

Université de Montréal

**Identification de composé sensibilisant préférentiellement
les cellules exprimant les protéines E6 et E7 du VPH à
l'irradiation**

par
Amel Derdour

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Biologie moléculaire
option Maladies complexes chez l'humain

Janvier, 2015

© Derdour Amel, 2015

Résumé

Le cancer du col utérin (CCU) est dans plus de 99% des cas provoqué par une infection avec le virus du papillome humain (VPH), dont le potentiel oncogénique réside dans l'expression des proto-oncogènes viraux E6/E7. Le potentiel carcinogénique de ces protéines virales réside essentiellement dans leurs actions sur les produits des gènes suppresseurs de tumeur p53 et RB. Les produits de ces gènes, p53 et Rb, font parti des voies de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN cellulaire (RDA) et leur perte entraîne une perte de fonctionnalité qui mène à une instabilité génomique. À long terme et en présence de d'autres facteurs ceux-ci mèneront au développement d'un cancer. Les protéines E6 et E7 sont constitutivement exprimées dans les cellules du CCU ainsi que dans les cellules de tout autre cancer induit par le VPH et seulement dans ces dernières. La prise en charge des cas avancés de ces cancers se fait principalement par radiothérapie et chimiothérapie concomitante. La chimio-radiothérapie utilisée en traitement est efficace mais résulte en un taux élevé de morbidité et un nombre important de patientes récidiveront.

Nous proposons que l'exploitation de l'expression spécifique d'E6 et d'E7 dans les cellules du CCU permette d'envisager une stratégie de létalité synthétique afin d'amplifier l'effet létal de l'irradiation sur les cellules CCU. Ceci permettrait potentiellement d'augmenter l'efficacité du traitement et de diminuer les récurrences, ainsi que la morbidité liée au traitement. En s'appuyant sur cette hypothèse, notre objectif est d'identifier des composés dont l'action seule ou couplée à l'irradiation provoquerait préférentiellement la mort des cellules exprimant les protéines E6 et E7 du VPH. Les cellules testées comprennent des cellules isogéniques humaines issues de kératinocytes normaux que nous avons modifiées séquentiellement pour obtenir les modifications associées aux cellules CCU (hTERT, E6 et E7), ainsi que les lignées de cellules de CCU HeLa et CaSki. Nous avons procédé à la mise au point et à la validation du protocole de criblage et des méthodes d'évaluation de la sensibilisation, qui se définit comme une perte de viabilité, un arrêt ou ralentissement de la croissance, par détection d'ATP ainsi que par coloration d'ADN génomique au DRAQ5. Suite à un criblage ciblé impliquant des inhibiteurs connus de la voie de réparation des dommages à l'ADN, nous avons identifié l'inhibiteur de mdm2, Nutlin-3, comme étant un composé sensibilisant et radio-sensibilisant

préférentiellement les cellules exprimant E6 et E7 du VPH. La Nutlin-3 a été testée sur des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, des cellules CaSki et HeLa. L'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation a été confirmé dans ces trois lignées. Tel que suggéré par son action sur mdm2, la Nutlin-3 permet la stabilisation de p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 et CaSki et sa réactivation dans les lignées cellulaires HeLa et CaSki. Malgré cette stabilisation de p53, de façon surprenante, l'effet de la Nutlin-3 sur la sensibilisation et la radio-sensibilisation des cellules HeLa et CaSki semble indépendant de p53, tel qu'observé en utilisant des cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE dont le p53 est déficient. In vivo la Nutlin-3a montre dans un essai préliminaire l'inhibition de la croissance tumorale des xénogreffes HeLa chez des souris RAG2 γ c. Ce résultat reste à confirmer avec un essai impliquant un nombre d'échantillons plus grand. À plus long terme, nous comptons étudier l'implication de mdm2 dans l'effet de sensibilisant de la Nutlin-3 dans les cellules CCUs, ainsi que les autres cibles pouvant être impliquées dans la création de cet effet sensibilisant observé.

Mots-clés : Cancer du col de l'utérus, VPH, Nutlin-3, E6, E7, Réactivation de p53, Radiothérapie.

Abstract

More than 99% of uterine cervical cancer (UCC) are caused by human papillomavirus (HPV) infections. The oncogenic potential of this virus lies in the expression of the proto-oncogenes E6/E7. These viral proteins are considered carcinogenic because of their effects on tumor suppressor proteins p53 and Rb. E6 and E7 promote p53 and Rb inactivation resulting in a loss of function in the DNA damage response pathways (DDR), genomic instability, and cancer development. The E6 and E7 proteins are expressed constitutively and specifically in cervical cancer cells and in the cells of other HPV-induced cancers. The treatment of advanced UCC is based on simultaneous radiotherapy and chemotherapy. Although these strategies are somewhat efficacious, there are still significant co-morbidities and cancer relapses. We hypothesized that the specific expression of E6 and E7 in cervical cancer cells can be exploited in a synthetic lethality strategy to amplify the lethal effect of irradiation. Thus, the efficacy of treatment could be increased, while reducing the cancer recurrence and treatment-related morbidities. Our objective is to identify chemical compounds that if used alone or coupled with irradiation, would preferentially induce the death of cells expressing proteins E6 and E7 of HPV. We used a cellular model of human keratinocytes that were modified to obtain the genetic signature associated with cervical cancer cells (the expression of E6 and E7). We then proceeded to the optimization and validation of the methods used to evaluate the sensitization of the tested cells. To measure sensitization, we evaluated the quantity of cellular ATP by ATPlite assay and the cellular DNA content with the DNA stain DRAQ5. After establishing a screening protocol, we proceeded to a low-density screening to identify a compound that can sensitize or radio-sensitize cervical cancer cells expressing the HPV proteins E6 and E7. We identified Nutlin-3 a mdm2, inhibitor, as a radio-sensitizing component for cells expressing E6 and E7 of HPV. Nutlin-3 was tested and sensitization confirmed in HEK_n-hTERT-E6-E7 and in the cervical cancer cell lines HeLa and CaSki. We confirmed by Western-Blot the stabilisation of p53 in HEK_n-hTERT-E6-E7 and CaSki cells treated with Nutlin-3. Moreover, Nutlin-3 promotes p53 reactivation in the HeLa and CaSki cell lines. Surprisingly, the effect of Nutlin-3 on the sensitization and radio-sensitization of the HeLa and CaSki cell lines appears to be p53-independent. This is based on the observations made using p53-deficient HeLa-GSE and CaSki-GSE cell lines, which were also sensitized by

Nutlin-3. In addition, preliminary experiments showed that Nutlin-3a inhibits *in vivo* tumor growth, as seen using xenografts of HeLa in mice with a RAG2 γ c genetic background. This remains to be confirmed using an extended cohort of mice. In the future, it will be important to examine the implication of mdm2 in the sensitization effect of Nutlin-3 in cervical cancer cells and to find others possible targets that may play a role in the sensitization effect of Nutlin-3 observed in cervical cancer cells.

Keywords : HPV, Cervical Cancer, E6, E7 , p53 reactivation, Nutlin-3, Radiotherapy.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et Abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1 : introduction.....	1
1.1. Épidémiologie.....	2
1.2 Le cancer du col de l’utérus et le VPH.....	4
1.3 Le virus du papillome humain.....	6
1.4 Le cycle virale du VPH.....	8
1.4.1 Phase d’attachement et d’entrée du virus.....	8
1.4.2 Phase de maintenance : Rôles des protéines E1 et E2 dans la réplication de l’ADN viral	9
1.4.3 Phase de prolifération cellulaire : Rôles des protéines E6 et E7.....	10
1.4.4 Phase d’amplification.....	16
1.4.5 Phase d’assemblage et de relâche : Rôles de L1 et L2.....	17
1.5 L’infection avortée comme précurseur du cancer.....	18
1.6 Intégration de l’ADN viral et carcinogénèse.....	19
1.7 L’implication d’E6 dans la voie de réponse aux dommages à l’ADN.....	22
1.7.1 Les dommages à l’ADN.....	23
1.7.2 La voie de signalisation en réponse aux dommages à l’ADN et les points de contrôles cellulaires.....	24
1.7.3 Le destin cellulaire.....	26
1.8 Déficience de la RDA des cellules du cancer du col de l’utérus et traitement de la maladie.....	31
1.8.1 Problématique associés aux traitements actuels.....	31

1.8.2	La létalité synthétique : solution possible.....	32
	Hypothèse et objectifs.....	39
Chapitre 2 :	Matériels et Méthodes.....	40
2.1	Lignées cellulaires et conditions de culture.....	41
2.1.1	Lignées cellulaires.....	41
2.1.2	Conditions de culture.....	42
2.2	Protocole et condition de criblage à faible débit.....	43
2.3	Méthodes d'évaluation de l'effet de sensibilisation.....	43
2.3.1	Test ATPlite (Trousse d'essai ATPlite, Perkin elmer).	44
2.3.2	DRAQ5.....	44
2.4	Extraction de protéines.....	44
2.5	Méthodes d'analyse de protéines.....	45
2.5.1	Buardage de western.....	45
2.5.2	Immuno-fluorescence.....	45
2.6	Injection de cellules tumorales chez la souris (Xénogreffe HeLa).....	46
2.6.1	Matériels :.....	46
2.6.2	Méthode :.....	46
2.7	Protocole de traitement des souris RAG2 γ C avec la Nutlin-3a.....	46
2.7.1	Matériel.....	46
2.7.2	Méthode.....	47
Chapitre 3 :	Résultats.....	48
3.1	Présentation et validation du modèle cellulaire.....	49
3.1.1	Présentation du modèle cellulaire.....	49
3.1.2	Validation du modèle cellulaire.....	52
3.2	Validation de la méthodologie.....	56
3.3	Criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la voie de réparation des dommages à l'ADN.....	64
3.3.1	Présentation du protocole de criblage à faible débit.....	65
3.3.2	Criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la RDA.....	66
3.4	Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires.....	73

3.4.1	Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires dans les cellules HEK293-hTERT-E6-E7	73
3.4.2	Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires dans les lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki	77
3.4.3	Implication du p53 dans l'effet de sensibilisation de Nutlin-3	80
3.5	Étude l'effet de sensibilisation de la Nutlin-3 in vivo	82
Chapitre 4 : Discussion		86
4.1	Pertinence du modèle cellulaire HEK293-hTERT-E6-E7	88
4.2	Choix de la méthode d'évaluation de la sensibilisation : ATP-lite et sénescence.	89
4.3	Criblage à Faible débit : Choix du composé radio-sensibilisant.....	91
4.4	La Nutlin-3 : Réactivation du p53 comme thérapie.....	93
4.5	Effet de la Nutlin-3 in vivo	95
Conclusion		97
Perspectives.....		99
Bibliographie.....		101
Annexe		xvi

Liste des tableaux

Chapitre 2 :

Tableau I : Lignées cellulaires utilisées tout au long du projet et leurs caractéristiques.....	41
Tableau II : Anticorps utilisés en buvardage de western.....	45

Chapitre 3 :

Tableau III : Présentation des inhibiteurs de la RDA utilisés pour le criblage à faible débit, avec leurs concentrations et leurs cibles cellulaires respectives.....	66
Tableau IV: Compilation des effets des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules HEK _n -hTERT et HEK _n -hTERT-E6-E7 comme observé dans les figure 26 et 27.....	71
Tableau V: Présentation du protocole de l'essai préliminaire de l'effet de la Nutlin-3a sur les xénogreffes HeLa chez des souris RAG2 γ C.....	84

Annexe :

Tableau VI : Test-t sur les données du test de sensibilisation à la Nutlin-3 10 μ M sur les cellules HeLa, CaSki, HeLa-GSE et CaSki-GSE.....	xvi
--	-----

Liste des figures

Chapitre 1 :

Figure 1 : Répartition mondiale des taux d'incidence et de mortalité du VPH.....	2
Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du col de l'utérus au Canada, normalisé selon l'âge couvrant la période de 1972 à 2004	3
Figure 3: Les VPHs et leur association avec le cancer du col de l'utérus.....	5
Figure 4: Structure du virus du papillome humain (VPH).....	6
Figure 5 : Génome du VPH 16 (7904 pb) montré en noir.....	7
Figure 6 : Présentation des différentes phases du cycle de viral du VPH.....	8
Figure 7 : Stimulation de la progression dans le cycle cellulaire par les VPHs à haut risque...	10
Figure 8 : Présentation des changements dans le profil d'expression des protéines virales, qui accompagnent la progression vers un cancer du col de l'utérus.....	19
Figure 9 : Présentation des cibles biologiques d'E7.....	21
Figure 10 : Présentation des cibles biologiques d'E6.....	22
Figure 11 : Cascade de réponse au dommage à l'ADN (RDA).....	25
Figure 12 : Présentation des deux voix apoptotiques induites par p53 et menant à l'apoptose caspases – dépendantes.....	28
Figure 13 : Altération de la voie de réparation des dommages à l'ADN suite à l'expression d'E6.....	30
Figure 14 : Présentation du concept de létalité synthétique.....	38

Chapitre 3 :

Figure 15 : Présentation du développement du modèle cellulaire, HEKn-hTERT-E6-E7.....	51
Figure 16 : Courbe de croissance des cellules HEKn-hTERT-E6-E7-GFP.....	52
Figure 17: Validation de la fonction biologique de la protéine E6 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7.....	54

Figure 18 : Validation de la fonction biologique d'E7 dans les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	55
Figure 19 : Réaction enzymatique sur laquelle se base le système ATPlite.....	57
Figure 20 : Détermination de la sensibilité de la méthode de quantification cellulaire ATPlite pour les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	58
Figure 21: Effet de l'irradiation sur la croissance des cellules HEK _n -hTERT-E6-E7 mesurée par ATPlite	59
Figure 22 : Réponse à l'irradiation des cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	60
Figure 23: Détermination de la sensibilité de la méthode de quantification cellulaire par coloration d'ADN au DRAQ5 pour les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	63
Figure 24: Effet de l'irradiation sur la croissance des cellules HEK _n -hTERT-E6-E7 évaluée par coloration au DRAQ5.....	64
Figure 25: Protocole de criblage à faible débit pour un composé sensibilisant ou radio-sensibilisant les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	67
Figure 26 : Effet des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules contrôles HEK _n -hTERT.....	68
Figure 27 : Effet des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7	69
Figure 28 : Effet de la Nutlin-3 à 3 et 10 μ M, utilisée seule ou couplée à l'irradiation, sur les cellules contrôles HEK _n -hTERT et les cellules modèles HEK _n -hTERT-E6-E7 mesuré par ATPlite.....	73
Figure 29 : Effet de la Nutlin-3 à 10 μ M, utilisée seule ou couplée à l'irradiation, sur les cellules contrôle HEK _n et les cellules modèles HEK _n -hTERT-E6-E7 mesuré par DRAQ5.....	75
Figure 30 : Effet de la Nutlin-3 10 μ M sur la stabilisation du p53 dans les cellules HEK _n -hTERT-E6-E7.....	76
Figure 31 : Effet de la Nutlin-3 10 μ M sur la sensibilisation des cellules HeLa et CaSki si utilisée seule ou couplée à l'irradiation.....	78
Figure 32 : Effet de la Nutlin-3 10 μ M sur les niveaux de p53 et de p21 dans les cellules du CCU HeLa et CaSki.....	80

Figure 33 : Implication de p53 dans l'effet de sensibilisation provoqué par la Nutlin-3 10 μ M dans les cellules du CCU HeLa et CaSkI.....83
Figure 34 : Étude de l'effet de la Nutlin-3a sur la croissance tumorale des xénogreffes HeLa chez des souris RAG2 γ C.....85

Chapitre 4 :

Figure 35 : Implication des inhibiteurs utilisés dans le criblage à faible débit dans la voie de réponse au dommage à l'ADN.....94

Annexe :

Figure 36 : Validation de l'expression d'un p53 dominant négatif dans les cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE.....xvii

Liste des sigles et Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP1	Activator protein 1
ARF	ADP ribosylation factor
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BAK	BCL-2 homologous antagonist / Killer
BAX	BCL (B Cell Lymphoma)-Associated X
BCL2	B – Cell leukemia / lymphoma-2 gene
BDB	Bris double brins
BER	Base excision repair
BH1-4	BCL-2 homology domains 1-4
BRCA1	Breast cancer gene 1
BRCA2	Breast cancer gene 2
BSA	Bovine Serum Albumin
BSB	Bris simple brins
Caspase	Cystein - Aspartate protease
CCU	Cancer du col de l'utérus
Cdc2	Cell division cycle protein 2
Cdc42	Cell division cycle protein 42
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
CIN1-3	Cervical intra epithelial neoplasia de grade 1-3
C-Myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog

COXIV	Cytochrome C Oxydase
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phénylindole
DDR	DNA damage response
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA-PK	DNA-activated protein kinase
DRAQ5	Anthraquinone compound
E6AP	E6- associated protein
E2F	Transcription factor family including E2F- and DP-like subunits
EGF	Epidermal growth factor
ER	Early region
FADD	Fas-Associated protein with death domain
FBS	Foetal Bovine Serum
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
GADD45	Growth arrest and DNA Damage gene 45
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GSE	Genetic suppressor element
HIS	High grade squamous intra-epithelial neoplasia
HSIL	High grade superficial intra-epithelial lesion
HR	Homologous recombinaison
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulines de type G
IR	Irradiation, Irradié.
Kb	Kilobase
LCR	Long control region
LR	Late region
LSIL	Low grade squamous intra-epithelial lesion
MDM	Murine double minute
MDM2	Murine double minute 2
NHEJ	Non homologous end-joining
NOXA	NADPH oxidase activator

ORF	Open reading frame
PAP	PAP smear test
PAP1	Transcription factor MYB75
PCN	Proliferating cell nuclear antigen
PDZ	PSD- 95,Dlg,Z01
PDK	3-phosphoinositide-dependent protein kinase
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PML	Promyelocytic leukemia
pRB	phosphorylated retinoblastoma protein
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RB	Retinoblastoma protein
Rad50	Homolog of S. Cerevisiae RAD50
Rad51	Homolog of S. Cerevisiae RAD51
RDA	Voies de Réponse aux dommages à l'ADN
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SCC	Squamous Cervical Cancer
SCCL	Squamous Cervical Cancer Lesion
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TINA	Taux d'incidence normalisé selon l'âge
TMNA	Taux de mortalité normalisé selon l'âge
TNF-R1	Tumor necrosis factor receptor 1
URR	Upstream regulatory region
VPH	Virus du papillome humain

*À mes parents, sans lesquels je ne serais pas là
aujourd'hui,*

Remerciements

Je tiens tous d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr Francis, Rodier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir offert la possibilité de travailler sur ce projet passionnant. Merci, pour ton support et tes encouragements et pour m'avoir permis de découvrir mon potentiel.

J'aimerais remercier la secrétaire du programme de biologie Moléculaire Vivianne Jodoin pour son aide et sa Patience. Merci au Dr Richard Bertrand pour son écoute.

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire avec lesquels j'ai pu travailler pendant mes trois ans de maîtrise. Un gros merci à Guillaume, Cardin pour son aide, pour sa contribution à mon projet et ses conseils souvent très vagues. Son sarcasme et ses théories du complot vont me manquer. Merci, à Nicolas, qui a été une grande aide dans les moments les plus difficiles de mon projet. Merci à Patrick (Laboratoire Royal), pour m'avoir sauvé la vie dans mes expériences in vivo et pour avoir offert généreusement ton aide lorsque personnes ne pouvaient aider. Merci à Aurélie fraîchement arrivée mais prête à aider. Merci à Sabrina pour son aide dans les moments où j'étais mal prise. A big thank you to Shuofei Cheng and Fiona Wong for their help and support. Merci à Marina, Sabrina et Stéphanie, Patrick, Katia, Gany, pour les encouragements, les rires et les conversations partagées. Merci à mes oiseaux de nuit Macha et Nadia pour avoir été là, un brin de joie et de soleil dans les soirées pénibles de ce long hiver, je ne vais pas oublier nos sorties Juliette et Chocolat et nos conversations, Afrique, mode et musique. Gros merci à Nawel Mechtouf pour avoir été une collègue toujours prête à aider, une amie toujours prête à écouter et une sœur toujours prête à sermonner. Merci Asma pour ton support. Housseem, un gros merci pour m'avoir écouté et supporté quand ça devenait trop difficile. Merci, à mes parents, à ma sœur Amira, mes frères, Moh, Raouf et Noureddine , pour leur appuie, et pour avoir toujours cru en moi. Gros Merci à Amel qui n'a pas laissé tomber.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet et aux membres de l'institut du cancer, qui sont généreux avec leurs conseils et leurs sourires.

Amel Derdour

Chapitre 1 : introduction

1.1. Épidémiologie

Le cancer du col utérin est le quatrième cancer le plus commun chez la femme dans le monde. En effet, en 2012 on a diagnostiqué 527 000 nouveaux cas dans le monde, ce qui représente 8% des nouveaux cas de cancer enregistrés chez la femme au niveau mondial.[1]. Parmi, les cas diagnostiqués, 86 %, ce qui correspond à environs 8 femmes sur 10, proviennent des pays en voie de développement [2]. Cette variation géographique de la distribution de la maladie est due à la prévalence des cas d'infection par le virus du papillome humain (VPH), principale cause du développement du cancer du col de l'utérus (CCU), dans ces régions du monde [2]. Outre l'infection préalable par le VPH, des causes environnementales sont aussi impliquées, telles que la prise de contraceptifs oraux pour une période prolongée, la consommation de cigarette, l'affaiblissement du système immunitaire par la prise en continu de médicaments suite à une transplantation ou une maladie touchant le système immunitaire telle que le SIDA [3]. La prévalence du cancer du col utérin, plus importante dans les pays en développement, est liée à l'inaccessibilité des moyens de dépistage de la maladie. En effet, la pratique du dépistage (test PAP) ainsi que la vaccination (Gardasil, Cervarix) pour la prévention du VPH présentent les causes majeures dans le recul du nombre de cas de CCU répertoriés dans les pays industrialisés. [4,5]

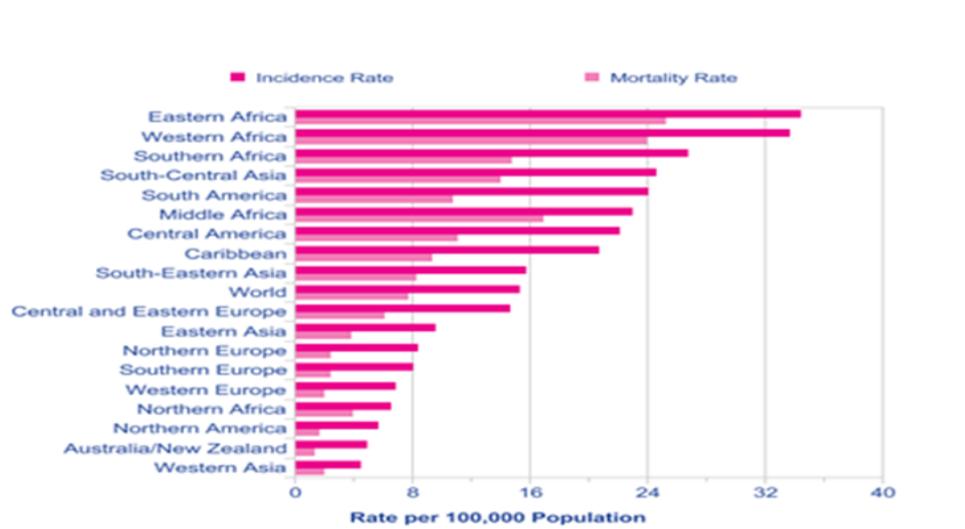


Figure 1. Répartition mondiale des taux d'incidence et de mortalité du VPH [1] (Autorisé par l'auteur)

Au Canada, et malgré le développement des vaccins contre le VPH, ainsi que la pratique systématique du dépistage, le CCU représente toujours 1,2 % des mortalités par cancer féminin et 2% de nouveaux cas de cancer répertoriés en 2008 [6]. On estimait d'ailleurs qu'une femme sur 150 s'attendrait à développer un cancer du col de l'utérus au cours de sa vie et que parmi ces femmes, 1 sur 423 allait en mourir [6].

En 2013, on prévoyait que 1450 canadiennes recevraient un diagnostic de cancer du col de l'utérus et 380 en mourraient [6]

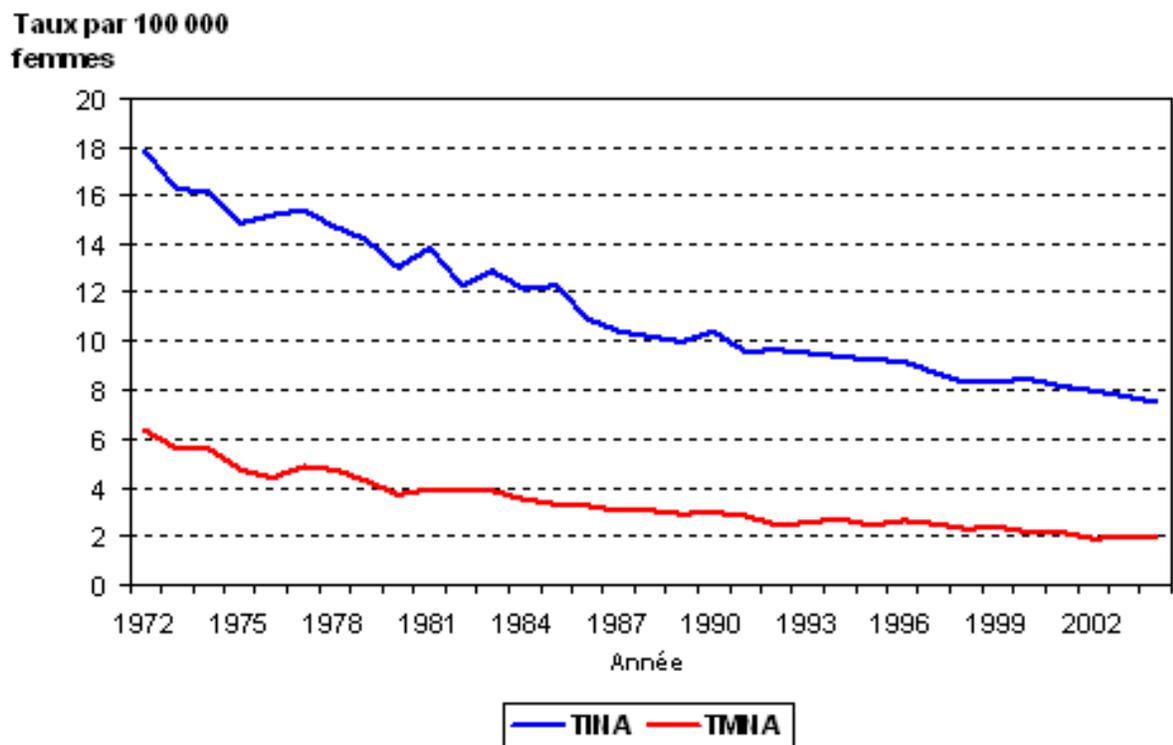


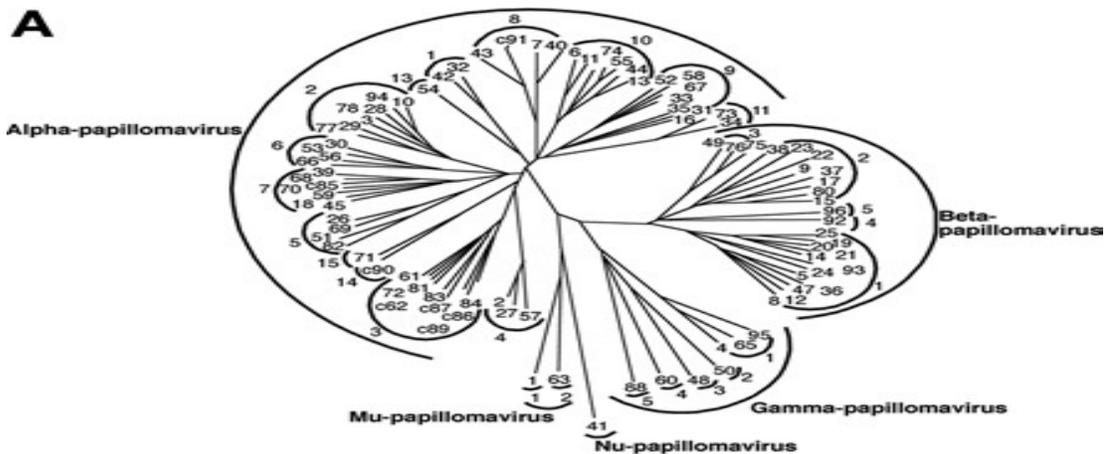
Figure 2 : Taux d'incidence (Bleu) et de mortalité (Rouge) du cancer du col de l'utérus au Canada, normalisés selon l'âge couvrant la période de 1972 à 2004 [7] (Autorisée par l'auteur)

1.2 Le cancer du col de l'utérus et le VPH

Le CCU prend naissance dans les cellules qui tapissent l'épithélium du col de l'utérus. Les virus du papillome humain (VPH) et plus précisément les VPHs à haut risque ont été identifiés comme étant le facteur étiologique majeur impliqué dans le développement du CCU [8]. Des évidences épidémiologiques ont démontré que dans plus de 99% des cas, le CCU est provoqué suite à une infection préalable au VPH [9].

Les virus du papillome humain infectent la couche de cellules épithéliales basales. Ils sont classés en deux types : cutané et muqueux. Les VPHs cutanés infectent les kératinocytes de la surface de la peau, ciblant la peau des mains et des pieds. Les VPHs de la muqueuse infectent la bouche, la gorge, le tractus respiratoire et l'épithélium du tractus ano-génitale [10].

La famille des virus du papillome humain regroupe plus de 150 virus. Le groupe α comprend la superfamille des VPHs transmissibles sexuellement [11]. Les types 6 et 11 de ce groupe sont connus majoritairement comme affectant 1% de la population active sexuellement [12]. Ces virus peuvent aussi affecter les sites oraux ou ils sont généralement associés à des papillomes bénins. Par contre, les VPHs à haut risque de la superfamille α , comme le VPH 16 et 18 causent des lésions de la muqueuse qui peuvent conduire chez certaines personnes au développement de néoplasme de haut grade ainsi qu'au CCU [9, 13, 14, 15, 16]. En effet, Les VPHs de type 16 et 18 sont responsables de plus de 70 % des cancers du col de l'utérus, du vagin, de l'anus et approximativement de plus de 30 à 40 % des cancers de la vulve, du pénis, de la tête, du cou et de l'oropharynx [17]. Les autres cancers dont la causalité est liée au VPH sont le cancer de la peau non-mélanome et le cancer de la conjonctive [15].



B Association of Alpha Papillomavirus types with cervical cancer

Genus + Species	Type Species	SCC Cervix	Adeno Cervix	Category
Alpha 1	HPV32 HPV42			low risk low risk
Alpha 2	HPV3 HPV10 HPV28 HPV29 HPV77 HPV78 HPV94			cutaneous cutaneous cutaneous cutaneous cutaneous cutaneous
Alpha 3	HPV61 C62 HPV72 HPV81 HPV83 HPV84 C86 C87 C89	0.04% 0.04%		low risk low risk low risk low risk
Alpha 4	HPV2 HPV27 HPV57			cutaneous cutaneous
Alpha 5	HPV26 HPV51 HPV69 HPV82	0.22% 0.75%	0.54%	high risk high risk
Alpha 6	HPV30 HPV53 HPV56	0.26%		high risk high risk
Alpha 7	HPV66 HPV18 HPV45 HPV59 HPV39 HPV68 HPV70 C85	1.19% 11.27% 5.21% 1.05% 0.82% 0.37%	37.30%	high risk high risk high risk high risk high risk high risk
Alpha 8	HPV7 HPV40 HPV43 C91			cutaneous (mucosal) cutaneous (mucosal) cutaneous (mucosal)
Alpha 9	HPV16 HPV31 HPV33 HPV35 HPV52 HPV58 HPV67	54.38% 3.82% 2.06% 1.27% 2.25% 1.72%	41.62%	high risk high risk high risk high risk high risk high risk
Alpha 10	HPV6 HPV11 HPV13 HPV44 HPV55 HPV74	0.07% 0.07%		low risk low risk low risk
Alpha 11	HPV34 HPV73	0.04%		low risk
Alpha 12	HPV34 HPV73	0.49%		high risk high risk
Alpha 13	HPV54			low risk
Alpha 14	C90			low risk
Alpha 15	HPV71			low risk

Figure 3: Les VPH et leurs associations avec le cancer du col de l'utérus [18].

(A) Les VPH sont regroupés en 5 catégories. Les VPH qui infectent le col de l'utérus font partie du groupe α qui comprend 60 membres. Les VPH de types Beta, Gamma, Mu et Nu infectent plus majoritairement les sites cutanés.

(B) Les VPH du groupe α sont classifiés en trois sous-groupes (haut risque, bas risque et cutané) selon leur prévalence dans la population et la fréquence à laquelle ils provoquent un cancer du col de l'utérus (Voir colonne de droite) [15]. Les VPH pour lesquels aucun pourcentage n'a été indiqué ne sont généralement pas associés au cancer du col de l'utérus. (Figure Autorisée par l'auteur)

Tel que mentionné précédemment, l'infection persistante avec un VPH de haut risque a été établie comme étant une étape nécessaire pour le développement d'un cancer du col de l'utérus [19]. Les molécules indispensables pour l'initiation et la progression de ce cancer sont les oncoprotéines E5, E6, et E7. Ces protéines virales agissent comme des facteurs qui permettent de surpasser les mécanismes biologiques de contrôle de la prolifération propre à la cellule hôte et permettent l'induction de l'instabilité génomique, un des marqueurs clé des cancers associés au VPH [20,21].

Lorsque le VPH est transmis au tractus génital suite à un contact sexuel, les facteurs de risque pour qu'il y ait infection et développement de lésions cervicales précancéreuses sont les mêmes que pour les autres maladies transmises sexuellement. Le facteur de risque le plus lié aux infections génitales par le VPH et donc au développement d'un cancer du col de l'utérus, est le nombre de partenaires sexuels. De plus, d'autres facteurs liés au comportement des individus, à leur génétique ,ainsi qu'à l'environnement peuvent contribuer à la formation d'un cancer du col de l'utérus [15, 22].

1.3 Le virus du papillome humain

Le virus du papillome humain est un virion non enveloppé contenant un ADN circulaire double brin de 8 Kb codant pour 8 gènes, associés à des protéines histone – *Like*, protégé par une capsidie formée par deux protéines tardives (*late protein* L1 et L2) [23,24,25].

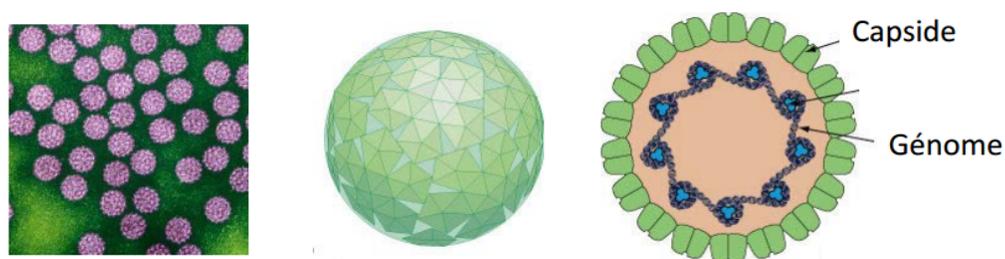


Figure 4: Structure du virus du papillome humain (VPH) [26]. (Figure autorisée par l'auteur)

Le génome du VPH est constitué de régions codantes et non codantes. La partie non codante se trouvant en amont du génome joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes viraux E6 et E7. La partie codante comprend deux sections, appelées précoce (Early Region) et tardive (Late Region). La région précoce, *Early Region (ER)* contient six cadres de lecture ouverts (*ORF*). Cette région code, pour les gènes précoces : E1, E2, E4, E5, E6, et E7, des protéines non-structurales impliquées dans les processus de réplication virale et dans l'oncogenèse. La région tardive, *Late Region (LR)*, code pour les protéines structurales L1 et L2, qui constituent la capside.[23, 27].) (Figure 5).

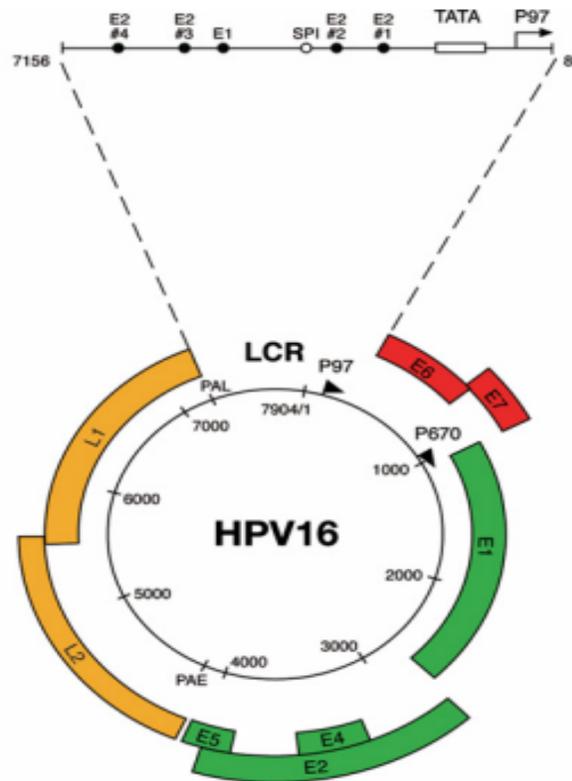


Figure 5 : Génome du VPH 16 (7904 pb) montré en noir.

Les promoteurs des régions précoces (p97) et des régions tardives (p670) sont montrés par des flèches noirs. Les régions précoces (E1, E2, E4 et E5 en vert et E6 et E7 en rouge) sont exprimées de p97 ou de p670 aux différentes étapes de la différenciation des cellules épithéliales. La région tardive, *the late ORF* est montrée en jaune, elle code pour les protéines structurales L1 et L2. La région *LCR* a été grossie pour montrer le site d'intégration d'E2 [18]. (Figure autorisée par l'auteur)

1.4 Le cycle virale du VPH

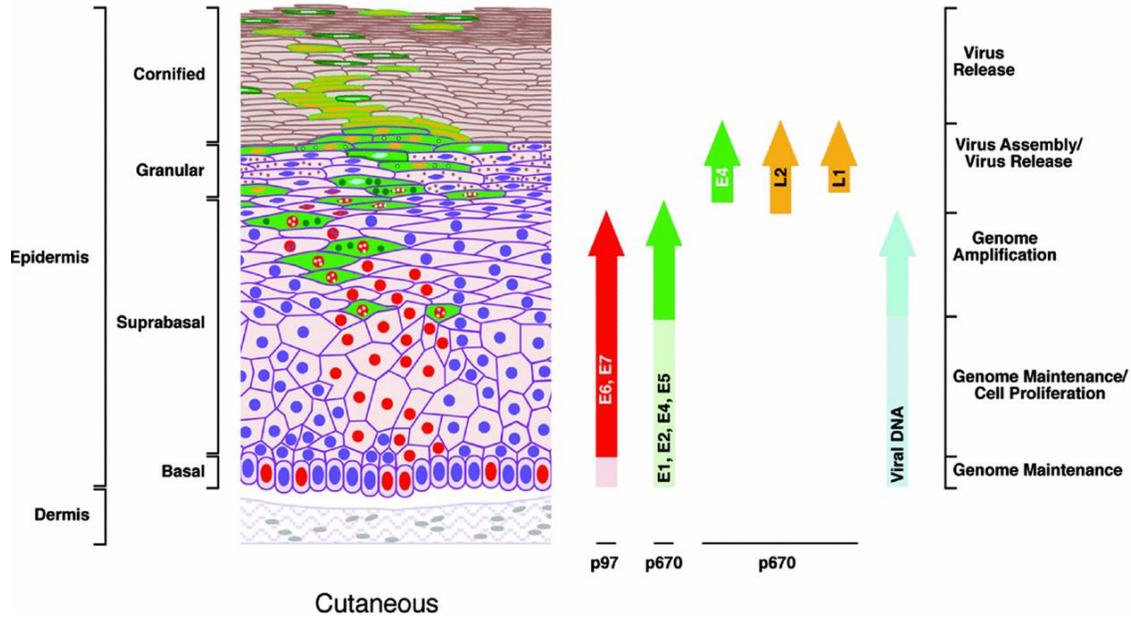


Figure 6 : Présentation des différentes phases du cycle de virale du VPH. La localisation de l'expression des protéines virales présentées à droite de l'image est illustrée à gauche par la couleur qui les représente. E6 et E7 en rouge, E1, E2, E4 et E5 en vert et L1 et L2 en jaune [28]. (Figure autorisée par l'auteur)

1.4.1 Phase d'attachement et d'entrée du virus

Le processus d'infection du papillomavirus requiert que le virus ait accès à la couche épithéliale basale et qu'il pénètre les cellules basales en division. Bien que, la nature du récepteur nécessaire pour l'entrée du virus reste toujours ambiguë [18, 29], il a été suggéré que les héparines sulfate protéoglycanes peuvent jouer un rôle dans l'initiation de la liaison et/ou de l'entrée du virus [18, 29, 30]. Comme d'autres virus [18, 31, 32], il semble que l'infection au VPH requière la présence d'un récepteur secondaire pour être efficace. Il a été suggéré que ce rôle de récepteur secondaire est joué par l'intégrine $\alpha 6$ [18, 33, 34]. Suite à la liaison du virus à la membrane des cellules de la couche épithéliale basale, les particules du virus sont lentement internalisées dans la cellule [18, 35]. Dans le cas du VPH 16, l'internalisation du

virus se fait par endocytose de la particule de virus enveloppée de clathrine [18, 36]. Toutefois, le mode d'entrée du virus peut ne pas être conservé dans tous les VPHs. En ce qui concerne le VPH3, il a été suggéré que son internalisation dans la cellule pourrait être l'œuvre de *caveolae* [18, 37]. Les particules virales du VPH se désassemblent en endosomes tardifs et/ou lysosomes, avec le transfert de l'ADN viral au noyau de la cellule qui est facilité par la protéine de la capsid L2 [18, 36, 38].

1.4.2 Phase de maintenance : Rôles des protéines E1 et E2 dans la réplication de l'ADN viral

Une fois le virus entré, il faut qu'il y ait établissement du génome viral sous forme d'épisome stable (sans intégration dans le génome de la cellule hôte) dans les cellules de la couche basale. Cette phase nécessite l'implication de deux protéines virales de réplication, E1 et E2.

La protéine E2 joue plusieurs rôles importants pendant l'infection productive. Sa présence est requise dans les cellules basales afin d'initier la réplication de l'ADN viral, ainsi que la ségrégation du génome [18]. E2 se lie à l'ADN grâce à son site de liaison à l'ADN et permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral en recrutant l'hélicase E, qui à son tour recrute et lie des protéines cellulaires nécessaires à la réplication du virus [18, 39, 40]. E2 se dissocie par la suite de l'origine virale de la réplication, ce qui permet l'assemblage d'E1 en une structure circulaire hexamérique permettant ainsi la réplication de l'ADN viral. L'ADN viral se multiplie dans les cellules basales pendant la phase S en même temps que l'ADN cellulaire. Les deux copies de l'ADN viral se divisent de manière équitable dans les deux cellules filles nouvellement formées [18, 41].

En plus de son implication dans la réplication et la ségrégation du génome viral, E2 joue le rôle de facteur de transcription et peut réguler le promoteur viral précoce p97 dans le VPH 16, le p99 dans le VPH 31 et contrôler l'expression des oncogènes viraux E6 et E7. Lorsqu'elle est présente à des niveaux plus bas, E2 agit comme un activateur transcriptionnel tandis que quand elle est présente à des hauts niveaux, E2 agit comme un répresseur de l'expression d'E6 et E7 [18, 42, 43].

1.4.3 Phase de prolifération cellulaire : Rôles des protéines E6 et E7

Suite à l'inoculation des cellules épithéliales avec le papillomavirus, une augmentation de la prolifération des cellules dans les compartiments cellulaires basaux et supra-basaux a été observée avec la formation de verrues visibles à 4 semaines post-infection [18, 44, 45]. Le temps entre l'infection initiale et l'apparition de papillome productif varie dépendamment du titre, de la nature et du type de virus infectant. Il a été suggéré que la phase de latence peut être le résultat d'une inoculation avec un virus à faible titre [18, 46, 47]. Dans les lésions cervicales causées par le VPH, l'augmentation de la prolifération dans les cellules épithéliales supra-basaux est attribuée à l'expression des oncogènes viraux, E6 et E7 (Figure 6).

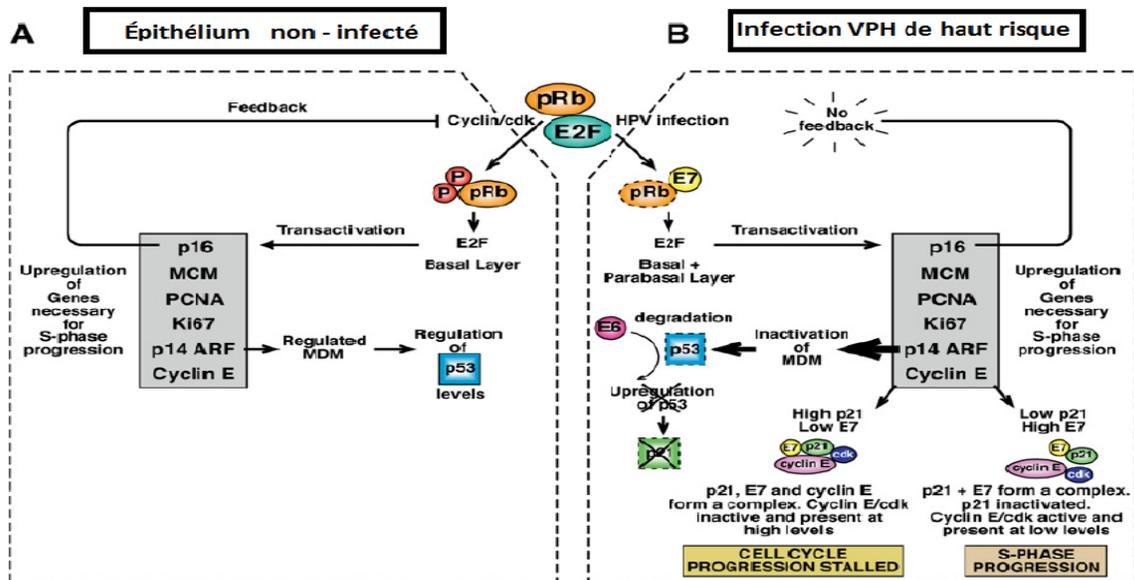


Figure 7 : Stimulation de la progression dans le cycle cellulaire par les VPHs à haut risque [18].

A) Présentation d'un épithélium normal. L'expression des protéines nécessaires pour la progression dans le cycle cellulaire est régulée par pRb. Dans les cellules normales en absence de signal prolifératif pRb empêche la progression dans le cycle cellulaire en s'associant avec la famille de facteurs de transcription E2F. La famille E2F dirige l'expression des protéines impliquées dans la progression en phase S. p16 régule le niveau de CyclinD/Cdk dans la cellule, ce qui procure un mécanisme de rétro-action qui régule le niveau de MCM, PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*) et cycline E qui sont importants pour l'entrée en phase S. p14^{Arf}, dont l'expression est directement liée à celle de p16, régule l'activité de l'ubiquitine ligase de mdm2, qui maintient les niveaux de p53 plus bas que le niveau nécessaire pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose .B) Présentation d'un épithélium infecté au VPH à haut risque. Dans un épithélium infecté au VPH, la progression dans le cycle cellulaire ne dépend plus des signaux extracellulaires, mais plutôt de l'action d'E6 sur p53 et d'E7 sur pRb [18]. (Figure autorisée par l'auteur)

Durant l'infection naturelle, l'activité de ces gènes permet au petit nombre de cellules infectées de s'amplifier, ce qui conduit à une augmentation du nombre de cellules qui vont produire des virions infectieux. L'habileté des protéines virales E6 et E7 à faire progresser les cellules en phase S, avec l'aide des protéines E1 et E2 est nécessaire pour la réplication des épisomes viraux dans la couche supra-basal [18, 50]. Normalement, les cellules supra-basales sortent du cycle cellulaire et commencent le processus de différenciation cellulaire qui leur permet de former la barrière protectrice qui représente normalement la peau [18, 48]. Cependant, dans les kératinocytes infectés au VPH, il y a une perte du contrôle de la progression dans le cycle cellulaire et le processus normal de différenciation terminale ne peut pas se dérouler [18, 49]. Le mécanisme de base par lequel le papillomavirus stimule la progression du cycle est bien connu et implique les oncoprotéines E6 et E7 [18, 50]. Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont des protéines qui sont connues pour avoir une activité transformatrice. Ces protéines ont une fonction pléiotropique et sont impliquées dans plusieurs processus comme la signalisation transmembranaire, la régulation du cycle cellulaire, la transformation des lignées cellulaires établies, l'immortalisation des lignées cellulaires primaires, ainsi que la régulation de la stabilité chromosomale [50]. E6 et E7 ont été reconnues comme étant des protéines nécessaires à la transformation maligne des cellules infectées par le VPH [50]. Les propriétés oncogéniques des protéines E6 et E7 des VPHs à haut risque résident dans leurs actions sur les protéines gardiennes du génome p53 et Rb [50].

1.4.3.1 La protéine E7

La protéine E7 s'associe avec la protéine de rétinoblastome (Rb) ainsi que d'autres membres de cette famille et empêche l'association entre Rb et la famille de facteur de transcription E2F et cela en ne tenant pas compte de la présence de facteurs de croissance externes (Figure 7). E2F trans-active les protéines cellulaires requises pour la réplication de l'ADN viral comme les cyclines A et E. En plus de son association avec Rb, la protéine virale E7 s'associe aussi avec d'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire incluant des histones déacetylases [18, 51], des composantes du complexe de transcription AP1 [52], et les inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes p21 et p27 [53]. Cependant, durant l'infection

naturelle, l'habileté d'E7 à promouvoir la prolifération cellulaire est inhibée dans certaines cellules, et cela dépendamment du niveau des inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes de p21 et p27 (Figure 7). La présence d'un niveau élevé de p21 et de p27 dans des kératinocytes différenciés peut mener à la formation de complexes inactifs avec E7 et Cycline E à l'intérieur de la cellule. Il semble que l'habileté de E7 à pousser les cellules d'un épithélium différencié à rentrer en mitose est limitée au cas des cellules ayant un faible niveau d'expression de p21 et de p27 ou aux cellules qui expriment un niveau suffisant de E7 pour pouvoir échapper au contrôle du cycle cellulaire [54].

La protéine E7, codée par les VPHs à haut risque comme VPH 16 et 18, se lie au Rb avec une affinité beaucoup plus importante que dans les cas des VPHs à bas risque, comme le VPH 6 et le VPH 11[50].

E7 se lie à une région de Rb en forme de poche, communément appelé « *the pocket domain* » [9]. La séquence des acides aminées composant le « *pocket domain* » de Rb est importante pour son activité de suppresseur de tumeur [18]. En effet, cette dernière est importante pour la reconnaissance et la liaison à la famille E2F-like, et la plupart des mutations naturelles amenant à une perte de fonctionnalité de Rb sont présentes dans cette région [18]. Dans une cellule normale, Rb agit comme un suppresseur de tumeurs en se liant à E2F et en le séquestrant. E2F est un facteur important pour la transcription de gènes codant pour des protéines importantes pour la réplication en phase S et pour le contrôle du cycle cellulaire dans la transition de phase G1/S. Parmi ces gènes régulés par E2F, on retrouve l'ADN polymérase α , la thymidine kinase, la dihydrofolate réductase, cdc6, HsORC1, et MCM5.[18,172]. Rb inhibe la progression du cycle cellulaire dans une cellule présentant une lésion à l'ADN en empêchant cette dernière de répliquer son ADN endommagé en bloquant la progression du cycle cellulaire en G1 [55]. Dans les cellules exprimant E7 des VPHs à haut risque, comme dans les cellules du cancer du col de l'utérus VPH induit, E7 se lie avec une très haute affinité à Rb dans sa poche de liaison à E2F, ce qui inhibe la liaison de Rb à E2F [50]. E2F étant libre sous sa forme transcriptionnellement active, peut alors remplir son rôle de promoteur de la réplication et de la division cellulaire. Ceci vient appuyer l'observation relevée plus haut selon

laquelle les kératinocytes, qui expriment constitutivement E7, restent toujours compétents au niveau de la réplication et de la différenciation [56].

1.4.3.2 La protéine E6

La fonction de la protéine virale E6 vient compléter celle d'E7. Dans les VPHs à haut risque, les deux protéines sont exprimées à partir d'un seul ARN messager polycistronique [57]. E6 est constituée de 158 acides aminés et contient deux motifs à doigts de zinc [58]. Dans le cas des VPHs à haut risque, E6 promeut la prolifération cellulaire en stimulant la dégradation de p53 via la formation d'un complexe trimérique contenant E6, p53 et l'enzyme d'ubiquitination cellulaire, E6AP [58]. La dégradation du p53 dans le protéosome par E6 amène à la perte du point de contrôle cellulaire maintenu par p53 [59].

En effet, p53 est une protéine jouant un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. p53 remplit différentes fonctions cellulaires. Un de ses rôles les plus importants est celui de facteur de transcription [146]. Dans des conditions physiologiques (en absence de stress), p53 est maintenu à des niveaux faibles dans la cellule, assez pour permettre l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse, la respiration cellulaire, ainsi que le maintien du bassin cellulaire en dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui sauvegarde l'homéostasie de la cellule [173, 174]. Le niveau basal de p53 est maintenu par sa dégradation au protéosome. La dégradation de p53 se fait suite à son interaction avec une E3 ubiquitine ligase, la plus connue est celle codée par mdm2. Cette interaction est soumise à une importante régulation via des modifications (phosphorylation, acétylation, sumoylation, méthylation, etc.) de p53 et compétitionne avec d'autres protéines (ex: p14ARF) [175]. Ces modifications surviennent en réponse à différents signaux et viennent diminuer l'affinité de l'interaction mdm2/p53. Une fois l'interaction interrompue le niveau de p53 augmente dans la cellule [175].

Ces différentes modifications permettant l'augmentation du niveau de p53 surviennent en réponse à différents facteurs de stress cellulaire. Ces facteurs peuvent être endogènes ou exogènes et comprennent l'irradiation, les dommages à l'ADN (bris, distorsion, modification

ou mésappariement de bases), les problèmes d'adhésion cellulaire, distorsion du cytosquelette, hypoxie, etc. La réponse cellulaire amenant à une augmentation du niveau de p53 dépend en grande partie de la gravité de la lésion ainsi que du type de cellules ayant subi une lésion [146].

Dans le cas où la lésion n'est pas importante, p53 sous sa forme de tétramère actif phosphorylé arrête le cycle cellulaire et agit comme activateur du processus de la réparation. Une fois le dommage réparé, p53 revient au niveau basal suite à l'activation de la transcription par mdm2 et dégradation au protéasome. Le rôle majeur joué par p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1 est dû à son rôle de facteur de transcription de CDKN1A qui code pour l'inhibiteur de kinase cycline dépendante p21. p21 interagit avec les kinases cyclines dépendantes CDK2, CDK1, CDK4/6 et empêche la transition de phase G1/S. Aussi, p53 régule la transcription de d'autres gènes (GADD45, 14-3-3-[sigma], REPRIMO, etc.) dont l'activité facilite l'arrêt du cycle cellulaire en G1, G2, S ou M [146, 176].

Dans les cas où les lésions à la cellule sont trop importantes et résultent en une altération importante de la physiologie de la cellule, comme un dommage à l'ADN irréparable, mutations, ou infection par un virus créant une distorsion de l'activité normale de la cellule, p53 déclenche le processus de mort cellulaire programmée par apoptose [177]. Agissant comme un facteur de transcription, p53 régule la transcription de plusieurs composantes de différentes voies apoptotiques. Ces composantes incluent APaf-1, une protéine activatrice de la cascade apoptotique caspase dépendante, ainsi que Bax et Puma des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3. p53 agit aussi comme activateur des récepteurs apoptotiques Apo/Fas et Killer/DR5, et est impliqué dans l'augmentation de la production et excrétion des espèces réactives oxygénées. Outre son rôle de facteur de transcription p53 agit comme un activateur direct de l'apoptose en interagissant directement avec les composantes mitochondriales stimulant la transition conformationnelle de Bax en sa forme active pro-apoptotique [178].

De part sa fonction biologique, p53 joue un rôle important dans la prévention de la prolifération des cellules anormales en présentant une barrière à l'accumulation de mutations et à l'induction de la carcinogénèse [146]. Le produit d'une perte de mécanismes de contrôle dirigés par p53 est une accumulation d'aberrations et de lésions génétiques qui progresserait en des pathologies comme le cancer. En effet, dans plus de la moitié des cas de cancers humains p53 se trouve muté et dans l'autre moitié ce dernier se retrouve inactif ou des mécanismes p53 dépendants sont altérés [146].

Sachant l'implication de p53 dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, la protéine virale E6 par son action sur p53 résulte en une perte de voies de défense cellulaires contre le cancer maintenues par p53.

On pense que la perte de fonctionnalité de p53 induite par E6 vient remédier à l'arrêt de croissance et l'entrée en apoptose provoqués par l'activation de la voie de signalisation ARF (*ADP-ribosylation factor*) [18]. L'activation de la voie de signalisation ARF par la cellule est un mécanisme de défense contre l'effet pro-prolifératif d'E7 (Figure 7) [18]. Le rôle anti-apoptotique d'E6 a été encore mis de l'avant par la découverte de son association avec les protéines pro-apoptotiques Bak [60] et Bax [61]. Ce rôle (anti-apoptotique) d'E6 contribue significativement au développement du CCU (Cancer du Col de l'Utérus), et cela par son action sur p53 qui compromet l'efficacité de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA), permettant ainsi l'accumulation de mutations dans la cellule [18]. La protéine E6 des VPHs à haut risque joue aussi un rôle dans la prolifération cellulaire qui est indépendant d'E7. La protéine E6 contient en son extrémité C-terminale un domaine de liaison aux protéines contenant le domaine PDZ (PSD-95, Dlg, ZO1) [18]. L'interaction d'E6 avec ces protéines promeut la prolifération cellulaire des cellules supra-basaux [18]. Cette prolifération anormale des cellules supra-basaux résulte en la perturbation de l'adhésion cellulaire ce qui facilite le développement métastatique [18, 62, 63,64].

1.4.4 Phase d'amplification

La prolifération cellulaire est requise pour avoir une formation de lésions et un maintien du génome viral. Toutefois, pour avoir une production de virions infectieux, les papillomavirus doivent procéder à l'amplification, ainsi qu'à l'assemblage de l'ADN viral dans une capsid. Les mécanismes qui déclenchent l'amplification du génome viral, son assemblage en capsid et la relâche des virions infectieux restent méconnus, mais semblent être initiés par des changements dans l'environnement cellulaire lors de la migration de ces cellules infectées vers la surface épithéliale [18]. La régulation positive des promoteurs dépendant de la différenciation est une étape critique dans le processus d'amplification [18,65,66]. L'activation de ces promoteurs dépend des changements dans la signalisation cellulaire plutôt que de l'amplification génomique [18, 65, 66], et amène à une augmentation de l'expression de protéines virales nécessaires à la réplication (E1-E5).

1.4.4.1 Le rôle de la protéine E2

Comme il a été mentionné précédemment (Chapitre 1.4.2) , E1 et E2 jouent un rôle important dans l'initiation de la réplication du génome viral. Outre son implication dans la réplication, E2 joue un rôle de régulateur à la fois de l'expression d'E6 et d'E7 et de l'amplification du génome. En effet, dépendamment de ses niveaux d'expressions, E2 peut agir en réprimant ou en activant l'expression des protéines E6 et E7, ce qui explique le faible niveau d'amplification dans le VPH 16 comparé au VPH 1 [67]. Rappelant ici qu'E4 et E5 sont deux autres protéines virales qui jouent un rôle important durant la phase d'amplification.

1.4.4.2 Le rôle de la protéine E5

E5 est une protéine transmembranaire qui réside de manière prédominante dans le réticulum endoplasmique mais qui peut s'associer avec l'ATPase à proton des vacuoles et ainsi retarder le processus d'acidification des endosomes [68, 69]. Cette fonction d'E5 pourrait avoir un effet sur le recyclage des récepteurs de facteurs de croissance se trouvant à la surface cellulaire. Ceci amènera à une augmentation de la signalisation par les récepteurs du facteur de croissance épidermique EGF permettant ainsi le maintien d'un environnement cellulaire propice à la réplication dans les cellules épithéliales supérieures [70].

1.4.4.3 Le rôle de la protéine E4

Le rôle d'E4 dans l'amplification du génome reste quant à lui encore mal défini. E4 s'accumule dans les cellules pendant la période d'amplification du génome viral et son accumulation semble être indispensable aux stades finaux du cycle viral [71, 72]. E4 semble interagir avec le complexe cyclinB/Cdk1 pour le relocaliser dans le cytoplasme [73, 74]. Ceci empêcherait l'accumulation nucléaire de CyclinB/Cdk1 qui est nécessaire pour l'entrée en mitose. E4 permet ainsi de bloquer le cycle cellulaire en G2 et ce blocage entraîne l'amplification du génome viral et inhibe par conséquence l'effet d'E7 [18].

1.4.5 Phase d'assemblage et de relâche : Rôles de L1 et L2

Le stade final dans le cycle viral du VPH est l'assemblage de l'ADN viral amplifiée dans des capsides pour former des particules virales qui vont être relâchées à la surface épithéliale. Cette phase requière l'intervention des deux protéines structurales L1 et L2, avec l'aide de la protéine E2. L'action de E2 se traduit par une augmentation de l'efficacité du processus d'encapsidation du génome viral durant l'infection naturelle [75, 76, 77].

1.5 L'infection avortée comme précurseur du cancer

Les cancers induits par des virus surviennent dans les cas où une infection productive n'a pas pu aboutir, ce qui implique que cette dernière n'a pas pu compléter un cycle viral normal, c'est ce qu'on appelle une infection avortée. Ce type d'infection survient dans des lieux où la lésion ne peut pas supporter la synthèse et l'amplification du virus [18]. En effet, certains VPHs à bas risque (VPH2 et VPH 4) causent l'apparition de verrues bénignes lorsque le site de lésions est la peau, mais peuvent aussi être à l'origine de cancers lorsque le site de lésions est une muqueuse [18]. Un VPH à bas risque peut mener à la formation d'un cancer si le site d'infection n'est pas propice à ce dernier [18].

Les VPHs à haut risque proviennent pour la plupart des groupes 7 et 9 de la famille alpha (**Figure 3B**). Parmi ces VPHs à haut risque le VPH 16 et le VPH 18 sont les plus prédominants. Ces virus ont été retrouvés chez des femmes sans anomalie cytologique, chez des femmes avec néoplasme inter-épithéliale de bas grade ou LSIL (*low grade squamous inter-epithelial neoplasia*), chez des femmes avec des néoplasmes inter-épithéliales de haut grade ou HSI (*High grade squamous inter-epithelial neoplasia*), ainsi que chez des femmes souffrant de lésions cancéreuses [81, 82].

L'ADN du VPH 16 a été détecté dans 26 % des LSIL [83] et 63 % des SCCL (carcinome squameux du col de l'utérus) [84]. Le VPH 18 est le deuxième VPH le plus associé au cancer du col de l'utérus après le VPH 16 avec 10 à 14% de cas de détection dans les SCCL, par contre il est le premier VPH associé à l'adénocarcinome du col causant 37 à 41 % des cas comparativement au VPH 16 qui en cause 26 à 37% [84]. L'ADN de ces VPHs a aussi été identifié dans des lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus : L'ADN du VPH 16 dans les lignées cellulaires CaSki et Siha, VPH 18 dans les lignées HeLa, C4-1 et SW756 [85, 86,87, 88].

1.6 Intégration de l'ADN viral et carcinogénèse

Le développement du cancer du col de l'utérus est un processus de carcinogénèse à plusieurs étapes. Toutefois, les événements qui entourent la progression d'un néoplasme inter-épithéliale de bas grade (LSIL ou CIN1) en un carcinome restent toujours méconnus.

Le développement d'un néoplasme cervical de haut grade survient chez les femmes pour lesquelles l'infection devient non résolue et persistante pendant les années et décennies suivant l'infection initiale. Chez ces femmes, la stimulation continue de l'entrée en phase S et de la prolifération par E7, couplée à la perte de p53 causée par E6, mènera à l'accumulation de mutations dans le génome cellulaire ce qui conduira, éventuellement, au développement d'un cancer [18].

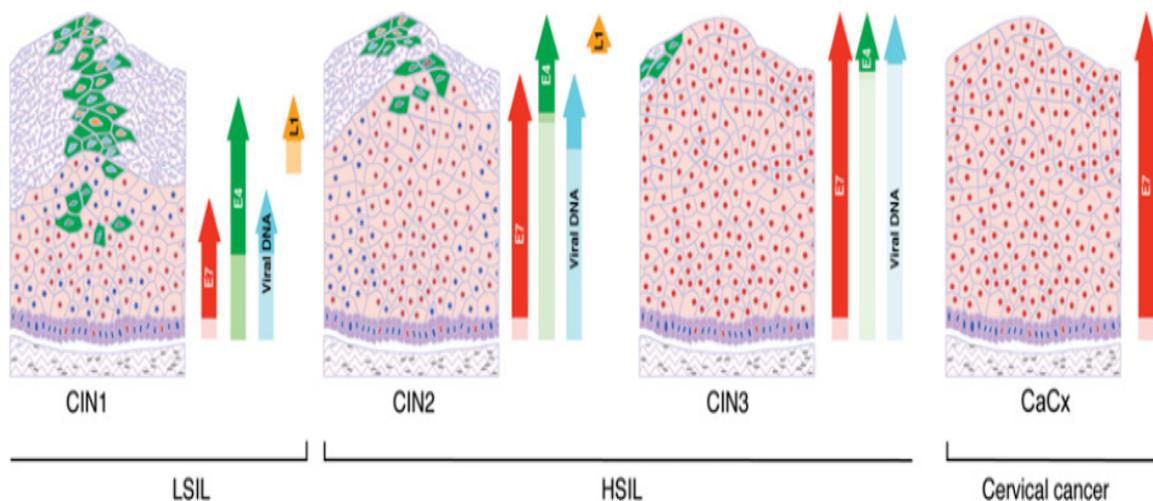
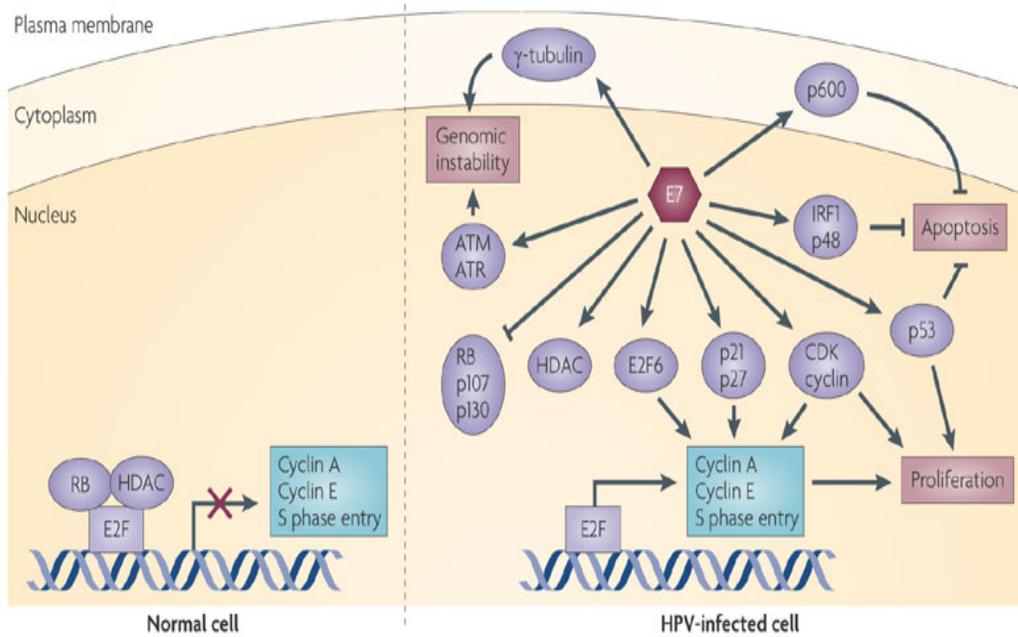


Figure 8 : Présentation des changements dans le profil d'expression de protéines virales, qui accompagnent la progression vers un cancer du col de l'utérus [18]. En CIN1 (LSIL), L'ordre de progression des événements est généralement similaire à celui qui est observé dans les lésions productives. Dans les lésions CIN2 et CIN3 les événements tardifs du cycle viral sont retardés. Aussi, même si l'ordre de progression du cycle virale reste le même, la production de virions infectieux devient plus restreintes et se trouve limitée à des petites régions proches de la surface épithéliale. L'intégration de l'ADN virale dans le génome de la cellule hôte, fait partie des changements majeurs amenant à un cancer du col de l'utérus.. Cette intégration de l'ADN viral provoque un changement dans le profil d'expression des oncoprotéines virales (E7 est présentée ici), suite à la perte de l'expression d'E2. Aussi dans les cellules CCU, il y a perte de l'étape productive du cycle virale et les épisomes viraux sont habituellement perdus [18]. (Figure autorisée par l'auteur)

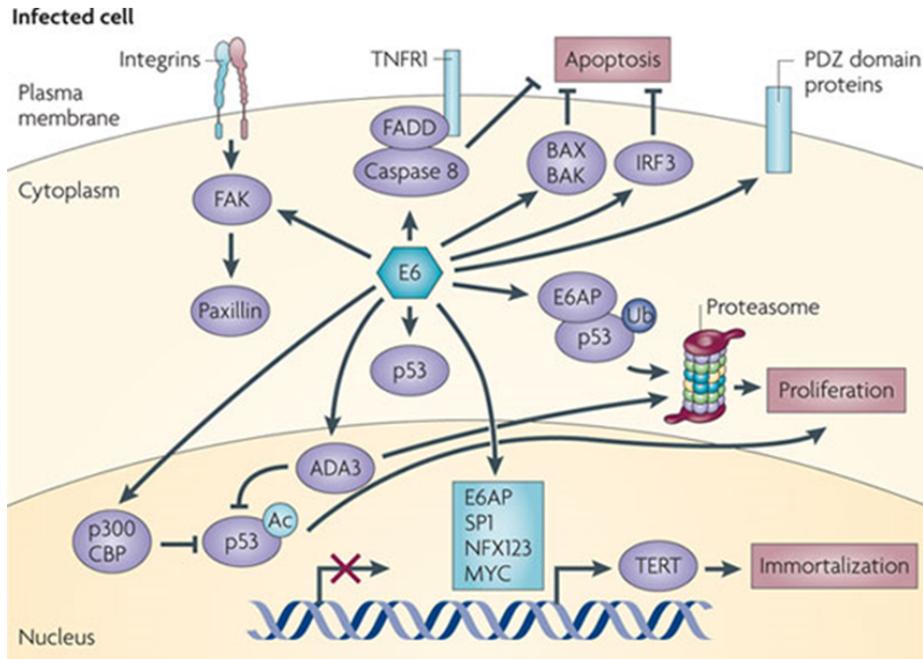
L'ADN viral du VPH a été retrouvé intégré dans le génome de la cellule hôte dans la plupart des cancers invasifs, ainsi que dans un sous-groupe de lésions de haut grade [91,92], de même qu'il peut aussi se retrouver dans certaines lésions CIN1. Il a été avancé que son intégration est un évènement précoce dans la chronologie de la progression du cancer du col de l'utérus [93]. Le site d'intégration dans le génome cellulaire semble être aléatoire, sachant que l'ADN viral intégré a été rapportée dans plusieurs sites différents dans différents chromosomes [94]. Toutefois, dans certaines lignées cellulaires, le site d'intégration a été retrouvé à proximité d'un oncogène connu [95].

L'étude des lignées cancéreuses dérivées de cancer du col de l'utérus où le nombre d'intégrations de génome viral est assez bas pour effectuer une étude détaillée a permis de révéler une spécificité remarquable du site où l'ADN génomique viral intégré est ouvert et modifié suite à son intégration [94]. L'intégration se passe principalement via la région E1/E2 du génome viral [96,97] ce qui vient modifier le profil de régulation transcriptionnelle du génome viral dirigé par E2. Comme il a été mentionné plus haut (Chapitre 1.4.4.1), E2 a une double activité de régulation de l'expression d'E7 et E6 qui peut être positive ou négative dépendamment de ses niveaux d'expressions [98]. Dans les HPV 16 et 18, E2 apparaît principalement comme étant un répresseur du promoteur des protéines E6 et E7 [99,100]. Par contre dans les lignées cellulaires dérivées du CCU, le génome viral est transcriptionnellement actif, menant à un profil d'expression spécifique et régulier, qui implique l'expression constitutive et spécifique des protéines E6 et E7 [101, 102]. Donc, il a été proposé que l'intégration du génome viral dans les cellules CCU a amené une modification dans le gène E2 allant même jusqu'à la perte de ce dernier, ce qui mène à une augmentation soutenue de l'expression des protéines E6 et E7 donnant à la cellule un avantage prolifératif sélectif [94]. En effet, un niveau élevé d'expression des protéines E6 et E7 a été détecté dans des lésions CIN1, CIN2 et CIN3 montrant des évidences d'intégrations [103, 204]. Les protéines E6 et E7 ont été prouvées comme étant indispensables pour le maintien du phénotype carcinogénique. Ceci a été démontré dans une étude impliquant les lignées cellulaires dérivées du CCU, les lignées HeLa et SiHa. Ces cellules rentrent en apoptose en présence de molécules inhibant la fonction d'E6 [105, 106]. E6 et E7 des VPHs à haut risque se lient au p53 et Rb avec une meilleure affinité que les mêmes protéines codées par les VPHs à bas risque [18].



Nature Reviews | Cancer

Figure 9 : Présentation des cibles biologiques d'E7 [21]. Figure autorisée par l'auteur.



Nature Reviews | Cancer

Figure 10 : Présentation des cibles biologiques d'E6 [21] (Figure autorisée par l'auteur)

1.7 L'implication d'E6 dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN.

Parmi les principales caractéristiques associées à la carcinogénèse on retrouve l'évasion à l'apoptose, l'évasion au contrôle des gènes suppresseurs de tumeurs, et le maintien d'un signal pro-prolifératif [110]. Ces caractéristiques résultent en grande partie de l'effet de l'accumulation de mutations et de l'instabilité génomique. Ces dernières, dans le cas des cancers induits par le VPH, sont les conséquences de l'action d'E6 et E7 sur les produits de gènes suppresseurs de tumeurs p53 et RB. En effet, les pertes de fonctionnalité de p53 et Rb, causées par l'action d'E6 et E7 dans les cellules infectées au VPH à haut risque résultent en la perte de fonctionnalité de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) entraînant une accumulation de mutations et une instabilité génomique qui favorisent la carcinogénèse [110, 18,111].

1.7.1 Les dommages à l'ADN

Chacune des cellules qui composent le corps humain reçoit approximativement 10 000 dommages à l'ADN par jour [112]. Ces dommages peuvent survenir physiologiquement, on parle alors de lésions à l'ADN causées par des problèmes rencontrés lors de la réplication, des réactions hydrolytiques ou de méthylation non enzymatiques, ainsi que par des radicaux libres oxygénés [113]. Ces composés chimiques attaquent l'ADN et conduisent à la formation d'adduits à l'ADN, qui mènent à une distorsion dans la structure de l'ADN conduisant à des problèmes d'appariement de nucléotides. Elles peuvent aussi conduire à la délétion de bases azotées et au blocage des processus de la réplication et de la transcription ce qui peut résulter en des bris simples brins de l'ADN (BSB). De plus, quand deux bris simples brins se retrouvent à proximité ou que la machinerie de réplication rencontre un BSB, ce dernier peut se transformer en un bris double brins (BDB). En effet, durant la réplication, quand la fourche de réplication rencontre une matrice d'ADN contenant un bris à l'ADN simple brin, ce bris sera convertit en un bris double brins dans une des chromatides sœurs. Les bris double brins à l'ADN (BDB) sont plus difficiles à réparer et sont toxiques pour la cellule comparé au bris simple brins [114]. Les bris doubles brins sont causés de manière directe ou indirecte. Dans les cas de cause directe, cette dernière peut être de source exogène (radiation ionisante) ou de source endogène (respiration oxydative, inflammation). En ce qui concerne les causes indirectes, on parle de lésions causées par un blocage de la machinerie de la réplication qui ne sont pas réparées [115]. Les bris doubles brins peuvent être causés par les radiations UV, ainsi que par les composés utilisés en chimiothérapie comme les agents inhibiteurs de la topoisomérase II, tel que la doxorubicine [115]. Les bris doubles brins non réparés résultent en la délétion de gène et des réarrangements chromosomiques qui facilitent l'accumulation de mutation et la mort cellulaire [115]. Pour réparer les dommages causés par les bris doubles brins deux mécanismes sont employés, qui sont la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) [115]. La NHEJ est un mécanisme qui n'est pas exempt d'erreur, mais pouvant intervenir à n'importe quel point du cycle cellulaire [116]. La recombinaison homologue (HR) quant-à-elle est un mécanisme exempt d'erreur, mais qui ne peut généralement intervenir que dans les phases G2 et S, car ce

mécanisme implique dans son procédé de réparation la participation des chromatides sœurs comme matrice afin d'assurer la fidélité de la réparation [117].

1.7.2 La voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN et les points de contrôles cellulaires.

Afin de garder l'intégrité de son génome et d'assurer le transfert de copies fidèles d'ADN aux générations futures, la cellule emploie une cascade de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) en réponse aux BDBs [118]. La RDA est composée d'un entrelacement de réseaux protéiques contenant des facteurs de réparation des dommages à l'ADN et des régulateurs du cycle cellulaire [118]. Étonnamment, cette cascade de réponse converge préférentiellement vers une protéine : p53. Bien que p53 ne soit pas l'unique régulateur et exécuteur de la RDA, la perte de p53 compromettrait d'une part la réparation de lésion à l'ADN, et d'autre part l'exécution en temps opportun de la décision concernant le destin de la cellule [118]. La réparation des lésions générées par les modifications chimiques aux bases d'ADN, comme les lésions oxydatives ou les adduits à l'ADN sont rapidement traitées par les voies de réparation par excision de nucléotides (NER) ou par réparation par excision de base (BER) [118]. Dans les cas où les voies NER ou BER sont déficientes, les lésions sont la plupart du temps converties en BDBs.

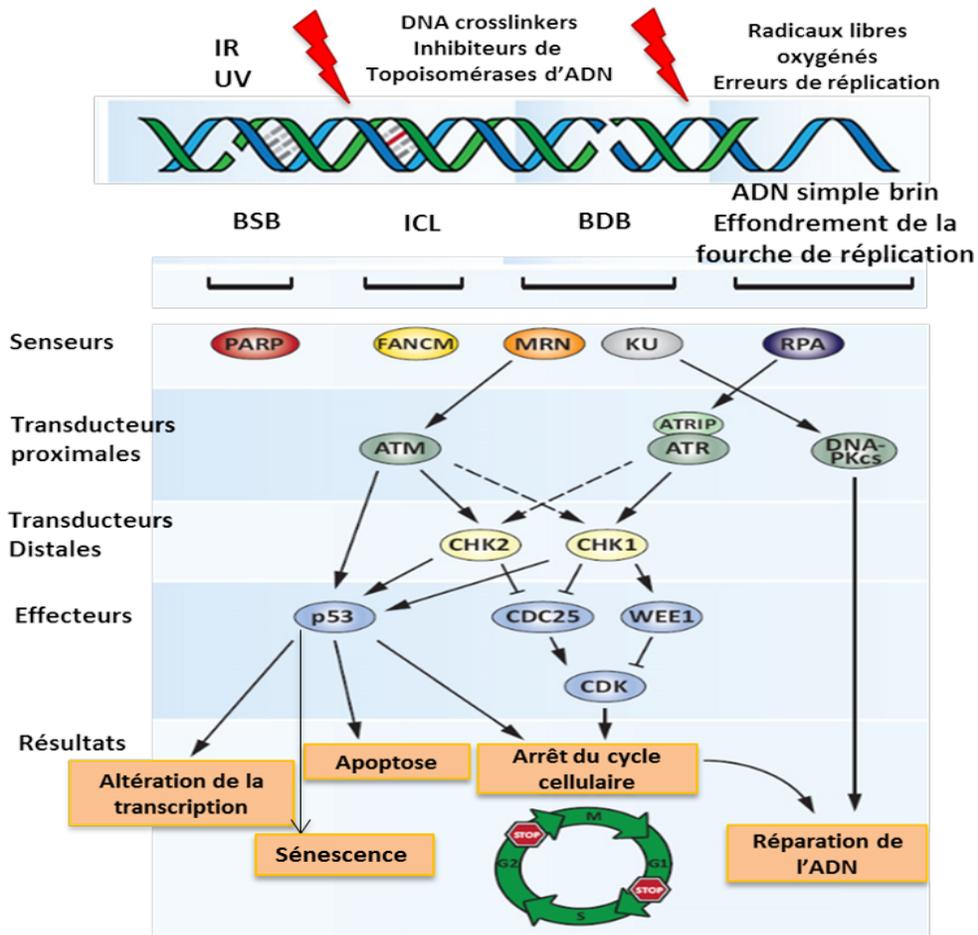


Figure 11 : Cascade de réponse au dommage à l'ADN (RDA). (Modifiée à partir de Daniela Huhn [121], autorisée par l'auteur)

Les BDBs initient la RDA en recrutant la kinase ATM, qui comme la kinase ATR, phosphoryle et active p53 [122, 123]. Le stress de la réplication en phase S peut dans le cas où il y a un effondrement de la machinerie de la réplication créer des BSBs ce qui va recruter et activer ATR et dans les cas où le bris simple brins persiste et progresse en bris double brins recruter ATM [120, 124]. Suite à la création d'un bris double brin, la RDA est initiée par deux kinases qui sont la DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) et ATM. DNA-PK active p53 par phosphorylation sur les sérines 15 et 37 et promeut la réparation par NHEJ [125]. ATM peut activer p53 directement par phosphorylation et via CHK2, une autre kinase de point de contrôle qui peut aussi phosphoryler p53. ATM et ATR permettent l'initiation de la réparation

par recombinaison homologue (HR) [119, 125]. Bien que les différentes kinases impliquées dans la RDA ont comme cibles d'autres substrats ayant une implication importante dans la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire, p53 reste un acteur et une cible clé de la RDA [118, 119]. La multitude de phosphorylations de p53 par les composantes de la RDA réduit son affinité de liaison à son inhibiteur biologique mdm2, ce qui permet la stabilisation et l'activation de p53 [126]. Une fois p53 activé, et dépendamment de la sévérité du signal de stress, du profil des modifications post-traductionnelles qu'aurait subit p53 et du contexte cellulaire, ce dernier peut promouvoir la réparation ou la mort cellulaire. Il peut migrer à la mitochondrie et promouvoir l'apoptose ou il peut directement aller sur le site du dommage et initier la réparation [127,131,128]. C'est ainsi que p53 décide du destin de la cellule endommagée. p53 promeut aussi la transcription de mdm2. Ce dernier se lie à l'extrémité N-terminale de p53 et inhibe son activité transcriptionnelle. Aussi, mdm2 de par son activité ubiquitine ligase provoque la dégradation de p53 par le protéosome agissant comme un signal de rétroaction négative pour p53 [129, 130].

1.7.3 Le destin cellulaire

L'activation de la RDA résulte normalement, soit en la réparation du dommage, soit en l'élimination de la cellule endommagée dans le cas où ce dommage est irréparable. Ce processus de réparation ou d'élimination de la cellule endommagée doit être respecté afin d'éviter le développement de pathologie. Lorsqu'une cellule normale se retrouve avec un dommage à l'ADN, une série d'évènements biologiques se retrouve enclenchée. Ces évènements comprennent la RDA (décrite plus haut) qui implique l'activation du p53. Pendant le traitement du dommage, les points de contrôle du cycle cellulaire activés par CHK1, CHK2 et p53 provoquent un arrêt temporaire du cycle cellulaire [119]. Tandis que le traitement initial de la lésion continue, p53 est localisé au site de la lésion et induit la réparation [131]. En même temps, p53 stimule la transcription de facteur impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire (inhibiteur des kinases cyclines dépendantes p21). Aussi, pour les lésions dont la réparation est plus lente, p53 induit la transcription des facteurs impliqués dans la réparation de dommages à l'ADN complexes incluant GADD45[132]. Une fois ce processus enclenché, la cellule peut

faire face à plusieurs destins différents dépendamment de la nature de la cellule et de la sévérité du dommage.

La première possibilité implique un arrêt temporaire de la cellule couplé à une réparation réussie. Ce cas représente le meilleur scénario pour la cellule et l'organisme. Dans le cas où le dommage n'est pas sévère, la cellule réussit à le réparer et s'en sort avec peu (ou pas) de conséquences [118].

La deuxième possibilité implique le cas où le dommage est très sévère et la cellule n'arrive pas à le réparer. Dans ce cas, afin d'essayer de protéger l'organisme la cellule a le choix de suivre un des deux scénarios suivant :

L'apoptose (mort cellulaire programmée) : Dans le cas où le dommage est sévère et non réparable, p53 agit comme activateur et régule positivement la transcription de gènes impliqués dans la promotion de l'apoptose tels que ceux de la famille des BH3-unique (Puma, Noxa et Bax) et réprime aussi la transcription de gènes impliqués dans la répression de l'apoptose tels que Bcl-2 et Survivin [128]. Les protéines nouvellement exprimées de la famille BH3-unique migrent vers la mitochondrie ou elles déclenchent une cascade de réactions biologiques pro-apoptotiques qui commence à la membrane mitochondriale [133]. De plus, p53 lui-même peut migrer à la mitochondrie où il induit la cascade pro-apoptotique en interférant directement avec le facteur anti-apoptotique Bcl-2 [134]. L'apoptose est un mécanisme physiologique qui a une importance majeure en embryogenèse et qui garde son rôle important chez les cellules adultes en permettant d'éliminer les cellules endommagées [118].

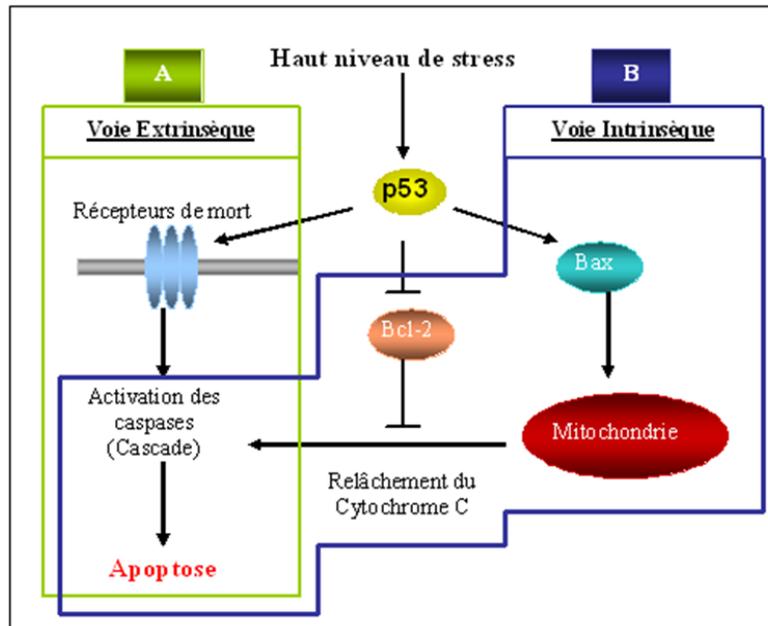


Figure 12 : Présentation des deux voies apoptotiques induites par p53 et menant à l'apoptose caspases – dépendantes [135]. A) La voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort extracellulaire à un récepteur de mort, ce qui active la cascade des caspases. B) La voie intrinsèque est enclenchée lorsque des protéines pro-apoptotiques, telle que Bax, permettent le relâchement du cytochrome c à l'extérieur de la mitochondrie. S'en suit l'activation des caspases. (Figure tirée du mémoire de Geneviève Synnott, 2007, autorisée par l'auteur)

La sénescence (arrêt de croissance permanent) : Comme il a été mentionné précédemment la décision de la cellule quant à son destin suite à un dommage à l'ADN varie dépendamment du type cellulaire et du contexte physiologique. Par exemple, en réponse à un dommage non réparé, les lignées cellulaires lymphoïdes opteraient pour l'apoptose [136], tandis que les lignées cellulaires épithéliales et stromales opteraient plutôt pour la sénescence [137]. La sénescence est un programme génétique complexe qui induit l'arrêt permanent de croissance cellulaire. La sénescence est une réponse cellulaire qui amène des altérations dans le métabolisme de la cellule, ce qui induit un changement dans le profil de sécrétion des protéines entraînant la modification du microenvironnement des tissus [138]. Dans la majorité des types cellulaires, l'activation de p53 est indispensable pour initier la sénescence en réponse à un dommage à l'ADN. Dans certains types cellulaires, p53 est aussi important pour maintenir l'arrêt de croissance (sénescence). Dans d'autres types de cellules, l'activation de

p53 est seulement requise pour initier la sénescence, qui devient ensuite irréversible et cela indépendamment de p53 [139].

Ces différents destins cellulaires sont gouvernés par la signalisation au p53 et permettent dans le cas où la réparation est impossible de supprimer la possibilité du développement de cancer. L'apoptose et la sénescence sont donc des mécanismes naturels de suppression de tumeurs. Dans les cellules infectées au VPH où il y a eu intégration de l'ADN viral et donc expression des oncoprotéines virales, l'expression des protéines E6 et E7 amène une perte de fonctionnalité de p53 et de Rb. Comme on vient de le décrire, la protéine p53 est impliquée dans la RDA. Le p53 gouverne les processus de réparation et dans le cas où le dommage est irréparable, cette dernière déclenche le processus d'apoptose ou de sénescence pour éviter l'accumulation de mutations pouvant mener au développement d'un cancer. Dans les cellules exprimant E6 du VPH, il y a une perte de fonctionnalité de p53, qui par l'intermédiaire d'E6 se fait dégrader par le protéosome. Le p53 est un acteur clé de la RDA et des décisions cellulaires qui en résulte. La perte de p53 dans les cellules exprimant E6 du VPH résulte en une perte de fonctionnalité de la RDA, une déficience dans la réparation, l'apoptose et la sénescence; trois destins cellulaires impliquant p53. Donc, dans ces cellules un quatrième scénario est rencontré. Celui-ci implique une persistance du dommage. La perte de p53 et de Rb résulte en une persistance du dommage qui en l'absence de mécanisme d'apoptose et de sénescence mène à une accumulation d'aberrations chromosomiques qui promeut le développement du cancer [118].

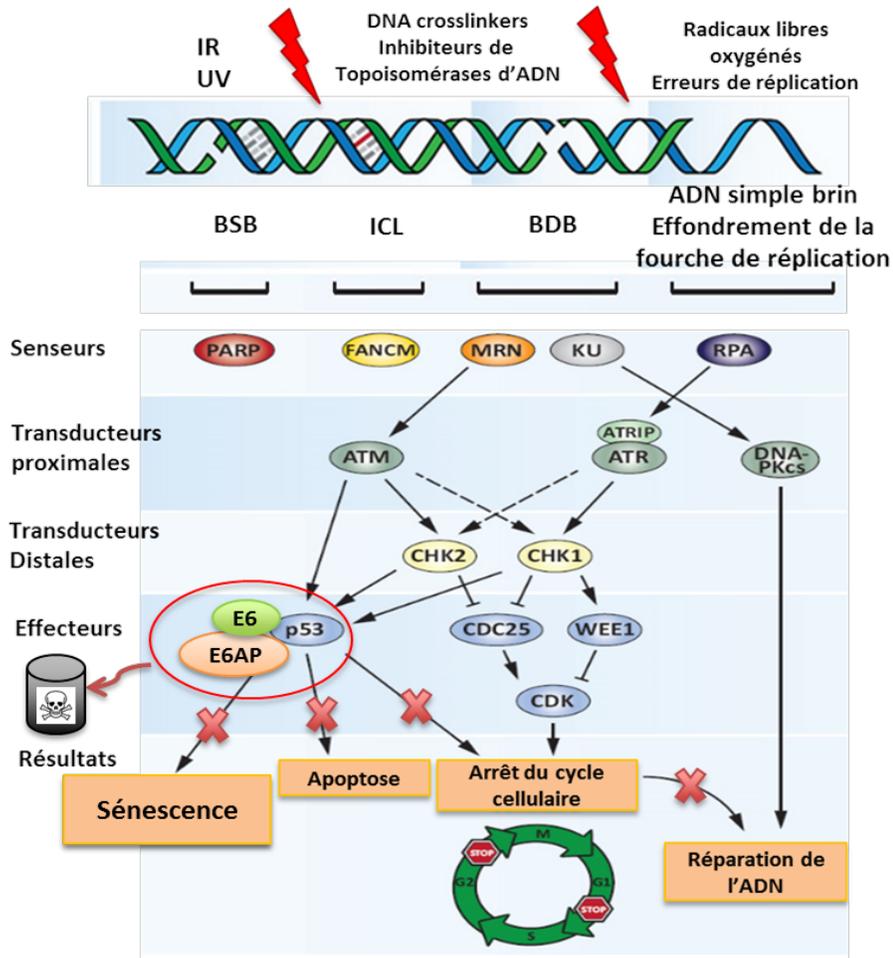


Figure 13 : Altération de la voie de réparation des dommages à l'ADN suite à l'expression d'E6 [121]. E6 forme un complexe avec E6AP et p53 et amène la dégradation du p53 dans le protéasome, ce qui cause une perte des réponses biologiques normales. (Modifiée à partir de Daniela Huhn et al, 2013, autorisée par l'auteur)

1.8 Déficience de la RDA des cellules du cancer du col de l'utérus et traitement de la maladie.

Pour les cancers du col de l'utérus, la prise en charge de la maladie implique souvent trois types de traitements qui sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

1.8.1 Problématique associés aux traitements actuels

Dans les cas avancés de la maladie, la chimiothérapie et la radiothérapie restent les traitements les plus appropriés. Ces deux modes de traitements agissent en créant des dommages à l'ADN et ont prouvés leurs efficacités dans le traitement de différents cancers [144, 145]. En effet, les cellules cancéreuses sont pour la plupart déficientes en réparation des dommages à l'ADN et ces dernières se multiplient à une vitesse beaucoup plus importante que les cellules normales (la phase S, phase de réplication d'ADN, étant le temps durant lequel la cellule se retrouve la plus vulnérable aux dommages à l'ADN). La radiothérapie et la chimiothérapie conduisent à la création de BDBs qui sont très toxiques pour la cellule. Le nombre important de ces bris doubles brins (BDBs) créés et l'impossibilité de les réparer détruisent les cellules cancéreuses. Toutefois, il faut noter que les cellules normales restent sensibles à la chimio et radio-thérapie et ce même si cette sensibilité est beaucoup moindre que pour les cellules cancéreuses [144, 145]. Donc, une déficience en RDA des cellules cancéreuses est positivement corrélée avec la réussite du traitement. Ceci est vrai, sauf dans le cas des cellules déficientes en p53 et en d'autres protéines pro-apoptotiques. En effet, une déficience en p53 résulte, le plus souvent, en une résistance au traitement [144,145].

Pour le CCU, les cellules cancéreuses sont déficientes en p53 et Rb. Cette déficience amène une perte de fonctionnalité de la réparation, et aussi des mécanismes de sénescence et d'apoptose. Cet état de fait conduit à ce que ces cellules soient sensibles au traitement de chimio-radiothérapie. Par contre, cette sensibilité se manifeste surtout à des doses élevées, ce qui sensibilise, aussi, les cellules normales et conduit à un taux important de toxicité. Cette toxicité touche en particulier les cellules normales à vitesse de prolifération rapide, tel que les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales intestinales. Elle consiste, le plus souvent,

en des réactions de stress qui mènent à la fibrose, ainsi qu'à un vieillissement prématuré des tissus [146]. Aussi, la perte du p53 et du Rb se traduit par une perte du mécanisme de sénescence et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses, ce qui augmente la résistance à la maladie et les récives [115].

1.8.2 La létalité synthétique : solution possible

Les traitements existants (radiothérapie, chimiothérapie) ne sont pas des traitements spécifiques aux cellules cancéreuses. En effet, ces traitements visent toutes les cellules en division rapide, ce qui touchent même les cellules normales et provoquent des effets secondaires comme des nausées, de l'anémie et des problèmes d'immunosuppression [146]. Aussi, le traitement utilisé n'est pas complètement efficace et les risques de résistance et de récives restent importants. Ce qui soulève le besoin de développer une thérapie plus spécifique aux cellules du cancer et dans notre cas aux cellules des cancers induits par le VPH. Ceci nous amène à nous intéresser à la létalité synthétique. La létalité synthétique se présente dans le cas où on se retrouve en présence de deux gènes synthétiquement létaux. Des gènes que l'on désigne comme étant synthétiquement létaux sont des gènes dont la mutation de l'un des deux gènes donne naissance à une déficience qui est viable pour la cellule, mais la présence d'une mutation dans les deux gènes synthétiquement létaux en concomitance donne naissance à une cellule non-viable [147].

La perte de fonctionnalité de la RDA est un évènement commun dans le développement de plusieurs cancers. La RDA est composée comme il a été décrit précédemment de plusieurs voies de réparation complémentaires et compensatrices. Dans le cas où il y a une perte de fonctionnalité d'une voie quelconque de réparation, le RDA réagit en impliquant une voie alternative procurant les mêmes résultats que la voie de réparation devenue dysfonctionnelle [179]. Dans une cellule cancéreuse, suite à la perte d'une voie de réparation, la cellule réagit en régulant positivement et donc sur activant la voie de réparation compensatrice [179].

Les cellules cancéreuses deviennent alors dépendantes de cette voie de réparation alternative. Cette dépendance a été baptisée la *non oncogene addiction*. La dépendance à cet élément compensatoire de la RDA crée une vulnérabilité chez les cellules cancéreuses qui pourrait être

exploitée par l'inhibition de cet élément dans une application pratique du principe de létalité synthétique [179]. Aussi, la sur activation de la voie compensatrice procure aux cellules cancéreuses une résistance aux traitements chimio radio-thérapeutiques. L'exploitation des inhibiteurs de la RDA dans le but de contrer ces voies alternatives dans une stratégie de létalité synthétique nous permettrait d'une part de procurer un traitement spécifique et d'une autre part de contrer la résistance à la chimio radiothérapie [179].

Plusieurs inhibiteurs visant différents éléments de la RDA pourraient être utilisés dans des stratégies de létalité synthétique et parmi ces inhibiteurs plusieurs visent des éléments des voies de réparations des dommages doubles brins.

Parmi les inhibiteurs développés ciblant la voie de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ), on retrouve la wortmanin. La cellule est perméable à la wortmanin. À des concentrations nano-molaires, la wortmanin inhibe spécifiquement et irréversiblement la PI-3 kinase avec peu à pas d'effet sur les autres molécules de signalisation cellulaire. Si présente à des concentrations micro-molaires, la wortmanin devient non spécifique à la PI-3 kinase et montre un effet inhibiteur sur DNA-PK, une des kinases apparentées à la famille des PI3-kinases. DNA-PK a un rôle important dans la voie de réparation NHEJ. Elle est recrutée au site de la lésion d'ADN par la liaison de l'hétéro-dimère KU à l'ADN. Suite à son recrutement et à l'activation de sa sous-unité catalytique, DNA-PK se joint à l'hétéro-dimère KU afin de former une holoenzyme trimérique. La formation de la holoenzyme est nécessaire pour l'activité de DNA-PK et pour le recrutement des éléments nécessaires à la réparation par NHEJ. La présence de la wortmanin inhibe DNA-PK, ce qui retarde la jonction des BDBs et augmente la vulnérabilité des ces cellules à l'irradiation et aux drogues inhibitrices de la topoisomérase II [179, 180].

Outre les inhibiteurs visant la réparation des BDBs par NHEJ, des inhibiteurs visant différentes composantes de la réparation homologue ont été développés. La majorité des recherches se sont focalisées sur les kinases ATM et ATR, composantes importantes

impliquées dans l'acheminement de la signalisation du dommage à l'ADN aux points de contrôles du cycle cellulaire [179].

La kinase ATM est une composante importante de la RDA. Une fois activée et recrutée au site de lésion, cette dernière permet le transfert du signal de réparation vers les protéines contrôles du cycle cellulaire. ATM a été reconnue comme étant une cible thérapeutique intéressante dans la recherche sur le cancer. Toutefois, la recherche dans ce sujet a été limitée par la non-disponibilité de petites molécules ayant un effet inhibiteur efficace. En se basant sur la similarité structurelle entre la kinase ATM et la PI3-kinase, Ku-55933 une molécule inhibitrice sélective d'ATM, a été développée à partir du LY294002, un inhibiteur de la PI3K [179].

Ku-55933 inhibe les effets d'ATM induit par l'action de l'irradiation. En effet, en inhibant ATM, Ku-55933 inhibe la phosphorylation de p53 par ATM et donc son activation, ce qui sensibilise la cellule à l'irradiation, ainsi qu'à l'action des drogues inhibitrices des topoisomérase I et II [179, 181, 182].

La perte du point de contrôle en G1/S est une caractéristique commune à plusieurs cellules cancéreuses. Elle se présente souvent par une déficience dans les gènes suppresseurs de tumeurs p53 et RB ou par une déstabilisation dans les niveaux de cyclines, des kinases cyclines dépendantes, ou dans leurs inhibiteurs. Cette perte du point contrôle en G1/S résulte en une augmentation de l'importance du point de contrôle en G2/S. Ce dernier, devient indispensable pour les cellules cancéreuses déficientes en point de contrôle en G1/S, car il permet d'éviter la transmission de dommages aux cellules filles. Cette vulnérabilité de ces cellules liée à leur dépendance au point de contrôle en G2/S, rend ce point de contrôle une cible intéressante à exploiter dans la recherche contre le cancer [179,183].

Une étude génétique impliquant une inhibition de type dominant négative d'ATR dans des cellules cancéreuses a montrée une perte du point de contrôle en G2/S, et une sensibilisation des cellules à plusieurs agents chimio-thérapeutiques. Toutefois, les inhibiteurs existants d'ATR ne se sont pas montrés spécifiques et efficaces. En effet, la caféine, inhibiteur prototype utilisé pour l'étude, s'est montré faible et non spécifique, par contre son utilisation a

permis la cueillette d'un nombre satisfaisant de données pour cimenter l'intérêt que présente cette cible [179].

Sachant le rôle important d'ATR dans le contrôle G2/S et l'effet des inhibiteurs d'ATM (Ku-55933) dans la sensibilisation des cellules cancéreuses à l'irradiation ainsi qu'à la chimiothérapie, Il était d'une grande importance de développer un inhibiteur visant ATR et ATM ,et ainsi le CGK-733 a été développé. CGK-733 est un dérivé thio-urée ayant un effet inhibiteur spécifique sur les kinases ATM et ATR avec un IC₅₀ de 200 ηM pour les deux kinases [184].

D'autres éléments de la RDA ont été ciblés tel que la kinase CHK1 par l'inhibiteur UCN-01. UCN-01 inhibe CHK1, une sérine thréonine kinase jouant un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle de la progression G2/M. UCN-01 est un inhibiteur ayant une large fenêtre d'action englobant toutes les protéines kinases C. UCN-01 augmente l'effet l'irradiation, de la cisplatine, et des inhibiteurs de la topoisomérase. Cet inhibiteur s'est montré très prometteur in vitro et in vivo chez l'animal pour utilisation comme un agent radio-sensibilisant et chimio-sensibilisant. Toutefois, UCN-01 n'a pas montré des effets significatifs en clinique chez l'humain [179, 185].

Outre les kinases impliquées dans la RDA, p53 représente une cible de choix dans la thérapie du cancer. Ce dernier a fait l'objet de plusieurs études visant sa réactivation [146].

En effet, p53 est muté dans 50% des cancers. Pour ceux qui réussissent à maintenir un p53 sauvage (*wild type, wt*), ce dernier se retrouve soumis à une régulation étroite et maintenu à des niveaux variant de minimales à indétectables dans la cellule. p53 a un temps de demi-vie de 20 minutes [156] maintenu par l'autorégulation négative par mdm2. mdm2 se lie à p53 et provoque via son activité ubiquitine ligase son transport du noyau au cytoplasme et sa dégradation dans le protéasome [157, 158]. mdm2 lie p53 à son site de liaison à la machinerie transcriptionnelle ce qui inhibe son action transcriptionnelle [159]

De par son rôle important dans l'inhibition de l'activité de p53, mdm2 se présente comme une cible intéressante pour la réactivation de p53 dans les tumeurs p53 wt [160].

En 2004, Vasilev et ses collègues rapportaient un groupe de composés imidazoles appelés Nutlins dont l'action serait d'inhiber la liaison mdm2-p53 et cela avec une haute affinité et sélectivité [161]. Parmi le groupe de Nutlins inhibiteurs de mdm2 (Nutlin-1, Nutlin-2, Nutlin-3), Nutlin-3 a été identifiée comme étant l'inhibiteur ayant la meilleure activité inhibitrice. À ce jour, Nutlin-3 est la petite molécule inhibitrice de l'interaction mdm2/mdmX- p53 la plus étudiée et publiée.

Nutlin-3 est un mélange racémique de Nutlin-3a (énantiomère actif) et Nutlin-3b (énantiomère inactif). L'affinité de Nutlin-3a pour le mdm2 est 150-fois plus forte que celle de Nutlin-3b [161]. Le mdm2 contient une poche profonde qui permet au p53 de se lier via 3 acides aminés (phe19, Trp23, Leu26), qui sont indispensables pour la formation de l'interaction p53-mdm2. Ces acides aminés se lient de manière étroite et très spécifique dans cette poche de mdm2 [162]. Nutlin-3 interagit avec ces trois acides aminés et se lie au mdm2 en son site de liaison au p53, ce qui empêche l'interaction p53-mdm2 [161,163]. En 2004, Vassilev a testé l'effet de Nutlin-3 sur l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des lignées cellulaires cancéreuses provenant de différentes tumeurs, incluant colorectal (HCT116 et RKO), poumons (H460 et A549), seins (MCF7), prostate (LnCap et 22Rv1), mélanome (Lox), ostéosarcome (SJSA-1), et du cancer du rein (A498) [164]. Après 24 heures de traitement avec Nutlin-3, les auteurs ont noté une déplétion et une réduction dans la fraction cellulaire en phase S, ainsi qu'un arrêt en G1 et G2 dans les cellules ayant un p53 wt. Par contre, l'effet pro-apoptotique de Nutlin-3 sur ces mêmes lignées est variable d'une lignée à l'autre [161].

Outre son effet sur le cycle et la survie cellulaire, Nutlin-3 a d'autres caractéristiques intéressantes qui ne cessent de ressortir depuis 2004. En effet, contrairement à l'irradiation et aux composés classiques utilisés en chimiothérapie, Nutlin-3 est un agent non-génotoxique [161,165]. Les cellules normales sont relativement insensibles à la Nutlin-3 [165]. En effet, Nutlin-3 induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses ayant un p53 wt, tandis que dans les cellules normales, elle provoque seulement un arrêt du cycle cellulaire, ce qui pourrait permettre de procurer une protection contre l'effet très agressif de la radio-chimiothérapie sur les cellules normales. Ceci indique que Nutlin-3 pourrait agir comme agent radio-chimio protecteur sur les cellules normales in vivo [166]. Ces caractéristiques font de Nutlin-3 un

agent intéressant à exploiter dans une stratégie de létalité synthétique dans des cellules exprimant un p53 sauvage déficient, comme dans le cas des cellules exprimant la protéine E6 du VPH.

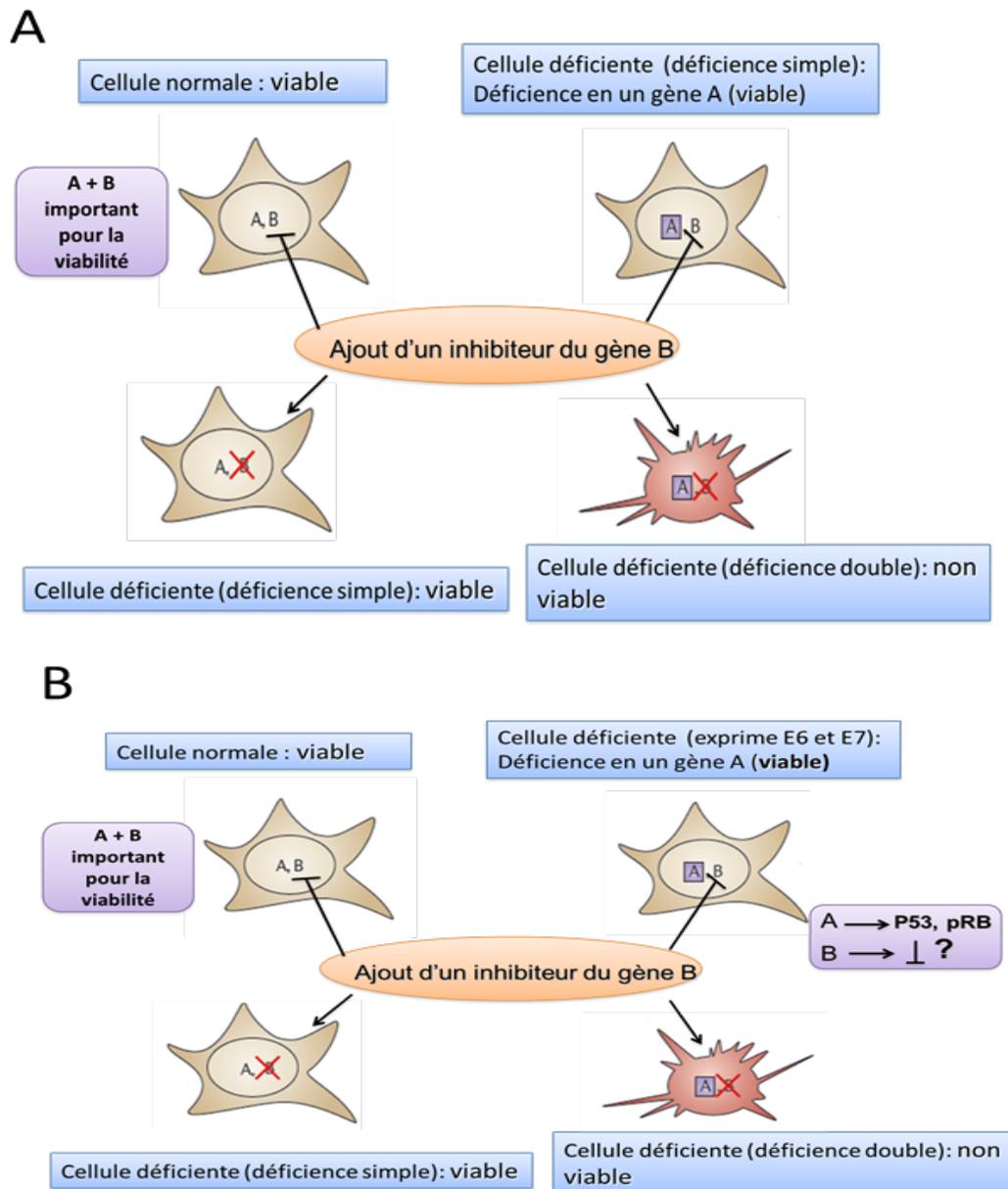


Figure 14 : Présentation du concept de létalité synthétique [149].

A) Présentation d'un modèle de létalité synthétique générale.

B) Présentation d'un modèle de létalité synthétique appliqué aux cellules CCU, ainsi qu'aux cellules exprimant les protéines virales E6 et E7 du VPH (Modifiée à partir de Chan et Giaccia, 2011, autorisée par l'auteur)

Hypothèse et objectifs

Les cellules CCU, ainsi que les cellules de tous les cancers induits par le VPH expriment E6 et E7 et sont, donc, déficientes en p53 et Rb, ce qui conduit à une perte de la fonctionnalité de la RDA. La prise en charge de la maladie fait souvent appel à la radiothérapie ainsi qu'à la chimiothérapie. Les doses importantes utilisées en chimiothérapie et radiothérapie entraînent un fort taux de morbidité. Pour remédier à ces problèmes, nous cherchons à augmenter la spécificité du traitement afin d'augmenter son efficacité et de diminuer la morbidité qui lui est associée. Pour y parvenir notre hypothèse consiste à exploiter la perte de fonctionnalité de p53 et Rb associée à l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 dans les cellules cancéreuses CCU afin d'identifier des composés qui permettent la sensibilisation de ces cellules.

Nos objectifs seront d'effectuer un criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la voie de réponse aux dommages à l'ADN, d'identifier des cibles intéressantes et d'étudier leurs effets biologiques seules et en synergie avec l'irradiation in vitro et in vivo. Différentes doses des composés sélectionnés seront étudiées. Les composés présentant une sensibilisation préférentielle en présence d'irradiation seront étudiés plus profondément au niveau de leur cible biologique. L'effet de sensibilisation sera étudié sur des cellules modèles CCU développées en laboratoire, les cellules HEK293-hTERT-E6-E7, ainsi que sur des lignées CCU dérivées de patientes (HeLa et CaSki). Les composés d'intérêts seront aussi étudiés in vivo dans des xénogreffes chez la souris afin d'étudier leurs effets sur la croissance tumorale.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Matériel et Méthodes des expériences IN VITRO

2.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

2.1.1 Lignées cellulaires

Durant mon projet de recherche différentes lignées cellulaires ont été utilisées. Le tableau I présenté ici-bas regroupe les différentes lignées utilisées tout au long du projet ainsi que leurs caractéristiques.

Lignées	Nature	Type	Milieu de culture	Particularité
BJ-U	Fibroblaste	Primaire	DMEM	-
HCA2	Fibroblaste	Primaire	DMEM	-
HEKn	Épithéliale	Primaire	Epilife	Contrôle
HEKn-hTERT	Épithéliale	Primaire	Epilife	Contrôle
HEKn-hTERT-E6-E7	Épithéliale	Primaire	Epilife	Modèle
HEKn-hTERT-E6-E7-GFP	Épithéliale	Primaire	Epilife	Protéine de fusion fluorescence (GFP)
HeLa	Épithéliale	CCU	DMEM	lignée cancéreuse dérivée de cancer du col de l'utérus
CaSki	Épithéliale	CCU	RPMI	lignée cancéreuse dérivée de cancer du col de l'utérus
CaSki – GSE	Épithéliale	CCU	RPMI	p53 non fonctionnel
HeLa – GSE	Épithéliale	CCU	DMEM	p53 non fonctionnel.

Tableau I : Lignées cellulaires utilisées tout au long du projet et leurs caractéristiques

Les lignées cellulaires HCA2 et BJU ont été utilisées dans les premiers stades d'optimisation des méthodes de détection de la sensibilisation des cellules testées. L'effet de sensibilisation se

défini par un arrêt, une perte ou diminution de la croissance cellulaire. Les HEKns sont des lignées cellulaires humaines isogéniques issues de kératinocytes normaux modifiés par infection par lentivirus. Nous avons ajouté l'expression de la sous-unité hTERT par vecteur Hygro-hTERT, afin de les immortaliser. Les cellules HEKn et HEKn – hTERT ont été utilisées comme cellules contrôles, représentant les cellules épithéliales normales dans les expériences de sensibilisations et d'études de composés sensibilisants in vitro. Les cellules HEKn-hTERT ont été ensuite séquentiellement modifiées par l'ajout de l'expression de la protéine du VPH E6 par infection par lentivirus-néomycine, et l'ajout de l'expression d'E7 du VPH par lentivirus BLAST-icidine. Nous avons ainsi obtenu nos cellules modèles CCU (**Chapitre 3.3.1, Figure 25, Section Résultat**). Les cellules HeLa et CaSki sont des lignées cellulaires directement dérivées de cancer du col de l'utérus. L'utilisation de ces cellules nous permet de tester la robustesse de l'effet de sensibilisation, observé dans nos cellules modèles et dans des cellules du cancer du col de l'utérus. Nous avons ensuite modifié les cellules HeLa et CaSki en ajoutant par infection au lentivirus le *Genetic suppressor element* pour p53 (GSE-22), un peptide inhibiteur dominant négatif de p53. Ces biomolécules dérivées du gène de p53 agissent comme des inhibiteurs de la fonction biologique de p53, en empêchant sa tétramérisation et relocalisation au noyau ce qui inhibe sa fonction biologique [81]. Le p53 se retrouve bloqué sous sa forme monomérique non active et ne peut plus remplir ses fonctions. Nous avons, donc, obtenu les lignées HeLa – GSE et CaSki – GSE, des lignées dont le p53 est complètement inactif, ce qui nous permet d'étudier l'importance de son implication [81].

2.1.2 Conditions de culture

Les cellules ont été maintenues dans des incubateurs à une température de 37°C dans des conditions atmosphériques humide à 5 % de CO₂. Sauf, en ce qui concerne les cellules HEKn et HEKn-hTERT qui ont été incubées à 7 % d'O₂.

Les fibroblastes primaires HCA2 et BJ-U ainsi que les cellules cancéreuses HeLa et HeLa – GSE ont été cultivées dans un milieu DMEM faible en glucose (Multicell, Wisent inc), complémenté avec 8 % de FBS (Sérum de veau foetal) et de 5% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine 10 000 µg/ml (Wisent inc). Les cellules cancéreuses CaSki et CaSki-GSE ont été incubées dans un milieu RPMI 1640 1X (Wisent), complémenté avec 8 % de FBS (Sérum de veau foetal) de 5% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine 10 000 µg/ml (Wisent inc). En ce qui concerne les cellules épithéliales primaires HEKn, HEKn – hTERT, HEKn – hTERT – E6 – E7 et HEKn – hTERT – E6 – E7 – GFP, elles ont été cultivées dans un milieu Epilife (cascade biologique, Gibco Life technologie), complémenté de 5 ml de HKGS 100 X (Human Keratinocyte Growth supplement, Gibco, Life technologie) et de 5% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine 10 000µg/ml (Wisent inc).

2.2 Protocole et condition de criblage à faible débit

Les cellules sontensemencées de 48 à 72 heures précédant le criblage dans des plaques de 96 puits. Le temps 0 heure correspond à 30 minutes après le traitement, ce qui a été jugé comme étant le temps requis pour observer un effet de sensibilisation de nos inhibiteurs sur nos cellules contrôles et modèles, que ça soit du niveau métabolique ou au niveau du cycle cellulaire. Les cellules sont traitées avec les différents composés testés (**Section résultats, chapitre 3.3, Tableau III**) et sont ensuite incubées à 37°C dans des conditions atmosphériques humides à 5 % de CO₂. Après 30 minutes d'incubation, l'évaluation du temps 0 est effectuée. En même temps, nous procédons à l'irradiation des cellules testées pour l'effet de synergie avec l'irradiation. Le milieu est changé aux 72 heures. L'évaluation de l'effet de sensibilisation a été effectuée aux temps assignés dans le protocole de criblage, telle que présentée dans la section résultats, **chapitre 3.3, Figure 25**.

2.3 Méthodes d'évaluation de l'effet de sensibilisation

Nous utilisons deux méthodes d'évaluation de l'effet de sensibilisation des composés testés sur nos cellules. Ces deux méthodes sont le test ATPlite et la coloration d'ADN par DRAQ5.

2.3.1 Test ATPlite (Trousse d'essai ATPlite, Perkin elmer).

Cette méthode permet l'évaluation du contenu d'ATP cellulaire. Les cellules ont été mises en culture préalablement dans des plaques blanches de 96 puits (Micro assay – plate Chimney, Greiner Bio One). Les plaques blanches ont été validées dans notre laboratoire, comme étant les meilleures surfaces de culture à utiliser pour la détection de la luminescence. La trousse d'essai ATPlite comprend une solution de lyse et une solution de substrat. La réaction enzymatique sur laquelle se base le principe de l'essai ATPlite implique l'enzyme luciférase, le substrat luciférine et l'ATP cellulaire. Le produit de la réaction est de l'énergie lumineuse. Les cellules sont traitées 5 minutes avec la solution de lyse, puis 5 minutes avec le substrat. Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes dans le noir avec agitation et une fois l'incubation complétée, nous mesurons la luminescence par spectrométrie (Perkin elmer luminescence spectrometer ls50b).

2.3.2 DRAQ5

Cette méthode implique l'évaluation du contenu d'ADN cellulaire. Les cellules sont fixées par une solution de formaline 10 % (Sigma, solution ph neutre). Elles sont ensuite marquées avec un colorant d'ADN fluorescent dans le rouge lointain, le DRAQ5 (*Far-red fluorescent live cell permanent DNA dye, 5mM, Cell signaling*) à une concentration de 0,5µM pendant une heure. Suite au lavage avec une solution de PBS1X et de Tween 1%, on procède à la lecture du signal fluorescent par spectrométrie (Li-COR Odyssey infrared system).

2.4 Extraction de protéines

Les protéines ont été extraites à partir de cellules en culture fraîchement sorties de l'incubateur. L'extraction s'est déroulée à 4°C en utilisant la solution de lyse M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo-Science).

2.5 Méthodes d'analyse de protéines

Afin d'étudier la cible cellulaire du composé sensibilisant identifié, nous avons employé deux méthodes d'analyse de protéines qui sont le buvardage de western et l'immunofluorescence.

2.5.1 Buvardage de western

Anticorps utilisés :

Protéines ciblées	Anti- corps primaires	Anti-corps secondaires
p53	p53(DO-1) <i>Santa Cruz Biotech</i> , monoclonal	Anti- mouse -HRP
p21	p21 (SX-118) <i>BD pharmagen</i> , monoclonal	Anti-mouse-HRP
COX IV	COXIV (3E11) <i>Cell signaling</i>	Anti-Rabbit-HRP
GAPDH	GAPDH (14C10) <i>Cell signaling</i>	Anti-Rabbit-HRP
β -actine	β -actine (AC – 15) <i>Abcam</i> , monoclonal	Anti-mouse-HRP

Tableau II : Anti-corps utilisés en buvardage de western.

Les anticorps primaires ont été utilisés à une concentration de 1/500 pour le p53 (DO-1), 1/100 pour le p21 (SX-118), 1/5000 pour COXIV (3E11) et 1/5000 pour GAPDH (14C10) et la β -actine (AC-15). Les anticorps secondaires anti-mouse et anti-rabbit IgG HRP (Cell signaling) ont été utilisés à une concentration de 1/5000. La révélation s'est faite par chimiluminescence avec la trousse de peroxydase, Amersham ECL prime Western-blotting reagent (Geolifescience).

2.5.2 Immuno-fluorescence

Les cellules ont été fixées à la formaline 10% (Sigma) deux heures et demi suite au traitement. Le noyau des cellules a été coloré en bleu par le marqueur d'ADN DAPI qui est une sonde fluorescente dans le bleu. Les cellules ont été traitées avec un anticorps contre p53, le p53 (DO-1), à une concentration de 1/500. Le p53 (DO-1) a été marqué en rouge par l'anticorps secondaire Alexa Fluor 594 Donkey anti-Goat IgG (H +L). Les lames ont été montées avec

l'aide du milieu *Vectashield* (VECTASHIELD Mounting Media for Fluorescence, Vector laboratories).

Matériels et Méthodes des expériences IN VIVO

2.6 Injection de cellules tumorales chez la souris (Xénogreffe HeLa).

2.6.1 Matériels :

- Matrigel froid (BD *Matrigel Basement Membrane Matrix*, Bioscience)
- Embouts froids
- Aiguille 25 G
- Seringues 1cc froides.
- Souris RAG2 γ C

2.6.2 Méthode :

Les souris ont été injectées en sous-cutané avec 4 millions de cellules HeLa dans les flancs droit et gauche, avec et sans matrigel.

2.7 Protocole de traitement des souris RAG2 γ C avec la Nutlin-3a

2.7.1 Matériel

- DMSO (Sigma Aldrich)
- Nutlin – 3a 10 mg/kg (Sigma)
- IR 6 Gy.

2.7.2 Méthode

Le traitement s'étend sur 18 jours. Les souris sont divisées en 4 groupes comme présentés dans le **tableau V au chapitre 3.5** de la section résultat. On a donc un groupe (contrôle) DMSO, un groupe IR + DMSO, un groupe Nutlin-3a 10 mg/kg, et un groupe IR + Nutlin-3a 10 mg/kg. La voie d'administration de la Nutlin-3a et du DMSO utilisée est la voie intrapéritonéale (I.P). La fréquence est de un jour sur deux à un volume de 50 µl et une concentration pour la Nutlin-3a de 10 mg/kg. Pour le groupe IR, les souris sont soumises à une dose unique d'irradiation de 6 Gy, le corps entier. Pour le groupe IR + Nutlin-3a, les souris sont traitées avec la Nutlin-3a, une journée avant l'irradiation. Les dernières doses de Nutlin-3a administrées ont été de 5 mg/kg, les souris ont été sacrifiées la journée suivante.

La croissance tumorale est déterminée en mesurant le volume de la tumeur qui est calculé en multipliant la longueur par la largeur par la profondeur de la tumeur. Le poids des souris ainsi que les points limites établis par le protocole du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) sont suivis et vérifiés à chaque prise de mesure de la croissance tumorale.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Présentation et validation du modèle cellulaire

Afin d'augmenter l'efficacité du traitement par radiothérapie des patientes du cancer du col de l'utérus et afin de diminuer le taux de morbidité associé au traitement, nous cherchons à développer un traitement spécifique en identifiant des agents sensibilisants ou radio-sensibilisants qui permettent de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses induites par le VPH. Pour y parvenir, nous proposons l'exploitation de l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 qui est spécifique aux cellules CCU, ainsi qu'à tout autre cancer induit par le VPH. Ces protéines sont exprimées de manière spécifique et constitutive dans les cellules CCU et seulement dans ces dernières. En effet, pour être en mesure d'identifier un composé sensibilisant préférentielle aux cellules CCU, il faut viser les protéines E6 et E7, ainsi que leur cibles cellulaires.

3.1.1 Présentation du modèle cellulaire

Avant de procéder au criblage à faible débit pour identifier des composés sensibilisants, nous avons procédé à la validation des méthodes d'évaluations de la sensibilisation, ainsi que du protocole de criblage. Les cellules utilisées pour la validation des méthodes d'évaluation de la sensibilisation, du protocole de criblage, ainsi que pour l'identification des composés sensibilisant sont des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, des cellules CCU – like développées au laboratoire. Pour développer ce modèle cellulaire nous avons utilisé des cellules isogéniques humaines issues de kératinocytes normaux, les cellules HEK_ns, que nous avons séquentiellement modifiées par lentivirus afin d'obtenir leur immortalisation suite à l'expression de la sous unité télomerase hTERT, obtenant les cellules contrôles HEK_n-hTERT. Nous avons ensuite ajouté grâce à des infections séquentielles par lentivirus l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7, obtenant ainsi les cellules modèles HEK_n-hTERT-E6-E7 (**Figure 15**).

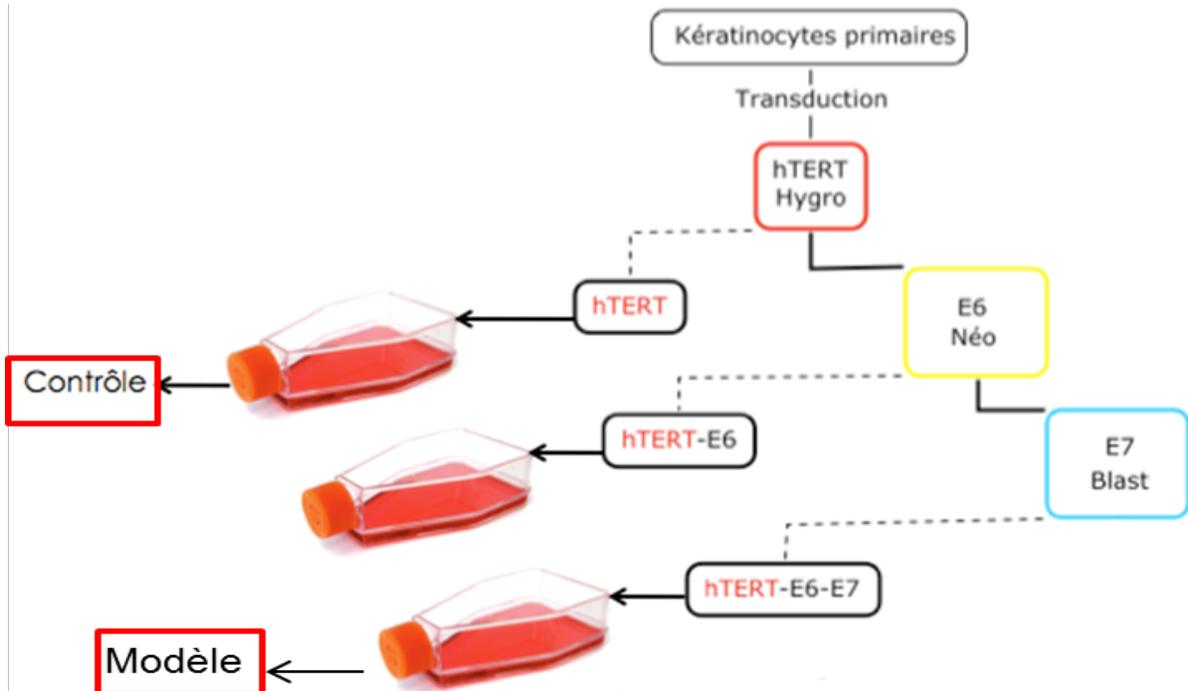


Figure 15 : Présentation du développement du modèle cellulaire, HEK_n-hTERT-E6-E7

Les ajouts de l'expression de la sous-unité télomérase; hTERT, de la protéine E6 et E7 se sont fait de manière séquentielle par infections au lenti-virus (Adapté d'une figure tirée du mémoire de maîtrise de Monika Knapik 2014, laboratoire du Dr. Rodier, autorisée par l'auteur).

Les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 sont utilisées dans les différentes expériences du projet à un doublement de population (pd) de 44 à 48, ce qui correspond comme nous le voyons dans la **figure 16** à une phase dans laquelle les cellules sont en croissance linéaire exponentielle.

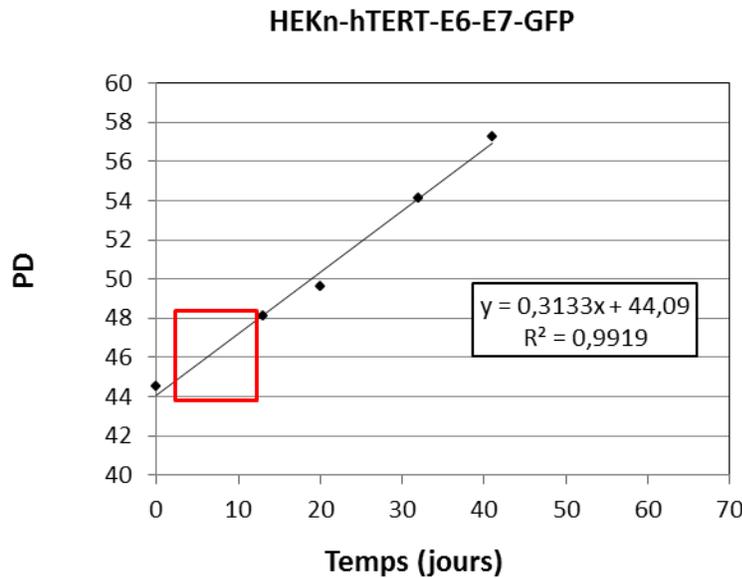


Figure 16 : Courbe de croissance des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7-GFP

Nous avons en ordonnée le doublement de population (pd) des cellules en culture. En abscisse, nous avons le temps passé en culture. Les points correspondent au doublement cumulatif de population des cellules après un temps X passé en culture. L'encadré rouge représente la fenêtre de pd auquel les cellules sont utilisées. L'expérience a été répétée 3 fois. Chaque point correspond au pd d'un flasque de cellule ayant subi un passage.

Une fois le modèle cellulaire développé, nous avons procédé à sa validation vis-à-vis de l'expression et de la fonction biologique des protéines virales E6 et E7. La validation de l'expression d'E6 et E7 a été effectuée par la méthode quantitative de RT-qPCR. L'ensemble des résultats de cette expérience ont été présentés dans le mémoire de l'étudiante Monika Knapik, l'ARN d'E6 et d'E7 a été confirmé dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. Sachant que l'expression des ARNm de E6 et E7 a été préalablement validée, j'ai procédé à la validation de leur effet biologique.

3.1.2 Validation du modèle cellulaire

3.1.2.1 Validation de la fonctionnalité d'E6

Tel qu'expliqué précédemment (**Chapitre 1.4.3.2**) E6 interagit avec p53 et provoque sa dégradation dans le protéasome. Afin de valider la fonctionnalité d'E6, nous avons procédé à la validation de son effet sur p53. Pour ce, nous avons investigué l'expression de la protéine p53 dans les cellules modèles HEK_n-hTERT-E6-E7 par buvardage de western. Nous avons utilisé comme contrôle de référence les cellules HEK_n-hTERT. Les protéines ont été extraites en même temps pour toutes les conditions, ce temps correspondant à 2h30 après traitement. Les cellules ont été irradiées avec une dose de 16 Gy afin de servir de contrôle positif pour la stabilisation de p53. Pour la validation de l'effet d'E6 sur p53, nous nous intéressons seulement aux premiers et derniers puits de chaque lignée, encadrés en rouge dans la **figure 17**. Notez la stabilisation de p53 par l'irradiation dans les cellules normales HEK_n-hTERT et la perte totale de p53 (en absence ou en présence de l'irradiation) dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. L'absence de l'expression de p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 comparativement aux cellules HEK_n-hTERT confirme donc la fonctionnalité de l'oncoprotéine E6 dans nos cellules modèles.

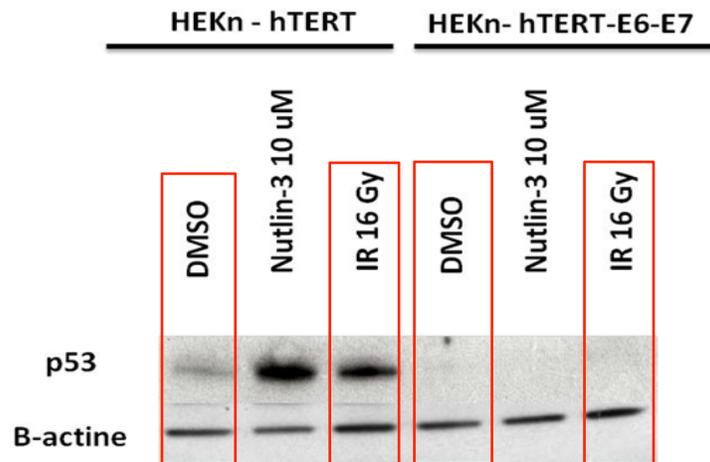


Figure 17: Validation de la fonction biologique de la protéine E6 dans les cellules HEK293T-E6-E7.

Nous avons validé la fonctionnalité d'E6 en explorant son effet sur le niveau d'expression de p53 dans les cellules HEK293T-E6-E7. Les cellules irradiées et non irradiées ont été traitées avec du DMSO (solvant). Les cellules ont été exposées à une dose d'irradiation de 16 Gy. Les protéines ont été extraites 2 heures post-irradiation. Le p53 cellulaire a été marqué avec un anti-corps monoclonal de souris anti-p53 (clone DO-1) à une concentration de 1/500. La β -actine, une protéine ubiquitaire a été utilisée comme contrôle et a été marquée avec l'anticorps anti- β -actine (AC-15) à une concentration de 1/5000. L'expérience a été répétée trois fois.

3.1.2.2 Validation de la fonctionnalité d'E7

Ensuite nous avons procédé à la validation de la fonction d'E7 dans les cellules HEK293T-E6-E7. La protéine virale E7 inhibe la fonction de Rb et provoque sa dégradation au protéasome. Dans les cellules normales, une accumulation de p16, en réponse à un stress cellulaire, promeut la sénescence via Rb [170]. Dans les cellules RB ou Rb déficientes la surexpression de p16 ne devrait avoir aucun effet sur la prolifération des cellules. Nous avons évalué la fonctionnalité de Rb, par l'investigation de sa capacité à induire la sénescence en réponse à un haut niveau de p16. Pour ce, nous avons évalué la prolifération des cellules modèles HEK293T-E6-E7, suite à l'induction de la surexpression de p16 par lentivirus. L'évaluation de la croissance cellulaire a été effectuée sur une période de 9 jours.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits. La quantité d'ADN présente dans chaque puits a été évaluée sur une période de 9 jours. L'ADN des cellules a été marquée au DRAQ5, un colorant d'ADN fluorescent dans l'infrarouge, chaque point rouge dans le puits correspond au noyau d'une cellule. Un logiciel de traitement traite le signal fluorescent émit dans chaque puits et lui attribut un chiffre, plus le nombre de cellules est important, plus le signal est important. Le contenu d'ADN a été normalisé au temps 0. Les cellules contrôle IR, ont été exposées à une dose d'irradiation de 8 Gy, et servent de contrôle positif de l'induction de p16. Nous pouvons observer dans la **figure 18** l'arrêt de croissance des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 suite au traitement à l'irradiation, ou à l'induction de p16.

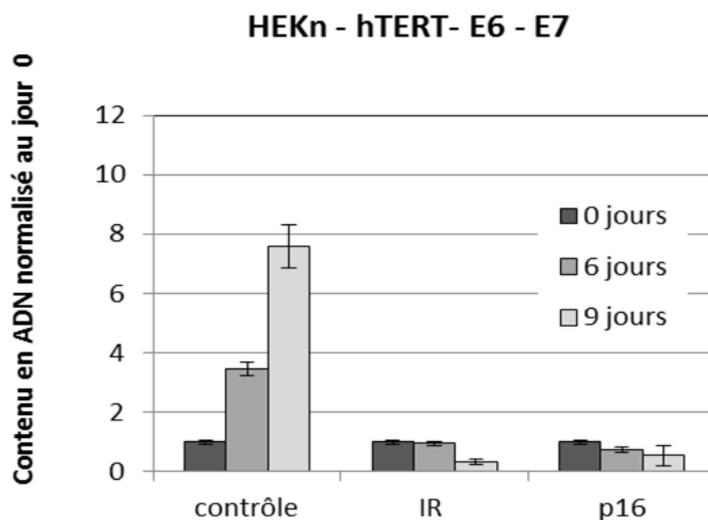


Figure 18 : Validation de la fonction biologique d'E7 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7

Nous avons validé la fonction biologique d'E7 en investiguant son effet sur sa cible biologique Rb. Nous avons examiné la capacité de Rb à induire la sénescence suite à une augmentation du niveau de p16 cellulaire. Nous avons présenté en ordonnée le contenu d'ADN normalisé au jour 0 des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. Le contenu en ADN des cellules a été coloré au DRAQ5 (1/10 000) après 0, 6 et 9 jours de culture cellulaire. Des cellules non traitées ont servi de contrôle négatif, des cellules exposées à une dose d'IR de 8 Gy ont servi de contrôle positif pour la surexpression de p16. Chaque barre correspond aux moyennes normalisées au jour 0. Les moyennes ont été calculées à partir de trois répliques ayant subit le même traitement à un temps donné. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type calculée à partir des écarts type de chaque triplicat. L'expérience a été répétée trois fois.

En résumé, nous avons procédé à l'investigation de la perte de fonctionnalité de Rb induite par E7, en se penchant sur la capacité de Rb à induire la sénescence en réponse à une sur activation de p16. Nos résultats nous indiquent que les cellules arrêtent leur prolifération suite à une augmentation du niveau de p16, ce qui implique que Rb est toujours fonctionnel. Donc la protéine E7, bien que exprimée dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, ne remplit pas sa fonction biologique. D'ailleurs, Monika Knapik a soulevé le faible niveau d'expression d'E7 en comparaison avec E6 par RT-qPCR.

Sachant que le Rb est toujours fonctionnel dans notre modèle cellulaire. Nous allons viser comme cible thérapeutique les voies associées au p53 et cela car nos cellules ont été confirmées comme exprimant une E6 fonctionnelle. Donc nous pouvons déjà avancer que tout effet de sensibilisation préférentielle que nous pourrions identifier relèverait de la fonction d'E6 dans nos cellules. Aussi, la non fonctionnalité de E7 dans notre modèle fait en sorte de limiter les composés utilisés en criblage à faible débit à des voies cellulaires associées à l'action de p53 plutôt que Rb.

Ayant mis au point et caractérisé les forces (E6) et faiblesses (E7) de notre modèle cellulaire, nous allons maintenant procéder à la validation des méthodes d'évaluation de la sensibilisation.

3.2 Validation de la méthodologie

3.2.1. Validation des méthodes d'évaluation de la sensibilisation

En criblant pour un sensibilisant des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, nous cherchons à identifier un composé qui cause l'arrêt, la diminution, ou la perte de croissance des cellules CCU traitées. La sensibilisation cellulaire sera évaluée sur une période de temps allant de 0 à 192 heures. Avant de procéder au criblage, il est nécessaire de mettre au point et de valider la méthodologie utilisée pour évaluer la sensibilisation des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7.

3.2.1.1 Évaluation de la sensibilisation : Test ATPlite

La première méthode utilisée pour évaluer la sensibilisation de nos cellules modèles est l'essai ATPlite. Le test ATPlite est un test de luminescence qui permet la quantification de l'ATP cellulaire. L'ATP est un marqueur de viabilité cellulaire et est présente dans toutes les cellules biologiquement actives. Le système d'essai ATPlite se base sur la production de lumière causée par la réaction enzymatique impliquant l'enzyme luciférase en présence d'ATP et de son réactif D-luciférine.

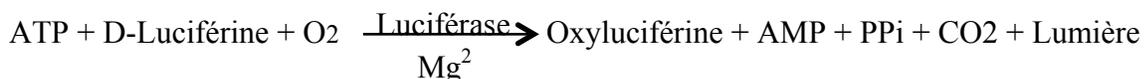


Figure 19 : Réaction enzymatique sur laquelle se base le système ATPlite.

Afin de valider le test ATPlite comme méthode d'évaluation de la sensibilisation des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. Nous avons procédé à l'évaluation de la linéarité, quantitativité, et de la limite de détection de la méthode. Nous avonsensemencé différentes concentrations de cellules allant de 625 à 10 000 cellules et nous avons effectué un test ATPlite après 24 heures de culture.

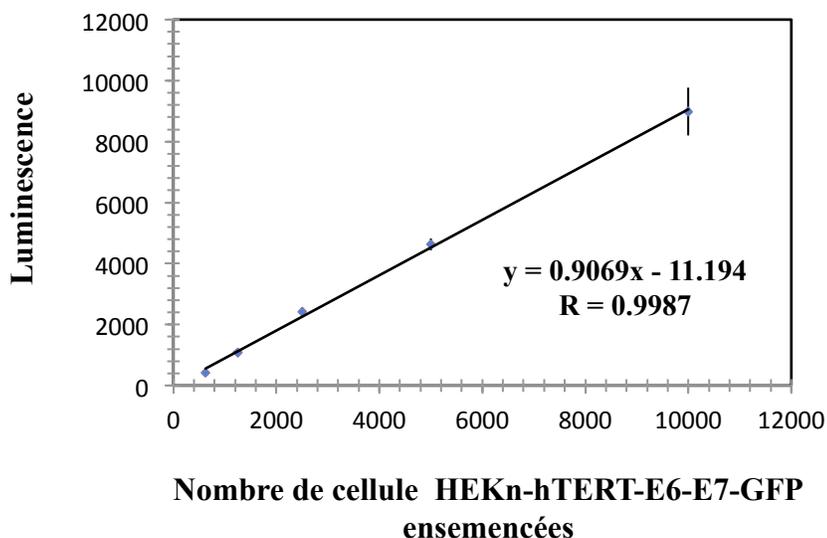


Figure 20 : Détermination de la sensibilité de la méthode de quantification cellulaire ATPlite pour les cellules HEK293T-E6-E7 (CCU).

Les dilutions des cellules HEK293T-E6-E7 permettent de générer une courbe standard et de valider la sensibilité de la technique pour nos cellules. Les différentes concentrations de cellules ensemencées par puits (dans une plaque de 96 puits) sont indiquées en abscisse. La valeur de luminescence détectée pour les différentes concentrations est rapportée en ordonnée. Les points représentent la moyenne et l'écart-type sur trois répliques expérimentaux.

Les résultats présentés à la **Figure 20** montrent la linéarité et la reproductibilité de la méthode sur une grande fenêtre avec des barres d'erreurs très étroites. La méthode est linéaire et quantitative. Elle est sensible à jusqu'à 625 cellules par puits et commence à perdre de la sensibilité vers 10 000 cellules.

Sachant, que nous voulons cribler pour un composé radio-sensibilisant, nous avons voulu investiguer, par l'intermédiaire du test ATPlite, l'effet de l'exposition à des doses croissantes d'irradiation (2 Gy, 4 Gy et 8Gy), pour une période de 96 heures, sur la croissance des cellules HEK293T-E6-E7. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 800 cellules. Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été irradiées.

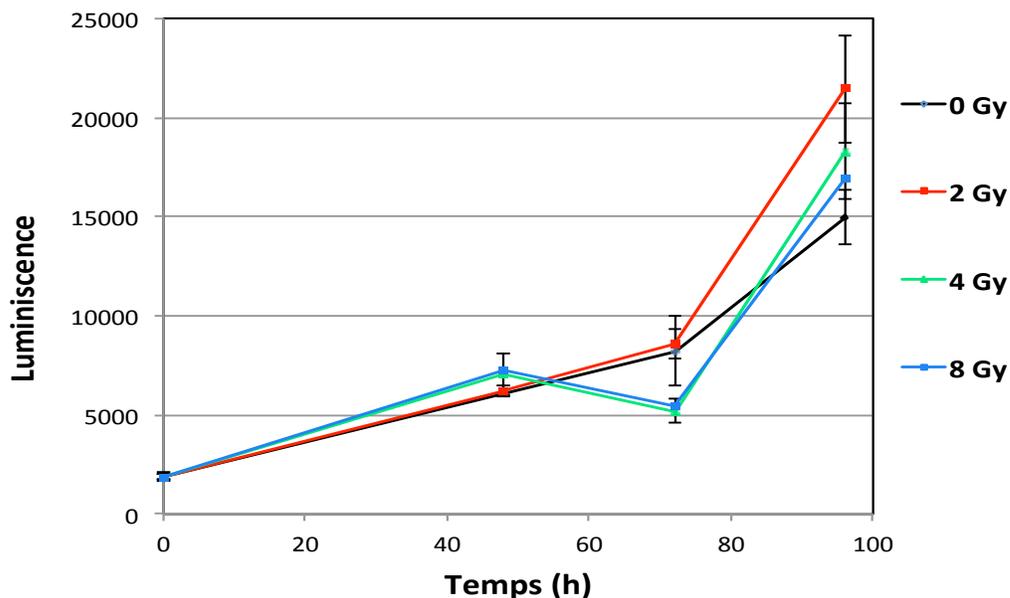


Figure 21: Effet de l'irradiation sur la croissance des cellules HEK293T-E6-E7 mesuré par ATPlite.

Les cellules ont été traitées avec des doses de 0, 2, 4 et 8 Gy. La quantification des cellules a été effectuée par ATPlite. Nous avons en abscisse le temps post-irradiation passé en culture. La valeur de luminescence mesurée au temps X est rapportée en ordonnée. Chaque point correspond à la moyenne de luminescence pour trois réplicas (Dans une plaque de 96 puits). Chaque barre d'erreur correspond à l'écart-type associé aux trois réplicas correspondant à un point donné.

Les résultats (**Figure 21**) montrent une baisse de la prolifération des cellules HEK293T-E6-E7 suite à l'irradiation entre 48h et 72h. Toutefois, l'exposition à une dose d'irradiation de 2 Gy ne semble pas avoir un effet observable sur les cellules HEK293T-E6-E7.

Les cellules exposées à une dose d'irradiation de 4 et 8 Gy se remettent à proliférer après 72h et comme pour les cellules exposées à une dose d'irradiation de 2 Gy, il semblerait qu'après 72 heures de culture, les cellules irradiées prolifèrent plus rapidement que les cellules non irradiées, ce qui n'est pas vraisemblable. En effet, ayant procédé au suivi par microscopie de la croissance des mes cellules lors des 96 heures qu'a duré l'essai, je peux affirmer avoir observé de la mort cellulaire dans les premiers 48 heures de culture suivit d'une diminution

notable de la prolifération des mes cellules qui était directement proportionnelle à la dose d'irradiation à laquelle elles ont été exposées.

Aussi, l'essai d'induction de la sénescence par Rb suite à une augmentation du niveau de p16 en réponse à l'irradiation démontre dans la **Figure 18**, que les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 arrêtent leur croissance en réponse à l'irradiation.

De plus, préalablement à ce projet afin de comprendre et de caractériser notre modèle cellulaire, une étude de l'effet de l'irradiation sur les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 a été effectuée. Nous avons exposé ces cellules à une dose d'irradiation de 10 Gy et nous avons observé leur morphologie après 96 heures de culture.

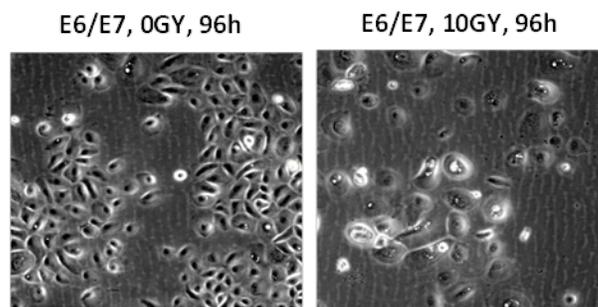


Figure 22: Réponse à l'irradiation des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7

Photos prises par microscope sous lumière blanche des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 96 heures après avoir été exposées ou non à une dose d'irradiation de 10 Gy. L'expérience a été effectuée deux fois indépendamment en triplicatas.

On peut observer dans la figure 22 une nette différence entre les cellules irradiées et non irradiées. En effet, suite à l'irradiation, les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 prolifèrent beaucoup moins que les cellules non-irradiées et leur forme est modifiée. Elles ont grossies et aplaties adoptant une morphologie semblable à celles des cellules sénescents [150]. Il y a peu de cellules flottantes suggérant une réponse de sénescence plutôt que de mort cellulaire. Il aurait été pertinent de confirmer le phénotype de sénescence dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 avec un marquage de l'activité de la sénescence associée β -galactosidase, qui est un

marqueur connu de la sénescence, malheureusement nous n'avons pas effectué cette expérience. Par contre, nous pouvons de par nos observations par microscopie et par les résultats obtenus dans la figure 18 avancer que nos cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, subissent un arrêt de croissance cellulaire suite à leur exposition à l'irradiation.

En se fiant qu'à la figure 21, nous serions porté à croire que nos cellules modèles continuent à croître à une vitesse semblable à plus grande que celle des cellules normales. Or sachant les dommages à l'ADN subit et la perte de fonctionnalité de p53 dont souffrent les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 cela semble improbable. Aussi, sachant que Rb est toujours fonctionnel, nous nous attendions à un arrêt du cycle cellulaire et entrée en sénescence des cellules. Cette réponse serait le résultat de l'action de Rb en réponse à l'augmentation du niveau de p16 en réponse au stress engendré par l'irradiation [170]. Nous pouvons observer cet arrêt de croissance Rb dépendant engendré par une augmentation du niveau de p16 suite à l'irradiation dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 dans la figure 18. Donc, suite au traitement à l'irradiation des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 nous devons avoir une diminution (mort cellulaire) couplé à un arrêt de croissance de nos cellules (sénescence). Ceci devait se traduire par un plateau dans la figure 21 et cela du moins pour la dose de 8 Gy, ce qui n'est pas le cas. Or, il ne faut pas oublier que le test ATPlite se base sur la détection de la quantité d'ATP cellulaire. Par conséquent, les données communiquées par cette méthode dépendent de l'activité métabolique cellulaire. Sachant que l'activité métabolique peut augmenter en réponse au stress ou dans le cas de la sénescence [152], nous devons utiliser une autre méthode afin de s'assurer de la robustesse de nos résultats. Le test ATPlite a été tout de même utilisé comme méthode d'évaluation de la sensibilisation lors du criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la RDA, et cela à cause de la non disponibilité d'une méthode alternative permettant d'effectuer un criblage de cette taille importante au début du projet. Aussi, la dose d'irradiation et le temps post-traitement choisi ne nous ont pas permis de relever les lacunes de la méthode soulevées ci-dessus. Toutefois, l'effet du composé sensibilisant identifié a été confirmé avec une autre méthode avant de procéder à la suite de l'étude.

3.2.1.2 Évaluation de la sensibilisation : Coloration DRAQ5

Cette technique d'évaluation de la sensibilisation se base sur la mesure de la quantité de cellules en fonction de la quantité d'ADN détecté dans les cellules.

Les cellules d'intérêt sont tout d'abord fixées à la formaline, puis colorées au DRAQ5 (composé synthétique avec une haute affinité pour l'ADN). Le colorant DRAQ5 permet une coloration des noyaux des cellules tout en émettant un signal fluorescent dans le rouge. La fluorescence est mesurée par spectromètre infrarouge (Li-COR Odyssey).

Comme pour l'essai ATPlite, nous avons procédé à l'évaluation de la sensibilité, de la linéarité et des limites de la méthode. L'essai consiste en un ensemencement de différentes densités de cellules et l'étude après 24 heures de culture de la quantité de fluorescence détectée en fonction de la densité de cellules.

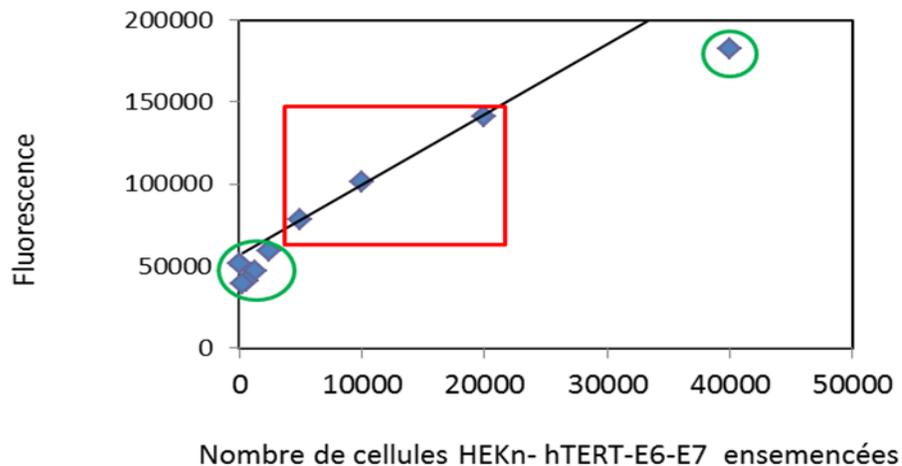


Figure 23: Détermination de la sensibilité de la méthode de quantification cellulaire par coloration d'ADN au DRAQ5 pour les cellules HEK293T-htTERT-E6-E7 (CCU).

Les dilutions des cellules HEK293T-htTERT-E6-E7 permettent de générer une courbe standard et de valider la sensibilité de la technique pour nos cellules. Les différentes concentrations de cellules ensemencées par puits (dans une plaque de 96 puits) sont indiquées en abscisse. La valeur de fluorescence détectée pour les différentes concentrations est rapportée en ordonnée. Les points représentent la moyenne sur trois répliques expérimentaux. Les cercles verts montrent les concentrations limites de la technique. L'encadré rouge montre l'intervalle de sensibilité de la méthode

Les résultats (**Figure 23**) montrent, d'une manière générale, une forte augmentation de la fluorescence avec le nombre de cellules. La relation est quasi linéaire pour des concentrations allant de 5000 à 20 000 cellules (fenêtre en rouge sur le diagramme de la **figure 23**). Au-delà de 20 000 cellules, la méthode perd sa quantitativité et en dessous de 5000 cellules (cercle vert dans le diagramme de la **figure 23**) nous ne pouvons plus différencier entre le résultat et le bruit de fond de la méthode.

Ensuite, comme pour le cas de la méthode ATPlite, nous avons investigué la croissance des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 sur une période de 96 heures suite au traitement avec l'irradiation à des doses de 2 Gy, 4 Gy et 8 Gy, afin d'évaluer la capacité de la méthode à mesurer la sénescence.

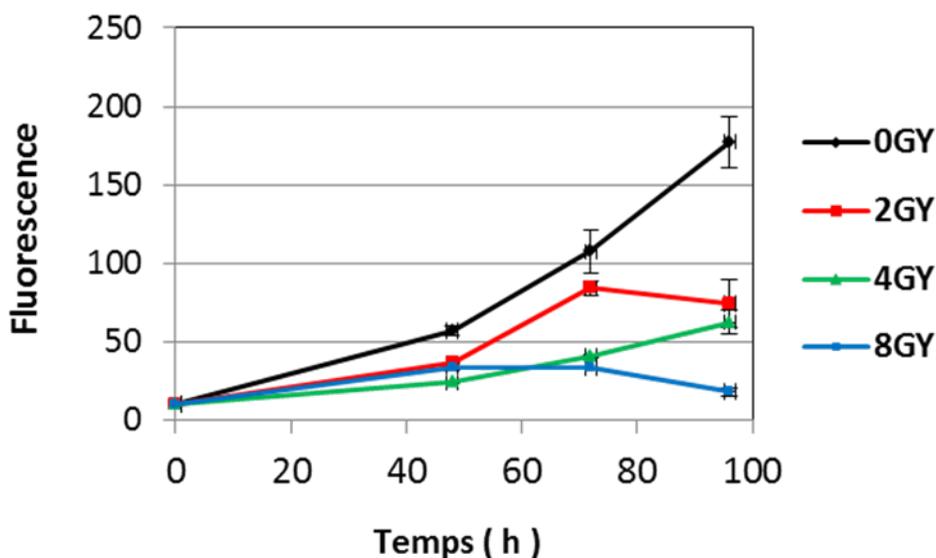


Figure 24: Effet de l'irradiation sur la croissance des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 évalué par coloration au DRAQ5.

Les cellules ont été traitées avec des doses d'irradiation de 0, 2, 4 et 8 Gy. La quantification des cellules a été effectuée par coloration d'ADN au DRAQ5 (Li-core). Nous avons en abscisse le temps post-irradiation passé en culture. La valeur de fluorescence mesurée au temps X est rapportée en ordonnée. Chaque point correspond à la moyenne de fluorescence pour trois réplicas (Dans une plaque de 96 puits). Chaque barre d'erreur correspond à l'écart-type associé aux trois réplicas correspondant à un point donné.

Nous avonsensemencés 1500 cellules, que nous avons traitées ou non avec l'irradiation après 48 heures de cultures. Le temps 0 correspond au temps 0 post irradiation. Nous pouvons observer dans la **figure 24** que suite au traitement à l'irradiation, il y a une diminution de la prolifération des cellules HEKn-hTERT-E6-E7. L'effet de l'irradiation sur la prolifération de ces cellules semble être dose dépendant. En effet, les cellules exposées à une dose d'irradiation de 2 Gy ralentissent leurs croissance puis se reprennent entre 48 et 72 heures pour ralentir jusqu'à arrêter entre 72 et 96 heures. L'effet d'inhibition de la prolifération est encore plus important suite à l'exposition à une dose d'irradiation de 4 Gy. Suite à l'exposition à une dose de 8 Gy, nous pouvons noter un arrêt de croissance entre 48 et 72 heures. Après 72 heures, nous avons observé une baisse de viabilité des cellules HEKn-hTERT-E6-E7.

Pour résumer, nous pouvons conclure que l'essai ATPlite est une technique d'une grande sensibilité et linéarité, qui permet de détecter un signal avec peu de cellules. Alors que la coloration d'ADN au DRAQ5 montre une sensibilité et linéarité restreintes à une fenêtre plus étroite (5000 à 20000 cellules). Toutefois, la coloration d'ADN par DRAQ5 à l'intérieur de sa fenêtre de détection, est plus quantitative et sensible quant à la détection de l'effet de l'irradiation sur les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 comparé au test ATPlite (**Figure 21 et Figure 24**).

Une fois la méthodologie d'évaluation de la sensibilisation mise au point, nous avons procédé au criblage à faible débit pour identifier un composé sensibilisant les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 si utilisé seul ou couplé à l'irradiation.

3.3 Criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la voie de réparation des dommages à l'ADN

Les composés utilisés pour le criblage sont des inhibiteurs connus de la voie de réponse aux dommages à l'ADN. Le choix de ces inhibiteurs en particulier s'est effectué en se basant sur leurs effets biologiques et leur intérêt prouvé comme cibles potentielles pour une thérapie anti-cancer (Chapitre 1.8.2). Aussi, ce choix a été encouragé par la disponibilité de ces inhibiteurs en laboratoire. Nous cherchons à identifier un composé qui permet la sensibilisation préférentielle des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 ou leur sensibilisation préférentielle en synergie avec l'irradiation. Nous avons choisi comme modèle cellulaire, les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, car nous voulions nous assurer que l'effet de sensibilisation préférentielle observé est spécifique à l'expression des protéines virales E6 et E7 et non à une mutation quelconque pouvant être présente dans les lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus comme c'est le cas des cellules HeLa et CaSki. En effet, sachant que la seule différence génétique entre nos cellules modèle et contrôle est l'expression des protéines E6 et E7 nous pouvons être sûr que l'effet de sensibilisation préférentielle observé est dépendant de l'expression des protéines virales. Aussi, nos cellules modèles ont été prouvées comme étant déficientes en E7. Donc, l'effet de sensibilisation observé est dépendant des voies de signalisation impliquant p53, cible moléculaire d'E6. Nous pouvons, donc, restreindre le choix des composés testés à ceux impliqués dans les voies cellulaires impliquant p53. De plus, sachant que nos cellules expriment une protéine E7 déficiente et que Rb est toujours fonctionnel, nous nous attendions à ce que les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 rentrent en sénescence suite au traitement à l'irradiation (Figure 18) [170], ce qui n'est pas le cas des cellules dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki qui échappent à la sénescence [186]. Sachant que nos cellules modèles sont déficientes en E7 et ne sont donc pas entièrement représentatives des cellules du cancer du col de l'utérus, nous devons tester le composé sensibilisant préférentiel identifié sur des cellules dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki afin de confirmer l'effet de sensibilisation identifié dans des cellules CCU, et s'assurer de la robustesse de cet effet en présence de variabilité génétique liée aux cellules provenant de patientes.

Les composés testés sont utilisés aux concentrations auxquelles ils ont été validés comme étant actifs dans notre laboratoire.

Inhibiteurs	Concentration	Protéines cibles
Caféine	1mM	ATM/ATR
CGK733	2uM	ATM/ATR
KU-55933	10uM	ATM
Wortmannin	5uM	PI3K/DNA-PK
UCN-01	15nM	CHK1
Nutlin-3	10uM	mdm2

Tableau III: Présentation des inhibiteurs de la RDA utilisés pour le criblage à faible débit, avec leurs concentrations et leurs cibles cellulaires respectives.

3.3.1 Présentation du protocole de criblage à faible débit

Les cellules modèles CCU (HEK_n-hTERT-E6-E7) et les cellules contrôles (HEK_n-hTERT) sontensemencées 48 à 72 heures avant le traitement. Au jour 0, elles sont traitées avec les différents inhibiteurs, aux doses testées. À 30 minutes après le traitement, les cellules sont irradiées ce qui correspond au temps 0. Les doses d'irradiation testées varient de 0 à 16 Gy. L'effet de sensibilisation est évalué par ATPlite à des temps allant de 0 à 192 heures après traitement. Les temps d'évaluation de la sensibilisation allant de 0 à 72 heures couvrent les destins précoces comme l'apoptose, la réparation et la nécrose. Les temps allant de 72 heures à 192 heures couvrent les destins tardifs comme la mort par catastrophe mitotique et la sénescence (**Figure 25**) [187].

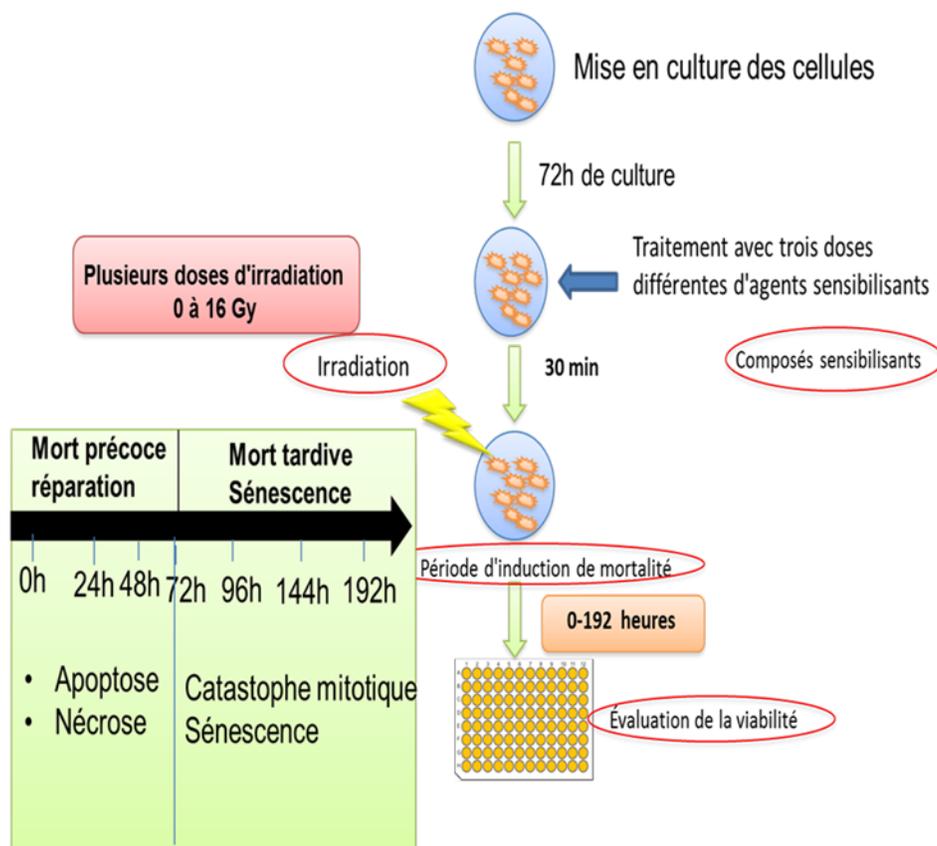


Figure 25: Protocole de criblage à faible débit pour un composé sensibilisant ou radio-sensibilisant les cellules HEK293T-E6-E7

3.3.2 Criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la RDA

Des criblages ont été effectués pour l'identification de composés radio-sensibilisants suite à une exposition à une dose d'irradiation de 2 Gy. En raison de la grandeur de l'essai et pour des raisons techniques, nous avons limité le criblage à deux composés à la fois. Le choix de la composition du couple s'est fait au hasard et ne présente aucune importance pour les résultats obtenus sachant que chaque composé est testé indépendamment de l'autre. Donc, nous avons effectué trois expériences indépendantes dans lesquelles, nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs à chaque fois : Ku-55933 10 μ M et UCN-01 15 η M, wortmanin 5 μ M et caféine 1mM, Nutlin-3 10 μ M et CGK-733 2 μ M. Les expériences ont porté sur des cellules contrôles (HEK293T) et les cellules modèles CCU-like (HEK293T – hTERT – E6 – E7). Nous avons choisi les temps de mesure expérimentaux qui permettent la meilleure représentation de l'effet sensibilisant pour chaque lignée cellulaire.

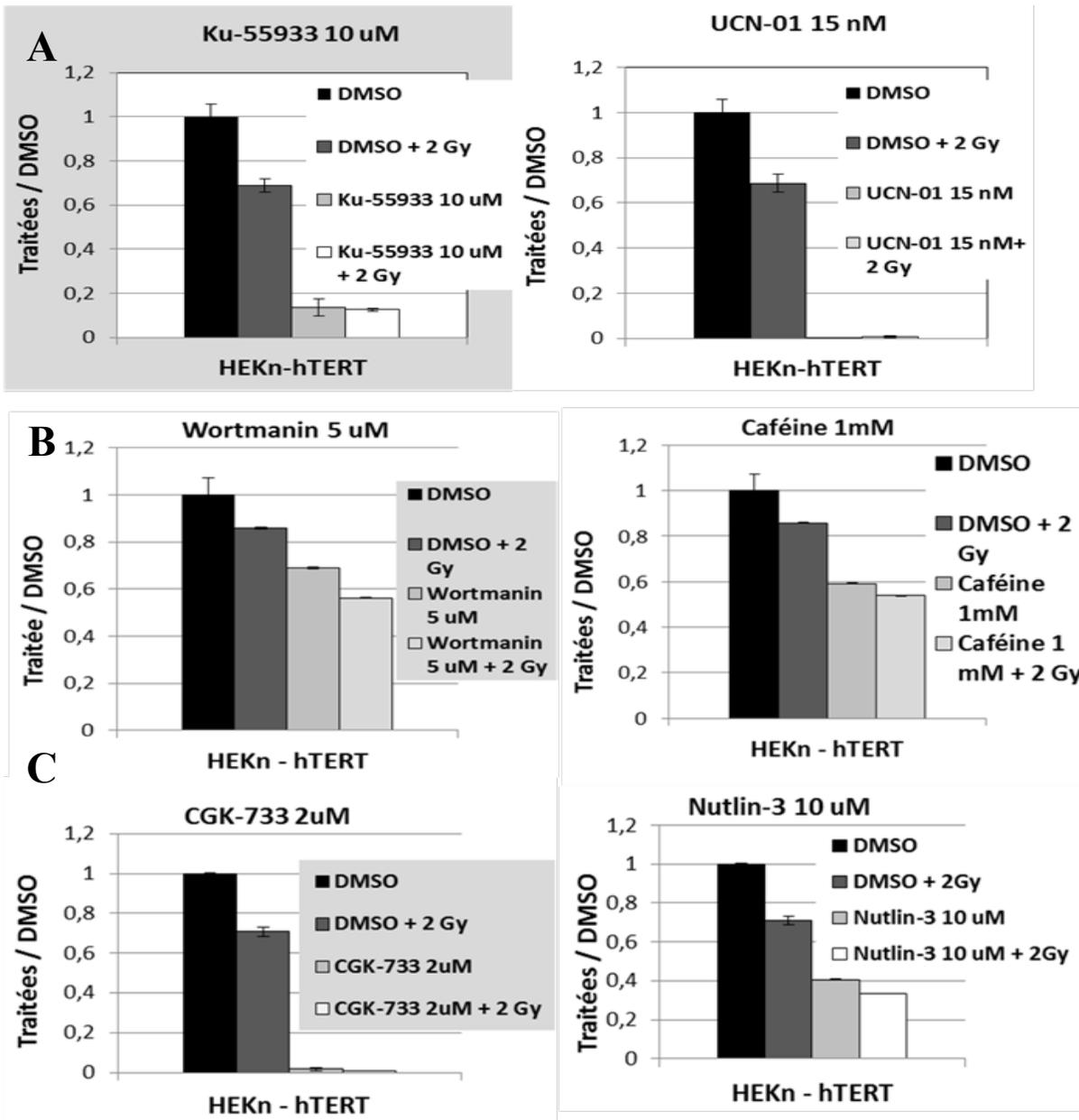


Figure 26 : Effet des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules contrôle HEK293T

Nous avons présenté en ordonnée la mesure par ATPlite de la sensibilisation des cellules contrôles au traitement. Cette sensibilisation ou viabilité relative correspond à la valeur de luminescence de cellules traitées avec un inhibiteur donné de la RDA sur la valeur de luminescence obtenue suite au traitement au DMSO (solvant). La mesure a été prise 96 heures post traitement. Chaque barre correspond à la valeur de sensibilisation calculée par la division de la moyenne de trois répliques traitées avec un inhibiteur de RDA sur la moyenne des trois répliques contrôles traités au DMSO. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type associée à chaque ratio, qui représente l'erreur relative. Les résultats présentés proviennent de trois expériences différentes qui sont présentées séparément en A, B et C.

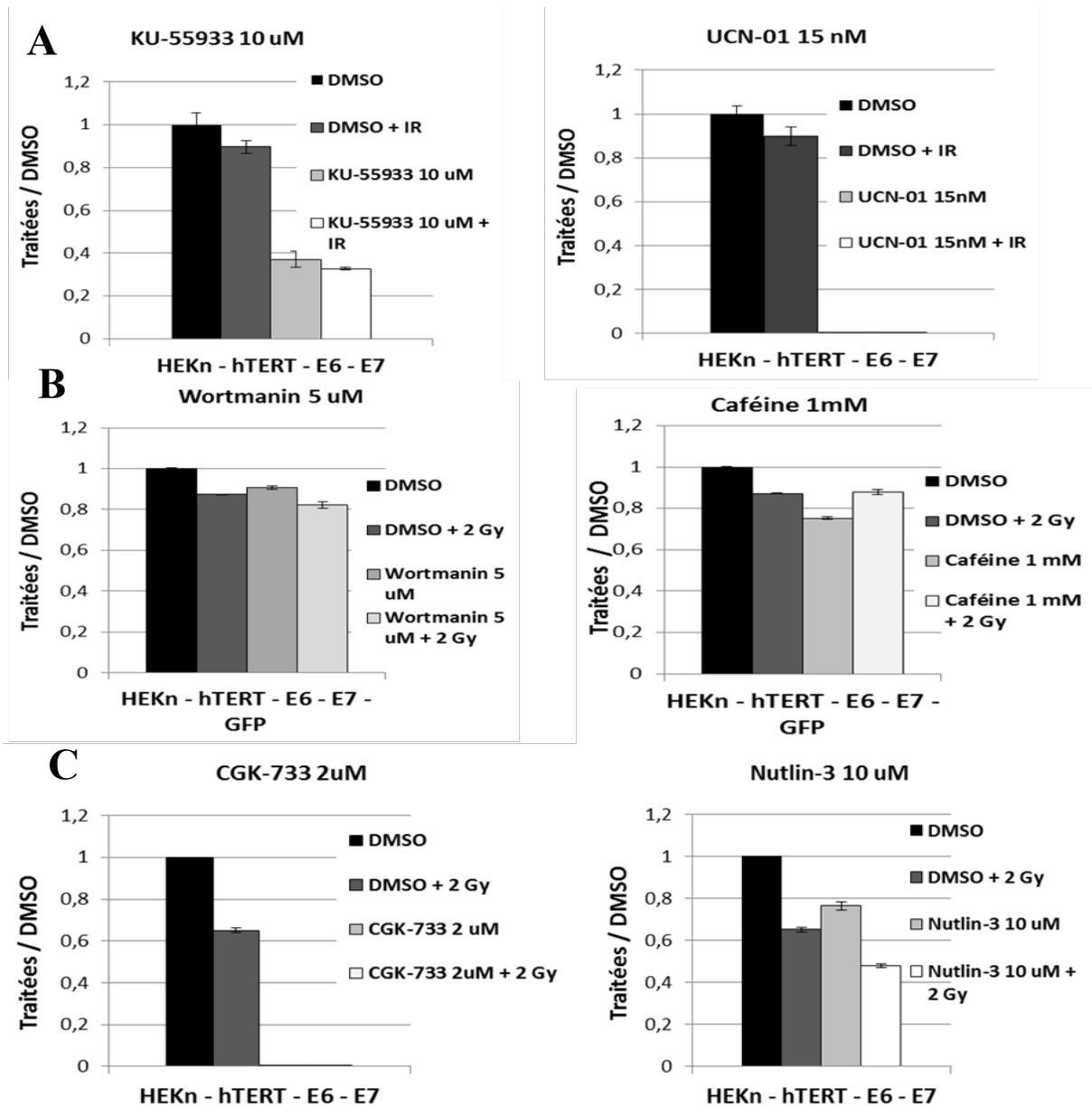


Figure 27 : Effet des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules HEK293T-E6-E7

Nous avons présenté en ordonnée la mesure par ATPlite de la sensibilisation des cellules modèles CCU au traitement. Cette sensibilisation ou viabilité relative correspond à la valeur de luminescence de cellules traitées avec un inhibiteur donné de la RDA sur la valeur de luminescence obtenue suite au traitement au DMSO (solvant). La mesure a été prise 72 heures post traitement. Chaque barre correspond à la valeur de sensibilisation calculée par la division de la moyenne de trois répliques traitées avec un inhibiteur de RDA sur la moyenne des trois répliques contrôles traités au DMSO. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type associée à chaque ratio, qui représente la viabilité relative. Les résultats présentés proviennent de trois expériences différentes qui sont présentées séparément en A, B et C.

Nous avons présenté en deux figures différentes (**Figure 26 et Figure 27**), l'effet des inhibiteurs testés sur les cellules contrôles HEK_n-hTERT (**Figure 26**) et les cellules modèles HEK_n-hTERT-E6-E7 (**Figure 27**). Le criblage a été effectué en trois expériences indépendantes dont les résultats sont présentés combinés dans chacune des deux figures. La sensibilisation des cellules a été mesurée par ATPlite. L'effet de sensibilisation est traduit par la valeur de luminescence obtenue pour les cellules traitées par les différents inhibiteurs ou par l'irradiation ou par la combinaison des deux que divise la valeur des cellules non irradiées traitées par le DMSO. Le DMSO (diméthylsulfoxyde) est le solvant organique utilisé pour solubiliser les inhibiteurs non-solubles en solution aqueuse comme la Nutlin-3, le Ku-55933, la wortmanin, l'UCN-01, et le CGK-733.

Nous avons observé les effets des différents inhibiteurs sur les cellules traitées. Nous avons visé à identifier des composés qui permettent de démontrer un effet sensibilisant sur les cellules testées. Parmi ces composés, nous avons cherché à ressortir les composés qui montrent un effet sensibilisant important sur les cellules modèles HEK_n-hTERT-E6-E7. Aussi, sachant que nous criblons pour un agent radio-sensibilisant, nous cherchons à identifier un composé qui a un effet synergique avec l'irradiation se traduisant par une augmentation de la sensibilisation des cellules modèles traitées et irradiées. La spécificité de l'effet sensibilisant du composé testé aux cellules modèles avec peu d'effet toxique sur les cellules contrôles en ferait un candidat idéal.

Les résultats obtenus (**Figures 26 et 27**), ont été simplifiés et présentés dans le **tableau IV**. Les effets des inhibiteurs testés sur les deux lignées cellulaires HEK_n-hTERT et HEK_n-hTERT-E6-E7 ont été présentés selon leurs toxicités, la spécificité de leur effet sur une lignée ou l'autre, leur potentiel comme agent radio-sensibilisant et la spécificité de cette radio-sensibilisation sur une lignée comparée à l'autre.

Observation sur les cellules traitées HEK _n -hTERT, HEK _n -hTERT-E6-E7	Traitements					
	Ku-55933 10 μM	UCN – 01 15 ηM	Wortmanin 5 μM	Caféine 1 mM	Nutlin -3 10 μM	CGK-733 2μM
Effet sensibilisant sur les deux lignées	X	X	-	X	X	X
Sensibilisation préférentielle des cellules normales	X	ND	X	X	X	ND
Sensibilisation préférentielle des cellules modèles	-	ND	-	-	-	ND
Synergie avec l'irradiation	-	ND	X	-	X	ND
Synergie avec l'irradiation préférentielle pour les cellules normales	-	ND	X	-	-	ND
Synergie avec l'irradiation préférentielle pour les cellules modèles	-	ND	-	-	X	ND

Tableau IV: Compilation des effets des différents inhibiteurs de la RDA sur les cellules HEK_n-hTERT et HEK_n-hTERT-E6-E7, observés dans les figure 26 et 27

ND : Non- définie, on parle ici de toxicité trop importante pour les deux types cellulaires, toutes les cellules sont mortes ce qui ne nous permet pas de tirer une conclusion valable sur l'effet sensibilisant observé.

Les inhibiteurs CGK-733 et UCN- 01 (**Figure 26 et 27, A et C, Tableau IV**) présentent une forte toxicité sur les cellules modèles et contrôles, ce qui ne nous permet pas de tirer de conclusion concernant leur effet de sensibilisation. Wortmanin montre une sensibilisation sur les cellules normales (**figure 26 B, Tableau IV**), mais aucun effet sur les cellules modèles (**Figure 27 B, tableau IV**). Aussi, elle montre une synergie à l'irradiation préférentielle pour les cellules normales (**Figure 26 B, Tableau IV**). Wortmanin n'est donc pas un candidat intéressant pour la sensibilisation des cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. Ku-55933 et la caféine montrent un effet de sensibilisation sur les deux lignées cellulaires (**Figure 26 et 27, A et B, tableau IV**). Toutefois, cet effet est non spécifique aux cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 et semble être plus important sur les cellules normales. Aussi, aucun effet de synergie avec

l'irradiation n'a été observé pour ces deux composés. Nutlin-3 montre un effet sensibilisant sur les deux lignées testées. Cet effet semble être plus important sur les cellules normales. En combinaison à l'irradiation, l'effet sensibilisant de Nutlin-3 est amplifié sur les cellules HEKn-hTERT-E6-E7. Cette synergie de Nutlin-3 avec l'irradiation est absente sur les cellules normales et est spécifique aux cellules modèles (**Figure 26 et 27 C, tableau IV**). Ce résultat fait de Nutlin-3 un bon candidat pour la radio-sensibilisation des cellules modèles HEKn-hTERT-E6-E7.

Nous avons ensuite étudié l'effet radio-sensibilisant de la Nutlin-3 à différentes concentrations sur les cellules contrôles et modèles. Ceci nous permet d'investiguer si l'effet observé est dose dépendant, et si ce dernier ne peut pas être obtenu à une dose plus faible de Nutlin-3. Les cellules ont été traitées suivant le protocole présenté à la **figure 25**. La sensibilisation des cellules a été mesurée par ATPlite à 96 heures post traitement. L'effet sensibilisant est présenté par le ratio de nombre de cellules traitées à la Nutlin-3 en combinaison ou non avec l'irradiation à une dose de 2 Gy sur le nombre de cellules traitées par le DMSO. Le nombre de cellules est traduit par la valeur luminescence produite via l'ATP présente dans la cellule (voir section résultat, **chapitre 3.2.1.1**)

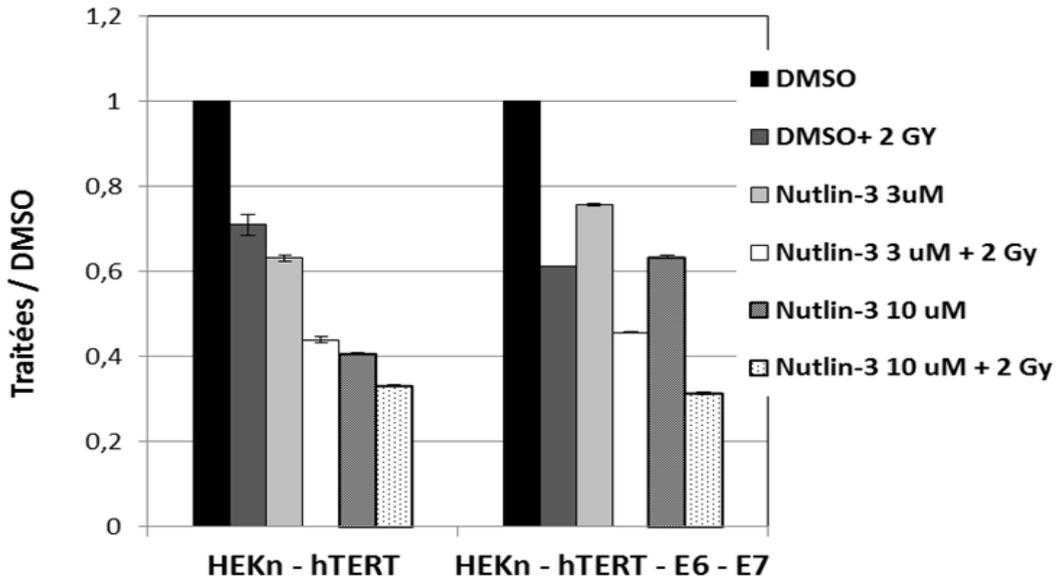


Figure 28 : Effet de la Nutlin-3 à 3 et 10 μ M, utilisée seule ou couplée à l’irradiation, sur les cellules contrôles HEK-n-hTERT et les cellules modèles HEK-n-hTERT-E6-E7 mesuré par ATPlite.

La valeur de sensibilisation ou viabilité relative (ratio de la moyenne des cellules traitées avec la Nutlin-3 ou avec l’irradiation à 2 Gy ou avec les deux sur la moyenne des cellules traitées avec le DMSO et non irradiées) est présentée en ordonnée. Les moyennes utilisées pour le calcul de la valeur de sensibilisation ont été obtenues à partir de trois réplicas ayant subi le même traitement. La quantification des cellules s’est faite par ATPlite à 96 heures post traitement. Les barres d’erreur correspondent à l’erreur type.

Nous pouvons observer dans la **Figure 28**, que les effets de sensibilisation et de radio-sensibilisation sont dose dépendant. Nutlin-3 à une concentration de 10 μ M montre les meilleurs effets de sensibilisation et de radio-sensibilisation sur les cellules HEK-n-hTERT-E6-E7.

3.4 Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires

3.4.1 Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7.

L'essai ATPlite est une méthode qui se base sur la quantification par luminescence de la quantité d'ATP cellulaire. Elle se base donc sur l'activité métabolique cellulaire. Cette activité métabolique peut varier facilement dépendamment des conditions cellulaires [152]. Aussi, afin d'observer un important effet de sensibilisation, nous voulons utiliser dans les prochaines expériences des doses d'irradiation plus fortes que celles utilisées dans les expériences précédentes. Nous avons démontré dans le chapitre 3.2.1.1, à la figure 22 de la section Résultat que les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 sénescence suite à une exposition à des doses élevées d'irradiation. La sénescence de nos cellules reste toujours à confirmer par un S-A β -gal, toutefois, nos observations, la fonctionnalité de Rb dans nos cellules, les figures 18 et 22 semblent démontrer que nos cellules sénescence suite au traitement à l'irradiation. Sachant que le test ATPlite se base sur la détection d'ATP, cette méthode n'est pas valable pour détecter un arrêt de croissance dû à la sénescence, car l'activité métabolique et la production d'ATP augmentent dans les cellules sénescence. (**Voir discussion chapitre 4.2**, [152]). Pour remédier à ce problème, nous allons procéder en plus à l'évaluation de l'effet de sensibilisation par mesure du contenu d'ADN par coloration au DRAQ5.

En prenant en compte les limites de la méthode, les cellules ont étéensemencées à une concentration de 2500 cellules, afin de se retrouver à l'intérieur de la fenêtre de détection de la méthode (**Chapitre 3.2.1.2, Figure 23**) au temps 0. Sachant que la méthode est sensible et linéaire dans un intervalle de 5000 à 20 000 cellules nous avons mis au point le protocole afin, de respecter cet intervalle.

Le traitement à la Nutlin-3 c'est fait à une dose de 10 μ M suivant le protocole présenté à la **Figure 25**. Le contenu en ADN a été mesuré sur 96 heures. Le temps de lecture de 72 heures a été choisi comme étant le plus représentatif de l'effet de sensibilisation. Les cellules ont été traitées avec une dose d'irradiation de 4 Gy.

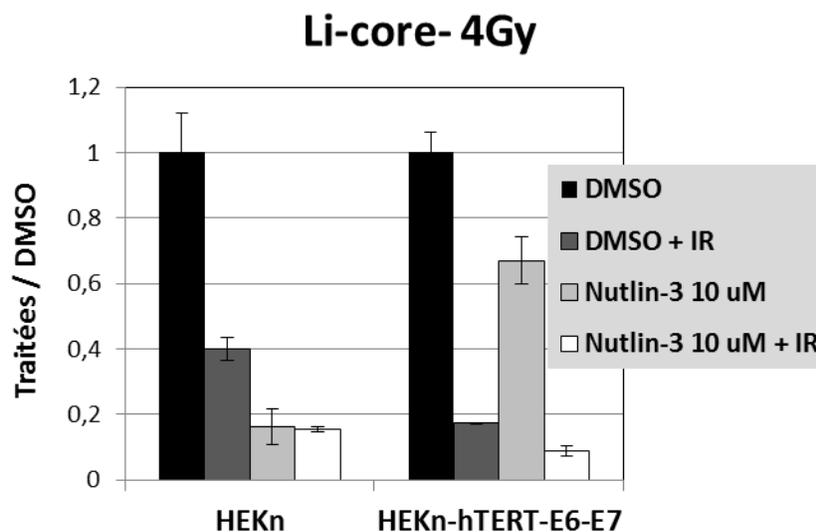


Figure 29 : Effet de la Nutlin-3 à 10 μ M, utilisée seule ou couplée à l'irradiation, sur les cellules contrôles HEKn et les cellules modèles HEKn-hTERT-E6-E7 mesuré par coloration au DRAQ5.

La valeur de sensibilisation, ou viabilité relative (ratio de la moyenne des cellules traitées avec la Nutlin-3 ou avec l'irradiation à 4 Gy ou avec les deux sur la moyenne des cellules traitées avec le DMSO et non irradiées) est présentée en ordonnée. Les moyennes utilisées pour le calcul de la valeur de sensibilisation ont été obtenues à partir de trois répliques ayant subi le même traitement. La quantification des cellules s'est faite par coloration d'ADN au DRAQ5 (1/10 000) à 72 heures post traitement. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type.

Nous pouvons constater que l'effet de sensibilisation suite au traitement par Nutlin-3 est plus important lorsqu'évalué par coloration au DRAQ5 (**Figure 29**) comparé au test ATPlite (**Figures 26 et 27 C**). Aussi, nous pouvons noter que nous tirons, tout de même, les mêmes conclusions, concernant la radio-sensibilisation préférentielle de Nutlin-3 10 μ M sur les cellules HEKn-hTERT-E6-E7, de la **figure 29 et des figures 26 et 27 C**. Toutefois, l'effet de synergie avec l'irradiation est plus fort lorsque mesuré par coloration au DRAQ5. Nutlin-3 est un inhibiteur de mdm2, une molécule qui joue le rôle d'inhibiteur naturel de p53. Sachant que les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 sont déficientes en p53 (**Chapitre 3.1.2.1, Figure 17**), nous avons voulu investiguer l'effet de Nutlin-3 sur le niveau de p53 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7.

Nous avons évalué l'effet de Nutlin-3 sur le p53 des cellules HEKn-hTERT-E6-E7 par buvardage de western et par immunofluorescence. Nous avons ensemencé des cellules HEKn-hTERT-E6-E7 que nous avons laissées proliférer. Nous disposons de quatre groupes. Un groupe contrôle (DMSO), un groupe contrôle positif irradié avec une dose de 8 Gy (DMSO + IR), un groupe Nutlin-3 10 μ M, et un groupe Nutlin-3 10 μ M couplé à l'irradiation (Nutlin-3 10 μ M + 8 Gy) pour tester l'effet de synergie. Les cellules ont été irradiées 30 minutes post-traitement. L'extraction de protéines a été complétée deux heures post-irradiation. En ce qui concerne l'analyse par immunofluorescence, nous disposons d'un groupe contrôle DMSO et d'un groupe traité à la Nutlin-3 10 μ M. Les cellules ont été fixées à la formaline 10 %, deux heures et demi post-traitement.

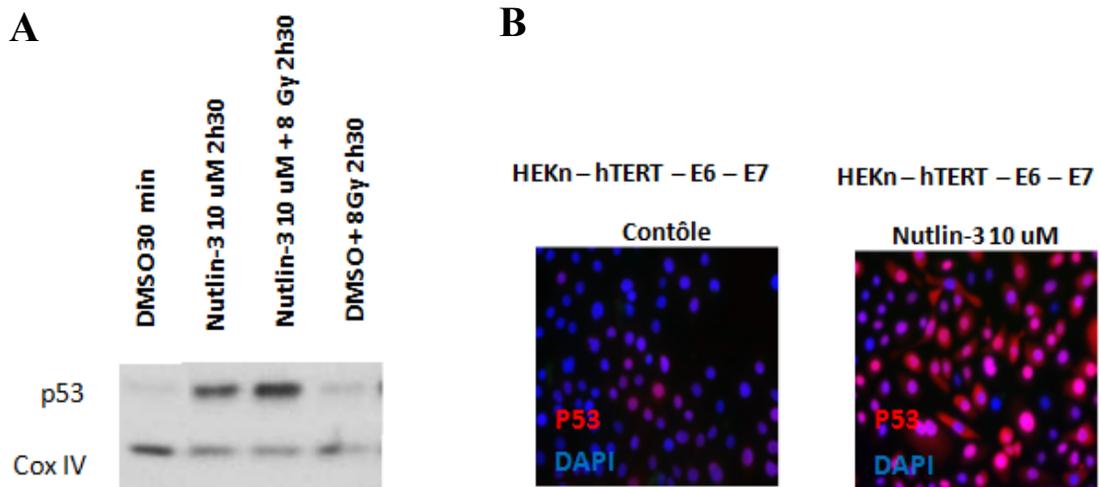


Figure 30 : Effet de la Nutlin-3 10 μ M sur la stabilisation du p53 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7.

A) Buvardage de western montrant le niveau de p53 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 suite aux différents traitements. Les protéines ont été extraites deux heures et demi post-traitement à la Nutlin-3 et deux heures post-traitement à l'irradiation à une dose de 8 Gy. La protéine ubiquitaire COX IV a été marquée avec l'anticorps lapin anti-COX IV clone (3E10) à une concentration de 1/5000 et a été utilisée comme contrôle. Le p53 a été marqué par l'anticorps monoclonal souris anti-p53 clone (DO-1) à une concentration de 1/500. L'expérience a été répétée trois fois afin de confirmer l'effet observé.

B) Investigation par immunofluorescence du niveau de p53 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 suite au traitement à la Nutlin-3 10 μ M. Les noyaux ont été marqués au DAPI en bleu. Le p53 a été marqué par l'anticorps primaire souris anti-p53 clone (DO-1) et anticorps secondaire Alexa Fluor 594 fluorescent dans le rouge. Les cellules HEKn-hTERT traitées au DMSO ont servies de contrôle. L'expérience a été répétée trois fois afin de confirmer l'effet observé.

Nous observons dans la **Figure 30 A**) une augmentation du niveau de p53 cellulaire suite au traitement avec Nutlin-3. En effet, le niveau de p53 suite au traitement avec Nutlin-3 est même plus important que le niveau de p53 dans le groupe traité avec l'irradiation à 8 Gy. Nous pouvons donc avancer que Nutlin-3 stabilise p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. L'effet de stabilisation observé est plus important en synergie avec l'irradiation (bande plus intense **Figure 30 A**), ce qui concorde avec les résultats obtenus lors des tests de sensibilisation. De plus, les résultats obtenus en IF (**Figure 30 B**) montrent une augmentation du niveau de p53, marqué en rouge, suite au traitement à la Nutlin-3 (10 µM) comparé au contrôle non-traité, ce qui vient appuyer les résultats obtenus en A. Nous pouvons conclure que Nutlin-3 à 10 µM stabilise p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7.

Nous avons voulu investiguer l'activité de p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 en nous intéressant au niveau de p21, cible transcriptionnelle de p53, dans nos cellules par immunofluorescence et buvardage de western. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir un niveau observable de p21 dans les cellules HEK_n-hTERT et HEK_n-hTERT-E6-E7 et cela même suite au traitement à l'irradiation. Nous n'avons obtenu aucun signal pour p21 suite au traitement à l'irradiation, à la Nutlin-3 à 10 µM et à la combinaison des deux traitements et cela dans les deux lignées cellulaires contrôle et modèle. Nous avons confirmé l'activité anti-p21 des anticorps utilisés en les testant sur une lignée cellulaire du cancer de l'ovaire. Aussi dans la figure 30 B, nous avons marqué les cellules avec un anticorps monoclonal souris anti-p21 clone (SX118) à une proportion de 1:200, et nous l'avons couplé à un fluorochrome vert, Alex Fluor 488 et nous n'avons obtenu aucun signal pour le p21. Après avoir répété plusieurs fois l'expérience par immunofluorescence et buvardage de western et après avoir essayé avec trois anticorps différents contre p21, nous avons décidé d'essayer de tester l'activation de p53 en réponse à la Nutlin-3 dans des cellules CCU, HeLa et CaSki.

Aussi, nos cellules modèles HEK_n-hTERT-E6-E7 sont déficientes en E7 et ne représentent donc pas fidèlement les cellules CCU. De plus, ayant identifié un composé sensibilisant, nous devons confirmer cet effet dans des cellules dérivées du cancer du col de l'utérus et s'assurer que cet effet de sensibilisation est conservé en présence de variabilité génétique.

3.4.2 Étude de l'effet de Nutlin-3 et de ces cibles cellulaires dans les lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki

Suite aux résultats obtenus dans le chapitre 3.4.1, nous avons voulu explorer l'effet de Nutlin-3 sur les lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki, qui sont respectivement positives pour le VPH 18 et 16. Nous avons traité ces cellules avec la Nutlin-3 à 10 μ M suivant le protocole de criblage présenté dans la **figure 25**. Afin d'investiguer l'effet radio-sensibilisant, les cellules ont été exposées à une dose d'irradiation de 6 Gy. La sensibilisation des cellules a été évaluée sur une période de 96 heures par coloration de l'ADN au DRAQ5.

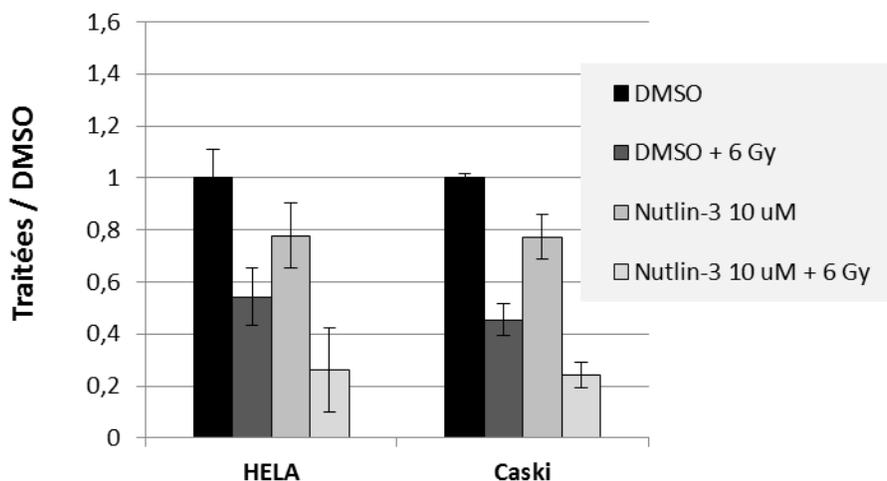


Figure 31 : Effet de Nutlin-3 10 μ M sur la sensibilisation des cellules HeLa et CaSki si utilisée seule ou couplée à l'irradiation.

La valeur de sensibilisation ou de viabilité relative (ratio de la moyenne des cellules traitées avec la Nutlin-3 ou avec l'irradiation à 6 Gy ou avec les deux sur la moyenne des cellules traitées avec le DMSO et non irradiées) est présentée en ordonnée. Les moyennes utilisées pour le calcul de la valeur de sensibilisation ont été obtenues à partir de trois répliques ayant subi le même traitement. La quantification des cellules s'est faite par coloration d'ADN au DRAQ5 (1/10 000) à 72 heures post traitement. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type. L'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation de la Nutlin-3 sur les cellules HeLa et CaSki a été confirmé par test-student comme étant statistiquement significatif avec un intervalle de confiance de 95% (p-value : 0,05).

Comme pour les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 (**Chapitre 3.4.1, Figure 29**), Nutlin-3 semble sensibiliser les cellules HeLa et CaSki et cette sensibilisation est amplifiée d'une manière importante lorsque couplée à l'irradiation. L'effet de Nutlin-3 sur les cellules HeLa et CaSki a été prouvé comme étant statistiquement significatif avec un t student de respectivement 0,01 et 0,001 pour l'effet de sensibilisation et avec des t student de 0,008 (HeLa) et de 0,0005 (CaSki) pour l'effet de radio-sensibilisation et ceci pour un intervalle de confiance de 95 %, p-value de 0,05 (Résultats du Test student en annexe tableau VI).

Ensuite, nous avons voulu investiguer comme pour les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7, l'effet de Nutlin-3 à 10 μ M sur la stabilisation du p53 dans les cellules HeLa et CaSki. Pour ce, nous avons évalué par buvardage de western le niveau de p53 dans les cellules HeLa et CaSki suite au traitement à la Nutlin-3 (10 μ M) et exposition à une dose d'irradiation de 6 Gy. Les protéines ont été extraites 3 heures et demi post-traitement.

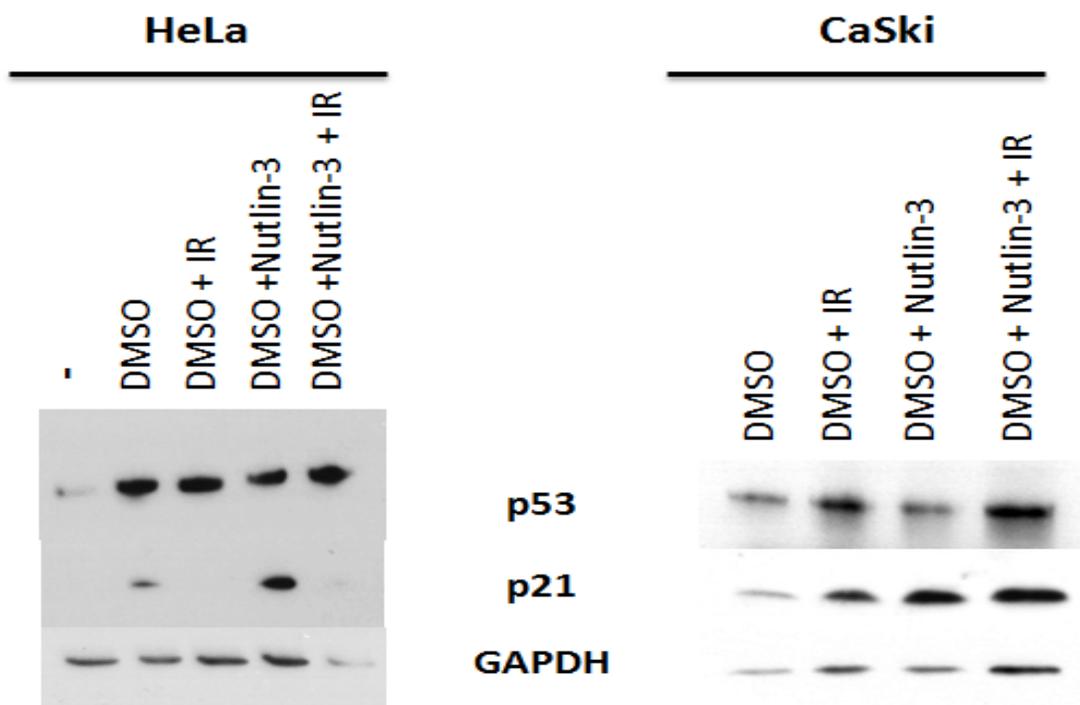


Figure 32 : Effet de Nutlin-3 10 μ M sur les niveaux de p53 et de p21 dans les cellules CCU HeLa et CaSki.
 La figure présente les niveaux d'expression de p53, marqué par l'anticorps souris anti-p53 clone (DO-1) à une concentration de 1/500, et de sa cible transcriptionnelle p21 marquée par l'anticorps souris anti-p21 clone (SX118) à une concentration de 1/100 dans les cellules HeLa et CaSki, suite au traitement avec de la Nutlin-3 (10 μ M) et exposition à une dose d'irradiation de 6 Gy. La protéine ubiquitaire GAPDH, marqué avec l'anticorps anti-GAPDH anti- lapin clone (14C10) à une concentration de 1/5000 a servi de contrôle. Expérience répétée trois fois.

Nous pouvons observer étrangement que le DMSO permet la stabilisation de p53 dans les cellules HeLa et CaSki et cette stabilisation est plus importante dans les cellules HeLa. D'après la **figure 32**, p53 n'est pas stabilisé dans les cellules HeLa suite au traitement à l'irradiation à une dose de 6 Gy ou à un traitement à la Nutlin-3 à une dose de 10 μ M. En ce qui concerne les cellules CaSki, nous pouvons constater une augmentation du niveau de p53 suite au traitement à la Nutlin-3. Cette stabilisation du p53 n'est pas amplifiée par l'irradiation. Nous nous sommes aussi intéressés à une des cibles transcriptionnelles de p53, qui est le supresseur de tumeur p21. Dans la **figure 32**, nous observons une augmentation du niveau de p21 dans les cellules HeLa, suite au traitement à la Nutlin-3 (10 μ M). Ceci laisse présager une

activité transcriptionnelle de p53. Toutefois, il semble qu'il y ait absence d'expression de p21 suite au traitement à l'irradiation, un des stimulateurs normaux de l'expression de p21 via p53. Dans les cellules, CaSki, suite au traitement à la Nutlin-3 (10 μ M) ou à l'irradiation, on observe une légère augmentation du niveau d'expression de p21.

Donc, Nutlin-3 à 10 μ M stabilise et active p53 dans les cellules CaSki. Par contre, la Nutlin-3 (10 μ M) n'a pas réussi à stabiliser p53 dans les cellules HeLa. Toutefois, nous avons pu constater l'activation de ce dernier traduite par une augmentation du niveau de p21 suite au traitement à la Nutlin-3 (10 μ M).

Les résultats résumés ci-dessus et présentés dans **la figure 32** nous ont poussés à nous questionner quant à l'implication de p53 dans l'effet de sensibilisation par la Nutlin-3 (10 μ M) sur les cellules HeLa et CaSki présenté dans **la figure 31**.

3.4.3 Implication du p53 dans l'effet de sensibilisation de Nutlin-3

Pour vérifier cette hypothèse nous avons voulu investiguer l'effet de Nutlin-3 (10 μ M) sur des cellules HeLa et CaSki exprimant un p53 déficient. Nous avons développé au laboratoire des cellules CaSki et HeLa auxquelles nous avons ajoutées par transfection au lentivirus le *Genetic suppressor element* pour p53 (GSE-22), un peptide inhibiteur dominant négatif de p53. Ces biomolécules dérivées du gène de p53 consistent en des fragments de l'extrémité C-terminal du p53 contenant son domaine d'oligomérisation. Le GSE-22 est un peptide interférent, il agit comme un inhibiteur de l'activité de p53 en interférant avec son oligomérisation, empêchant ainsi sa tétramérisation. Sous l'action de GSE-22, p53 reste bloqué sous sa forme monomérique non-active et ne peut pas relocaliser au noyau ce qui inhibe sa fonction biologique [81]. Le GSE-22 a été prouvé comme étant un inhibiteur de type dominant négatif de p53 et son effet a déjà été validé dans notre laboratoire [81]. Suite à l'ajout de GSE-22 dans mes cellules HeLa et CaSki, nous avons obtenu les cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE. L'expression du GSE-22 a été confirmée par buvardage de western (Annexe Figure 36).

Les cellules HeLa, CaSki, HeLa-GSE, et CaSki-GSE ont été traitées avec de Nutlin-3 à 10 μ M et exposées à une dose d'irradiation de 6 Gy selon le protocole décrit dans la **figure 25**. La sensibilisation des cellules a été évaluée sur une période de 96 heures, par coloration d'ADN au DRAQ5.

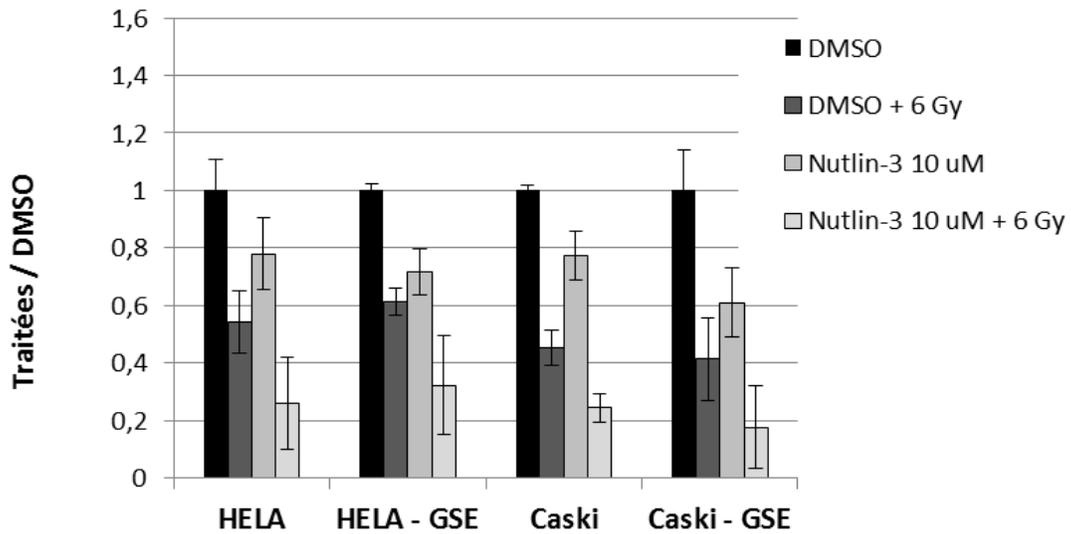


Figure 33 : Implication du p53 dans l'effet de sensibilisation provoqué par la Nutlin-3 (10 μ M) dans les cellules CCU HeLa et CaSki.

Présentation de l'effet du traitement à la Nutlin-3 10 μ M seule ou en combinaison à l'irradiation à une dose de 6 Gy sur les cellules HeLa, CaSki, HeLa-GSE et CaSki-GSE mesuré par marquage d'ADN au DRAQ5 à 72 heures post traitement. La valeur de sensibilisation ou de viabilité relative (ratio de la moyenne des cellules traitées avec la Nutlin-3 ou avec l'irradiation à 6 Gy ou avec les deux sur la moyenne des cellules traitées avec le DMSO et non irradiées) est présentée en ordonnée. Les moyennes utilisées pour le calcul de la valeur de sensibilisation ont été obtenues à partir de trois répliques ayant subi le même traitement. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type. L'effet de sensibilisation et de radiosensibilisation de la Nutlin-3 sur les cellules CaSki, HeLa, CaSki- GSE et HeLa-GSE a été confirmé par test t student avec un intervalle de confiance de 95 % (p-value : 0,05)

Nous pouvons observer dans la **figure 33**, que l'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation provoqué par le traitement avec la Nutlin-3 (10 μ M) est conservé dans les cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE déficientes en p53. Cette constatation, nous pousse à conclure que l'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation de la Nutlin-3 (10 μ M) observés dans les cellules exprimant E6 et E7 du VPH sont indépendants de p53. L'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation sur les cellules HeLa – GSE et CaSki – GSE a été confirmé comme étant statistiquement significatif avec un t student de respectivement 0,001 et 0,001 pour l'effet de sensibilisation et de 0,00005 et de 0,0001 pour l'effet de radio-sensibilisation pour un p-value de 0,05 (test-t en annexe Tableau VI). Ceci concorde avec les résultats d'absence de stabilisation de p53 dans les cellules HeLa, que semble démontrer la **figure 32**.

En conclusion la Nutlin-3 (10 μ M) montre un effet sensibilisant et radio-sensibilisant sur le modèle cellulaire HEKn-hTERT-E6-E7, sur les lignées dérivées du CCU, HeLa et CaSki et cet effet est indépendant de p53.

Sachant que notre objectif ultime est l'utilisation de Nutlin-3 comme agent sensibilisant et radio-sensibilisant pour augmenter l'efficacité et la spécificité du traitement des patients souffrant d'un cancer induit par le VPH, nous avons exploré l'effet de Nutlin-3 in vivo. Pour ce, nous avons testé l'effet de la Nutlin-3a sur des xénogreffes de tumeurs HeLa chez des souris RAG2 γ C.

3.5 Étude l'effet de sensibilisation de la Nutlin-3 in vivo

Nutlin-3 existe sous forme de mélange racémique. Nutlin-3a est l'énantiomère actif de la Nutlin-3. Pour nos expériences in vivo, nous avons utilisé des souris immunodéficientes RAG2 γ C. Les souris ont été injectées en sous cutanés avec 4 millions de cellules HeLa sur le flanc gauche et droit, avec et sans matrigel. Le matrigel est une matrice de membrane basale solubilisée. Elle est utilisée pour faciliter la croissance tumorale des cellules cancéreuses

injectées en les maintenant dans une matrice et leur fournissant les facteurs nécessaires à leur attachement et prolifération (BD Biosciences). Une fois que la tumeur a atteint une taille satisfaisante les souris sont traitées selon le protocole présenté dans le **tableau V**.

Cellules	n	Traitement	Dose	Mode	Fréquence	Durée
HeLa	3	DMSO	50 µL	I.P	Dose unique	18 jours
	4	Nutlin-3	10 mg/kg	I.P	Un jour sur deux	18 jours
	4	IR*	6 Gy	Corps entier	Dose unique	18 jours
	4	Nutlin-3a + IR	10 mg/kg + 6 Gy	I.P	Un jour sur deux	18 jours

Tableau V: Présentation du protocole de l'essai préliminaire de l'effet de la Nutlin-3a sur les xénogreffes HeLa chez des souris RAG2γC. (IR* LD5 = 6.3 Gy, Intervalle de dosage = 5,7 Gy-6,75 Gy [151])

Les souris irradiées ont été injectées avec une dose de 50 µl de DMSO, ce dernier étant le véhicule de la Nutlin-3a. Le dernier traitement à la Nutlin-3a s'est fait à une dose de 5 mg/kg et les souris ont été sacrifiées une journée après le traitement. La croissance tumorale a été suivie tout au long de l'essai, en prenant en note la largeur, la longueur et la profondeur de la tumeur. Le poids et les limites imposées par le protocole du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) ont été suivis. Une perte de poids associée à la croissance tumorale et de la nervosité caractéristique des souches de souris utilisées ont été observées dans tous les groupes soumis à l'étude. Aucun effet secondaire additionnel n'a été observé, suite au traitement avec la Nutlin-3a. Concernant les groupes traités avec la Nutlin-3a et irradiés, l'irradiation a été effectuée une journée après le traitement à la Nutlin-3a. En suivant la croissance tumorale nous avons compilés les données de l'essai préliminaire dans **la figure 34**.

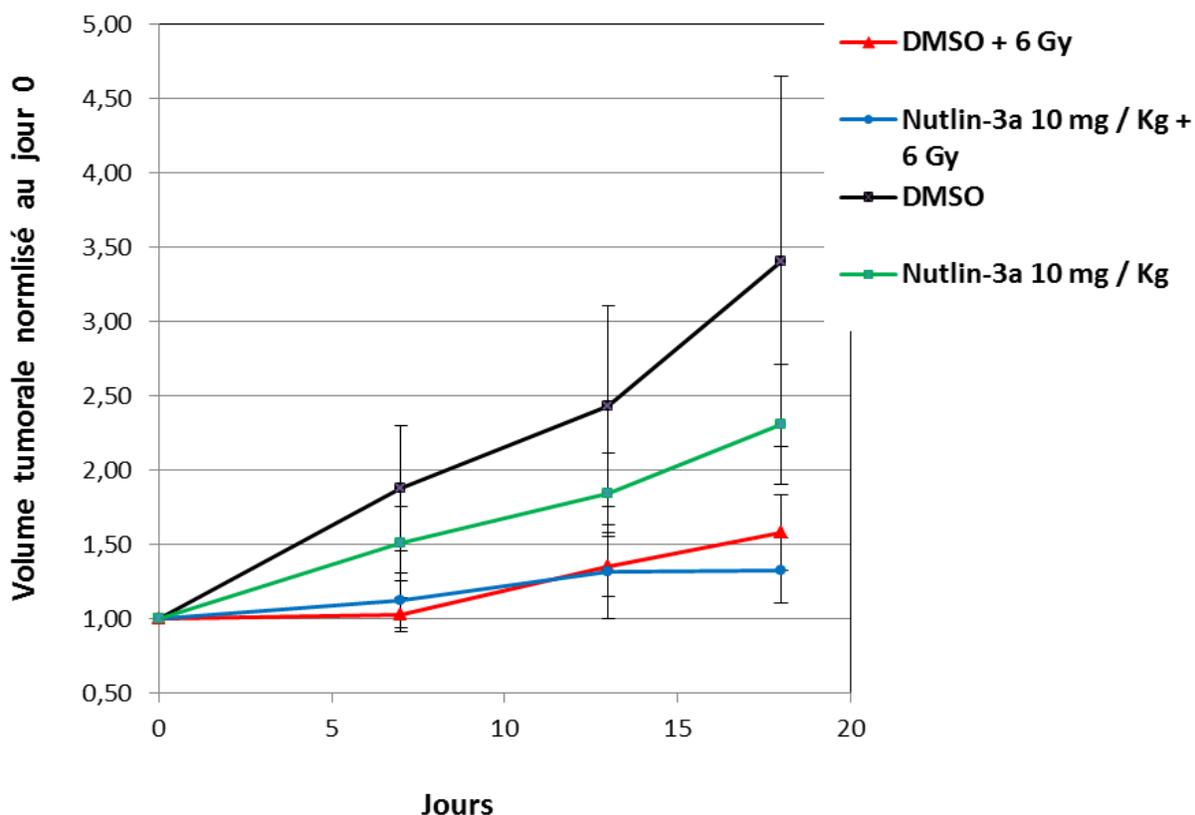


Figure 34 : Étude de l'effet de la Nutlin-3a sur la croissance tumorale des xénogreffes HeLa chez des souris RAG2 γ C.

Les différentes courbes montrent la croissance des tumeurs HeLa chez les souris RAG2 γ C en réponse aux différents traitements (DMSO, IR, Nutlin-3a, Nutlin-3a + IR) sur une période de 18 jours. En ordonnée nous avons présenté le volume tumoral normalisé au jour 0. Le volume tumoral correspond au produit de la longueur de la tumeur par sa largeur par sa profondeur. Les dimensions des tumeurs ont été mesurées aux temps indiqués en jours sur l'axe des abscisses. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des volumes tumoraux de n nombre de souris faisant partis d'un groupe donné mesuré à un temps X (n = 4, sauf dans le cas du groupe DMSO ou n = 3). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types et traduisent la variabilité génétique. N = 15, l'expérience a été effectuée qu'une seule fois, et reste à être reproduite avec un plus grand nombre d'échantillon.

D'après ces données préliminaires présentées dans **la figure 34**, il semblerait que le traitement avec la Nutlin-3a à une concentration de 10 mg/kg ralentit la croissance des tumeurs des xénogreffes HeLa chez les souris RAG2 γ C. En ce qui concerne l'effet de la Nutlin-3a comme radio-sensibilisant, il semblerait qu'il y ait une tendance à partir de deux semaines vers un ralentissement plus important de la croissance tumorale chez les souris traitées avec la Nutlin-3a et irradiées comparé aux souris irradiées seulement ou traitées à la Nutlin-3a seulement. Toutefois, il faut souligner que les résultats de cette étude ne sont que des données préliminaires et qu'il faudrait refaire l'expérience en augmentant le nombre de souris dans chaque groupe, afin de diminuer la variabilité et cueillir des données qui nous permettent d'obtenir des résultats concluants.

Chapitre 4 : Discussion

Le cancer du col de l'utérus a comme cause majeure une infection préalable et persistante au virus du papillome humain [8,9]. Le potentiel oncogénique du VPH réside dans l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 [59,18]. Ces protéines s'expriment spécifiquement dans les cellules des cancers induits par le VPH [18]. La protéine E6 provoque une perte de fonctionnalité du p53 en induisant sa dégradation par le protéasome [59]. Ceci produit une perte de fonctionnalité de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) [18]. La protéine E7 agit en parallèle avec E6 et inhibe ainsi que promeut la dégradation du Rb cellulaire [18]. Ces actions d'E6 et E7 se traduisent par une perte de fonctionnalité de la RDA, une accumulation de mutation et une instabilité génomique [18]. Ces perturbations présentent un environnement de choix pour le développement d'un cancer. La prise en charge thérapeutique des cas avancés et persistants de CCU fait souvent appel à une combinaison de traitements en chimio-radiothérapie [142]. La combinaison de ces deux traitements agressifs de par leur mode d'action, ainsi que les doses utilisées résulte en une forte morbidité [142]. Aussi, le nombre de patientes résistantes aux traitements et de récidives reste important [142]. Ceci nous a poussé à réfléchir à un moyen permettant d'augmenter la spécificité du traitement aux cellules CCU. Cela impliquerait un traitement qui épargnerait les cellules normales permettant de diminuer la morbidité. Aussi, l'utilisation d'un traitement ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses permettrait d'utiliser des doses plus fortes et donc d'augmenter l'efficacité du traitement, ce qui contrerait les résistances et récidives sans pour autant augmenter la morbidité.

Donc notre hypothèse est d'exploiter l'expression des protéines E6 et E7 spécifique aux cellules CCU dans une stratégie de létalité synthétique afin d'identifier des composés dans l'utilisation seuls ou en combinaison avec l'irradiation permettrait de sensibiliser préférentiellement les cellules cancéreuses induites par le VPH.

Nous avons comme objectifs premièrement d'effectuer un criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs connus de la RDA dans le but d'identifier des composés sensibilisant les cellules CCU si utilisés seuls ou en synergie avec l'irradiation. Deuxièmement, d'étudier l'effet biologique des composés sensibilisants sur leurs cibles cellulaires. Troisièmement, d'étudier l'effet de sensibilisation des composés identifiés in vivo sur des xénogreffes chez la souris.

Afin de procéder à la réalisation de nos objectifs et de s'assurer de l'absence d'artéfacts et de la validité de nos observations, nous avons commencé par mettre au point notre méthodologie.

4.1 Pertinence du modèle cellulaire HEK_n-hTERT-E6-E7

Pour notre projet nous devons disposer de cellules modèles exprimant de manière constitutive les oncoprotéines virales E6 et E7 du VPH. Il aurait été facile d'utiliser des cellules exprimant E6 et E7 provenant d'un autre laboratoire, ou des cellules provenant de patientes du cancer du col de l'utérus ou d'un autre cancer VPH positif. Cependant, l'utilisation de cellules modèles provenant d'un autre laboratoire avait comme désavantage les artéfacts associés au nombre de passages (temps) passé en culture subis par ces cellules. En effet, sachant que les cellules exprimant E6 et E7 du VPH présentent une perte de fonctionnalité dans les voies de régulations cellulaires gouvernées par p53 et Rb, la possibilité d'accumulation de mutations lors du temps passé en culture augmente l'instabilité génomique et la variabilité non contrôlée. Alternativement, les cellules dérivées des tumeurs de patientes présentent comme désavantage la présence d'artéfacts liés à leurs grandes variabilités génétiques. Ces deux sources de cellules modèles pourraient nuire à l'atteinte de nos objectifs. En effet, nous voulons cribler pour un composé sensibilisant les cellules exprimant les oncoprotéines E6 et E7 du VPH. Nous devons, donc, nous assurer de la spécificité de l'effet de sensibilisation observé à l'expression des protéines E6 et E7 du VPH dans les cellules traitées et éviter les autres déficiences causées par une mutation résultante du long temps passé en culture des cellules provenant d'un autre laboratoire ou de la variabilité génétique propre aux cellules provenant de patientes.

Nous avons donc développé nos cellules modèles CCU-like exprimant les protéines virales E6 et E7 au laboratoire. La méthodologie utilisée pour développer nos cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 a été expliquée au **chapitre 3.1.1 figure 15** de la section résultat. Nous avons utilisé comme contrôle les cellules HEK_n-hTERT et HEK_n, afin de veiller à ce que l'effet de sensibilisation ou de radio-sensibilisation préférentielle observé soit spécifique à l'expression des protéines E6 et E7. Les cellules ont été utilisées à un doublement de population auquel elles se trouvaient en phase de croissance. Aussi, nous nous sommes assurés d'utiliser toujours des cellules fraîches et de limiter le temps en culture à la fenêtre présentée en rouge dans la

figure 16 (Chapitre 3.1.1, section résultats) correspondant à un pd variant entre 44 et 48. Cela nous permet d'éviter l'accumulation de mutation. Les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 sont obtenues à un doublement de population de 35. Elles sont ensuite amplifiées et congelées pour utilisation dans les essais de sensibilisation. Lors du criblage, les cellules sont décongelées, elles ont un pd pour la plupart de 44. Elles sont mises en culture et sont utilisées pour le criblage après un passage et se retrouvent, donc, avec un pd variant entre 44 et 48. Nous avons choisi cet intervalle afin de minimiser le nombre de passage, pour éviter les mutations.

Les cellules ont été validées quant à l'expression des protéines E6 et E7 et à la fonctionnalité de ces dernières (**Chapitre 3.1.2, section résultats, Figure 17 et 18**). Nous avons conclu suite aux résultats des **figures 17 et 18**, et des résultats préalables obtenus dans notre laboratoire, que les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 expriment les protéines virales E6 et E7. Par contre, seule la protéine E6 est biologiquement fonctionnelle. Ceci, nous indique que tout effet de sensibilisation que nous avons pu observer lors du criblage à faible débit est dépendant de l'action de la protéine E6 sur sa cible p53 et ce qui en a résulté comme perturbation des fonctions cellulaires normales. Ceci nous permet de cibler le choix des composés sensibilisants à tester sur les inhibiteurs impliqués dans les voies cellulaires p53 dépendantes.

4.2 Choix de la méthode d'évaluation de la sensibilisation : ATPlite et sénescence.

Nous avons employé deux méthodes pour évaluer la sensibilisation des cellules traitées avec les composés testés. Ces deux méthodes nous permettent d'évaluer indirectement la perte, diminution ou arrêt de la croissance cellulaire. La première méthode, le test ATPlite mesure la quantité d'ATP cellulaire. La deuxième méthode, l'essai DRAQ5, permet de quantifier l'ADN cellulaire suite à la coloration avec une sonde fluorescente, qui est le DRAQ5. Les deux méthodes utilisées ont des avantages et des désavantages.

Le test ATPlite est une expérience qui implique l'ajout de deux réactifs (solution de lyse et substrat), ceci la rend simple et facilement reproductible d'une expérience à l'autre. Aussi, elle est quantitative avec peu de cellules (625 cellules) et reste linéaire jusqu'à 10 000 cellules (**Figure 20**). Par contre, en atteignant 10 000 cellules ou plus, la méthode perd sa sensibilité.

Un des désavantages majeurs de la méthode ATPlite est son incapacité à quantifier la sénescence. Les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 répondent par la sénescence suite à l'exposition à l'irradiation (**Section résultat, chapitre 3.2.1.1, Figure 18, et 22**). La méthode ATPlite permet la quantification d'ATP cellulaire et dépend donc de l'activité métabolique des cellules dérivée de leur activité mitochondriale. Malheureusement, il a été rapporté dans la littérature une augmentation de la masse mitochondriale et donc une augmentation de l'activité métabolique dans les cellules sénescents [152]. Cette augmentation de l'activité mitochondriale suite à la sénescence est illustrée dans la section résultat, chapitre 3.2.1.1 à la figure 21, par les valeurs de luminescence qui continuent à grimper au temps 96 heures, même suite à l'irradiation. L'effet est encore plus évident, si on compare la figure 21 et la figure 24, où nous avons la même expérience évaluée par ATPlite dans la figure 21 et par essai DRAQ5 dans la figure 24, nous pouvons voir dans la figure 24 un effet marqué de ralentissement de croissance et de mort cellulaire suite au traitement à l'irradiation qui n'est pas traduit par ATPlite.

La méthode de coloration par DRAQ5 ne nous permet pas la sensibilité du test ATPlite dans la détection d'un petit nombre de cellules et contient beaucoup d'étapes dans son protocole, ce qui augmente le risque d'erreur. Par contre, elle est toujours quantitative jusqu'à 20 000 cellules (Figure 23), ce qui la rend pertinente pour des études de croissance cellulaire sur des longues périodes. Aussi, le test se base sur la quantification d'ADN cellulaire ce qui la rend plus robuste que la méthode ATPlite qui est sensible au changement dans l'activité métabolique.

Nous avons évalué la sensibilisation des cellules utilisant les deux méthodes présentées plus haut. Ce qui nous a permis d'être plus confiants quant à la validité des résultats. Suivant notre protocole de criblage présenté dans la **figure 25 du chapitre 3.3.1 de la section résultat**, la méthode ATPlite est une méthode idéale pour la mesure de la viabilité dans les temps allant de 0 à 48 heures, la limite étant autour de 72 heures, afin d'éviter les désavantages de la méthode. La méthode de coloration d'ADN au DRAQ5 est la méthode idéale pour les temps allant de

72 à 144 heures. Aussi, c'est la méthode à employer pour l'étude de l'effet radio-sensibilisant du composé choisi en raison de sa fidélité à traduire l'arrêt de croissance par sénescence et la mort cellulaire. L'utilisation d'une méthode d'évaluation de la viabilité se basant sur le compte cellulaire, tel le compte cellulaire, ou l'essai de formation de colonie aurait mieux traduit la viabilité des cellules, toutefois en raison de contrainte de temps, et de la grosseur du projet, nous n'avons pas pu employer ces dernières. En effet, sachant que nous criblons pour plusieurs composés en utilisant plusieurs doses pour chaque composé, testant plusieurs temps de lectures et plusieurs doses d'irradiation, nous avons besoins d'une méthode pouvant traiter plusieurs plaques de 96 puits de manière rapide et efficace.

4.3 Criblage à Faible débit : Choix du composé radio-sensibilisant

Dans le but d'identifier un composé sensibilisant ou radio-sensibilisant les cellules HEK293-hTERT-E6-E7, nous avons procédé à un criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs connus de la RDA. Les inhibiteurs ont été choisis de part leur importance comme cibles thérapeutiques dans la thérapie anti-cancer (Introduction, Chapitre 1.8.2), et leur disponibilité dans le laboratoire. Les inhibiteurs ont été utilisés aux concentrations auxquels ils ont été validés précédemment, comme étant actifs dans notre laboratoire. Plusieurs expériences d'optimisation ont été effectuées pour obtenir finalement le protocole à la figure 25.

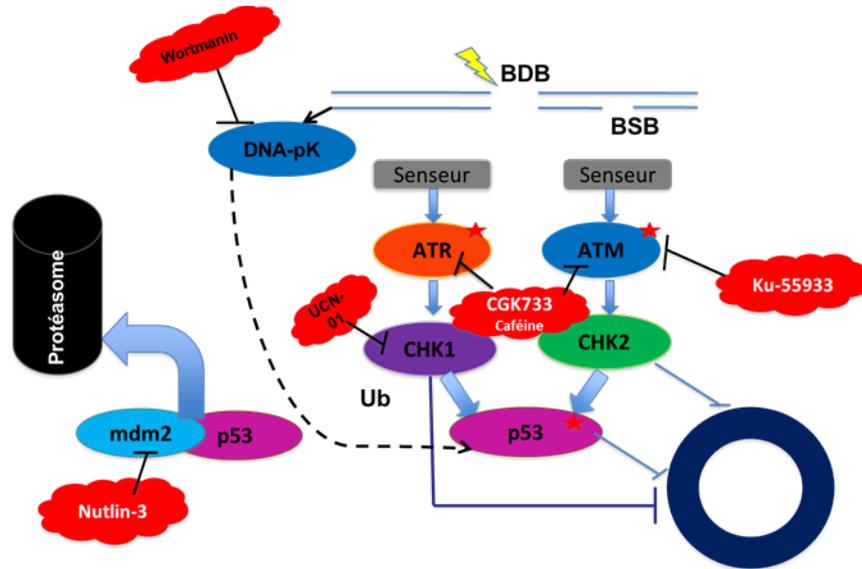


Figure 35 : Implication des inhibiteurs utilisés dans le criblage à faible débit dans la voie de réponse au dommage à l'ADN

Le test ATPlite a été la méthodologie utilisée pour évaluer la sensibilisation des cellules. Afin d'éviter d'induire la sénescence, les cellules ont été exposées à une dose d'irradiation de 2 Gy. Aussi, les cellules ont étéensemencées à basse densité afin de rester dans l'intervalle de sensibilité de la méthode.

L'effet de sensibilisation a été calculé en divisant la valeur de luminescence des cellules traitées aux différents inhibiteurs, à l'irradiation ou au deux, par la valeur de luminescence des cellules traitées au DMSO, non irradiées.

On peut noter dans les figures 26 et 27 du chapitre 3.3.1 de la section résultat, une variation dans l'effet de l'irradiation sur les cellules contrôles et modèles d'une expérience à l'autre. Les expériences sont présentées par une lettre de l'alphabet (A, B, C) dans chaque figure. Donc d'une expérience à l'autre suivant le même protocole, il y a une petite variabilité dans le niveau de réponse de sensibilisation observé. Cette variabilité traduit une différence dans les conditions de culture précédant l'expérience de sensibilisation (Exemple : changement du milieu la veille de l'expérience ou non). Ceci, nous a amené à porter une plus grande attention à l'uniformité de la manipulation des cellules préalablement au traitement de sensibilisation d'une expérience à l'autre.

Suite au criblage à faible débit, la Nutlin-3 à une concentration de 10 μM a été retenue comme candidate idéale grâce à son action radio-sensibilisante préférentielle sur les cellules HEK293-hTERT-E6-E7. De plus, sachant que les conditions de croissance des cellules *in vitro* et *in vivo* sont différentes, nous nous attendions à ce que la Nutlin-3 puisse avoir un effet sensibilisant qui est préférentielle aux cellules tumorales et cela même en absence d'irradiation. Nous proposons cette idée puisque les cellules normales en culture cellulaires se retrouvent en présence d'un signal de croissance perpétuelle en raison d'un environnement riche en facteurs de croissance fournis par le milieu cellulaire, ce qui n'est pas le cas *in vivo* où la croissance cellulaire répond à un contrôle étroit. Nous pensons donc que les cellules normales prolifèrent, *in vivo*, à une vitesse extrêmement lente comparée aux cellules en culture et aux cellules tumorales ce qui pourrait les rendre plus résistantes et améliorer encore plus l'effet de toxicité préférentielle.

4.4 La Nutlin-3 : Réactivation du p53 comme thérapie

Dans une cellule normale le p53 est activé par les dommages à l'ADN et l'hypoxie. Une fois activé p53 permet la transcription de plusieurs gènes importants pour l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, et l'inhibition de l'angiogenèse [153]. P53 peut aussi avoir une action pro-apoptotique qui est indépendante de ses fonctions transcriptionnelles [154, 155].

P53 est soumis à une autorégulation négative par mdm2 une de ses cibles transcriptionnelles [157, 158]. Le mdm2 lie p53 à son site de liaison à la machinerie transcriptionnelle ce qui inhibe son action transcriptionnelle [159]

De par son rôle important dans l'inhibition de l'activité de p53, mdm2 se présente comme une cible intéressante pour la réactivation de p53 dans les tumeurs p53 wt [160].

Comme il a été mentionné dans l'introduction les cellules CCU contiennent un p53 wt, qui pourrait être la cible de réactivation par la Nutlin-3 un inhibiteur puissant de mdm2.

Sachant que la plupart des cellules tumorales réagissent par la sénescence suite au traitement à la Nutlin-3 [161, 164, 166], nous avons ré-évalué l'effet de sensibilisation de la Nutlin-3 sur les cellules HEKn-hTERT-E6-E7 utilisant la méthode de coloration d'ADN au DRAQ5. La méthode ATPlite a été utilisée pour confirmer l'effet observé. Nous pouvons constater l'effet sensibilisant et la très forte radio-sensibilisation de la Nutlin-3 sur nos cellules CCU-like (figure 29). Sachant que la Nutlin-3 par son mode d'action est un activateur de p53, nous avons investigué la stabilisation de p53 dans les cellules HEKn-hTERT-E6-E7.

Nous avons observé une augmentation importante du niveau de p53 cellulaire suite au traitement avec la Nutlin-3 (10 μ M), comparé aux cellules traitées au DMSO (Figure 30, chapitre 3.4.1, section résultats), ce qui confirme la stabilisation du p53.

Nous nous sommes ensuite intéressés à confirmer l'effet de sensibilisation observé dans des lignées cellulaires dérivés du cancer du col, les cellules HeLa et CaSki. Nous avons voulu valider l'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation de la Nutlin-3 observés dans la figure 29 en présence de mutations multiples et de l'hétérogénéité génétique présentes dans les lignées cellulaires tumorales dérivés de patientes.

Nous avons pu observer dans la section résultat, au chapitre 3.4.2 et la figure 31 que l'effet de sensibilisation est conservé dans les lignées du cancer du col de l'utérus HeLa et CaSki.

Suite à l'investigation de la stabilisation et de l'activation de p53 dans les cellules HeLa et CaSki, nous avons conclu que comme pour nos cellules modèles CCU-like le p53 est stabilisé et activé dans les cellules CaSki (Chapitre 3.4.2, figure 32). Par contre, en ce qui a trait aux cellules HeLa, nous ne notons aucune stabilisation du p53 suite aux traitements à la Nutlin-3, à l'irradiation, ou à la combinaison des deux. Toutefois, nous pouvons remarquer une activation du p53 par l'augmentation du niveau de p21 suite au traitement à la Nutlin-3 dans les cellules HeLa et légèrement dans les cellules CaSki (Figure 32). Étrangement, le p53 mesuré par sa capacité à induire la transcription de sa cible p21, ne semble pas s'activer en réponse à l'irradiation dans les cellules HeLa.

L'absence de stabilisation du p53 dans les cellules HeLa en réponse au traitement à la Nutlin-3 a suscité en nous un questionnement tant qu'à l'implication des voies de signalisation p53 dépendantes dans l'effet de sensibilisation produit par le traitement à la Nutlin-3. Pour répondre à cette question, nous avons testé la Nutlin-3 sur des cellules HeLa et CaSki transfectées avec un élément GSE pour p53 (GSE-22), qui va agir comme un inhibiteur de

type dominant négatif en interférant avec la tétramérisation de p53 et le bloquant ainsi sous sa forme monomérique inactive [171]. Normalement, si l'effet de sensibilisation observé est dépendant de p53, nous devrions voir une perte de l'effet de sensibilisation par la Nutlin-3 dans les cellules GSE. Les cellules HeLa- GSE et CaSki-GSE ont été doublement sélectionnées à la puromycine, ainsi qu'à la Nutlin-3. Suite aux traitements de ces cellules à la Nutlin-3 seule ou en combinaison avec l'irradiation, nous observons une sensibilisation de ces cellules semblable à celle des cellules HeLa et CaSki, ce qui nous informe avec 95 % de confiance que l'effet sensibilisant de la Nutlin-3 est indépendant du p53 (Annexe Tableau VI). Sachant que la Nutlin-3 est un inhibiteur spécifique de mdm2, nous avons comme théorie que l'effet de sensibilisation observé peut être dépendant de mdm2 ou d'une de ses cibles moléculaires. Nous pourrions explorer cette question en utilisant un SiRNA contre mdm2 ou en visant ses cibles.

4.5 Effet de la Nutlin-3 in vivo

In vivo, la Nutlin-3a utilisée en monothérapie, a montré un effet anti-tumoral important en étude préclinique de modèle humain d'ostéosarcome, de cancer de la prostate, de rétinoblastome, de lymphome KSHV, de neuroblastome, de mélanome oculaire et de cancer gastrique. Le traitement à la Nutlin-3a a été bien toléré sans causer aucune perte de poids ou anomalies grossières qui auraient pu se faire remarquer suite à la nécropsie à la fin du traitement [167, 168, 169].

En se basant sur les publications préalables et nos résultats in vitro, nous avons testé l'effet de la Nutlin-3a à une concentration de 10 mg/kg seule ou en combinaison à une exposition à une dose d'irradiation de 6 Gy sur des souris RGA2 γ C porteuses de xénogreffes HeLa. Le traitement a été administré selon le protocole présenté dans la section résultats chapitre 3.5, au tableau V. La croissance tumorale a été suivie sur une période de 18 jours. La figure 34 présente le volume tumoral normalisé au jour 0 en fonction du temps écoulé suite au début du traitement. Nous pouvons conclure suite à ses résultats que la Nutlin-3 semble montrer une inhibition de la croissance tumorale. Toutefois, cette étude ne représente qu'une expérience

préliminaire. En effet, l'hétérogénéité des tumeurs et des échantillons étudiés cause une grande variabilité dans les résultats obtenus ce qui nous ne permet pas de tirer une conclusion définitive tant qu'à l'effet de la Nutlin-3a observé. Afin, d'augmenter la robustesse des résultats nous devons augmenter le nombre d'échantillons afin d'être statistiquement significatif. Aussi, lors des injections du groupe contrôle DMSO et des groupe DMSO + IR, le traitement au DMSO ne s'est fait qu'une fois au début de l'étude et n'a pas suivi les injections à la Nutlin-3a, ce qui diminue de la crédibilité des résultats ce qui nous poussent à re-tester les groupes contrôles afin de s'assurer du résultat observé.

Conclusion

Notre objectif a été d'identifier un composé permettant la sensibilisation ou la radio-sensibilisation des cellules exprimant les oncoprotéines virales E6 et E7 du VPH. Pour y parvenir nous avons développé au laboratoire des cellules modèles CCU-like, les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7. Ces cellules ont servi de modèles lors d'un criblage à faible débit impliquant des inhibiteurs de la voie de réparation des dommages à l'ADN. La sensibilisation a été évaluée par deux méthodes, le test ATPlite qui mesure la quantité d'ATP cellulaire, et l'essai de coloration d'ADN au DRAQ5 qui mesure le contenu en ADN des cellules. La Nutlin-3 a été identifiée comme un composé sensibilisant préférentiellement les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 à l'irradiation. La Nutlin-3 a été validée pour la sensibilisation et radio-sensibilisation préférentielle des lignées cellulaires dérivées du cancer du col de l'utérus, HeLa et CaSki. Nous avons démontré par buvardage de western et immunofluorescence une augmentation du niveau de p53 dans les cellules HEK_n-hTERT-E6-E7 suite au traitement avec la Nutlin-3. Ce résultat a été confirmé dans les cellules CaSki. Aussi, nous avons observé par buvardage de western la réactivation du p53 par la Nutlin-3 dans les cellules CaSki et HeLa, qui s'est traduite par une augmentation du niveau cellulaire du p21, cible transcriptionnelle de p53. À l'ombre de ces résultats, et connaissant l'action de la Nutlin-3 sur mdm2, nous avons investigué l'implication de p53 dans l'effet de sensibilisation et de radio-sensibilisation causés par la Nutlin-3 sur les cellules exprimant E6 et E7 du VPH. Dans ce but, nous avons exploré l'effet de la Nutlin-3 sur des cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE, dont le p53 se trouve séquestré au cytosol sous forme monomérique non-active. La Nutlin-3 a réussi à sensibiliser et radio-sensibiliser les cellules HeLa-GSE et CaSki-GSE, ce qui indique avec un p-value de 0,05, que l'effet de sensibilisation observé est indépendant de p53. Finalement nous avons étudié dans un essai préliminaire l'effet in vivo de la Nutlin-3a, énantiomère actif de la Nutlin-3, sur la croissance tumorale des souris RAG2 γ C portant des xénogreffes HeLa. La Nutlin-3a a montré une inhibition de la croissance tumorale des souris traitées, qui reste à confirmer avec un essai plus contrôlé, impliquant un échantillon plus important de souris pour contrôler la variabilité hétéro-génétique et être statistiquement significatif.

Perspectives

En se basant sur les résultats obtenus dans ce projet, il serait pertinent de valider que l'effet de la Nutlin-3 est indépendant de p53, en testant l'effet de la Nutlin-3 sur des cellules HeLa et CaSki dans lesquelles le gène codant pour p53 a été silencé par shRNA ou siRNA, ce qui aurait comme avantage de nous fournir une inhibition totale et irréversible de p53. Aussi, sachant que la cible directe de la Nutlin-3 est le mdm2, et que l'effet de sensibilisation observé semble être indépendant de p53, il serait intéressant de vérifier si cet effet est dépendant des voies de signalisation impliquant le mdm2. Pour ce, nous pouvons inhiber l'action de mdm2 chimiquement en utilisant un autre inhibiteur de mdm2 comme le RG7388, ou génétiquement en utilisant un siRNA ou shRNA contre mdm2. Aussi, afin de comprendre et de maximiser l'effet sensibilisant et radio-sensibilisant de la Nutlin-3 sur les cellules exprimant E6 et E7 du VPH, il serait attrayant d'étudier les destins cellulaires résultant de cette sensibilisation. Pour s'assurer de la robustesse de l'évaluation de la viabilité une troisième méthode serait ajoutée. Cette méthode implique l'évaluation de la viabilité des cellules contrôles et modèles, qui seraient ensemencées dans le même puits et qui seraient toutes les deux marquées avec des protéines de fusions qui ont chacune une fluorescence différente, exemple GFP pour les cellules contrôles et td Tomato pour les cellules modèles. La viabilité serait déterminée par la quantité de fluorescence émise par microscopie à fluorescence. Cette méthode est plus fiable car elle permet de quantifier directement le nombre de cellules, en s'assurant que les cellules modèles et contrôles ont subi le même traitement. Un essai de formation de colonie serait aussi envisageable.

En ce qui concerne les études in vivo, il faudrait refaire une étude de l'effet de la Nutlin-3 sur la croissance tumorale des xénogreffes HeLa dans des souris RAG2 γ C, avec un nombre d'échantillon statistiquement significatif. Aussi, lors de l'essai préliminaire, les tumeurs et organes des groupes de souris testés avec les différents traitements ont été récupérés post nécropsie. Ces échantillons seraient utilisés pour l'étude du p53 dans ces tissus par immunohistochimie, buvardage de western et RTq-PCR. Aussi, les organes récupérés pourraient servir dans un projet d'étude de l'effet de l'utilisation de la Nutlin-3, agent prouvé radio-sensibilisant sur la toxicité liée à l'irradiation dans les organes périphériques des souris traitées.

Bibliographie

1. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/cervix/incidence/#world> (Accédé le 01 mai 2014)
2. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr> (Accédé le 25 mars 2014)
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> (Accédé le 01-mai-2014)
4. www.who.int (Accédé le 25-mars-2014)
5. Franco, E. L., Harper DM, *Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control*. *Vaccine*, 2005. **23**:2388-94.
6. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/cervical/statistics/?region=bc> (Accédé le 25 mars 2014)
7. http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cancer/cancer_du_col_uterus_figures-cervical_cancer_figures-fra.php (Accédé le 25 mars 2014)
8. Hausen, H. Z., *Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis*, *J. Natl. Cancer Inst*, 2000, **92**: 690-698.
9. Walboomers, J.M., et al, *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*, *J. patho*, 1999, **189**:12-9.
10. Burd, E. M., *Human papillomavirus and cervical cancer*, *Clin.Microbiol. Rev*, 2003, **16**:1-17.
11. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H., *Classification of papillomaviruses*, *Virology*, 2004, **324**:17-27.
12. Brentjens, M. H., Yeung-Yue, K. A., Lee, P. C., Tyring, S. K., *Human papillomavirus: a review*, *Dermatol. Clin*, 2002, **20**:315-331.
13. Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G. and Pimenta, J. M., *Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer*, *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev*, 2005, **14**:1157-1164.
14. Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., Meijer, C.J.L.M., Shah, K.V., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*, *J. Clin. Pathol*, 2002, **55**:244-265.

15. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A.B., Gissmann, L., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*, Vaccine, 2006, **24**:1-10.
16. Zekri, A.R., Bahnassy, A.A., Seif-Eldin, W.M., Alam El-Din, H.M., Madbouly, et al., *Role of human papilloma virus (HPV) in common and genital warts and its relation to P53 expression*. J Egypt.Nat.Cancer Inst, 2006, **18**:117-124.
17. Stanley, M.A, *Pathology and epidemiology of HPV infection in females*, J. Gynecol. Oncol , 2010, **117**:S5-10.
18. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*, Clin.Sci, 2006, **110**:525–541.
19. Trottier, H., Franco, E.L., *The epidemiology of genital human papillomavirus infection*, Vaccine, 2006, **24**:S1-15.
20. Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M. & Huh, K., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*, J. Virol, 2004, **78**:11451-11460.
21. Moody, C.A., and Laimins, L.A., *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*, Nat. Rev. Cancer, 2010, **10**:550-560.
22. Fernandes, J.V., Meissner, R.V., Carvalho, M.G., Fernandes, T.A.A.M., Azevedo, P.R., Sobrinho., *Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil*, BMC. Res. Notes, 2010, **3**: 96.
23. Jo, H., Kim, J.W., *Implications of HPV infection in uterine cervical cancer*, Cancer Therapy, 2005, **3**:419-434.
24. Zheng, Z.M., Baker, C.C., *Papillomavirus genome structure, expression, and posttranscriptional regulation*, FRONT.BIOSCI, 2006, **11**: 2286-2302.
25. Sapp, M., Volpers, C., Müller, M., & Streeck, R.E., *Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles.*, J. Gen. Virol,1995, **76**:2407-2412.
26. http://www.ircm.qc.ca/CONFERENCES/cafe/2012/Documents/CafeIRCM_VPH2012_PresArch.pdf (Accédé le 30 mai 2014)
27. Fehrmann, F., & Laimins, L.A., *Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation*, Oncogene, 2003, **22**:5201-5207.

28. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*, J. Clin. Virol, 2005, **32**(1):S7-15.
29. Patterson, N. A., Smith, J. L., and Ozburn, M. A., *Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate*, J. Virol, 2005, **79**:6838–6847.
30. Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., et al., *The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes*, J. Biol. Chem, 1991, **274**:5810–5822.
31. Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S., and Chang, W., *A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate*, J. Virol, 1998, **72**:1577–1585.
32. Summerford, C., Bartlett, J. S. and Samulski, R. J., *$\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection*, Nat. Med, 1999, **5**:78–82.
33. McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H., and Evander, M., *Expression of the $\alpha 6$ integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells*, Virology, 1999, **261**:271–279.
34. Bossis, I., Roden, R. B., Gambhira, R. et al., *Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection*, J. Virol, 2005, **79**:6723–6731.
35. Culp, T. D. and Christensen, N. D., *Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions*, Virology, 2004, **319**:152–161.
36. Day, P. M., Lowy, D. R., and Schiller, J. T., *Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway*, Virology, 2003, **307**:1–11.
37. Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P. Y., and Coursaget, P., *Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells*, J. Virol, 2003, **77**:3846–3850.
38. Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R., and Schiller, J. T., *Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression*. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 2004, **101**:14252–14257.

39. Loo, Y. M., and Melendy, T., *Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA*, J. Virol, 2004, **78**:1605–1615.
40. Han, Y., Loo, Y. M., Militello, K. T., and Melendy, T., *Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein*, A. J. Virol, 1999, **73** :4899–4907.
41. You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K., and Howley, P. M., *Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes*, Cell, 2004, **117**:349–360.
42. Bechtold, V., Beard, P., and Raj, K., *Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA*, J. Virol, 2003, **77**:2021–2028.
43. Kim, K., Garner-Hamrick, P. A., Fisher, C., Lee, D., and Lambert, P. F., *Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function and implications in viral infection*. J. Virol, 2003, **77**:12450–12459.
44. Christensen, N. D., Cladel, N. M., Reed, C. A., and Han, R., *Rabbit oral papillomavirus complete genome sequence and immunity following genital infection*, Virology, 2000, **269**:451–461.
45. Nicholls, P., Klaunberg, B., Moore, R. A. et al., *Naturally occurring, nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection*, Virology, 1999, **265**:365–374.
46. Zhang, P., Nouri, M., Brandsma, J. L., Iftner, T., and Steinberg, B. M., *Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation*, Virology, 1999, **263**:388–394.
47. Campo, M. S., *Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination*, Trends. Microbiol, 1995, **3**:92–97.
48. Madison, K. C., *Barrier function of the skin: 'la raison d'etre' of the epidermis*, J. Invest. Dermatol, 2003, **121**:231–241.
49. Sherman, L., Jackman, A., Itzhaki, H., Stoppler, M. C., Koval, D., and Schlegel, R., *Inhibition of serum and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation*, Virology, 1997, **237**:296–306.

50. Eun-Kyoung, Yim., and Jong-Sup Park., *The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis*, *Cancer. Res. Treat*, 2005, **37**:319-324.
51. Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A. et al., *The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth*, *EMBO. J*, 1999, **18**:2449–2458.
52. Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L., and McCance, D. J., *The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors*, *EMBO. J*, 1996, **15**:1950–1960.
53. Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D. A., *Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV16 E7 oncoprotein*, *Genes. Dev*, 1997, **11**:2090–2100.
54. Noya, F., Chien, W.M., Broker, T. R., and Chow, L. T., *p21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7*, *J. Virol*, 2001, **75**:6121–6134.
55. Das, S. K., Hashimoto, T., Shimizu K, et al., *Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1726**: 328–335.
56. Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D.C., Murant, T., Broker, T.R., Chow, L.T., *Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes*, *Genes. Dev*, 1995, **9**:2335–2349.
57. Stacey, S. N., Jordan, D., Williamson, A. J., Brown, M., Coote, J. H., and Arrand, J. R., *Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA*, *J. Virol*, 2000, **74**:7284–7297.
58. Lipari, F., McGibbon, G.A., Wardrop, E., Cordingley, M.G., *Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein*, *Biochemistry*, 2001, **40**:1196-204.

59. Crook, T., Tidy, J.A., Vousden, K.H., *Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation*, Cell, 1991, **67**:547-556.
60. Thomas, M., and Banks, L., *Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6*, Oncogene, 1998, **17**:2943–2954.
61. Li, B., and Dou, Q. P., *Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**:3850–3855.
62. Thomas, M., Laura, R., Hepner, K. et al., *Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation*, Oncogene, 2002, **21**: 5088–5096.
63. Nguyen, M. L., Nguyen, M. M., Lee, D., Griep, A. E., and Lambert, P. F., *The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo*, J. Virol, 2003, **77**:6957–6964.
64. Nguyen, M. M., Nguyen, M. L., Caruana, G., Bernstein, A., Lambert, P. F., and Griep, A. E., *Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium*, Mol. Cell. Biol, 2003, **23**:8970–8981.
65. Bodily, J.M., and Meyers, C., *Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoters*, J. Virol, 2005, **79**:3309–3321.
66. Spink, K. M., and Laimins, L. A., *Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification.*, J. Virol, 2005, **79**:4918–4926.
67. Middleton, K., Peh, W., Southern, S. A. et al., *Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers*, J. Virol, 2003, **77**:10186–10201.
68. Hwang, E. S., Nottoli, T., and Dimaio, D., *The HPV16 E5 protein: expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells*, Virology, 1995, **211**:227–233.
69. Straight, S.W., Herman, B., and McCance, D. J., *The E5 oncoprotein of HPV16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes*, J. Virol, 1995, **69**:3185–3192.

70. Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A., *The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR independent process in stressed human keratinocytes*, *Virus. Genes*, 2000, **20**:65–69.
71. Wilson, R., Fehrmann, F., and Laimins, L. A., *Role of the E1–E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31*, *J. Virol*, 2005, **79** :6732–6740.
72. Peh, W. L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X., and Doorbar, J., *The Viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) productive cycle in vivo*, *J. Virol*, 2004, **15**:2142–2151.
73. Davy, C. E., Jackson, D. J., Raj, K. et al., *Human Papillomavirus type 16 E1/E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes*, *J. Virol*, 2005, **79**:3998–4011.
74. Davy, C. E., Jackson, D. J., Wang, Q., et al., *Identification of a G2 arrest domain in the E1/E4 protein of human papillomavirus type 16*, *J. Virol*, 2002, **76** :9806–9818.
75. Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T., *The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1 and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains*, *J. Virol*, 1998, **72**:142–150.
76. Zhao, K. N., Hengst, K., Liu, W. J., et al., *BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions*, *Virology*, 2000, **272**:382–393.
77. Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., and Schiller, J. T., *Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors*, *J. Virol*, 2004, **78**:751–757.
78. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E., and Sapp, M., *Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins*, *J. Virol*, 2002, **76**:10009–10014.
79. Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K., and Beard, P., *Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions*, *J. Mol. Biol*, 1998, **283**:529–536.
80. Roden, R. B., Lowy, D. R., and Schiller, J. T., *Papillomavirus is resistant to desiccation*, *J. Infect. Dis*, 1997, **176**:1076–1079.
81. Coppe, J. P., Patil, K. C., Rodier, F., *Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell Non autonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor*

- Suppressor*, Plos. Biology, 2008, **16**:2854-2868.
82. Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., et al., *The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students*, Cancer .Epidemiol. Biomarkers. Prev, 2003, **12**:485–490.
 83. Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G., and Pimenta, J. M., *Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer*, Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev, 2005, **14**:1157–1164.
 84. Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N., and Franceschi, S., *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis*, Br. J. Cancer, 2003, **88**:63–73.
 85. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., et al., *A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*, EMBO. J, 1984, **3**:1151-1157.
 86. Schwarz, E., Dorst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., et al., *DNA sequence and genuine organization of genital human papillomavirus type 6b*, EMBO. J., 1983, **2**: 2341-2348.
 87. Seedorf, K., Krammer, G., et al., *Human papillomavirus type 16 DNA sequence*, Virology, 1985, **145**:181-185.
 88. Dartmann, K., Schwarz, E., Gissmann, L., zur Hausen, H., *The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11*, Virology, 1986,**151**:124-130.
 89. Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O., and Matthews, F. E., *The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK*, Lancet, 2004, **364**:249–256.
 90. Peh, W. L., Middleton, K., Christensen, N., et al., *Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease*, J. Virol, 2002, **76**:10401–10416.
 91. Klaes, R., Woerner, S. M., Ridder, R., et al., *Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes*, Cancer. Res, 1999, **59**:6132–6136.

92. Fujii, T., Masumoto, N., Saito, M. et al., *Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia*, *Diagn. Mol. Pathol*, 2005, **14**:103–108.
93. Peitsaro, P., Johansson, B., and Syrjanen, S., *Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique*, *J. Clin. Microbiol*, 2002, **40**:886–891.
94. Howley, P.M., *Role of the Human Papillomaviruses in Human Cancer*, *Cancer. Res*, 1991, **51**:5019s-5022s.
95. Durst, M., Croce. C., Gissmann, L., Schwarz. E., and Huebner, K., *Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas*, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*.1987, **84**: 1070-1074.
96. Baker. C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley. P. M., *Structural and transcriptional analysis of human papilloma virus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines*, *J. Virol*, 1987, **61**: 962-971.
97. Schwarz, E., Freese. U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H., *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*, *Nature* , 1985, **314**: 111-114.
98. McBride. A. A., Spalholz, B. A., Lambert, P. F., and Howley, P. M., *Functional domains of papillomavirus E2 proteins*, In: L. P. Villarreal (ed.) *Common Mechanisms of Transformation by Small DNA Tumor Viruses*, pp. 115-126. Washington. DC: American Society for Microbiology. 1989.
99. Thierry, F., and Yaniv, M., *The BPVI-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV 18 regulatory region*, *EMBO. J*, 1987, **6**:3391-3397.
100. Romanczuk. H., Thierry. F., and Howley, P. M., *Mutational analysis of the cis-elements involved in the E2 repression of the HPV-16 P97 and HPV-18 P105 promoters*. *J. Virol*, 1990, **64**: 2849-2859.
101. Baker, C. C., Phelps. W. C. Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., and Howley. P. M., *Structural and transcriptional analysis of human papilloma virus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines*, *J. Virol*, 1987, **61**: 962-971.

102. Smotkin, D., and Wettstein, F. O., *Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, **83**:4680-4684.
103. Kalof, A. N., Evans, M. F., Simmons-Arnold, L., Beatty, B. G., and Cooper, K., *p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. Am. J. Surg. Pathol, 2005, **29**:674–679.
104. Dray, M., Russell, P., Dalrymple, C. et al., *p16 (INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies*, Pathology, 2005, **37**:112–124.
105. Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F., *siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells*, Oncogene, 2003, **22**:5938–5945.
106. Griffin, H., Elston, R., Jackson, D., et al., *Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting*, J. Mol. Biol, 2006, **355**:360–378.
107. Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S., *Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein*, Cell. Growth. Differ, 1997, **8**:1277–1286.
108. Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V., *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*, Cancer. Res, 1996, **56**:4620–4624.
109. Duensing, S., and Munger, K., *Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins*, Int. J. Cancer, 2004, **109**:157–162.
110. Hanahan, D., Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*, Cell, 2011, **144**:646-674.
111. Shiyu Song, Gene, A., Gulliver, and Lambert, F.P., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo*

- through p53-dependent and p53-independent pathways*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, **95**:2290–2295.
112. Lindahl, T., Barnes, D.E., *Repair of endogenous DNA damage*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol, 2000, **65**:127-134.
113. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M et Mazur, M., *Free radicals, metals and antioxydants in oxidative stress-induced cancer*, Chem. Biol. Interact, 2006, **160**:1-40.
114. Khanna, K.K., Jackson, S.P., *DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection*, Nat. Genet, 2001, **27**:247-254.
115. Jackson, S. P., Bartek, J., *The DNA-damage response in human biology and disease*, Nature. Rev, 2009, **461**:1071-1078.
116. Lieber, M. R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*, J. Biol. Chem, 2008, **283**:1-5.
117. San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*, Annu. Rev. Biochem, 2008, **77**:229-257.
118. Rodier, F., Campisi, J., Bhaumik, D., *Tow faces of p53: aging and tumor suppression*, Nucleic. Acids. Res, 2007, **35**:7475-7484..
119. Bakkenist, C.J., et Kastan, M.B., *Initiating cellular stress responses*, Cell, 2004, **118**:9-17.
120. Cortez, D., *Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling*, Genes. Dev, 2005, **19**:1007–1012.
121. Hühn, D., Bolck, H.A., Sartori, A.A., *Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy*, Swiss. Med. Wkly, 2013; **143**:w13837.
122. Marini, F., Nardo, T., Giannattasio, M., Minuzzo, M., Stefanini, M., Plevani, P., Falconi, M.M., *DNA nucleotide excision repair-dependent signaling to checkpoint activation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, **103**:17325–17330.
123. Jiang, G., Sancar, A., *Recruitment of DNA damage checkpoint proteins to damage in transcribed and nontranscribed sequences*, Mol. Cell. Biol, 2006, **26**:39–49.

124. Zou, L., Elledge, S.J., *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*, Science, 2003, **300**:1542–1548.
125. Pluquet, O., Hainaut, P., *Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction*, Cancer. Lett, 2001, **174**:1–15.
126. Lavin, M.F., Gueven, N., *The complexity of p53 stabilization and activation*, Cell. Death. Differ, 2006, **13**:941–950.
127. Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M., *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria, A potential role in apoptotic signaling*, J. Biol. Chem, 2000, **275**:16202–16212.
128. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*, Cell. Death. Differ, 2003, **10**:431–442.
129. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George D, Levine, A.J., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*, Cell, 1992, **69**:1237–1245.
130. Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., *Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53*, Nature, 1993, **362**: 857–860.
131. Al Rashid, S.T., Dellaire, G., Cuddihy, A., Jalali, F., Vaid, M., Coackley, C., Folkard, M., Xu, Y., Chen, B.P., et al. *Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo*, Cancer. Res, 2005, **65**:10810–10821.
132. Guillouf, C., Grana, X., Selvakumaran, M., De Luca, A., Giordano, A., Hoffman, B., Liebermann, D.A., *Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest*, Blood, 1995, **85**:2691–2698.
133. Danial, N.N., Korsmeyer, S. J., *Cell death: critical control points*. Cell, 2004, **116**:205–219.
134. Murphy, M.E., Leu, J.I., George, D. L., *p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis*, Cell. Cycle, 2004, **3**:836–839.

135. Synnott, G., *Mode d'action antiprolifératif des Nutlins dans les cellules tumorales et son application dans l'évaluation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et des voies de signalisation de p53*, Mémoire. Université de Laval, 2007
136. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*, Nature, 1993, **362**: 847–849.
137. Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*, Genes. Dev, 1994, **8**:2540–2551.
138. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*, Cell, 2005, **120**:513–522.
139. Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., Campisi, J., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*, EMBO. J, 2003, **22**:4212–4222.
140. TNM, L. Sobin and Ch Wittekind UICC et International Union against Cancer, Geneva, Switzerland, Classification Figo, 2002, 6th ed, pp 115-157.
141. Bekkers, R. L., L. F. Massuger, J. Bulten, and W. J. Melchers., *Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical*, Cancer.Rev. Med. Virol, 2004, 1495-105.
142. Petignat, P., Roy, M., *Diagnosis and management of cervical cancer*, B.M.J, 2007, **335**:765-768.
143. Keys, H.M., Bundy, B.N., Stehman, F.B., Muderspach, L.I., Chafe, W.E., Suggs, C.L., et al., *Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma*, N. Engl. J. Med, 1999, **340**:1154-61.
144. Vousden, K. H., and D. P. Lane., *p53 in health and disease*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2007, **8**:275-83.
145. Jiang, P., Du, W., Yang, X., *p53 and regulation of tumor metabolism*, J. Carcinog, 2013, 12-21.
146. Almazov, V. P., Kochetkov, D.V., Chumakov, P.M., *Use of p53 for therapy of human cancer*, Molecular Biology, 2007, **41**: 863-877.

147. Kaelin, W.G. Jr., *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy*, Nat. Rev. Cancer, 2005, **5**:689-698.
148. Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., Helleday, T., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*, Nature, 2005, **434**:913-917.
149. Chan, D.A., Giaccia, A.J., *Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery*, Nat. Rev. Drug. Discov, 2011, **10**:351-364.
150. Goldstein, S., *Replicative senescence: the human fibroblast comes of age*, Science, 1990, **249**:1129–1133.
151. Grahn, D., Hamilton, K.F., *Genetic variation in the acute lethal response of four inbred mouse strains to whole body X- irradiation*, Genetics, 1957, **42**:189–198.
152. Passos, F.J., Nelson, G., et al., *Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence*, Mol. Syst. Biol, 2010, **6**:347.
153. Brown, C.J., et al., *Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway*, Nat. Rev.. Cancer, 2009, **9**: 862-873.
154. Speidel, D., *Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to Death*, Trends. Cell. Biol, 2010. **20**:14-24.
155. Moll, U.M., et al., *Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53*, *Curr. Opin. Cell. Biol*, 2005, **17**:631-636.

156. Reich, N.C., et al., *Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53*, Mol. Cell. Biol, 1983, **3**:2143-2150.
157. Tao, W., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, **96**:3077-3080.
158. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*, Nature, 1997, **387**:296-299.
159. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*, Cell, 1992, **69**:1237-1245.

160. Chene, P., *Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy*, Nat. Rev.. Cancer, 2003, **3**:102-109.
161. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*, Science, 2004, **303**:844-848.
162. Kussie, P.H., et al., *Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain*, Science, 1996, **274**:948-953.
163. Laurie, N.A., et al., *Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma*, Nature, 2006, **444**:61-66.
164. Tovar, C., et al., *Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2006, **103**:1888-18893.
165. Vassilev, L.T., *MDM2 inhibitors for cancer therapy*, Trends. Mol. Med, 2007, **13**:23–31.
166. Kranz, D., et al., *Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phasespecific chemotherapy*, Cancer. Res, 2006, **66**:10274-10280.
167. Zhang, F., *Preclinical Pharmacology of the Mdm2 Antagonist Nutlin-3a*, Proquest, Umi Dissertation Publishing, 2012, pp-136.
168. Maerken, T. V., et al., *Selective inhibition of the p53–MDM2 interaction by Nutlin drugs: a new therapeutic perspective for neuroblastoma*, P. Belg. Roy. Acad. Med, 2013, **2**:198-207.
169. Shinji Endo, et al., *Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor Nutlin-3 in gastric cancer cells*, Cancer.Sci, 2011, **102**:605–613.
170. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2007, **8**:729-740.
171. Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., Campisi, J., *Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways*, EMBO. J, 2003, **22**:4212–4222.
172. Kogoma, T., *Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription*, Microbiol. Mol. Biol. Rev, 1997, **61**:212–238.

173. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*, Cell, 2006, **126**:107–120.
174. Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M., *Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD*, Science, 2004, **304**:596–600.
175. Chumakov, P.M., *Function of the p53 gene: Choice between life and death*, Biokhimiya, 2000, **65**:34–47.
176. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*, Cell 1993, **75**:817–825.
177. Chipuk, J.E., Green, D.R., *Dissecting p53-dependent apoptosis*, Cell. Death. Differ, 2006, **13**:994–1002.
178. Yee, K.S., Vousden, K.H., *Complicating the complexity of p53*, Carcinogenesis, 2005, **26**:1317–1322.
179. Curtin, N. J., *Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer*, Br. J. Pharmacol, 2013, **169**:1745-1765.
180. Wymann, M.P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., et al. ,*Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*, Mol. Cell. Biol, 1996, **16**:1722-1733.
181. Hollick, J.J., Rigoreau, L.J.M., Cano-Soumillac, C., Cockcroft. X., Curtin, N.J., Frigerio, M., et al., *Pyranone, thiopyranone, and pyridone inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase related kinases. Structure-activity relationships for DNA-dependent protein kinase inhibition, and identification of the first potent and selective inhibitor of the ataxia telangiectasia mutated kinase*, J. Med. Chem, 2007, **50**: 1958–1972.
182. Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, M.N.B., et al., *Identification of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM*, 2004, Cancer. Res, **64**: 9152–9159.
183. Cimprich, K.A., Cortez, D., *ATR: an essential regulator of genome integrity*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2008, **9**: 616–627.

184. Alao, J. P., Sunnerhagen. P., *The ATM and ATR inhibitors CGK733 and caffeine suppress cyclin D1 levels and inhibit cell proliferation*, *Radiat. Oncol*, 2009, **4**:1-7.
185. Zho, B., Bower, M. J., McDevitt, J.P., et al, *Structural basis for CHK1 inhibition by UCN-01*, *J. Bio. Chem*, 2002, **277**:46609-46615.
186. Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, W.Y., *Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status*, *Int. J. Mol. Sci*, 2013, **14**:22409-22435.
187. Endlich, B., Radford, I.R., Forrester, H.B., Dewey, W.C., *Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells*, *Radiat. Res*, 2000, **153**:36-48.

Annexe

	T-Student avec 95 % de confiance			
	DMSO vs Nutlin-3 10 uM	DMSO vs Nutlin-3 10 uM + IR	DMSO vs IR	Nutlin-3 10 uM + Nutlin3 10 uM + IR
HeLa	0,01048382	7,92351E-06	0,002514253	0,000834831
HeLa-GSE	0,000970464	9,82343E-07	2,1901E-05	5,15701E-05
CaSki	0,003455045	5,79042E-06	4,92815E-05	0,00058109
CaSki-GSE	0,001539289	8,7384E-05	0,002509153	0,000169017

Tableau VI : Test-t sur les données du test de sensibilisation à la Nutlin-3 10 μ M sur les cellules HeLa, CaSki, HeLa-GSE et CaSki-GSE.

Le test a été effectué avec un intervalle de confiance de 95%, nous avons comparé entre deux groupes de données différentes. Hypothèse 0 : Il n'y pas de différence statistiquement significative entre la sensibilisation des cellules traitées avec un traitement ou l'autre.

Par exemple pour la colonne une : H_0 = il n'y a pas de différence statistiquement significative entre la viabilité observée par essai DRAQ5 pour les cellules traitées par le DMSO comparé aux cellules traitées avec la Nutlin-3 10 μ M. C'est un test uni-latérale, à variance égale.

P value = 0,05, donc toutes les valeurs de t-student plus basses que 0,05 sont statistiquement significatives avec 95 % de confiance, et l'hypothèse 0 est refusée.

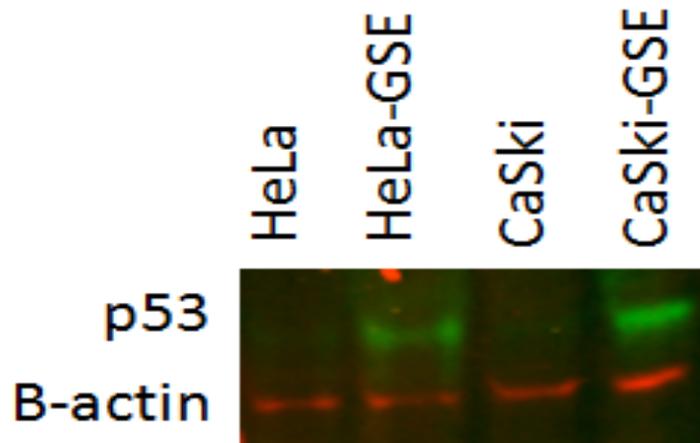


Figure 36 : Validation de l'expression d'un p53 dominant négative dans les cellules HeLa-GSE, et CaSki-GSE.

Les protéines ont été marquées avec un anticorps souris anti-p53 clone (DO-1), révélé par spectromètre Li-cor avec un anticorps secondaire fluorescent dans le vert VRDye (Li-cor Bioscience secondary anti-body) (1/5000). La β -actine a servi de contrôle et a été marquée avec un anticorps primaire lapin anti- β -actine (13E5) et a été couplée avec l'anticorps secondaire fluorescent dans le rouge IRDye (Li-cor Bioscience secondary anti-body) (1/5000)

