ROS metabolism. These E6*I-deregulated genes have been validated using RT-qPCR. The high correlations found demonstrate the robustness of fold changes estimated from RNA-seq.

To further investigate the effects of E6*I expression observed in the U-2 OS model, we validated the cellular target genes involved in ROS metabolism in the W12 HPV16-infected keratinocyte cell line. These cells, derived from a low-grade cervical lesion, has been extensively used for the study of HPV infection, life cycle and carcinogenesis. Many clones have been established harboring episomal or integrated type I and II HPV16 genomes to study all those aspects⁵⁸. Interestingly, each clone expresses different levels of E6 and E6*I mRNAs allowing us to get a better understanding on how E6*I potentially modulates the cellular targets identified by RNA-seq and on the existing interplay between E6 and E6*I. Quantification of HPV16 transcripts and proteins in W12 clones revealed a close correlation between mRNA levels and subsequent protein levels as it has been previously reported⁵⁹. TNFAIP6 was found upregulated in both U-E6All and U-E6*I cells by RNA-seq. Nevertheless,

TNFAIP6 RNA levels correlate with E6 expression in the W12. Finally, we confirm that RAC2, CCL2 and PDGFB mRNA levels correlate with E6*I expression in the W12 cellular model. RAC2 is a Rho-like small GTPase, implicated in the activation of the NADPH Oxidase complex-2 (Nox2), catalyzing the production of ROS. It has been shown that ROS production induced by Rac2 leads to DNA damage in leukemia stem cells causing genome instability suspected to drive the rapid accumulation of mutations in progenitor cells⁵⁴. Low levels of RAC2 have also been linked to lower ROS production and DNA damage in quiescent cells exposed to radiation⁵⁵. Interestingly, PDGF growth factor is also closely related to the Nox complex. PDGF interaction with its receptor was shown to activate ROS production by the Nox complex in hepatic⁴⁷ and epithelial model⁴⁶. Finally, CCL2 increases production of ROS by regulating gp91phox, a subunit of the Nox complex⁶⁰. CCL2 expression has also been shown to be reduced when the Nox complex is impaired and produce low levels of ROS⁶¹. The expression of RAC2, CCL2 and PDGFB induced by E6*I could drive Nox2 complex activation, thus representing a new pathway by which E6*I is able to increase cellular ROS production.

Oxidative stress is crucial in carcinogenesis because of its role in inflammation, mutagenesis, initiation and neoplastic progression⁶². Cellular antioxidant defenses exist to maintain cellular homeostasis and viruses are well known to induce oxidative stress by interfering with those defenses^{63,64}. Studies have linked HPV16 E6*I expression to changes in the activity of antioxidant enzymes, increased level of ROS and accumulation of DNA damage^{24,65,66}. In our study, RNA sequencing did not reveal any change in SOD and GPX mRNA levels when E6*I is expressed, probably due to a post-translational regulation of these enzymes by E6*I. In the context of hrHPV-driven carcinogenesis, it has been proposed that oxidative stress induced by E6*I could cause genome instability thus facilitating the integration of HPV genomes into the host cell genome^{67,68}. This hypothesis is consistent with the correlation between the severity of cervical lesions and the increasing levels of spliced E6*I mRNA^{5,12–14,26}.

In conclusion, our study reports that HPV16 E6*I induces modulation of the U-2 OS cellular transcriptome using RNA sequencing. We identified cellular genes involved in ROS metabolism that were deregulated by the ectopic expression of E6*I in our model and that are also found deregulated by endogenous E6*I expression in the W12 keratinocyte model. In agreement with previous studies, E6*I can promote viral genome integration into host genome⁶⁹ by inducing ROS and subsequently increasing genome instability²⁴. Here, we highlight the NADPH oxidase pathway as a new potential target of HPV16 E6*I that could explain the increased ROS production. Further studies will be needed to fully understand how oxidative stress related genes modulated by E6*I could affect HPV-driven carcinogenesis and life cycle. This study also demonstrate that E6*I-cellular transcriptome modulation is altered in the presence of E6 suggesting, among others things, a rivalry between the two protein isoforms. The overlap of only 11 transcripts between U-E6All and U-E6*I conditions suggests that E6 is able to partially negate the effects of E6*I. The modulation of ROS production in U-2 OS, and ROS-related genes expression in U-2 OS and W12 clones depending on E6/E6*I levels is in agreement with this interplay. Similarly, it has been observed that the effects of ectopic E6*I on antioxidant enzymes²⁴ seems to be lost when E6*I is co-expressed with E6⁷⁰. Other paradoxical observations were made concerning the expression of E6 and E6*I. The first aspect of this interplay was reported on the opposite effects of both isoforms on p53 degradation and subsequent apoptosis of E6-expressing cells²⁰. More recently, the protection of E6-expressing cells from TNF was only seen when E6 or E6*I are expressed alone but not when both isoforms are expressed³⁷. These observations ask the question of how E6*I can be considered separately of E6 in the natural history of HPV16 infection.

Materials and Methods

Cell culture. Human osteosarcoma derived cell line U-2 OS, HPV16-positive carcinoma derived cell lines SiHa (ATCC[®] HTB-35[™]), SCC090 (ATCC[®] CRL-3239[™]) and U-2 OS stable cell lines were cultured in DMEM medium (Lonza, Verviers, Belgium). U-2 OS stably transfected clones were routinely cultured in the presence of 625 µg/mL G418 to maintain selection. HPV16-positive carcinoma derived cell line Ca Ski (ATCC[®] CRL-1550[™]) was cultured in RPMI-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium). All media were supplemented with 10% Fetal Calf Serum (Eurobio, Courtaboeuf, France). Undifferentiated W12 20861, 20862 and 20863 clones were cultured in monolayer on Mitomycin C treated mouse 3T3 cells as previously described⁵⁸. Cell lines were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂.

Plasmids, transient and stable transfections. pXJ40 (empty) and pXJ40-E6All vectors, containing the HPV16 E6 coding sequence, have been generously provided by Murielle Masson (ESBS, Illkirch, France). The pXJ40βGloΔint vector was generated from the pXJ40 vector, using Q5Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) and the following primers 5'-CTCCTGGGCAACGTG-3' and 5'-CCTGAAGTTCTCAGGATCG-3'. The pXJ40-E6*I vector, lacking the intron 1 located in the E6 ORF corresponding to the nucleotides from 227 to 408 was generated from the pXJ40-E6All vector (Primers: 5'-GTGTATTAAGTGTCAAAAGCC-3' and 5'-CTCAGTCGCAGTAACTG-3'). Transient transfections of the U-2 OS cell line were performed using JetPEI reagent (Polyplus-transfection, Illkirch, France) according to manufacturer's instructions. Cells were incubated in the presence or absence of 10 µM of proteasome inhibitor MG132 for 16 h and harvested after 48 h incubation post-transfection. U-2 OS stable cell lines were obtained using JetPEI reagent by co-transfecting with a ratio of 1:9 respectively, the pcDNA3.1-2Flag vector (neomycin resistance) and corresponding pXJ40 vectors (pXJ-CTL, pXJ40-E6All and pXJ40-E6*I). G418 resistant stable clones were then selected after 3 weeks under selection with 800 µg/mL G418 (Euromedex).

Cell proliferation and clonogenicity assays. Cell proliferation assays were done with 10,000 cells in 12-well plates by counting cells each day for 4 days using the EVE[™] automatic cell counter (Nano EnTek). Clonogenicity assays were performed by seeding 500 cells of each U-CTL, U-E6All and U-E6*I cell lines in 10 cm dishes. After 14 days of culture, colony were counted after crystal violet staining. Clonogenicity radio sensitivity

assays were performed by seeding 300 cells in 6-well plates 24 h before gamma irradiation (0 to 8 Gy) using Gammacell[®] 40 Exactor (Best Theratronics, Ltd). After treatment, cells were cultured for 10 days then stained with crystal violet. Cell colonies presenting >50 cells were finally counted. For each biological replicate (n = 3), 2 wells were analyzed for colonies counting.

Measurement of Hydrogen peroxide (H₂O₂). Measurement of H₂O₂ released from stably transfected U-2 OS cells was carried using the Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen) following manufacturer instructions. Four hours after seeding 800,000 cells of each clone in 35 mm dishes, cells were incubated for 1 h in 500 µL PBS1X. Then, 50 µL was transferred in an opaque 96 well plate in triplicate and mixed with an equal amount of Amplex Red reagent (50 µM Amplex Red and 0,1 U/mL HRP final concentrations). After 1 h incubation at room temperature in the dark, fluorescence was measured (560_{ex}/590_{em} nm) on a SynergyTM H1 microplate reader (Biotek).

Immunoblot assays. U-2 OS, SiHa, Ca Ski or W12 cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Na deoxycholate, 1 mM EDTA) supplemented with 30 µg/mL of anti-protease mixture (Roche Diagnostics) followed by sonication. After centrifugation at 10,000 × g for 10 min at 4 °C, protein concentrations were determined in supernatant using Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. Forty µg of protein in Laemmli lysis buffer were then loaded onto a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel. After the transfer of proteins onto 0.2 µm AmershamTMHybondTM-PVDF membrane (GE Healthcare) and blocking 1 hour with 5% nonfat milk in Tris-buffered Saline-Tween20, membranes were probed with primary antibodies for 2 hours (except cell signaling antibodies on night) then with HRP-conjugated secondary antibodies (see below) for 1 h. Chemiluminescent signal was detected using PierceECL 2 Western Blotting Substrate (ThermoScientific).

Antibodies. Anti-HPV16E6 antibodies 1E-6F4 (E6 N-ter) and 2E-3F8 (E6 C-ter) were obtained from Euromedex. Anti-p53 (DO-1) and anti-pRb (4H1) antibodies were obtained from Cell Signaling. Anti-β-actin (AC-15) antibody was obtained from Sigma-Aldrich. Anti-HPV16E7 (NM2) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology. HRP-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was purchased from BD Pharmingen. Primary and secondary antibodies have been diluted respectively to 1:1000 and 1:5000 in blocking buffer (except for β-actin at 1:20,000 and 1:30,000).

RT-PCR and RT-qPCR. Total RNAs were extracted using RiboZol reagent (Amresco) and then 500 µg were retro-transcribed into cDNA using Maxima first strand cDNA synthesis kit (ThermoScientific) according to manufacturer instructions. For PCR, cDNAs were amplified using DreamTaq polymerase (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions. PCR products were analyzed on a 2% (w/v) agarose gel prepared with Tris-Borate-EDTA buffer. Quantitative PCR was performed using Power SYBR Green PCR mix (Life Technologies) according to manufacturer instructions and analyzed on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Serial dilutions of pXJ40-E6 and pXJ40-E6*I from 10⁷ to 10¹ copies/µL diluted in salmon sperm DNA (50 ng/µL) (Invitrogen) were used as template to generate standard curve for absolute quantification of E6 and E6*I mRNA copies respectively in W12 clones. Primer sequences used are listed in Supplementary Table 3. RPLP0 expression levels was used as internal normalization standards. The 2^{-ΔΔC_t} method was used for relative mRNA quantification.

RNA sequencing. RNA-seq was carried out to identify differentially expressed transcripts in U-E6All or U-E6*I cell lines compared to U-CTL cell lines. For each clone, total RNAs were extracted using RiboZol reagent (Amresco) according to manufacturer's instructions. cDNA libraries were produced with 1 µg of total RNA using TrueSeq Stranded mRNA Sample preparation kit (Illumina, Inc.). Sequencing was carried on 75 bp in single read on the NextSeq500 platform using the NextSeq500 High Output v2 kit (Illumina, Inc.).

Reads alignment. Raw reads quality was assessed using the fastQC software v0.11.3 (Babraham Institute, UK). Reads from each sample were then aligned to the reference human genome (GRCh38, release 87) using TopHat v2.1.1 (John Hopkins University, USA)⁷¹ with a minimum mapping quality score of 30. For each sample, an average of 45 million reads were uniquely mapped.

Differential expression analysis of cellular transcripts deregulated by E6 and/or E6*I. Cufflinks (Trapnell Laboratory, University of Washington, USA) was used for transcripts assembly and to assess transcripts abundance, which was normalized between all 9 samples using the fragments per kilobase per million mapped reads (FPKM) method to correct transcript length and library size bias⁷². Differentially expressed transcripts between control condition U-CTL and U-E6All or U-E6*I conditions were finally identified using Cuffdiff (Trapnell Laboratory). Transcripts with a false discovery rate (FDR) < 0,05 were considered significantly deregulated. No fold change cutoff was applied to the data. Nevertheless, more than 95% of transcripts with FDR < 0,05 had a fold change >2.

Accession numbers. RNA sequencing data in the form of BAM files have been submitted to SRA@ncbi.nih.gov under the BioProject PRJNA421890 and BioSamples SAMN08159315 (U-CTL #par); SAMN08159316 (U-CTL #1); SAMN08159317 (U-CTL #3); SAMN08159318 (U-E6All #1); SAMN08159319 (U-E6All #6); SAMN08159320 (U-E6All #7); SAMN08159321 (U-E6*I #1); SAMN08159323 (U-E6*I #6); SAMN08159324 (U-E6*I #14).

Functional analysis of deregulated genes. Enrichment analyses were performed using Gene Ontology (GO) database v1.2 on PANTHER v13.0⁷³, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) release 81.0⁷⁴ and STRING v10.5⁷⁵.

Statistics. Statistical analyses were carried out using XLSTAT v2017.4 (Addinsoft, Paris, France). Pearson's correlation coefficients (r) were used to investigate correlation between RNA sequencing and RT-qPCR analyses. Mann-Whitney tests were used to analyze statistical significance of proliferation, clonogenicity and H₂O₂ assays, and RT-qPCR experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Proliferation, clonogenicity, H₂O₂ and RT-qPCR graphs represent the mean of 3 experiments and the error bars represent the standard deviation.

References

- Schiffman, M. *et al.* The role of human papillomavirus (HPV) genotyping in cervical cancer screening: A large-scale evaluation of the cobas HPV test. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **24**, 1304–1310 (2015).
- de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J. & Franceschi, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer* **141**, 664–670 (2017).
- Graham, S. V. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses* **9**, 245 (2017).
- Johansson, C. & Schwartz, S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 239–251 (2013).
- Chen, J. *et al.* Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* **462**, 14–24 (2014).
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 550 (2010).
- McLaughlin-Drubin, M. E. & Münger, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* **384**, 335–344 (2009).
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. & Harlow, E. The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* **243**, 934–937 (1989).
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76–80 (1990).
- Smotkin, D., Prokoph, H. & Wettstein, F. O. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* **63**, 1441–1447 (1989).
- Cornelissen, M. T. E. *et al.* Uniformity of the Splicing Pattern of the E6/E7 Transcripts in Human Papillomavirus Type 16-transformed Human Fibroblasts, Human Cervical Premalignant Lesions and Carcinomas. *J. Gen. Virol.* **71**, 1243–1246 (1990).
- Kösel, S., Burggraf, S., Engelhardt, W. & Olgemöller, B. Increased levels of HPV16 E6*1 transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. *Cytopathology* **18**, 290–299 (2007).
- Cricca, M. *et al.* Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *J. Med. Virol.* **81**, 1276–1282 (2009).
- Lin, K. *et al.* E6-associated transcription patterns in human papilloma virus 16-positive cervical tissues. *Oncol. Lett.* **9**, 478–482 (2015).
- Hong, A. *et al.* E6 viral protein ratio correlates with outcomes in human papillomavirus related oropharyngeal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **17**, 181–187 (2016).
- Tang, S., Tao, M., McCoy, J. P. & Zheng, Z.-M. The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6*1 Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation. *J. Virol.* **80**, 4249–4263 (2006).
- Zheng, Z.-M. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J. Biomed. Sci.* **11**, 278–294 (2004).
- Stacey, S. N. *et al.* Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J. Virol.* **74**, 7284–7297 (2000).
- del Moral-Hernández, O. *et al.* The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells. *Arch. Virol.* **155**, 1959–1970 (2010).
- Pim, D., Massimi, P. & Banks, L. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* **15**, 257–264 (1997).
- Storrs, C. H. & Silverstein, S. J. PATJ, a Tight Junction-Associated PDZ Protein, Is a Novel Degradation Target of High-Risk Human Papillomavirus E6 and the Alternatively Spliced Isoform 18 E6*. *J. Virol.* **81**, 4080–4090 (2007).
- Pim, D., Tomaic, V. & Banks, L. The Human Papillomavirus (HPV) E6* Proteins from High-Risk, Mucosal HPVs Can Direct Degradation of Cellular Proteins in the Absence of Full-Length E6 Protein. *J. Virol.* **83**, 9863–9874 (2009).
- Wanichwatanadecha, P., Sirisrimangkorn, S., Kaewprag, J. & Ponglikitmongkol, M. Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*1 on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J. Gen. Virol.* **93**, 1081–1092 (2012).
- Williams, V. M., Filippova, M., Filippov, V., Payne, K. J. & Duerksen-Hughes, P. Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. *J. Virol.* **88**, 6751–6761 (2014).
- Filippova, M. *et al.* The small splice variant of HPV16 E6, E6N, reduces tumor formation in cervical carcinoma xenografts. *Virology* **450–451**, 153–164 (2014).
- Olmedo-Nieva, L., Muñoz-Bello, J. O., Contreras-Paredes, A. & Lizano, M. The Role of E6 Spliced Isoforms (E6*) in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Viruses* **10** (2018).
- Liu, Y., Tergaonkar, V., Krishna, S. & Androphy, E. J. Human Papillomavirus Type 16 E6-enhanced Susceptibility of L929 Cells to Tumor Necrosis Factor α Correlates with Increased Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **274**, 24819–24827 (1999).
- Shin, H.-J. *et al.* Human papillomavirus 16 E6 increases the radiosensitivity of p53-mutated cervical cancer cells, associated with up-regulation of aurora A. *Int. J. Radiat. Biol.* **86**, 769–779 (2010).
- den Boon, J. A. *et al.* Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E3255–E3264 (2015).
- Pyeon, D. *et al.* Fundamental Differences in Cell Cycle Deregulation in Human Papillomavirus-Positive and Human Papillomavirus-Negative Head/Neck and Cervical Cancers. *Cancer Res.* **67**, 4605–4619 (2007).
- Masterson, L. *et al.* Deregulation of SYCP2 predicts early stage human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma: A prospective whole transcriptome analysis. *Cancer Sci.* **106**, 1568–1575 (2015).
- Rajkumar, T. *et al.* Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer* **11**, 80 (2011).
- Harden, M. & Munger, K. Perturbation of DROSHA and DICER expression by Human Papillomavirus 16 Oncoproteins. *Virology* **507**, 192–198 (2017).
- Isok-Paas, H., Männik, A., Ustav, E. & Ustav, M. The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome. *Viol. J.* **12**, 59 (2015).
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129–1136 (1990).

36. Jung, A. C. *et al.* Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **126**, 1882–1894 (2010).
37. Filippova, M. *et al.* Complexes of Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Form Pseudo-Death-Inducing Signaling Complex Structures during Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis. *J. Virol.* **83**, 210–227 (2009).
38. Czech, B. & Hannon, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 19 (2011).
39. Sedman, S. A. *et al.* The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* **65**, 4860–4866 (1991).
40. Ristriani, T., Fournane, S., Orfanoudakis, G., Travé, G. & Masson, M. A single-codon mutation converts HPV16 E6 oncoprotein into a potential tumor suppressor, which induces p53-dependent senescence of HPV-positive HeLa cervical cancer cells. *Oncogene* **28**, 762–772 (2009).
41. Kesis, T. D. *et al.* Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 3988–3992 (1993).
42. Klymenko, T. *et al.* RNA-Seq Analysis of Differentiated Keratinocytes Reveals a Massive Response to Late Events during Human Papillomavirus 16 Infection, Including Loss of Epithelial Barrier Function. *J. Virol.* **91**, e01001–17 (2017).
43. van de Schootbrugge, C. *et al.* Effect of hypoxia on the expression of α B-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 252 (2014).
44. Li, X. *et al.* A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **35**, 1362–1370 (2014).
45. Murphy-Marshman, H. *et al.* Antioxidants and NOX1/NOX4 inhibition blocks TGF β 1-induced CCN2 and α -SMA expression in dermal and gingival fibroblasts. *PLoS ONE* **12** (2017).
46. Chen, K. C.-W., Zhou, Y., Zhang, W. & Lou, M. F. Control of PDGF-induced reactive oxygen species (ROS) generation and signal transduction in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* **13**, 374–387 (2007).
47. Adachi, T. *et al.* NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* **41**, 1272–1281 (2005).
48. Ohkouchi, S., Kikuchi, T., Ebina, M. & Nukiwa, T. Novel functions of stanniocalcin-1 (STC1) through uncoupling protein 2 (UCP2) up-regulation; promoting survival of cancer cells under oxidative stress and inducing the uncoupling respiration (Warburg effect). *Eur. Respir. J.* **38**, p1490 (2011).
49. Keith, B., Adelman, D. M. & Simon, M. C. Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6692–6697 (2001).
50. Waldron, A. L. *et al.* Oxidative stress-dependent MMP-13 activity underlies glucose neurotoxicity. *J. Diabetes Complications* **32**, 249–257 (2018).
51. Del Carlo, M., Schwartz, D., Erickson, E. A. & Loeser, R. F. The Endogenous Production of Reactive Oxygen Species Is Required For Stimulation of Human Articular Chondrocyte MMP Production by Fibronectin Fragments. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1350–1358 (2007).
52. Radisky, D. C. *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**, 123–127 (2005).
53. Choi, D.-H. *et al.* Matrix Metalloproteinase-3 Causes Dopaminergic Neuronal Death through Nox1-Regenerated Oxidative Stress. *PLoS ONE* **9** (2014).
54. Nieborowska-Skorska, M. *et al.* Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* **119**, 4253–4263 (2012).
55. Pei, H. *et al.* RAC2-P38 MAPK-dependent NADPH oxidase activity is associated with the resistance of quiescent cells to ionizing radiation. *Cell Cycle* **16**, 113–122 (2017).
56. Watanabe, R. *et al.* Emerging Roles of Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 in the Pathophysiology and Treatment of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018).
57. Shkolnik, K. *et al.* Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 1462–1467 (2011).
58. Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* **69**, 2989–2997 (1995).
59. Scarpini, C. G., Groves, I. J., Pett, M. R., Ward, D. & Coleman, N. Virus transcript levels and cell growth rates after naturally occurring HPV16 integration events in basal cervical keratinocytes. *J. Pathol.* **233**, 281–293 (2014).
60. Chun, E. *et al.* CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* **12**, 244–257 (2015).
61. Chen, X.-L., Zhang, Q., Zhao, R. & Medford, R. M. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF- α -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **286**, H1001–H1007 (2004).
62. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603–1616 (2010).
63. Paracha, U. Z. *et al.* Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virol. J.* **10**, 251 (2013).
64. Reshi, M. L., Su, Y.-C. & Hong, J.-R. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, <https://doi.org/10.1155/2014/467452> (2014).
65. Mouret, S. *et al.* E6* oncoprotein expression of human papillomavirus type-16 determines different ultraviolet sensitivity related to glutathione and glutathione peroxidase antioxidant defence. *Exp. Dermatol.* **14**, 401–410 (2005).
66. Evans, W. *et al.* Overexpression of HPV16 E6* Alters β -Integrin and Mitochondrial Dysfunction Pathways in Cervical Cancer Cells. *Cancer Genomics. Proteomics* **13**, 259–273 (2016).
67. Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U. & Duerksen-Hughes, P. J. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* **6**, 45–57 (2010).
68. Camini, F. C., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T. & de Brito Magalhães, C. L. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch. Virol.* **162**, 907–917 (2017).
69. Chen Wongworawat, Y., Filippova, M., Williams, V. M., Filippov, V. & Duerksen-Hughes, P. J. Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 764–780 (2016).
70. Cruz-Gregorio, A. *et al.* Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 21–35 (2018).
71. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111 (2009).
72. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
73. Mi, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
74. Ogata, H. *et al.* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 29–34 (1999).
75. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).

Acknowledgements

We thank Muriel Masson for kindly providing the pXJ40-E6All vector, Julie Frejaville and Anne Peigney for technical assistance, Gilles Travé for helpful advice and discussions and Nathalie Dourdin for carefully reading the manuscript. We also wish to thank Paul F. Lambert for kindly providing W12 cell clones. K.M. and P.P. had fellowships from the French ministry of research and technology. J.P. had fellowships from the Conseil Régional de Franche-Comté. This work was supported by Cancéropôle Est (CE), Ligue Contre le Cancer (Comité du Doubs and CCIR-GE), Université de Franche-Comté (UFC) and Région Franche-Comté.

Author Contributions

A.B. conceived the project. P.P.B. performed the bioinformatics analysis, the biochemical assays and the functional assays, K.M. realized the cloning and established the stable cell lines. D.B. performed radio sensitivity tests, A.J. provided the clinical samples, P.P.B. K.M., D.B., J.P., M.H., C.M., J.L.P. and A.B. analyzed the data. P.P.B. and A.B. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42393-6>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are small, non-enveloped double-stranded DNA viruses and infect cutaneous and mucosal epithelia. Highly widespread in the human population, infections are mostly asymptomatic, while a minority causes cutaneous and genital warts, and carcinomas. HPV-induced cancers represent 640 000 cases in 2012 worldwide and are localized at the anogenital and head and neck sites.

Cell transformation is induced by the overexpression of two viral oncoproteins E6 and E7, which are necessary for the initiation, promotion and progression of the cancerous phenotype. Indeed, their extinction causes cancer cell death. E6 and E7, for example, promote the degradation of p53 and pRb, thus inducing uncontrolled and increased proliferation of infected cells. But the two viral oncoproteins also interact with more than 150 protein partners and deregulate cell homeostasis. Interestingly, E6 and E7 modulate the expression of many proteins involved in the establishment of epigenetic marks, regulating gene expression. Furthermore, the overexpression of viral oncoproteins may be related to viral genome DNA methylation.

Since E6 and E7 hijack epigenetic mechanisms, the aim of the thesis was to study the molecular mechanisms regulating the oncoprotein expression during the treatment of cervical cancer cells by a DNA demethylating agent, the 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC).

In cervical cancer cells, we observed that a demethylating treatment induced E6 protein repression and destabilization of its transcripts, suggesting the involvement of a miRNA. Among miRNAs targeting viral transcripts, miR-375 was most likely to be involved this destabilization because (i) its promoter methylation increases with the severity of cervical lesions, (ii) it targets viral transcripts at five different regions, and (iii) its expression is increased in cervical cancer cells treated with 5azadC. In our experiences, miR-375 was indeed involved in the partial repression of viral transcripts during treatment. The results of this study further suggest that another molecular mechanism might be implicated in this repression. This is why, in a second step, we studied the possible involvement of a transcription factor, TBX2, in the viral transcript repression. Although the transcriptional rate of TBX2 is increased in cells treated with high concentrations of 5azadC, our results suggest that the protein is not expressed in cells, even after treatment, and that TBX2 does not regulate the viral promoter activity integrated into the cellular genome.

Cell treatment with demethylating agent also leads to loss of viability, in particular in Ca Ski cells. Indeed, 5azadC induces a G2/M cycle arrest in these cells, an increase of Sub-G1 cells percentage and a PARP cleavage. While 5azadC is already used in clinical practice for the treatment of other cancers, our data shed new light on the molecular mechanisms of 5azadC in cancers induced by HPV, which could be treated by this molecule or analogues.

Résumé

Les papillomavirus humains (HPV) sont des petits virus non enveloppés à ADN double brin, qui infectent les épithéliums cutanés et muqueux. Très largement répandus dans la population humaine, les infections sont la plupart du temps asymptomatiques, tandis qu'une minorité provoquent des verrues cutanées, des condylomes acuminés et des carcinomes. Les cancers induits par HPV représentent 640 000 cas en 2012 dans le monde et sont localisés au niveau anogénital et au niveau des voies aérodigestives supérieures.

La transformation des cellules est induite en particulier par la surexpression de deux oncoprotéines virales : E6 et E7, qui sont nécessaires à l'initiation, la promotion et la progression du phénotype cancéreux. Leur extinction provoque d'ailleurs la mort des cellules cancéreuses. E6 et E7 favorisent par exemple la dégradation de p53 et pRb, induisant ainsi une prolifération non contrôlée et accrue des cellules infectées. Mais les deux oncoprotéines virales interagissent aussi avec plus de 150 partenaires protéiques et dérèglent l'homéostasie cellulaire. Fait intéressant, E6 et E7 modulent l'expression de nombreuses protéines impliquées dans l'établissement des marques épigénétiques, impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. D'ailleurs, la surexpression des oncoprotéines virales peut être liée à la méthylation de l'ADN d'une partie du génome viral.

Puisque E6 et E7 détournent la machinerie épigénétique de la cellule, l'objectif du travail de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires régulant l'expression des oncoprotéines lors du traitement des cellules de cancers du col par un agent déméthylant de l'ADN, le 5-aza-2'-déoxycytidine (5azadC).

Dans des cellules issues de cancers du col de l'utérus, nous avons observé qu'un traitement déméthylant induisait une répression de la protéine E6 et une déstabilisation de ses transcrits, suggérant l'implication d'un miARN. Parmi les miARN ciblant les transcrits viraux, le miR-375 était le plus susceptible d'être impliqué dans la déstabilisation des transcrits car (i) la méthylation de son promoteur augmente avec la gravité des lésions du col de l'utérus, (ii) il cible les transcrits viraux au niveau de cinq régions différentes, et (iii) son expression est augmentée lors du traitement de cellules dérivées du cancer du col de l'utérus avec le 5azadC. Il s'est avéré que le miR-375 était effectivement impliqué dans la répression partielle des transcrits viraux lors du traitement. Les résultats de cette étude suggèrent par ailleurs qu'un autre mécanisme moléculaire pourrait être impliqué dans cette répression. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, nous avons étudié l'implication possible d'un facteur de transcription, TBX2, dans la répression des transcrits viraux. Bien que le taux transcriptionnel de TBX2 soit augmenté lors du traitement des cellules avec des fortes concentrations de 5azadC, nos résultats suggèrent que la protéine n'est pas exprimée dans les cellules, même après traitement, et que TBX2 ne régule pas l'activité du promoteur viral intégré au génome cellulaire.

Le traitement des cellules par l'agent déméthylant entraîne aussi une perte de viabilité en particulier des cellules Ca Ski. En effet, le 5azadC induit un blocage du cycle en G2/M dans ces cellules, une augmentation du pourcentage de cellules en Sub-G1 et un clivage de la PARP. Si le 5azadC est déjà utilisé en clinique pour le traitement d'autres cancers, nos données apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes moléculaires du 5azadC dans les cancers induits par HPV, qui pourraient ainsi être traités par cette molécule.