UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

U.F.R. DE MEDECINE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Biologie cellulaire

Présentée par

Grégoire LE BRAS

Etude du rôle des Papillomavirus Humains (HPV) dans la régulation du phénotype invasif des cellules tumorales.

Travaux réalisés sous la direction des Docteurs Myriam Polette et Véronique Dalstein

Mr le Professeur Philippe Birembaut (Reims)Président du JuryMme le Professeur Christiane Mougin (Besançon)RapporteurMr le Professeur Philippe Delvenne (Liège)RapporteurMr le Docteur Joseph Abecassis (Strasbourg)ExaminateurMr le Professeur André Chays (Reims)ExaminateurMme le Docteur Myriam Polette (Reims)Directeur de thèse, examinateur

<u>Titre :</u> Etude du rôle des Papillomavirus Humains (HPV) dans la régulation du phénotype invasif des cellules tumorales.

Résumé: Les papillomavirus humains sont responsables des cancers cervicaux mais sont également retrouvés dans 25 à 50% des cancers de l'oropharynx et en particulier au niveau de l'amygdale palatine. Les processus de carcinogenèse induits par le virus sont bien connus mais leur rôle potentiel sur l'invasion tumorale n'a pas été déterminé. Au travers d'une étude sur des carcinomes de l'amygdale palatine, nous mettons en évidence la présence d'HPV associée à un marquage immunohistochimique p16 et une tendance vers une meilleure survie globale. La présence d'HPV en plus faible proportion qu'habituellement rapportée dans la littérature pourrait être la conséquence de la forte imprégnation alcoolo-tabagique de la population étudiée. L'étude de l'expression des oncoprotéines E6/E7 d'HPV16 *in vitro* dans des lignées tumorales HPV positives et négatives met en évidence un effet pro-invasif des oncoprotéines. Cet effet n'est pas associé à l'expression des MMP2 et MT1-MMP. L'inhibition de ces oncoprotéines par siRNA a pour effet d'entraîner une baisse de la capacité invasive. Cet effet est cependant associé à une augmentation de l'expression de la MT1-MMP ainsi qu'à une diminution de l'occludine.

L'expression des oncoprotéines E6/E7 est donc associée au phénotype invasif des lignées tumorales. Cependant les effets d'apparence contradictoire mis en évidence dans notre étude traduisent la complexité de la régulation de l'expression des oncoprotéines et de ses effets *in vivo*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence de variants de E6 et la régulation de l'épissage de l'ARNm E6/E7 participe à l'acquisition de propriétés invasives des lignées tumorales HPV positives. **Mots Clefs :** HPV, Cancers de l'oropharynx, E6/E7, MMP, Invasion tumorale

<u>Title :</u> Study of Human Papillomavirus (HPV) role in invasive phenotype regulation of tumor cells.

Summary : Human papillomaviruses are responsible for cervical carcinoma but are also found in about 25 to 50% of oropharyngeal carcinomas, especially in those originating from palatine tonsil. Carcinogenesis mechanisms induced by the virus are well known but HPV involvement in tumor invasion has not been determined. In a study of palatine tonsillar carcinomas, we show that HPV presence is associated with p16 immunohistochemical staining and with a tendency toward a better overall survival. The lower HPV presence than usually reported in literature could be the consequence of heavy alcohol and tobacco consumption in the studied population. Our study of HPV16 E6/E7 oncoproteins expression *in vitro*, in HPV positive and negative tumor cell lines, shows a pro-invasive effect of oncoproteins. This effect is not associated with MMP2 and MT1-MMP expression. Oncoproteins inhibition using siRNA resulted in decreased invasion. However this effect was associated with increased MT1-MMP expression as well as a decrease of occludin.

E6/E7 oncoproteins expression is associated with tumoral cell line's invasive phenotype. However the seemingly contradictory effects shown in our study illustrate the impact of oncoprotein complex regulation *in vivo*. We propose that E6 variants and E6/E7 ARNm participate in the acquisition of invasive properties by tumor cell lines.

Keywords: HPV, Oropharyngeal cancer, E6/E7, MMP, Tumoral invasion

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'unité INSERM 514 de Reims, dirigée par le docteur Edith Puchelle puis dans l'unité INSERM 903 dirigée par le professeur Philippe Birembaut. Je les remercie sincèrement tous deux de m'avoir accueilli pendant ces quatre années au sein de l'unité. Je suis en particulier reconnaissant au professeur Philippe Birembaut d'avoir accepté de faire partie du jury d'évaluation de ce travail.

Je remercie le professeur Christiane Mougin, professeur de biologie cellulaire et responsable de l'EA 3181 à Besançon, d'avoir participé en tant que rapporteur à l'évaluation de ma thèse. Je lui suis extrêmement reconnaissant pour son accueil dans son laboratoire de Besançon.

Je remercie le professeur Philippe Delvenne, professeur d'anatomie pathoglogique au CHU de Liège, d'avoir accepté de participer en tant que rapporteur à l'évaluation de ce travail. Je lui suis reconnaissant pour l'accueil dans son laboratoire de Liège et pour les échanges que j'ai pu avoir avec lui.

J'exprime mes remerciements sincères au docteur Joseph Abecassis, chef du laboratoire de biologie tumorale du centre Paul Strauss à Strasbourg, d'avoir accepté de participer au jury pour évaluer mon travail de thèse.

Je voudrais aussi remercier le professeur André Chays, chef du service d'O.R.L. et chirugie Cervico-Faciale au CHU de Reims, de participer au jury d'évaluation de mon travail de thèse.

D'autre part je voudrais évidemment remercier chaleureusement le docteur Myriam Polette et le docteur Véronique Dalstein qui ont encadré ce travail de thèse. C'est en grande partie grâce à leur aide et conseils inestimables que j'ai pu réaliser cet ouvrage et je leur suis particulièrement reconnaissant pour tout le temps qu'elles m'ont consacré. Face aux différents obstacles que j'ai rencontrés je tiens à saluer leur capacité à toujours m'apporter un point de vue favorable pour les surmonter.

Le professeur Christine Clavel a toute ma reconnaissance pour le temps qu'elle a trouvé à me consacrer et sa contribution précieuse à la rédaction de l'article sur l'étude clinique présentée dans ce document. Ces travaux n'auraient évidemment jamais été possibles sans l'apport initial et capital du docteur Cyrille Coissard que je remercie. Je tiens par la même occasion à remercier toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce projet et notamment tout le personnel technique du laboratoire de biologie de Pol Bouin, en particulier Marie Martin et Isabelle Putaud.

Je tiens à remercier les docteurs Sylvie Fauconnet, Isabelle Lascombe et Nicolas Clere pour leur accueil à Besançon qui m'a grandement aidé dans la résolution des problèmes techniques rencontrés.

De même je voudrais remercier le docteur Jean-Hubert Caberg pour son accueil à Liège et l'aide qu'il m'a apportée dans la mise au point de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7.

De nombreuses expériences présentées ici n'auraient jamais pu être réalisées sans l'aide scientifique et technique des différents membres de l'unité INSERM UMRS 903. Je remercie notamment le docteur Béatrice Nawrocki-Raby, le docteur Jean-Marie Zahm, le docteur Christine Terryn et le docteur Jean-Marie Tournier. Je suis également reconnaissant aux docteurs Christelle Coraux, Noël Bonnet, Stéphanie Caudroy, à Jérôme Cutronat pour les conseils qu'ils m'ont apportés. Je voudrais aussi tout particulièrement remercier la contribution technique et « logistique » que m'ont apporté Henriette Burlet, Claire Kileztky, Véronique Laplace, Magali Milliot, Tiphaine Poirier, Sarah Lingée, Steven Collet pour la réalisation de mes expériences. Je n'oublie pas l'aide administrative précieuse d'Annie Chaveriat, Stéphane Binet, Anne Quiqueret et Rachel Potier. Je voudrais souligner spécialement leur gentillesse.

Je tiens bien sûr à remercier la région Champagne-Ardenne et l'association ARC pour leur financement tout au long de ma thèse.

Ces années passées à réaliser mon travail de thèse n'auraient jamais été les mêmes sans la bonne humeur et le soutien généreux que m'ont apporté tous les étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer au sein l'unité Inserm. Je voudrais donc remercier les docteurs Delphine Gras, Rodolphe Hajj, Arnaud Bonnomet, Salma Hazgui, Guillaume Besson, Ferial Toumi, Konstantina Fragaki, Franck Delavoie, Jenny Briolat, Kamel Maouche qui m'ont précédé, accueilli et fait découvrir l'unité. En particulier je dois souligner la chance que j'ai eu d'atterrir dans le bureau 9 occupé par le sémillant docteur Pierre Lesimple et la fortune d'accueillir à mon tour venu le plus que convivial docteur Simon Toupance. Je voudrais également exprimer toute ma sympathie aux étudiants qui me suivent et que j'ai eu plaisir à rencontrer notamment Emilie Luczka, Audrey Joannes, Thomas Jolly, Jacqueline Roux, Kahina Medjber, Rym Ben-Abid et plus brièvement Alexandra Brochot et Romain Pierlot.

Enfin je voudrais évidemment remercier le soutien indéfectible apporté par les membres de ma famille au cours de ces années et qui a pour moi été d'une grande aide à la réalisation de cette thèse.

Publications et communications liées à l'étude

<u>Le Bras G</u>, Dalstein V, Vitry F, Coissard C, Lorenzato M, Polette M, Birembaut P, Mérol JC, Chays A, Diebold MD, Clavel C: Implication of high-risk human papillomaviruses in tonsillar carcinomas in a tobacco- and alcohol-exposed population *Head and neck* Soumis

Le Bras G, Dalstein V, Clavel C, Birembaut P, Polette M : Involvement of HPV16 E6/E7 on the invasiveness of cancer cells 25th International Papillomavirus Conference 2009 Malmö, Sweden

Le Bras G, Dalstein V, Clavel C, Birembaut P, Polette M : Rôle des oncoprotéines E6 et E7 d'HPV16 sur le phénotype invasif des cellules cancéreuses. *Journées de Recherche Respiratoire* 2008 Grenoble

Le Bras G, Dalstein V, Polette M : Rôle des oncoprotéines E6 et E7 d'HPV16 sur le phénotype invasif. *Journées des jeunes chercheurs* 2008 Reims

Le Bras G, Dalstein V, Polette M : Rôle des oncoprotéines E6 et E7 d'HPV16 sur le phénotype invasif des cellules cancéreuses *Société de biologie de Reims* 2008 Reims

Sommaire

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIÉES À L'ÉTUDE	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS EMPLOYÉES	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE	20
I CANCERS DES VOIES AÉRIENNES ET DIGESTIVES SUPÉRIEURES	22
I.A. VOIES AÉRIENNES ET DIGESTIVES SUPÉRIEURES	22
I.A.1. Aspects anatomiaues	
I A 2 Aspects histologiques	24
LB CARCINOMES DES VADS	25
I B 1 Eacteurs de risques	25
I.D.1. Fucceurs de lisques	2J
	20
1.B.3. Les concers des VADS	20
I.C. CANCERS DES VADS ASSOCIES AUX HPV	28
II PAPILLOMAVIRUS ET CANCÉROGENÈSE VIRO-INDUITE	31
II.A. ASPECTS STRUCTURAUX ET MOLÉCULAIRES	31
II.A.1. Structure du génome	31
II.A.2. Structure du virion	32
II.B. CLASSIFICATION DES PAPILLOMAVIRUS	35
II.C. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÉNOME D'HPV	37
II.C.1. Contrôle de la transcription des aènes du papillomavirus	37
II.C.1.1. La protéine virale E2 régulateur de la transcription des HPV	37
II.C.1.2. Activateurs de la transcription du génome viral	40
II.C.1.2.1 Les activateurs épithéliaux spécifiques des HPV muqueux	40
II.C.1.2.2 Régulation par les stéroïdes	42
II.C.1.3. Autres systèmes de régulation de la transcription	43
II.C.1.3.1 Régulation de la transcription par le complexe du nucléosome	43
II.C.1.3.2 Régulation de la transcription par les régions d'attachement à la matrice nucléaire	44
II.C.1.3.3 Inhibition de la transcription par YY1 et CDP	44
II.C.2. Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'HPV	45
II.C.2.1. Régulation de l'expression des gènes d'HPV par méthylation	45
II.C.2.2. Rôle de l'épissage alternatif dans la transcription des gènes d'HPV	46
II.C.2.3. Polyadénylation des ARNm dans l'expression des gènes d'HPV	49
II.C.2.4. Contrôle des ARN messagers	50
II.D. CYCLE VIRAL	51
II.D.1. Pénétration du virus dans la cellule	51
II.D.2. Etapes de l'infection virale et expression des oncoprotéines virales au cours du temps	54
II.D.2.1. Maintenance du génome	54
II.D.2.2. Phase proliferative	54
II.D.2.3. Amplification du genome	56
II.D.2.4. Synthese du virion	
ILD 2.6 Infection productive abortive et cancers associás aux HDV	/ د
II D 3 Oncontratéines E1 E2 et rénlication de l' Δ DN viral d'HDV	50 50
II F = Oncode oténies E5 E6 ET E7 ET DEOCESSUS DE TRANSCORMATION	ور ۶۲
II = 1	05 6F
II.E.2. L'ancoprotéine E7	دن مے
	00

	II.E.2.1.	Caractéristiques de E7	68
	II.E.2.2.	E7, immortalisation et transformation de cellules	70
	II.E.2.3.	Régulation du cycle cellulaire par E7	74
	II.E.2.4.	Régulation de l'apoptose, de la sénescence et de p53 par E7	77
	II.E.2.5.	Régulation de la transcription et actions épigénétiques de E7	79
	II.E.2.6.	Régulation de fonctions associées à l'invasion et l'angiogenèse par E7	80
	II.E.2.7.	Régulation du métabolisme cellulaire par E7	82
	II.E.2.8.	Régulation de l'immunité et de la réponse aux cytokines et aux facteurs de croissance par E7	83
	II.E.2.9.	Instabilité chromosomique induite par E7	85
	II.E.3. L	'oncoprotéine E6	87
	II.E.3.1.	Caractéristiques structurales de E6	88
	II.E.3.2.	Immortalisation et transformation des cellules par E6	91
	II.E.3.3.	Dégradation et régulation des fonctions de p53 par E6	93
	II.E.3.4.	E6 associated protein (E6AP)	95
	II.E.3.5.	Régulation de l'activité de la télomérase par E6	96
	II.E.3.6.	Régulation de l'apoptose par E6	97
	II.E.3.7.	Echappement au système immunitaire par l'intermédiaire de E6	98
	II.E.3.8.	Régulation de protéines d'adhérence et des protéines à domaine PDZ par E6	99
	II.E.3.9.	Régulation transcriptionnelle et régulation épigénétique par E6	102
	II.E.3.10.	Instabilité génomique induite par E6	104
	II.E.3.11.	Variants de E6	105
ш		SSION THMORALE	109
	LATINOONL		105
II	I.A. LES JON	CTIONS INTERCELLULAIRES	111
	III.A.1. L	es jonctions adhérentes	111
	III.A.1.1.	Cadhérine-E et caténines	111
	III.A.1.2.	Nectines et afadine	115
	III.A.1.3.	Complexes cadhérine-E/caténines et cancer	116
	III.A.1.3	3.1 Contrôle de la transcription de la cadhérine-E	116
	III.A.1.3	3.2 Contrôle post-traductionnel de la cadhérine-E	120
	III.A.2. J	onctions serrées	122
	III.A.2.1.	Les protéines membranaires des jonctions serrées	124
	III.A.2.	L.1 Les claudines	124
	III.A.2.	L2 L'occludine	124
	III.A.2.:	L.3 Protéines JAM	125
	III.A.2.:	I.4 Crumbs3	126
	III.A.2.2.	Les complexes multiprotéiques des jonctions serrées	127
	III.A.2.2	2.1 Le complexe protéique ZO	127
	III.A.2.	2.2 Le complexe PAR-3-aPKC-PAR-6	128
	III.A.2.2	2.3 Le complexe Crumbs-Pals1-PATJ	129
	III.A.2.3.	Jonctions serrées et cancer	132
II	I.B. MÉTAL	LOPROTÉINASES MATRICIELLES	136
	III.B.1. L	es différents types de MMP	139
	III.B.1.1.	Les collagénases	139
	III.B.1.2.	Les gélatinases	139
	III.B.1.3.	Les stromélysines	140
	III.B.1.4.	Les matrilysines	140
	III.B.1.5.	Les MMP membranaires (MT-MMP)	140
	III.B.1.6.	Les autres MMP	141
	III.B.2. F	Régulation des MMP	142
	III.B.2.1.	Régulation de l'expression	142
	III.B.2.	1.1 Transcription des MMP	144
	III.B.2.:	.2 Méthylation des MMP	145
	III.B.2.1	L.3 Acétylations des histones et remodelage de la chromatine	145

	III.B.2.1.	4 Stabilité de l'ARN des MMP	145
	III.B.2.2.	Régulation de l'activité des MMP	147
	III.B.2.2.	1 Inhibiteurs endogènes des MMP	147
	III.B.2.2.	2 Mécanisme d'inhibition des TIMP	147
	III.B.2.2.	3 Autres inhibiteurs de MMP	148
	III.B.3. M	MP et cancer	148
Μ	ATÉRIELS ET MÉ	THODES	153
I	ETUDE DES C	ARCINOMES DE L'AMYGDALE PALATINE ASSOCIÉS AUX HPV	153
	I.A. COLLECT	E DES TUMEURS ET POPULATION ÉTUDIÉE	153
	I.B. EXTRACT	ION DE L'ADN	153
	I.C. GÉNOTY	PAGE DE L'ADN	154
	I.D. DÉTERMI	NATION DE LA CHARGE VIRALE ET DE L'INTÉGRATION D'HPV16	154
	I.E. ANALYSE	DE LA SÉQUENCE D'HPV16 E6	156
	I.F. MARQUA	GE EN IMMUNOHISTOCHIMIE	157
	I.G. ANALYSE	D'IMAGES	157
	I.H. ANALYSE	STATISTIQUE	158
יי חו	L DANS DES LIGI	VERS CELLUL AIRES TUMORALES	159
0.			135
	II.A. CULTURE	CELLULAIRE	159
	II.A.1. Lig	gnées cellulaires	159
	II.A.2. Co	nditions de culture	159
	II.B. TRANSFE	CTIONS TRANSITOIRES	160
	II.B.1. Tr	ansfection transitoire de cDNA	160
	II.B.2. Tr	ansfection d'ARN interférents	161
	II.B.2.1.	Hybridation des siRNA	161
	II.B.2.2.	Transfection par CaCl ₂	162
	II.B.2.3.	Transfection à l'aide de la transfectine	162
	II.C. ANALYSE	DE L'EXPRESSION DES ARINM	163
	11.C.1. EX	traction des ARN	163
	11.C.2. 1r	anscription inverse et amplification par reaction de polymerisation en chaine (R1-PCR)	163
	11.C.3. M	Igration et revelation des produits de RT-PCR	166
	11.C.4. Ar	alyse de l'expression des ARNm par membrane de SuperArray	166
	11.C.5. Ar	alyse de l'expression des ARNm par puce Affymetrix' ^m	167
	II.D. ANALYSE	DES PROTEINES	169
	II.D.1. Ex	traction et dosage des echantillons proteiques	169
	11.D.2. W	estern Blotting	169
	II.D.3. Ar	nalyse par zymographie	1/1
	II.D.4. In	imunohistochimie	172
	II.E. ANALYSE	DU COMPORTEMENT CELLULAIRE	174
	II.E.1. M	esure de la capacité invasive des cellules en chambre de Boyden	174
	II.E.2. No	imeration cellulaire	174
	II.F. ANALYSE	STATISTIQUE DES DONNÉES	175
RÉ	SULTATS		176
I	ETUDE DE 58	CAS DE CARCINOMES ÉPIDERMOÏDE DE L'AMYGDALE PALATINE	176
	I.A. CARACTÉ	RISTIQUES DES PATIENTS ET DES TUMEURS	176
	I.B. MARQUE	URS VIRAUX ET CELLULAIRES	178
	I.C. SURVIE C	ELLULAIRE	180

П	ETUDE DU	RÔLE DES ONCOPROTÉINES E6/E7 SUR LE PHÉNOTYPE INVASIF DES LIGNÉES TUMORALES	181	
11.	A. Effet	'S DE LA TRANSFECTION TRANSITOIRE D'ADNC E6/E7	. 181	
	II.A.1.	Lignées cellulaires utilisées	181	
	II.A.2.	Effets des oncoprotéines E6/E7 sur les lignées tumorales A549 et MCF7	182	
	II.A.3.	Effets des oncoprotéines E6/E7 sur des lignées tumorales immortalisées par SV40	183	
	II.A.4.	Effets des oncoprotéines E6/E7 sur des lignées tumorales HPV16 positives	184	
II.	B. Effet	S DE L'INHIBITION DES ONCOPROTÉINES VIRALES E6/E7	. 187	
	II.B.1.	Lignées utilisées	187	
	II.B.2.	Inhibition des oncoprotéines E6/E7 par siRNA	189	
	II.B.3.	Effets de l'inhibition des oncoprotéines sur le phénotype invasif des cellules tumorales	191	
	II.B.4.	Effets de l'inhibition des oncoprotéines sur l'expression des gènes de l'invasion	191	
	II.B.5.	Effets de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 sur les protéines d'adhérence	198	
DISC	USSION		. 202	
I	ETUDE DU	RÔLE DES PAPILLOMAVIRUS DANS LES CARCINOMES DE L'AMYGDALE PALATINE	. 202	
П	II EFFETS DES ONCOPROTÉINES E6/E7 D'HPV16 SUR LE PHÉNOTYPE INVASIF DES LIGNÉES TUMORALES 209			
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES				
RÉFÉ	RENCES		. 226	

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Coupe sagittale médiane de la tête et rapports anatomiques des différentes cavités des voies aéro-digestives supérieures.

Figure 2 : Situation anatomique des amygdales et représentation schématique de l'anneau de Waldeyer.

Figure 3 : Progression phénotypique des cancers des VADS.

Figure 4 : Schéma de la structure du génome d'HPV16.

Figure 5 : Schéma de l'épissage alternatif précoce des transcrits d'HPV16.

Figure 6 : Diagramme schématique de la structure de la capside.

Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la protéine de structure L1 de 118 Papillomavirus.

Figure 8 : Schéma global des différents facteurs régulant la transcription des gènes d'HPV16.

Figure 9 : Structure du génome d'HPV16 et sa carte de transcription.

Figure 10 : Etapes de pénétration du virus dans la cellule puis dans le noyau.

Figure 11 : Expression des protéines virales dans les différentes couches de l'épithélium.

Figure 12 : Représentation schématique des différents domaines d'interactions des protéines E1 et E2 (BPV1).

Figure 13 : Assemblage du complexe d'initiation de la transcription d'HPV.

Figure 14 : Modèle de fonctionnement du double hexamère en tant que machinerie helicase bidirectionnelle.

Figure 15 : Diagramme des cibles potentielles de E5.

Figure 16 : Schéma de la structure d'HPV16 E7.

Figure 17 : Cibles cellulaires et activités de l'oncoprotéine E7.

Figure 18 : Schéma de la structure de HPV16 E6 et les domaines d'interactions avec ses cibles principales.

Figure 19 : Cibles cellulaires et activités de l'oncoprotéine E6.

Figure 20 : Schéma des différents processus et moyens de coopération par lesquels les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV agissent sur les processus de transformation des cellules.

Figure 21 : Schéma des différentes étapes de la progression tumorale.

Figure 22 : Organisation schématique des systèmes de jonctions intercellulaire et cellulematrice.

Figure 23 : Complexes majeurs des jonctions adhérentes.

Figure 24 : Organisation schématique des liaisons réalisées par la cadhérine-E et de ses voies de signalisation.

Figure 25 : Organisation des complexes des jonctions serrées.

Figure 26 : Réseaux formés par les protéines des complexes des jonctions serrées dans les cellules épithéliales.

Figure 27 : Tableau de la composition des différentes MMP et schéma correspondant à l'assemblage des différentes parties.

Figure 28 Séquences de reconnaissance dans les promoteurs des MMP1, MMP2, MMP9 et MT1-MMP, TIMP1 et TIMP2.

Figure 29 Schéma des étapes de RT-PCR.

Figure 30 Schéma d'organisation d'une puce AffymetrixTM

Figure 31 Schéma d'une chambre de Boyden.

Figure 32 Analyse de la survie des patients sélectionnés en fonction du statut HPV (p=0,086).

Figure 33 Expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées A549 et MCF7 transfectées par les plasmides E6, E7 et témoin.

Figure 34 Mesure de la capacité invasive des cellules BZR après transfection transitoire des plasmides E6, E7 et Témoin en chambre de Boyden.

Figure 35 Etude de l'expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées BZR et 16HBE transfectées par les plasmides E6, E7 et Témoin.

Figure 36 Mesure de la capacité invasive des cellules CaSki après transfection transitoire des plasmides E6, E7 et Témoin en chambre de Boyden.

Figure 37 Etude de l'expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées HPV16 positives CaSki et SiHa transfectées par les plasmides E6, E7 et témoin.

Figure 38 Inhibition des oncoprotéines E6/E7 par siRNA.

Figure 39 Effets des siRNA sur l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Figure 40 Mesure de la capacité invasive des cellules CaSki transfectées par siRNA E6, E7 et E7 773 en chambre de Boyden.

Figure 41 Effets des siRNA sur l'expression des MMP, inhibiteurs de MMP et gènes associés à l'invasion tumorale.

Figure 42 Effets des siRNA sur l'expression des ARNm de la MT1-MMP dans les cellules CaSki.

Figure 43 Effets des siRNA sur les MT1-MMP en western Blot dans les cellules CaSki.

Figure 44 Effets des siRNA sur l'expression de la MMP2 dans les cellules CaSki.

Figure 45 Effets des siRNA sur l'expression de MT1-MMP dans les cellules CaSki en présence d'inhibiteur de TGF- β .

Figure 46 Effets des siRNA sur les complexes des protéines de jonction intercellulaires.

Figure 47 Effets de la transfection par siRNA E7 sur la protéine de jonction serrée occludine.

Figure 48 Effets des siRNA sur la protéine de jonction serrée occludine.

Tableau 1 Sondes et amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

Tableau 2 Séquences des siRNA utilisés.

Tableau 3 Séquences des amorces et tailles des amplicons des gènes cibles.

<u>**Tableau 4**</u> Durée des cycles et températures d'hybridation pour les différentes amorces utilisées.

<u>**Tableau 5**</u> Variants de HPV16 E6 détectés et les modifications correspondantes au niveau des acides nucléiques et acides aminés.

<u>**Tableau 6**</u> Immunohistochimie et caractéristiques des variants des cas de carcinomes de l'amygdale positifs aux HPV16.

<u>Tableau 7</u> Variants de HPV16 E6 détectés et les modifications correspondantes au niveau des acides nucléiques et acides aminés.

Tableau 8 Caractéristiques immunohistochimiques et statut HPV.

<u>Tableau 9</u> Différentes lignées utilisées et leurs caractéristiques pour la transfection des ADNc des oncoprotéines.

Tableau 10 Effets de la transfection des oncoprotéines E6 ou E7 sur l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale.

Tableau 11 Expression des gènes altérés suite à la transfection de l'oncoprotéine E6.

Tableau 12 Effets de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 sur un panel de gènes associés au cancer.

Tableau 13 Gènes dont l'expression est affectée d'un facteur 2 au moins après transfection de siRNA E7.

Liste des abréviations employées

ADIP	Afadin DIL domain-binding protein	CAR	CAR Coxsackie- and adenovirus receptor
HIF-1a	Hypoxia-Inducible Factor 1α	CARD8	Caspase recruitment domain family, member 8
ACSL4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	CASP1	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase</i> (<i>interleukin 1, beta, convertase</i>)
ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	СВР	CREB Binding Protein
ACVR1B	Activin A Receptor type IB	CCNA2	Cyclin A2
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	CCND1	Cyclin D1
ADAM23	ADAM metallopeptidase domain 23	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
ADAMS	A Disintegrin and metalloproteinase	CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
ADAMTS	ADAM with Thrombospondin repeats	cdc42	Cell division cycle 42
ADN	Acide désoxyribonucléique	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
AFAP1	Actin Filament Associated Protein 1	CDCA3	Cell division cycle associated 3
AGT	Angiotensinogen	CDK	Kinase dépendantes de cyclines
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	cdk2	Cyclin-dependent kinase 2
AKR1C3	Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3- alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) wakt murine thromoma viral oncoaene homolog	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
AKT3	3 (protein kinase B, gamma)	CDKN1C	Kip2)
AMF	Facteur autocrine de mobilité	CDKN2A	p16INK4
Amot	Angiomotine	CDP	CCAT-displacement protein
ANKRD12	Ankyrin repeat domain 12	CENPA	Centromere protein A
AP1	Activator Protein	CENPI	Centromere protein I
aPKC	A typical Protein Kinase C	CENPN	Centromere protein N
ARF4	ADP-ribosylation factor 4	CEP55	Centrosomal protein 55 kDa
ARF6	ADP-ribosylation factor 6	CHRAC	Chromatin Accessibility Complex
ARHGAP4	Rho GTPase activating protein 4	CKII	Caséine kinase II
ARHGDIA	Rho GDP dissociation inhibitor GDI alpha	CLCA2	CLCA family member 2, chloride channel
ARNm	Acide ribonucléique messager	CLDN4	regulator Caudine 4
ASH1	Absent Small and Homeotic disks protein 1 ATPase, H+ transporting, lysosomal 9 kDa, V0	CLMP	Coxsackie- and adenovirus receptor-like membrane protein
ATP6V0E1	subunit el	CLTB	Clathrin, light chain (Lcb)
ATPase vacuolaire	V-AIPase Vacuolar Adenosine Triphosphate hydrolase	COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1
ATXN1	Ataxin 1	COL4A6	Collagène de type IV alpha 6
AUF1	AU-rich element RNA binding protein 1	COL7A1	Collagène de type VII alpha 1
AURE	Adenosine-Uridine-Rich Elements	СРА	Cellules présentatrices d'antigènes
AURKB	Aurora kinase B	CPEB1	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1
AVEN	Apoptosis, caspase activation inhibitor	CR2	Conserved region 2
bHLH	Basic helix-loop-helix	CRB3	Crumbs3
BLZF1	Basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)	CRE	cAMP response element
BMP	Protéine de morphogenèse osseuse	CREB	cAMP response element binding
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like	CREG1	Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset	CRIB	cdc42/Rac-interactive Binding
C3	Complement component 3	CTBP2	C-terminal binding protein
CALD1	Caldesmon 1	CTF2	Fragment C-terminale de la cadhérine-E
CAPNS1	Calpain, small subunit 1	CTSB	Cathepsin B

CUL5	Cullin 5	FAM115A	Family with sequence similarity 115, member A
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
CYFIP1	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
CYP24A1	Cytochrome P450, family 24, subfamily A,	FBXO21	F-box protein 21
DBD	DNA binding domain.	FGF	Signal de croissance fibroblastique
DbpA	Decorin-binding protein A	FLG	Filaggrin
DCP2	DCP2 decapping enzyme homolog (S.	FN1	Fibronectine1
	<i>Cerevisiae)</i> <i>Damage-specific DNA binding protein 2, 48</i>	FRK	Fyn-related kinase
DDB2	kDa	FZD6	Frizzled homolog 6
DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	GAP	Gtpase-activating protein
Dlg1	Discs large homolog	GATA6	GATA binding protein 6
DR1	(negative cofactor 2)	GATAD2A	GATA zinc finger domain containing 2A
DSB	Rupture double brin ADN	GEF	Facteur d'échange de nucléotides guanylate
DUSP10	Dual specificity phosphatase 10	GPR1	G protein-coupled receptor 1
Dvl	Disheveled	GPRC5B	<i>G</i> protein-coupled receptor, family <i>C</i> , group 5, member <i>B</i>
DYRK2	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	Gps2	<i>G protein pathway suppressor 2</i>
E2F1	E2F transcription factor 1	GRB14	Growth factor receptor-bound protein 14
E2F8	E2F transcription factor 8	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5
E6AP	Ubiquitin protein ligase E3A	GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
E6BP	Reticulocalbin 2	GTPase Ran	Guanosine triphosphate hydrolase ras-related
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	H2AEV	nuclear protein H24 historie family, member V
EFHD1	EF-hand domain family, member D1	H2AFY	H24 histone family, member V
EFNB1	Ephrin-B1	hadaa	Transcriptional adaptor 3
EGF	Facteur de croissance épithéliale	нат	Histones acétyl transférases
EGF1	Early growth factor 1		Heparin Binding-Epidermal Growth Factor
EGFR	<i>Récepteur au facteur de croissance épithélial</i>		precursor
EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	HDAC	Histones deacetylases de classe I
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E	HDAC9	Histone deacetylase 9
FIF5B	binding protein 1 Fukarvatic translation initiation factor 5B	HGF	Hepatocyte growin jactor
FII3	Elongation factor PNA polymerase II like 3		Hypoxia maacibie jacior-1 a
ELLS ENO2	Enolgen 2 (agrima nouronal)	nln HmCM7	Protéine de maintenance du minichromosome
ENO2	Enclase 2 (gamma, neuronal)	HMCA2	High mobility group protein
ENO5	Enolase 5 (bela, muscle)	HINGA2	Papillomovirus humains
ENOPHI ENOY2	Enouse-phosphalase 1	HR-HPV	HPV à haut risque HR-HPV.
ENUA2	Ecto-NOA alsuijiae-inioi exchanger 2	HS2ST1	Heparan sulfate 2-O-sulfatransferase 1
	Enithelial protein lost in noonlasm	HSPG	Protéoglycanes à héparane sulfate
	Epimeitai protein tost in neopiasm	HSPG2	Heparan sulfate proteoplycan 2
	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene	hTERT	Transcriptase inverse de la télomérase
ErbB4	homolog 4	HUR	Human antigen r
Erk	Extracellular signal-regulated protein kinase	IAP-2	Inhibiteur d'apoptose 2
ESAM	Endothelial cell Adhesion Molecule	ID	Inhibitor of DNA binding
EAUI	Exonuclease 1	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative
F2K	Coagulation factor II (thrombin) receptor	IFN	helix-loop-helix protein Interféron
FADD	Domaine de mort associée à Fas	TT.I.V	incijeron
		ICF	Factour de croissance apparenté à l'insuline

IGF1	Insuline like growth factor 1	mdm2	Murine double minute 2
IGFBP-3	Igf binding protein 3	MEC	Matrice extracellulaire
п	Interleukine	MHCI	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I MHCI
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	miR	Micros ARN
IL24	Interleukin 24	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
INFAR1	Récepteur 1 à l'inf-α	MMP	Métalloprotéinases matricielles
IRF	Facteur de régulation de l'interféron	MMP14	Matrix metallopeptidase 14 (membrane- inserted)
ISGF-3	Interferon-stimulated gene factor 3	mNET-1	Neuroepithelial cell transforming gene 1
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	MPP5	Membrane-associated palmitoylated protein 5
ITGB2	Integrine beta 2	MR1	Major histocompatibility complex, class I- related
ITGB4	Integrine beta 4	MT1G	Metallothionein 1G
ITGB5	Integrin, beta 5	MT1X	Metallothionein 1X
ITGB6	Integrine beta 6	MUPP1/MPDZ	Multiple PDZ domain protein
JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome) Janus kinases-Signal Transducers and	MYBL2	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
JAK-STAT	Activators of Transcription	MYLK	Myosin light chain kinase
JAM	Junction cell Adhesion Molecule	MYO1E	Myosin IE
JEAP	Protéine semblable à l'angiomotine	NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3
257K9.7	hypothetical protein LOC100129128	NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. Cerevisiae)
KLHDC3	Kelch domain containing 3	NFI	Nuclear factor I
KRAS	homolog	NFIB	Nuclear factor i/b
L1-CAM	L1 cell adhesion molecule	NFIB	Nuclear factor I/B
LAMB2	Laminin, beta 2 (laminin S)	NFIC	Nuclear factor i/c
LAMB2	Laminine beta 2	NFX1-91	Nuclear transcription factor X-box binding 1
LAMB3	Laminine beta 3	NF-ĸB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
Lgl	Lethal giant larvae	NLES	Signal d'exportation du noyau
LHX2	LIM homeobox 2	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
	Lin11 isl-1 & mec-3	NXT2	Nuclear transport factor 2-like export factor 2
	LIM domain only /	ori	Origine de réplication
	Lysyl-oxidase like	p120ctn	Caténine p120
LRP	protein 1 Latent transforming growth factor beta binding	p190RhoGAP/ GRLF1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1
	protein 2 Membrane associated quanylate kingse WW and	PAI-1	Serpine E1
MAGI	PDZ domain containing	PAK1	p21 activated kinase
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase	PAK4	p21(CDKN1A)-activated kinase 4
MAP	Protéine associée aux microtubules	PAR-3	Partition defective-3
MAP3K2	2	PATJ	PALS1-associated tight junction protein
MAP4	Microtubule-associated protein 4	PCAF	p300/CBP-associated factor
MAP4K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	PcG	Groupe polycomb PcG.
МАРК	Mitogen-activated protein kinase	PCPE-1	C-protéinase du collagène
MAR	Attachement à la matrice nucléaire	PDGF	Facteur dérivé de croissance des plaquettes
MASCOT	Protéine semblable à l'angiomotine 2	PDPK1	3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1
MCAM	Melanoma Cell Adhesion molecule	PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 Protein GeranylGaranylTransferace Type I Pate
MCM10	Minichromosome maintenance complex component 10	PGGT1B	subunit

phase S	Phase de synthèse		kinase 1
РІЗК	Phosphotidylinositol-3 kinase	RPA	Protéine de réplication A
PIK3C2A	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha	RRAS2	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
PIK3CD	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide	S100A13	S100 calcium binding protein A13
PIP	Phosphoinositide	SAF-B	Scaffold attachment factor B
РК	Pyruvate kinase	SC35/SFRS2	Splicing Factor arginine/serine-rich 2
PLA2G6	Phospholipase A2, group VI (cytosolic, calcium-	SCEL	Sciellin
ΡΙΑΠ	independent) Plasminogen activator, urokinase	SCF	Stem cell factor
PL D1	Phaspholingsa D1 phosphatidylaboling specific	SCNN1A	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
	Pala like binana 1 (Decembile)	scr	Scrambled
PLKI	Polo-like kindse 1 (Drosopnila) Proteolipid protein 2 (colonic epithelium-	Scrib	Scribble
PLP2	enriched)	SERPINB3	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin),
PNN	Pinin	SFRPINR4	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin),
POLR3G	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kd)		member 4 Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin,
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2B	SERPINE1	plasminogen activator inhibitor type 1), member
PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	SF3A1	Splicing factor 3a, subunit 1, 120 kDa
PPM1G	Protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent gamma isoform	si	Silencing
PPP1CB	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta	SIP-1	Smad interacting protein-1
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)	siRNA	Silencing RNA
	subunit 15A	SmAP1	Stromal membrane-Associated Protein 1
рко	Proteine du retinoblastome Protein kinase, camp-dependent, regulatory.	SMC4	Structural maintenance of chromosomes 4
PRKAR2A	type II, alpha	SNAI2	Slug
PSD95	Dlg4 un autre membre de la famille Dlg	SNAPC1	Small nuclear RNA activating complex,
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	SOCS-1	polypeptide 1, 43 kDa Suppresseur de signal cytokine 1
PTPN13	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 13	SPC1	Suppresseur de signal Cylokine 1
PTPN21	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	SRCI	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1
RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	SKD5A1	(3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family	SRPK2	SFRS protein kinase 2
RAB38	RAB38, member RAS oncogene family	STAC	SH3 and cysteine rich domain
Rac1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)
RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	STK38L	Serine/threonine kinase 38 like
RALB	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B</i> (<i>ras related; GTP binding protein</i>)	STYK1	Serine/threonine/tyrosine kinase 1
RBM47	RNA binding motif protein 47	SWI-SNF	Switch/Sucrose nonfermentable
RC3H2	Ring finger and CCCH-type zinc finger domains 2	TACE	Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme
RCAN2	Regulator of calcineurin 2	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
RCAN3	RCAN family member 3	TAF5	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 100 kDa
RECK	Reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs	Tag	Antigène grand T
REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene	TFIID	Transcriptor factor
RFC3	Replication factor C (activator 1) 3, 38 kDa	TFPI-2	Tissu factor pathway inhibitor-2
Rho	Ras homolog	TFR2	Transferrin receptor 2
RhoA	Ras homolog gene family member A	TGFB2	Transforming growth factor beta 2
RIN2	Ras and Rab interactor 2	TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa
RING finger/UBR	Really Interesting New Gene finger/ ubiquitine	TGFBR3	Transforming growth factor, beta receptor III
ROCK1	recognition Rho-associated, coiled-coil containing protein	TGF-β	Le facteur de croissance transformant beta

TGF-βRI	Récepteur I du TGF-β	TUBB	Tubulin, beta
THBS1	Thrombospondin 1	Tyk2	Tyrosine kinase 2
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	UBE2J1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteases	UBE3B	Ubiquitin protein ligase E3B
TIP-1	Tax interfacting proteins	USF	Upstream transcription factor
TLL2	Tolloid-like 2	VADS	Voies Aériennes et Digestives Supérieures
TLR	Récepteurs de types Toll	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TLR3	Toll-like receptor 3	VEGER2	Récepteur-2 du facteur de croissance
TM7SF2	Transmembrane 7 superfamily member 2	VEGIN2	endothéliale vasculaire
TMDIM1	Transmembrane BAX inhibitor motif containing	WAPAL	Wings apart-like homolog (Drosophila)
	1	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
TMEM186	Transmembrane protein 186	WNT7A	Wingless-type MMTV Integration site family
TMEM30A	Transmembrane protein 30A	WINITA	member 7A
TMEM41B	Transmembrane protein 41B	XRCC1	X-ray repair complementing dejective repair in Chinese hamster cells 1
TNF R1	Récepteur 1 du facteur nécrosant de tumeur	YY1	Yin- Yang-1
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	ZBTB43	Zinc finger and BTB domain containing 43
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	ZBTB7A	Zinc finger and BTB domain containing 7A
TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily,	ZEB	Zinc E-box binding factor
TNFa	Facteur nécrosant des tumeurs a	ZMYM6	Zinc finger, MYM-type 6
TP53AP1	TP53 activated protein 1	ZNF14	Zinc finger protein 14
TRAIL	TNF-Related Inducing Apoptosis Ligand	ZO-1	Zonula occludens 1
TRENA WILCHI -H	Three prime repair exonuclease 2 /// UCHL5	ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid-binding protein
TREX2 /// UCHL5II	interacting protein	ZSCAN12	Zinc finger and SCAN domain containing 12
TRIAP1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1		Line jinger und berny domain comaining 12
TSPAN1	Tetraspanin 1		
TSPAN2	Tetraspanin 2		

Introduction générale

Selon le modèle de tumorigenèse de Fearon (**Fearon & Vogelstein** 1990), l'apparition d'une tumeur nécessite l'accumulation de plusieurs mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou de proto-oncogènes. Plus récemment Hanahan et Weinberg (**Hanahan & Weinberg** 2000) ont proposé un modèle de cancérogenèse dans lequel sont définies six étapes principales acquises dans un ordre variable. Elles entraînent successivement l'apparition de cellules tumorales dans un foyer primaire, sa croissance sous la forme d'un carcinome *in situ*, enfin son envahissement des tissus sous-jacents en carcinome infiltrant. Ces six étapes sont l'autarcie en signaux de croissance, la résistance aux signaux antiprolifératifs, l'échappement à la mort cellulaire programmée, un potentiel illimité de division, une angiogenèse continue, la capacité à envahir les tissus voisins et la formation de métastases.

Les papillomavirus humains à haut risque (HPV-HR) sont des virus oncogènes responsables de la quasi-totalité des cancers du col de l'utérus et également d'autres cancers de la sphère anogénitale. Ils sont de plus retrouvés dans 20 à 50% des cancers de l'oropharynx, en particulier les carcinomes des amygdales palatines. Les mécanismes de la cancérogenèse HPV-induite sont bien définis, l'infection par les HPV-HR entraînant l'acquisition de 3 des traits fondamentaux définis par Hanahan : les cellules infectées sont indépendantes vis-à-vis de la régulation de la prolifération, résistantes à l'apoptose et capables de se multiplier indéfiniment. L'acquisition de ces caractéristiques nécessite l'inhibition d'un nombre relativement restreint de protéines cellulaires par les oncoprotéines virales E6/E7 des HPV-HR mais de nombreuses autres cibles cellulaires ont été mises en évidence. La dégradation de ces cibles pourrait participer à la progression tumorale qui se définit par la cancérogenèse, l'invasion tumorale et la formation de métastase.

Ainsi, le but de notre étude est de nous intéresser au rôle des oncoprotéines virales E6/E7 sur l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules tumorales.

Dans un premier temps, dans une étude clinique de 58 cas de carcinomes de l'oropharynx, nous avons recherché la présence des HPV dans le tissu tumoral et leur influence sur certaines cibles cellulaires. Ainsi les caractéristiques virales de l'infection ont été examinées dans ces carcinomes et nous avons déterminé si la présence du virus était associée à des marqueurs moléculaires cibles des oncoprotéines E6/E7. En particulier nous avons déterminé l'impact d'une forte consommation d'alcool et de tabac sur la fraction HPV positive dans une série de cancers de l'oropharynx et la relation avec le pronostic après traitement. La latence qui sépare l'apparition d'un cancer invasif après une infection est potentiellement dépendante de l'activation d'autres voies oncogéniques qui agiraient en synergie ou en complément des actions du virus. C'est pourquoi nous avons étudié si la présence d'autres agents carcinogène, comme l'alcool et le tabac, pouvait influencer le développement des tumeurs de l'amygdale associées aux HPV.

Dans un deuxième temps par des études *in vitro*, en modulant l'expression des oncoprotéines E6/E7 soit par surexpression soit par inhibition, nous avons étudié l'expression des protéases et des protéines des complexes de jonctions. Nous en avons déterminé les effets sur le phénotype invasif des lignées tumorales. L'expression continue des oncoprotéines virales est nécessaire au maintien du phénotype des cellules transformées. Une des caractéristiques des lésions persistantes aux HPV est la surexpression de ces oncoprotéines, ce phénomène étant attribué à l'intégration d'une partie du génome viral dans la cellule et à la perte d'inhibition exercée sur le promoteur viral après intégration. Les changements d'expression des oncoprotéines E6/E7 ont dont un rôle important dans la progression tumorale. D'autre part les processus qui sont à l'origine de l'apparition d'un carcinome infiltrant peuvent être classés en

deux grandes catégories que sont la perte des jonctions intercellulaires et l'acquisition d'une capacité à dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Ces deux processus sont en fait interdépendants. La perte des complexes de jonction a pour effet de libérer des protéines du cytoplasme qui peuvent agir comme facteur de transcription sur l'expression de protéases capables de dégrader la MEC. Les protéases elles-mêmes sont capables de cliver des molécules d'adhérence et ainsi de participer à la disparition de l'adhérence intercellulaire.

Ainsi nous avons cherché à mettre en évidence, à la fois par une étude clinique et par des études *in vitro* les mécanismes et processus qui sont à l'origine ou qui contribuent à la transformation de carcinomes *in situ* en carcinomes invasifs en relation avec la présence des HPV et en particulier avec l'expression des oncoprotéines virales E6/E7.

I Cancers des voies aériennes et digestives supérieures

Les cancers des voies aériennes et digestives supérieures (VADS) ne représentent pas une entité spécifique mais forment une catégorie assez large de cancers regroupant des tumeurs aux origines anatomiques aussi variées que les os du crâne et de la face, les tissus mous, les glandes salivaires, la peau ou encore les muqueuses. Néanmoins dans 90% des cas, ce sont des carcinomes épidermoïdes qui ont pour origine l'épithélium des fosses nasales, de la cavité buccale du pharynx ou du larynx (**Cognetti et al.** 2008 ; **Marur & Forastiere** 2008 ; **Pai & Westra** 2009). Les carcinomes de l'oropharynx seront principalement abordés dans cette introduction.

I.A. Voies aériennes et digestives supérieures

Les voies aériennes et digestives supérieures sont constituées de la cavité buccale, des fosses nasales, du pharynx et du larynx. En leur centre, le pharynx constitue un véritable carrefour d'échange entre les voies aériennes et digestives. Il intervient ainsi dans des fonctions aussi



Figure 1 Coupe sagittale médiane de la tête et rapports anatomiques des différentes cavités des voies aéro-digestives supérieures.



Figure 2 Situation anatomique des amygdales et représentation schématique de l'anneau de Waldeyer.

essentielles que la déglutition, la respiration mais également dans des fonctions « sociales » comme l'olfaction, la gustation et la phonation (figure 1).

I.A.1. Aspects anatomiques

Le pharynx est un organe musculo-membraneux formé de haut en bas par 3 segments que sont le rhino-pharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx. Le rhinopharynx s'ouvre en haut et en arrière vers les fosses nasales et les trompes d'Eustache et répond en arrière à l'arc antérieur de l'atlas. L'oropharynx s'étend du bord libre du palais au repli glosso-épiglotique. Il comprend la base de la langue, les amygdales (ou tonsilles), le palais mou, l'uvule le mur postérieur du pharynx et le mur latéral du pharynx. Les amygdales palatines font partie de l'anneau de Waldeyer composé également des amygdales linguales, tubaires et adénoïdes (figure 2). L'hypopharynx enfin est interposé entre l'oropharynx et l'œsophage cervical s'étendant du niveau de l'os hyoïde, en haut, au sphincter supérieur de l'œsophage en regard de la 6e vertèbre cervicale, en bas. Il est situé en arrière du larynx qu'il circonscrit partiellement de chaque côté. L'hypopharynx est divisé en une paroi pharyngée postérieure, les deux sinus piriformes et la région rétrocricoïdienne.

I.A.2. Aspects histologiques

La cavité orale est recouverte d'un épithélium malpighien dont l'épaisseur et la kératinisation peuvent varier en fonction de l'exposition aux forces de mastication ou aux agents irritants (**Pai & Westra** 2009). Comme tous les épithéliums, il repose sur une membrane basale qui fait office de barrière entre l'épithélium et le tissu conjonctif. Le pharynx constitue un espace de transition entre les épithéliums respiratoires des cavités nasales et du rhinopharynx, pseudostratifié et cilié, et l'épithélium de la cavité buccale et des voies digestives. La muqueuse qui recouvre les amygdales linguales et palatines est particulière par sa relation intime avec le tissu lymphoïde sous-jacent (**Perry** 1994). Les amygdales du cercle de

Waldeyer sont un regroupement de tissus lymphoïde sous muqueux qui protègent les VADS et servent de première ligne de défense contre les agents pathogènes contenus dans l'air ou les aliments ingérés. La surface des amygdales est augmentée par la présence de nombreuses cryptes en cul de sac qui s'étendent dans toute sa longueur (**Abbey & Kawabata** 1988). Des portions des cryptes tonsillaires sont recouvertes d'un épithélium squameux réticulé qui est structuré de façon à permettre un échange facilité des agents antigènes de l'environnement extérieur avec le tissu lymphoïde. De plus la couche cellulaire basale est incomplète et la lame basale qui la soutient est interrompue par endroits et poreuse ce qui permet un passage direct des lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). La couche cellulaire intermédiaire de l'épithélium est également imprégnée de lymphocytes et de CPA. La couche cellulaire superficielle est fine et fragile, sa desquamation complète à certains endroits exposant l'environnement intérieur de l'amygdale aux pathogènes extérieurs.

I.B. Carcinomes des VADS

I.B.1. Facteurs de risques

L'exposition au tabac et à l'alcool est de loin le facteur de risque le plus important à l'origine de l'apparition de cancer des VADS. Des consommateurs réguliers de tabac ont 5 à 25 fois plus de risque de développer un carcinome que les non fumeurs (**Goldenberg et al.** 2004). La nicotine et les hydrocarbones aromatiques polycycliques sont directement responsables des effets génotoxiques de la fumée de cigarette. L'alcool est un facteur aggravant et synergique de la consommation de tabac. L'alcool n'est pas directement carcinogène mais joue sans doute un rôle de solvant des agents carcinogènes du tabac. Ses métabolites, les acétaldéhydes, forment des adduits à l'ADN (acide désoxyribonucléique) perturbant sa synthèse et sa réparation (**Marur & Forastiere** 2008).

Par ailleurs de nombreuses études épidémiologiques ont apporté la preuve du rôle carcinogène des papillomavirus humains (HPV) dans les cancers de l'oropharynx (**Andrews et al.** 2009 ; **Dahlstrand & Dalianis** 2005 ; **D'Souza et al.** 2007 ; **Psyrri & DiMaio** 2008 ; **Syrjänen** 2004). Ces carcinomes associés aux HPV touchent plutôt une population jeune et sans habitude de consommation alcoolo-tabagique, ils sont abordés plus en détails par la suite.

I.B.2. Epidémiologie

Les cancers des VADS représentent environ 650 000 nouveaux cas dans le monde et à peu près 350 000 décès ce qui les place au sixième rang des cancers les plus fréquents (**Argiris et al.** 2008). La France est particulièrement touchée avec 12 700 cas en 2005 (78% chez des hommes) pour 4000 décès. Un recul est néanmoins enregistré depuis ces dernières 25 années avec une baisse de 2,2% de 1980 à 2005 et surtout de 5% entre 2000 et 2005. Cette baisse est attribuée à une moindre consommation d'alcool et de tabac (**Belot et al.** 2008). En revanche, l'incidence des carcinomes de la base de la langue et de l'amygdale palatine est en augmentation a priori du fait de la recrudescence des carcinomes associés aux HPV (**Sturgis & Cinciripini** 2007).

I.B.3. Les cancers des VADS

Les lésions néoplasiques dans lesquelles des phénomènes d'invasion du tissu sous-épithélial apparaissent, sont désignées comme dysplasies squameuses. Les changements observés incluent une activité mitotique accrue, un accroissement de la taille du noyau, une organisation cellulaire anormale. Ces altérations sont gradées en fonction de leur sévérité. Une atypie limitée au premier tiers de l'épithélium est considérée comme une dysplasie légère, au deux tiers une dysplasie modérée et lorsqu'elle touche toute l'épaisseur de l'épithélium, on parle alors de dysplasie sévère ou carcinome *in situ*. Avec la progression, le carcinome *in situ* franchit la membrane basale et infiltre le tissu conjonctif sous-jacent. Dans



Figure **3** Progression phénotypique des cancers des VADS. Evolution histologique illustrée par des marquages hématoxyline et éosine sur coupe (x200) (d'après Argiris, 2008).

les stades avancés de la croissance tumorale, le carcinome peut envahir les muscles squelettiques, les os du crâne ou la peau du visage. L'invasion des cellules peut être associée à des extensions le long des nerfs et peut emprunter les espaces lymphatiques (figure 3).

D'apparence microscopique variable, les carcinomes épidermoïdes des VADS sont la plupart du temps moyennement différenciés. Les carcinomes épidermoïdes de type basaloïde sont identifiés par leur morphologie distinctive et leur caractère très agressif. Les carcinomes induits par les HPV présentent également ces caractéristiques. Cependant la distinction entre des carcinomes HPV négatifs et HPV positifs serait importante pour le diagnostic et nécessaire au choix thérapeutique de part les particularités de ces derniers comme exposé par la suite (**Pai & Westra** 2009 ; **Wain et al.** 1986 ; **El-Mofty & Patil** 2006 ; **Gillison et al.** 2000).

L'initiation et la progression des cancers des VADS est, comme le définit le modèle de tumorigenèse actuellement retenu, un processus complexe et multi-étapes qui nécessite l'acquisition progressive d'altérations génétiques et épigénétiques (**Fearon & Vogelstein** 1990). Les voies de signalisation de p53 et pRb (protéine du rétinoblastome) sont la plupart du temps altérées dans les carcinomes des VADS. La voie de signalisation de p53 contrôle la croissance cellulaire en régulant la progression du cycle et la réponse au stress par l'apoptose.

Une perte d'hétérozygotie au niveau de la région chromosomique 17p et des mutations ponctuelles de Tp53 sont retrouvées dans environ 50% des cas de carcinomes de VADS. Le gène le plus fréquemment ciblé de la voie pRb est CDKN2A ($p16^{INK4}$) un inhibiteur de kinase dépendante de cycline qui inhibe les cyclines 4 et 6 et empêche le cycle cellulaire de se poursuivre. L'inactivation de CDKN2A peut être la résultante de méthylation du promoteur, de mutation du gène ou de perte d'hétérozygotie dans la région 9p21 (**Deshpande & Wong** 2008 ; **Partridge et al.** 2007). La cycline D1, un proto-oncogène qui active la progression cellulaire, est également augmentée dans 30 à 50% des cancers des VADS. Enfin plus récemment, le rôle du récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR) a été mis en évidence dans les cancers des VADS et est augmenté dans plus de 95% des cas (**Argiris et al.** 2008).

I.C. Cancers des VADS associés aux HPV

Les carcinomes HPV positifs sont peu différenciés, souvent basaloïdes et présentent un stade avancé (**Psyrri & DiMaio** 2008). Les HPV sont surtout présents dans les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx avec une incidence de l'ordre de 25%, cette incidence pouvant atteindre 50% au niveau de l'amygdale palatine et de la base de la langue (**Dahlstrand & Dalianis** 2005). Une étude récente réalisée dans le comté de Stockholm a relevé des chiffres dépassant les 90% et les auteurs estiment que dans les années à venir le cancer de l'amygdale pourrait être à 100% HPV induit (**Näsman et al.** 2009). D'autre part l'incidence des cancers de la base de la langue et de l'amygdale palatine a augmenté de 1973 à 2001, en particulier chez les hommes et les femmes jeunes, alors que l'incidence des cancers des autres sites des VADS a diminué (**Sturgis & Cinciripini** 2007). Plusieurs études suggèrent que l'infection à l'HPV serait dépendante des pratiques sexuelles (**D'Souza et al.** 2009 ; **Gillison et al.** 2008 ; **Schwartz et al.** 1998). De même que pour les cancers du col utérin les HPV16 et 18 sont les types les plus fréquemment retrouvés, néanmoins la prévalence d'HPV16 est supérieure à celle observée dans les cancers cervicaux et dépasse les 90% dans les carcinomes de l'amygdale infectés par HPV (**Gillison et al.** 2000 ; **Weinberger et al.** 2006).

L'autre analogie avec les cancers du col de l'utérus est l'apparition privilégiée de lésions cancéreuses associées aux HPV aux zones de fragilité mécanique fréquemment lésées, particulièrement propices à la pénétration du virus dans les cellules basales. Dans le cas des cancers de l'oropharynx il s'agit de l'épithélium qui est en remaniement constant réalisé dans le but de permettre la présentation des antigènes au système immunitaire. Dans le cas des cancers cervicaux il s'agit de la zone de transformation, qui correspond à la jonction entre les épithéliums exocervical et endocervical.

Le sous-groupe de carcinomes HPV positifs présente une signature moléculaire caractéristique, probablement associée à l'hyperexpression des oncoprotéines virales E6/E7. Ces cancers présentent le plus souvent une surexpression de p16 ainsi qu'une diminution de pRb et de la cycline D1 (**Hafkamp et al.** 2009). L'expression de p53 n'est en revanche pas liée significativement à la présence d'HPV (**Smith et al.** 2008b). L'intégration du génome viral dans les cellules n'a pas été clairement décrite, une étude plus ancienne faisait état d'une proportion élevée de formes épisomales (**Mellin et al.** 2002) mais des travaux plus récents mettent en évidence une forte proportion de formes intégrées seules ou associées à des formes épisomales (**Hafkamp et al.** 2003; **Kuo et al.** 2008).

Enfin ces carcinomes HPV positifs se distinguent par une meilleure survie globale après traitement par radiothérapie, ces tumeurs étant plus radiosensibles (Lindel et al. 2001). Le sous-groupe présentant la meilleure survie globale après traitement est constitué des carcinomes HPV positifs et p16 positifs (Weinberger et al. 2009 ; Smith et al. 2008a). De

même les carcinomes positifs aux HPV et présentant une absence de marquage ou de mutation de p53 sont de meilleur pronostic (**Smith et al.** 2008b). Une meilleure survie globale a également été mise en évidence pour les patients présentant des carcinomes HPV positifs avec une plus forte charge virale (**Mellin et al.** 2002). Cependant la même étude observe une absence d'intégration du génome d'HPV alors que Kuo et al. ont récemment mis en évidence une association entre l'intégration et une meilleure survie globale (**Kuo et al.** 2008).



Figure 4 Schéma de la structure du génome d'HPV16. Les phases ouvertes de lecture précédées d'un E codent les protéines précoces (leurs principales fonctions sont indiquées), les phases ouvertes de lecture précédées d'un L codent les protéines tardives de structure.

L'association des HPV avec un meilleur pronostic est attribuée à la particularité de la protéine virale oncogénique E6 de dégrader en partie p53 et peut-être ainsi conserver certains de ses effets pro-apoptotiques réenclenchés au moment du traitement (**Dahlstrand & Dalianis** 2005).

II Papillomavirus et cancérogenèse viro-induite

II.A. Aspects structuraux et moléculaires

II.A.1. Structure du génome

Les papillomavirus humains sont des petits virus à ADN bicaténaire circulaire et non enveloppé dont la taille est d'environ 55nm de diamètre (**Seedorf et al.** 1985).

L'ADN viral avoisine les 8000pb et peut être subdivisé en trois parties (figure 4).

- Une partie qui code les protéines de régulation non structurales dites précoces et d'environ 4Kb;
- Une partie qui code les protéines de structure dites tardives faisant 3Kb ;
- Enfin une partie représentant la région variable non codante LCR (long control region) de taille comprise entre 400 et 1000pb.

Ces trois régions sont séparées par deux sites de polyadénylation : un site précoce A_E et tardif A_L .

La partie précoce du génome encode 6 phases ouvertes de lecture qui sont E1, E2, E4, E5, E6 et E7. E1 et E2 jouent un rôle important dans la réplication virale (**Lambert** 1991). E5 mais surtout E6 et E7 sont les protéines responsables de l'immortalisation et de la transformation des cellules infectées (**DiMaio & Mattoon** 2001 ; **Mantovani & Banks** 2001 ; **McLaughlin-Drubin & Münger** 2009). La partie tardive (L) encode 2 phases ouvertes de lecture traduites en L1 et L2, respectivement les protéines majeure et mineure de structure (**DiMaio & Mattoon** 2001).



Figure **5** Schéma de l'épissage alternatif précoce des transcrits d'HPV16. P97 et P670 désignent les promoteurs, Ae représente le site précoce de polyadénylation (d'après Zheng, 2006).

Le génome des HPV16 contient deux promoteurs majeurs :

- le promoteur P97 en amont de E6 et qui est responsable de la synthèse de presque tous
 les gènes précoces (Smotkin & Wettstein 1986);
- le promoteur P670 qui se situe dans le cadre ouvert de lecture de E7 et qui est responsable de l'expression des gènes tardifs (**Grassmann et al.** 1996).

Les transcrits précoces ont tous 3 exons et 2 introns, ils peuvent être épissés alternativement et sont polyadénylés au niveau du nucléotide 4215. Les introns peuvent être épissés en 3' aux nucléotides 409, 526 ou 742 dans le premier intron (**Zheng et al.** 2004), et en 3' aux nucléotides 2582, 2709 et 3358 dans l'intron 2 (**Doorbar et al.** 1990 ; **Sherman & Alloul** 1992 ; **Sherman et al.** 1992). L'épissage entraîne une production d'au moins 14 espèces de transcrits d'ARNm (acide ribonucléique messager) avec des potentiels codants différents (figures 5 et 9).

II.A.2. Structure du virion

La capside des HPV forme un icosaèdre constitué uniquement par deux protéines, la protéine majeure de capside L1 et la protéine mineure de capside L2 (**Hagensee et al.** 1993). La capside est composée de 360 molécules de L1, le nombre de L2 incorporé en revanche n'a pas été exactement défini mais est supposé être dans un rapport stœchiométrique avec L1 de 30 :1 soit 12 molécules de L2 par capside (**Buck et al.** 2008 ; **Pereira et al.** 2009) (figure 6).

La protéine L1 contient toutes les informations nécessaires à l'assemblage de la capside (**Casini et al.** 2004). Cependant L'ajout de L2 pour la formation de capside *in vitro*, permet de limiter les variations de taille. L2 est aussi impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral. Le génome des HPV s'associe avec les histones cellulaires pour former des nucléosomes, les minichromosomes qui en résultent pouvant servir d'échafaudage pour la formation de la capside, l'ensemble étant facilité par la présence de L2 (**Casini et al.** 2004).



Figure 6 Diagramme schématique de la structure de la capside formée de l'assemblage de 72 capsomères disposés de façon pentavalente ou hexavalente (A). Image de virions de BPV en microscopie électronique (B). Mode d'assemblage des protéines de la capside (C) (d'après Pereira, 2009).

II.B. Classification des Papillomavirus

Le terme papillomavirus est formé de la contraction du latin *papilloma* dérivé de *papula* et signifiant bouton et du suffixe grec *–ome* qui désigne son caractère tumoral.

Les papillomavirus ne sont pas regroupés au sein d'un ordre mais appartiennent à la famille des *papillomaviridae* (**Fauquet et al.** 2005). Ce sont des virus très anciens qui ont évolué parallèlement à l'hôte qu'ils infectent. De ce fait la nomenclature pour les désigner consiste à rajouter au suffixe PV (papillomavirus), l'abréviation désignant l'hôte infecté dérivée du terme anglais. Ainsi on parle d'HPV (human papillomavirus), de CRPV (cottontail rabbit papillomavirus), de BPV (Bovine papillomavirus) etc.

En plus de leur spécificité d'hôte, les papillomavirus présentent une spécificité tissulaire. Ils sont épithéliotropes stricts et infectent les épithéliums muqueux comme cutanés. Leur tropisme tissulaire et la caractérisation de leur pouvoir pathogénique ont longtemps servi de classification cependant cette méthode ne reflétait pas correctement l'histoire de l'évolution des PV et leurs similitudes génétiques.

Devant le nombre de PV recensés, plus de 200 actuellement dont environ 100 humains, il était important d'établir les moyens de les ordonner. L'arbre phylogénétique réalisé (figure 7) (**de Villiers et al.** 2004) repose sur la représentation graphique obtenue par des algorithmes de la différence entre tout ou partie du génome des PV.

La phase ouverte de lecture de L1 est en particulier utilisée car très conservée entre les différents types de PV. Un minimum de 43 à 60% d'identité de séquence permet de distinguer un genre, entre 60 à 70% une espèce, entre 71 à 89% un type, entre 90 à 98% un sous-type. Enfin moins de 2% de différences distinguent les variants (**Bernard et al.** 2006).



Figure 7 Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la protéine de structure L1 de 118 Papillomavirus. (A) Distribution des 118 papillomavirus selon leur pourcentage d'homologie de séquence de L1 (B) (d'après de Villiers, 2004).
Dans le cas des variants, on désigne comme prototype la séquence génomique qui sert de référence par exemple pour E6. Un seul changement nucléotidique suffit à définir un variant. Des études menées sur de nombreux types d'HPV ont permis de mettre en évidence qu'il existait un nombre relativement restreint de variants pour chaque type d'HPV (par exemple entre 20 et 100) et que les variants étaient d'autant plus éloignés qu'ils avaient évolué dans des groupes ethniques très longtemps éloignés. Ainsi sont définis 5 « clusters » majeurs en fonction de leur origine géographique, européen (E), asiatique (As), asiatique américain (AA), nord américain (NA) et africain 1 et 2 (Af1 et Af2).

Le genre qui nous intéressera plus particulièrement dans la suite de l'étude est le genre α -papillomavirus contenant dans l'espèce 9 le type HPV16. Enfin, il est à préciser que par facilité les termes haut risque et bas risque sont fréquemment employés pour désigner les HPV à pouvoir oncogène ou non. HPV16 est dit à haut risque oncogène et infecte les muqueuses.

II.C. Régulation de l'expression du génome d'HPV

II.C.1. Contrôle de la transcription des gènes du papillomavirus

L'origine de réplication du génome viral est située dans la LCR, entre les POL L1 et E6. Cette origine de réplication est également le site de liaison de nombreux facteurs de transcription qui régulent l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II.

II.C.1.1. La protéine virale E2 régulateur de la transcription des HPV La protéine E2 est relativement bien conservée au sein des papillomavirus avec une identité de séquence de 35% entre ses domaines. D'une taille avoisinant les 45 kDa elle peut être subdivisée en trois parties (**McBride et al.** 1991).

- Une partie N-terminale d'environ 200 acides aminés et qui constitue le domaine de transactivation de la protéine ;
- Une région charnière de longueur variable ;
- Un segment C-terminal d'environ 70 acides aminés participant à la liaison à l'ADN.

Elle est présente en tant que dimère dans les cellules infectées et reconnait spécifiquement la séquence palindromique ACCgNNNNcGGT. Les bases nucléotidiques indiquées en minuscules permettent une meilleure liaison de E2 mais peuvent différer. La longueur de la partie variable NNNN est strictement conservée dans tous les papillomavirus même si la séquence elle-même peut-être variable (**Hegde** 2002).

Le domaine de reconnaissance à l'ADN de E2 représente une nouvelle classe de structure pour les protéines se liant à l'ADN appelée DBD (DNA binding domain). La formation du dimère crée un tonneau β , chacune des deux sous-unités apportant la moitié du tonneau avec 4 brins de feuillets β anti parallèles, la structure est d'une très grande stabilité.

Il existe plusieurs copies de sites de liaison à E2 au sein des régions de régulation des divers papillomavirus, néanmoins les HPV muqueux n'en présentent que 4 (figure 8). Les distances qui séparent ces sites de liaisons sont conservées. Il y a 1 à 2 nucléotides entre les séquences de liaison un et deux (les séquences les plus proximales du promoteur), 64 nucléotides séparent le deuxième site de liaison avec le troisième, enfin 320 nucléotides sont présents entre la troisième séquence et la quatrième la plus distale. La distance séparant la première séquence reconnue par E2 de la boîte TATA est également bien conservée et d'une longueur de 3 nucléotides dans les HPV muqueux (**Thierry** 2009).

Il existe 4 éléments de réponse en cis dans le promoteur de E6 permettent la mise en place d'un « interrupteur » à 4 voies. On trouve un site de liaison pour sp1 qui est superposé à un site de liaison de E2 et un second site de liaison pour E2 qui se superpose à l'emplacement de la boîte TATA, le site de liaison de TFIID (transcriptor factor). L'occupation alternative de ces différents sites permet les multiples niveaux d'activité du promoteur (**Bernard** 2002). Dans les cellules épithéliales indifférenciées (et dans les fibroblastes), le site Sp1 est occupé par un facteur connexe à Sp1 à savoir Sp3, la liaison de ce dernier ne permet pas d'activer le promoteur de E6 (**Apt et al.** 1996). Dans les cellules épithéliales différenciées, le promoteur est activé par Sp1 et par l'intermédiaire de TFIID ainsi que l'ensemble des facteurs de la machinerie de transcription qui se lient à la boîte TATA et permettent l'activité maximale du promoteur (**Gloss & Bernard** 1990). Les transcrits qui en résultent encodent le gène E2 (en aval de E6 et E7) et la protéine E2 ainsi traduite peut se lier au site de reconnaissance distal et déplacer le facteur de transcription Sp1. La liaison a pour effet de réduire l'activité du promoteur de E6, E2 à cette position étant un moindre activateur que Sp1 (**Demeret et al.** 1997; **Tan et al.** 1992).

Quand des concentrations élevées de E2 sont atteintes, cette dernière n'a plus seulement pour effet de déplacer Sp1 mais empêche également la fixation de TFIID ce qui entraîne l'inhibition effective du promoteur. Cette inhibition peut également avoir lieu par la fixation du produit d'épissage E8-E2 (un super inhibiteur) dont le domaine activateur de la transcription est manquant (**Stubenrauch et al.** 2000).

Le génome de l'HPV16 est fréquemment intégré dans les lésions malignes. La rupture de la structure épisomale avant intégration s'effectuant le plus souvent en aval de E7, laissant la POL de E7 intacte mais fragmentant celle de E2. Ainsi le contrôle de la transcription par E2 est perdu et la surexpression de E6/E7 qui en résulte est considérée comme contribuant au phénotype plus agressif des cellules cancéreuses infectées (**Daniel et al.** 1995 ; **Francis et al.** 2000 ; **Schwarz et al.** 1985).

II.C.1.2. Activateurs de la transcription du génome viral

II.C.1.2.1 Les activateurs épithéliaux spécifiques des HPV muqueux

Pour que le promoteur des HPV puisse pleinement exercer son activité, il doit être stimulé par un activateur (enhancer), dans le cas présent il s'agit d'un segment de 400 pb en amont du promoteur de la région régulatrice dont il est séparé par un segment de 100 pb qui contient l'origine de réplication ainsi que la séquence silencer (figure 8). Les séquences activatrices sont des regroupements de sites de liaison à des facteurs de transcription qui activent le promoteur à distance (**Bernard** 2002).

La séquence activatrice des HPV muqueux est uniquement fonctionnelle dans les épithéliums, c'est sans doute la raison pour laquelle les HPV n'infectent pas les autres tissus (**Cripe et al.** 1987). Il est logique de penser que cette particularité découle directement de la nature des protéines et marqueurs exprimés dans ces cellules épithéliales et de la machinerie de transcription qui y est présente, pourtant à ce jour aucun facteur de transcription ou mécanisme n'ont encore été strictement identifiés. Une explication possible réside dans la composition des facteurs de transcription qui sont formés de sous-unités et dont l'assemblage est différent selon les tissus.

AP1 (activator protein 1) est composé de deux sous-unités en homo ou hétérodimère qui appartiennent à la famille des protéines Jun (Jun appelé auparavant c-Jun, JunB, JunD) et des protéines Fos (Fos auparavant désigné par c-Fos, Fos-B, Fra-1 et Fra-2). Des membres de la famille ATF (ATFa, ATF-2, ATF-3) ainsi que de la famille JDP (JDP-1, JDP-2) peuvent également former des dimères préférentiellement avec Jun (Karin et al. 1997). En tout plusieurs centaines de combinaisons sont possibles (Chinenov & Kerppola 2001).

Il existe un ou plusieurs sites de reconnaissance d'AP1 dans la séquence régulatrice des HPV muqueux (**Chong et al.** 1990) et AP1 participe également au contrôle de la transcription de gènes épithéliaux comme les cytokératines K1, K14 et K18 (**Sinha et al.** 2000). AP1 est ainsi considéré comme le plus grand contributeur à la transcription de l'ADN viral des HPV (**O'Connor et al.** 2005). Dans les cellules épithéliales où les HPV sont activement transcrits, il est principalement composé du dimère JunB et FRA-2 (**Thierry et al.** 1992).

Il existe des groupements de séquences TTGGCT/A au sein des promoteurs d'HPV qui sont des séquences de liaisons semi-palindromique pour le facteur de transcription NFI (nuclear factor I) (**Gloss et al.** 1989b). Des expériences de compétitions et de mutations ont montré que NFI était un activateur important de la séquence activatrice des HPV mais les raisons pour lesquelles ne sont retrouvées que des demies séquences palindromique n'ont pas encore été élucidées (**Gloss et al.** 1989a). D'autre part dans les cellules épithéliales NFI est principalement composé de sous-unités dérivées du gène NFI-C et il active la transcription des HPV (**Apt et al.** 1993). En revanche dans les cellules non épithéliales, NFI est principalement composé des sous-unités dérivées du gène NFI-X. Cette composition n'active pas la transcription virale (**Apt et al.** 1994).

TEF-1 est en plus d'AP1, NFI et Sp1 (au niveau du promoteur) un autre facteur de transcription impliqué dans la spécificité épithéliale. Sa liaison à l'ADN nécessite un cofacteur qui ne possède pas de spécificité cellulaire (**Ishiji et al.** 1992).

D'autres facteurs de transcription encore ont été mis en évidence, Oct-1 par exemple se lie à la séquence activatrice mais a été montré comme ayant soit une action activatrice, soit une action répressive (**Sibbet et al.** 1995 ; **O'Connor & Bernard** 1995).



Figure **8** Schéma global des différents facteurs régulant la transcription des gènes d'HPV16 (d'après bernard, 2002).

II.C.1.2.2 Régulation par les stéroïdes

La séquence activatrice de certains HPV contient des sites de liaison pour les récepteurs de la progestérone et du glucocorticoïde. Ils reconnaissent tous les deux une séquence palindromique de 15 nucléotides (**Chan et al.** 1989). Ainsi le traitement par glucorticoïde ou progestérone, par le biais du promoteur E6, accroît la transformation de cellules en culture infectées par HPV (**Pater et al.** 1988). Ces études *in vitro* soulèvent la possibilité que des traitements de longue durée par des doses croissantes de progestérone chez des femmes pourraient avoir pour conséquence d'accroître le risque de développer un cancer cervical (**von Knebel Doeberitz et al.** 1997).

II.C.1.3. Autres systèmes de régulation de la transcription

II.C.1.3.1 Régulation de la transcription par le complexe du nucléosome

Chez les eucaryotes l'ADN est organisé sous la forme de chromatine, soit l'assemblage d'environ 160 pb d'ADN double hélice enroulée autour d'une structure octogonale formée de protéines appelées histones. La structure qui en résulte est appelée nucléosome et ces nucléosomes sont liés les uns aux autres par des segments d'ADN libre, on parle ainsi d'assemblage en collier de perles.

La compaction de l'ADN en nucléosome n'est pas seulement un moyen pour la cellule de pouvoir faire face à l'impressionnante taille et longueur du matériel génétique, c'est également un moyen de contrôle de la transcription des gènes. Les nucléosomes sont difficiles d'accès aux facteurs de transcription comme à la machinerie de transcription, ils bloquent également les ARN polymérases au moment de l'élongation. L'accès au nucléosome peut en revanche être facilité par des complexes enzymatiques comme SWI-SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) et CHRAC (Chromatin Accessibility Complex), ainsi que par l'acétylation des histones. A l'opposé, la déacétylation des histones empêche l'accès à l'ADN. L'ADN compacté dans les nucléosomes peut donc passer d'états réprimés à non réprimés selon une variété de processus enzymatiques (**Wolffe** 2001).

L'ADN des HPV est également compacté sous la forme de nucléosomes. De façon intéressante ces nucléosomes ne sont pas disposés aléatoirement sur le génome des HPV16 et HPV18, un nucléosome recouvre la partie activatrice alors qu'un autre se situe sur l'origine de réplication et sur le promoteur de E6 (**Stünkel & Bernard** 1999). Un site AP1 isolé reste à l'état accessible entre les deux nucléosomes. Cette configuration très particulière suggère un rôle important des nucléosomes dans la régulation de la transcription des HPV.

II.C.1.3.2 Régulation de la transcription par les régions d'attachement à la matrice nucléaire

La matrice nucléaire est une structure fibrogranuleuse. Dans chaque gène cellulaire ou à proximité sont présents de courtes séquences d'ADN qui ont une affinité élevée avec la matrice nucléaire et qui sont appelées régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR) (Wei et al. 1998). Elles sont souvent proches de séquences activatrices et peuvent être considérées comme des éléments de réponse en cis. L'HPV16 possède 3 segments MAR qui sont situés dans la partie 5' de la LCR, dans le gène E6 ainsi qu'au niveau du segment entre les régions précoces et tardives (Tan et al. 1998). Des expériences ont montré que lorsque l'ADN viral d'HPV est sous forme épisomale, les MAR exercent un pouvoir d'inhibition sur la transcription des gènes E6/E7, en revanche au moment de l'intégration ces MAR permettent de placer les gènes viraux dans un environnement favorable à la transcription. Ce phénomène privilégierait, au moment de la carcinogenèse, la sélection des cellules dans lesquelles le génome viral est intégré (Stünkel et al. 2000).

II.C.1.3.3 Inhibition de la transcription par YY1 et CDP

Entre la séquence activatrice et le promoteur existe un segment d'environ 100 paires de bases qui contient des sites de liaison à deux facteurs de répression de la transcription. On trouve notamment des séquences de reconnaissance pour YY1 (yin- yang-1) ainsi que deux zones riches en répétitions AT qui participent à la fixation du facteur de répression CDP (CCAT-displacement protein) et au site de fixation de E1 au niveau de l'origine de réplication (**O'Connor et al.** 1996 ; **Chen & Stenlund** 2001). Ce facteur exerce son activité inhibitrice sur le promoteur des E6 des HPV en étant à la fois lié à une histone déacétylase mais également en perturbant la fixation de E1 (**O'Connor et al.** 2000).

L'expression des facteurs de transcription CDP et YY1 est liée à la différentiation des cellules (Li et al. 1999a ; Yao et al. 2001). Au niveau des cellules basales ces facteurs sont fortement exprimés et inhibent la transcription des HPV en formant des complexes avec des histones déacétylases. A mesure que la différentiation des kératinocytes s'opère, l'expression de ces facteurs diminue alors que celle d'AP1 augmente. AP1 peut altérer la structure des nucléosomes au travers de son cofacteur CBP (CREB Binding Protein) et en s'associant à l'histone acétylase (Bannister & Kouzarides 1996). Ces mécanismes constituent probablement le moyen par lequel la transcription et la réplication des HPV sont associées à la différentiation épithéliale.

II.C.2. Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'HPV

II.C.2.1. Régulation de l'expression des gènes d'HPV par méthylation

La méthylation de l'ADN régule aussi bien l'expression des gènes cellulaires que viraux, l'ajout de groupements méthyle aux résidus cytosine au niveau des dinucléotides CpG entraîne l'inhibition de la transcription, principalement par encombrement stérique. En outre les dinucléotides CpG méthylés interagissent avec les protéines de liaisons aux CpG méthylés qui recrutent elles-mêmes des histones déacétylases (**Jones & Takai** 2001). La méthylation CpG a lieu le plus souvent au niveau de la LCR ou de la séquence L1 des HPV16 et 18 (**Badal et al.** 2003). La méthylation de la LCR et des séquences de reconnaissance de E2 est dépendante de la différentiation des cellules (**Kim et al.** 2003). Dans les lignées cervicales infectées par HPV, dans lesquelles le génome est intégré, la plupart des promoteurs sont méthylés et seuls quelques promoteurs autour de la région périnucléolaire demeurent actifs (**Van Tine et al.** 2004). La méthylation des groupements CpG semble corrélée à la pathogénicité des HPV dans les cancers cervicaux (**Feng et al.** 2005). Cependant la méthylation de l'ADN dans les cancers ne semble pas être spécifique de l'ADN d'HPV mais intervient plutôt comme un événement fréquent sur tout le génome de la cellule hôte (**Zhang** et al. 2005).

II.C.2.2. Rôle de l'épissage alternatif dans la transcription des gènes d'HPV

L'épissage de l'ARN est une régulation post-transcriptionnelle joue un rôle très important dans le cycle cellulaire des HPV et le contrôle de la traduction de leurs oncoprotéines (figure 9). L'épissage d'un intron et la liaison coordonnée des exons nécessitent 5 petits ARN U (U1, U2, U4, U5 et U6) ainsi que de nombreux facteurs d'épissage (**Ladd & Cooper** 2002 ; **Zheng** 2004 ; **Zheng & Baker** 2006).

Pratiquement tous les transcrits des papillomavirus sont polycistroniques, avec de multiples exons et introns. Ces transcrits contiennent des motifs de reconnaissance sub-optimaux de l'épissage. Les papillomavirus encodent de nombreuses protéines dans un génome très compact et profitent de l'épissage alternatif pour exprimer différemment ces protéines au cours de la différentiation cellulaire et du cycle viral (**Barksdale & Baker** 1995).



Figure 9 Structure du génome d'HPV16 et sa carte de transcription. Les codants potentiels sont représentés par des traits pleins pour les parties transcrites et des traits fins pour les parties épissées. P97 et P670 désignent les promoteurs; LCR : région régulatrice ; A_E et A_L Site de polyadénylation précoce et tardif (d'après Zheng, 2006).

Ainsi la régulation de l'épissage alternatif des ARN pré-messagers tardifs d'HPV16 fait appel à des activateurs et des inhibiteurs de l'épissage. Les pré-messagers ARN tardifs d'HPV16 possèdent 3 exons et 2 introns ainsi que 2 sites potentiels de polyadénylation. Le second intron est alternativement intron ou exon pour HPV16 comme pour BPV1 (figures 5 et 9).

Les transcrits des HPV à haut risque sont de façon prédominante transcrits à partir d'un seul promoteur, P97 pour HPV16. Chaque pré-messager est composé de 3 exons et 2 introns, avec 3 sites alternatifs d'épissage en 3' dans chaque intron. Par exemple les ARN pré-messagers de E6 et E7 d'HPV16 sont transcrits à partir du même promoteur P97 en ARN pré-messagers bicistroniques, ils possèdent un intron dans la partie codant E6 avec un site d'épissage en 5' et 3 sites d'épissages en 3'. L'épissage du pré-ARN messager E6/E7 par l'utilisation alternative de ces 3 sites d'épissage en 3'conduit à la production d'ARN pré-messagers E6*I, E6*II et E6^E7. Si l'intron demeure non épissé, l'ARN messager qui en résulte code pour la protéine E6 oncogénique et entière (Zheng et al. 2004). Il a été montré in vitro que le pré-ARN messager E6/E7 est épissé de façon efficace lorsque qu'il est protégé par une coiffe et que les facteurs cellulaires responsables de l'attachement de la coiffe sont impliqués dans l'épissage. L'épissage du fait de la présence de la coiffe est extrêmement efficace dans les lignées cervicales cancéreuses dans lesquelles on retrouve principalement une production de E6*I. Il est en revanche inefficace dans les cellules transfectées par un vecteur rétroviral, pLXSN16E6E7 à cause de la longueur augmentée de l'exon1 dans le pré-ARN messager exprimé par ce vecteur, ceci suggère que l'efficacité de l'épissage est dépendante de la distance entre la coiffe proximale de l'intron et celle en 5' de l'ARN (Zheng et al. 2004). De façon intéressante, il a été montré que l'épissage favorisait la production de la protéine E7. Le ratio optimal entre épissage et production d'E6 non épissée est finement contrebalancé mais le mécanisme qui gouverne cet équilibre est encore inconnu. Ce contrôle pourrait être dépendant des protéines régulatrices E2 et E6 mais d'autres éléments viraux en cis pourraient être également impliqués (**Bodaghi et al.** 2009).

II.C.2.3. Polyadénylation des ARNm dans l'expression des gènes d'HPV

La polyadénylation des ARN messagers est un mécanisme qui joue un rôle important dans le contrôle des gènes eukaryotiques comme viraux (**Colgan & Manley** 1997) (figure 5). La maturation de l'extrémité 3' des ARN messagers nécessite la coupure du transcrit initial et l'ajout d'une queue poly(A) d'environ 150 à 200 résidus adénosine. (**Chen et al.** 1995).

L'expression des protéines de capside est limitée aux cellules entrant en différentiation dans l'épithélium stratifié. Cet effet peut être en partie expliqué par la différentiation virale et l'expression des gènes sous contrôle du promoteur tardif (Ozbun & Meyers 1997). Les protéines L1 et L2 ne sont produites que dans des kératinocytes en phase terminale de différenciation dans les couches supérieures de l'épithélium, alors que les pré-ARNm peuvent être détectés dans le noyau de cellules moins différenciées, ce qui suggère fortement que l'expression des gènes tardifs est largement régulée par des processus post-transcriptionnels (Stoler et al. 1989). La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes tardifs du virus est complexe. L'unité tardive de transcription recouvre au moins en partie l'unité précoce de transcription et contient deux sites de polyadénylation (précoce et tardif) qui sont potentiellement en compétition l'un par rapport à l'autre. De plus, le site précoce de polyadénylation se situe dans le second intron du pré-ARNm de L1. Il en résulte que les processus d'épissage et de polyadénylation sont en compétition et sont mutuellement exclusifs. C'est pourquoi la bascule vers l'expression des gènes tardifs des HPV pourrait découler de changement dans l'épissage, la polyadénylation ou les deux à la fois (Rush et al. 2005 ; **Zhao et al.** 2004).

II.C.2.4. Contrôle des ARN messagers

Le contrôle de l'expression des protéines est également dépendant de la stabilité des ARNm produits. A la différence de la plupart des ARNm cellulaires matures les ARNm des papillomavirus ne sont pas transcrits de façon efficace et constitutive. Cette différence peut être expliquée par 3 hypothèses : l'instabilité des ARN, l'utilisation de codons rares et le contrôle de l'initiation de la traduction (**Zheng & Baker** 2006).

La première théorie d'instabilité des ARN a été initialement proposée au moment de la découverte d'une séquence flanquante en cis au niveau du site tardif de polyadénylation qui déstabilisait *in vitro* les transcrits tardifs d'HPV16 mais d'autres études ont montré qu'il s'agirait plutôt d'un inhibiteur de polyadénylation (**Kennedy et al.** 1991). D'autres éléments ont été identifiés comme pouvant réguler et provoquer l'instabilité des ARN mais ils se sont également avérés être des éléments intervenant dans l'épissage ou la polyadénylation (**Collier et al.** 2002 ; **Oberg et al.** 2003 ; **Sokolowski et al.** 1997 ; **Tan & Schwartz** 1995).

Une seconde hypothèse est le besoin limitant en codons rares pour la synthèse des protéines virales. Des expériences *in vitro* ont en effet montré qu'il était possible d'optimiser la production de protéine L1 et L2 en suppléant les cellules avec certains codons (**Gu et al.** 2004 ; **Zhou et al.** 1999). La disponibilité des ARNt appariée à l'utilisation des codons est un des facteurs qui restreint l'expression des gènes tardifs des papillomavirus au niveau de l'épithélium différencié. Il a été montré qu'au moment de la différentiation de l'épithélium chez la souris, la composition en ARN de transfert changeait de façon substantielle, favorisant la production des protéines tardives du virus (**Zhao et al.** 2005).

Enfin la troisième hypothèse est le contrôle de l'initiation de la traduction qui peut également influencer la stabilité des ARNm. Comme décrit précédemment pratiquement tous les transcrits des papillomavirus sont polycistroniques. Considérant que les ribosomes « scannent » les ARNm de façon linéaire en débutant par l'extrémité 5', il est difficile de comprendre de quelle façon ils parviennent à lire les autres cadres ouverts de lecture en aval du premier qu'ils trouvent. Plusieurs mécanismes peuvent en fait expliquer cette possibilité : une réinitialisation de la transcription, une lecture imparfaite, un saut de ribosome ou encore une entrée interne de ribosome (**Remm et al.** 1999 ; **Sedman et al.** 1991 ; **Stacey et al.** 2000). Des expériences ont ainsi montré que la protéine E7 était préférentiellement traduite lorsque l'ARN bicistronique E6/E7 était épissé dans la partie E6 (**Zheng et al.** 2004). L'épissage a en effet pour conséquence de créer un codon stop juste après la zone d'épissage ce qui rallonge la distance entre le cadre ouvert de lecture de E6*I et E7 et permet ainsi une réinitialisation de la transcription.

La régulation de la transcription des protéines virales fait donc intervenir un ensemble de mécanismes complexes et interdépendants qui permettent au virus de réguler précisément l'expression de son génome. Cette régulation est primordiale au virus pour réaliser son cycle viral qui est coordonné à la différentiation de l'épithélium.

II.D. Cycle viral

II.D.1. Pénétration du virus dans la cellule

L'internalisation des HPV est supposée impliquer un système dépendant de la clathrine (**Pereira et al.** 2009). Cependant, à la différence d'autres virus, cette internalisation est longue, 4 heures au lieu de 5 à 15 min, ce qui laisse penser que des événements en amont sont nécessaires (**Laniosz et al.** 2008). Ces événements peuvent être un transfert du virion depuis la matrice extracellulaire (MEC), des changements de conformation, ou le transfert d'un récepteur d'attachement vers un récepteur d'internalisation (**Smith et al.** 2007) (figure 10).

L'hypothèse d'une série d'événements s'appuie sur le fait que la laminine 5, un composant de la MEC sécrété par les kératinocytes, sert à l'entrée de l'HPV11 (**Culp et al.** 2006).



Figure 10 Etapes de pénétration du virus dans la cellule puis dans le noyau (d'après Pereira,

2009).

Cette observation suggère qu'un autre récepteur que les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), initialement considérés comme étant les récepteurs membranaire utilisés par les HPV pour entrer dans les cellules (**Bousarghin et al.** 2003 ; **Knappe et al.** 2007), servirait d'initiateur à la liaison d'HPV. Le HSPG est reconnu par une boucle de L1 exposée à la surface du virion (**Holmgren et al.** 2005). La liaison de L1 aux HSPG est supposée entraîner un changement de conformation, exposant des sites du virion normalement masqués, ce qui participe à l'internalisation (**Day et al.** 2007). Ce changement de conformation exposerait la région N-terminale de L2, qui est elle-même clivée par la furine, une pro-protéine convertase, retirant ainsi les 9 premiers acides aminés (**Buck et al.** 2008 ; **Day et al.** 2004).

Le virion est supposé être par la suite internalisé par un mécanisme d'endocytose à puits de clathrine (**Kämper et al.** 2006). Cependant des études récentes ont montré qu'une internalisation par le biais de la cavéoline était également possible notamment pour l'HPV31 (**Smith et al.** 2007). L'endocytose par le biais de la clathrine est caractérisée par la fusion d'un endosome avec un autre type d'endosome, comme un lysosome, selon le signal d'acheminement. L'endocytose réalisée par la cavéoline peut rejoindre directement le réticulum endoplasmique pour libérer les virions. Les deux systèmes pourraient être utilisés par le virus.

Une fois libérée, la région N-terminale de la protéine L2, définie par les résidus 41 à 44, interagit avec un des récepteurs abondants à la surface du réticulum endoplasmique, la syntaxine 18, ce qui pourrait constituer le mécanisme par lequel le virus pénètre dans le noyau (**Bossis et al.** 2005). Une autre région contenue dans la partie C-terminale de L2 a été identifiée comme pouvant se lier à la dynéine, une protéine motrice des microtubules, qui peut également faciliter le mouvement du complexe formé par le génome viral et la protéine L2 au noyau (**Florin et al.** 2006). De plus, les parties N et C terminales de la protéine de capside L2

de BPV1 sont riches en résidus basiques qui fonctionnent comme des signaux de localisation nucléaire (NLS) (**Fay et al.** 2004). Le modèle suivant est donc proposé, L2 fonctionnerait comme un adaptateur entre l'ADN viral grâce au NLS porté sur la partie C-terminale et les karyophérines grâce au NLS de la partie N-terminale, facilitant ainsi l'accès de l'ADN viral au noyau.

II.D.2. Etapes de l'infection virale et expression des oncoprotéines virales au cours du temps

II.D.2.1. Maintenance du génome

Suite à l'infection, le virus maintient son génome dans les cellules basales par un faible nombre de copies épisomales (**Bedell et al.** 1991). L'expression des gènes viraux dans ces cellules n'est pas très bien définie mais il est admis que les protéines E1 et E2 suffisent à maintenir l'ADN viral sous forme épisomale et à faciliter sa ségrégation au moment de la division cellulaire par l'intermédiaire de Brd4 (**Wilson et al.** 2002 ; **You et al.** 2004). L'expression des oncoprotéines E6/E7 à cette étape du cycle viral n'est pas établie, cependant suite à l'infection une phase proliférative a lieu au cours de laquelle le nombre de cellules basales portant le virus augmente (**Crum et al.** 1988). Il est considéré que dans ces cellules basales le nombre de copies virales s'établit entre 10 et 200 copies (**Stanley et al.** 1989 ; **Doorbar** 2005 ; **Hall et al.** 1997) (figure 11).

II.D.2.2. Phase proliférative

Dans un épithélium les cellules basales, après avoir migrées dans les couches suprabasales, sortent du cycle cellulaire et entrent dans un processus de différentiation terminale. Au moment de l'infection, E7 (E6 aussi probablement) est exprimée dans ces cellules, le blocage du cycle cellulaire est levé et la différentiation terminale retardée (**Sherman et al.** 1997). E6 et E7 coopèrent pour réaliser l'ensemble de ces actions, ces deux oncoprotéines étant traduites



Figure 11 Expression des protéines virales dans les différentes couches de l'épithélium. (A)Expression des protéines virales suivant l'évolution de la lésion (B) (d'après Doorbar, 2006).

à partir d'un ARN polycistronique commun qui est sous la dépendance du promoteur P97 chez HPV16 (Stacey et al. 2000). Brièvement E7 s'associe avec les membres de la famille des protéines dites « de poches » dont pRb (protéine du rétinoblastome). pRb est un inhibiteur de la progression cellulaire qui en temps normal empêche l'entrée dans la phase S en s'associant aux facteurs de transcription de la famille E2F. La liaison de E7 à pRb inhibe la formation du complexe pRb/E2F et permet le recrutement de la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication de l'ADN viral comme cellulaire (McLaughlin-Drubin & Münger 2009). Malgré sa capacité à remettre les cellules en cycle, au moment de la phase productive de l'infection seule une partie des cellules des couches parabasales infectées par HPV est capable de mitose. La progression dans la phase S serait limitée aux cellules exprimant des quantités suffisantes d'oncoprotéine E7 ou dans lesquelles des inhibiteurs du cycle cellulaire p21/p27 sont en quantité trop faible pour inhiber le complexe cyclineE/cdk2, ce dernier étant nécessaire au déroulement du cycle (Noya et al. 2001). La protéine E6 complète l'action de E7 et prévient l'apoptose en dégradant p53, apoptose qui résulte de la synthèse d'ADN et de l'entrée non programmée en phase S. L'action anti-apoptotique de E6 participe à l'accumulation de mutations dans le génome cellulaire et à la cancérogenèse induite par HPV. Les autres oncoprotéines, E1, E2, E4 et E5 sont supposées être également exprimées avant le début de la phase d'amplification génomique et participent au maintien du virus sous forme épisomale (Middleton et al. 2003).

II.D.2.3. Amplification du génome

L'amplification du génome se passe dans les couches moyennes et supérieures de l'épithélium sous la dépendance du promoteur tardif P670 de l'HPV, le promoteur étant lui-même induit par l'état de différentiation cellulaire. Son activation entraînerait une augmentation d'expression des protéines impliquées dans la réplication virale (E1, E2, E4 et E5) sans pour autant affecter directement l'expression des oncoprotéines E6 et E7, l'action de ces dernières étant toujours nécessaire au passage en phase S (**Middleton et al.** 2003). L'amplification du génome viral a lieu dans une partie des cellules du compartiment prolifératif. Elle nécessite l'expression de tous les gènes viraux précoces dont E1^E4 et E5 (**Genther et al.** 2003 ; **Peh et al.** 2002), bien que le rôle de E1^E4 et E5 dans la réplication reste non élucidé. La liaison de E2 à la région LCR en amont du promoteur précoce P97 est nécessaire à la réplication et implique le recrutement de l'ADN hélicase E1. Tout au long du cycle viral, l'expression des oncoprotéines est sous le contrôle des promoteurs et dépend de l'épissage alternatif des transcrits, l'augmentation du niveau d'expression de E1 et E2 permet un accroissement du nombre de copies virales dans les couches supérieures de l'épithélium (**Ozbun & Meyers** 1998a). Une légère augmentation de l'activité du promoteur au moment de la différentiation pourrait engendrer une expression accrue de E1 et E2 et par conséquent une augmentation du nombre de copies virales. Les génomes nouvellement répliqués pourraient servir de support pour une expression augmentée de E1 et E2 et ainsi de suite (**Middleton et al.** 2003).

II.D.2.4. Synthèse du virion

La synthèse du virion est dépendante de l'expression des protéines tardives de capside L1 et L2 (**Ozbun & Meyers** 1998b). Le génome est encapsidé dans un assemblage icosaédrique. La réussite de l'infection dépend de la libération du virus des cellules et de sa survie dans le milieu extracellulaire avant réinfection. Les papillomavirus ne sont pas lytiques et ne sont donc relâchés qu'une fois que les cellules ont atteint la surface de l'épithélium et desquament.

II.D.2.5. Latence virale

Dans la plupart des cas cependant, la lésion conséquente à l'infection virale régresse sous l'action du système immunitaire. L'HPV, comme la plupart des autres virus, peut persister au sein de quelques cellules dans un état latent. La persistance du virus à l'état latent pourrait être semblable en termes d'expression des protéines virales, aux stades se déroulant dans les

couches les plus inférieures de l'épithélium, et seule l'expression de E1 et E2 serait nécessaire pour maintenir le génome viral dans un état latent (**Zhang et al.** 1999).

II.D.2.6. Infection productive, abortive et cancers associés aux HPV

En l'absence de régression, l'infection peut persister et parfois évoluer vers un cancer. Une caractéristique des virus associés aux cancers, est leur propension à engendrer des tumeurs lorsque leur cycle viral productif est inachevé. C'est semble-t-il le cas pour les HPV. En comparaison de la prévalence des infections à HPV, le nombre de lésions qui progressent jusqu'au stade cancéreux est très faible. Chez les femmes chez qui l'infection n'est pas efficacement éliminée apparaissent des stades de lésions dites CIN1 qui peuvent progresser vers des lésions de type CIN2 puis CIN3 et finalement un cancer. La chronologie de la progression des lésions n'est cependant peut-être pas si hiérarchisée (Moscicki et al. 2006), des lésions de type CIN2 ou CIN3 pouvant apparaître en première instance. Plus le grade de la lésion se rapproche d'une lésion précancéreuse, plus le cycle prolifératif du virus s'allonge alors que la production effective de virus diminue (Middleton et al. 2003). L'hyperexpression des oncoprotéines E6/E7 pourrait être l'élément clef de la bascule d'une lésion productive vers une lésion néoplasique de haut grade. La surexpression des oncoprotéines entraîne la transformation des cellules et permet l'accumulation de mutations renforçant l'acquisition de propriétés cancéreuses (von Knebel 2002). La zone de transition entre les épithéliums au niveau du col de l'utérus serait particulièrement sensible au développement de lésions cancéreuses, les virus à haut risque comme les HPV16, ne pouvant compléter de façon fiable leur cycle viral avec pour conséquence d'engendrer des infections abortives. Un rôle important de l'intégration dans la progression tumorale est fortement suggéré. En effet l'intégration du génome viral lèverait l'inhibition de E2 sur la régulation du promoteur P97 et permettrait la surexpression de E6/E7 en plus d'accroître la stabilité des transcrits (Jeon et al. 1995 ; Jeon & Lambert 1995). Cette théorie n'explique néanmoins qu'une partie des phénomènes. Il a en effet été montré que d'une part l'intégration n'était pas forcément synonyme d'une expression importante de transcrits E6/E7 (**Häfner et al.** 2008) et d'autre part que le contrôle de E2 sur le promoteur P97 était surtout valable dans le cas de génome intégré sur des lignées cellulaires mais que son action inhibitrice était moindre sur le promoteur des formes épisomales (**Bechtold et al.** 2003). C'est peut-être ce qui explique également les cas de cancers, environ 20%, dans lesquels on ne retrouve que des formes épisomales (**Arias-Pulido et al.** 2006).

II.D.3. Oncoprotéines E1, E2 et réplication de l'ADN viral d'HPV

La réplication de l'ADN chez les papillomavirus nécessite une origine de réplication (*ori*) et deux protéines virale : l'ADN hélicase E1 et l'activateur de transcription E2 dans leur forme entière (**Stenlund** 2007).

E1 est la protéine la plus longue entre 593 (HPV48) et 681 acides aminés (HPV10), sa masse moléculaire oscille aux alentours des 70 kDa selon le type d'HPV. Elle est aussi la mieux conservée entre les HPV (**Giri & Danos** 1986). Bien qu'essentielle pour la réplication du virus, elle n'est exprimée qu'à des taux faibles dans les cellules infectées ou transformées (**Nasseri et al.** 1987 ; **Seedorf et al.** 1987). La protéine E1 est organisée en 3 parties, une région N-terminale d'activité non définie contenant le signal de localisation nucléaire, un séparateur de longueur variable et une région C-terminale plus longue en relation avec les activités ATPase et hélicase de la protéine. Toutes les fonctions essentielles à la réplication sont contenues dans la partie C-terminale, mais la partie N-terminale contribue de façon significative à son efficacité (**Amin et al.** 2000 ; **Ferran & McBride** 1998 ; **McBride et al.** 1991). La région N-terminale possède également des séquences de reconnaissances pour des



Figure **12** Représentation schématique des différents domaines d'interactions des protéines E1 et E2 (BPV1) (d'après Stenlund 2007).

kinases dépendantes de cyclines et est un substrat de la cycline E/cdk2 (**Deng et al.** 2004 ; **Lentz et al.** 1993) (figure 12).

La plupart des études sur la protéine E1 ont été menées sur BPV1 et sont applicables aux E1 des autres PV du fait de leur forte homologie. La structure de E1 au-delà de sa séquence primaire n'est pas connue hormis le domaine de liaison à l'ADN de E1 chez BPV1 (DNA binding domain DBD). Les prédictions de structure secondaire, qui semblent confortées par les études en spectroscopie de dichroïsme circulaire, supposent un très important contenu en hélices α et particulièrement dans les deux tiers de la partie N-terminale. De même la structure cristalline du DBD de 1,9 Å a révélé de nombreuses hélices α avec 6 hélices de surface organisées autour d'une hélice centrale de 5 brins de feuillets β antiparallèles (**Rocque et al.** 2000).

L'analyse de la structure quaternaire a montré que la protéine E1 a la capacité de former des oligomères en présence d'ADN et notamment des hexamères ou des doubles hexamères. Ceci lui permet de créer un tunnel par lequel passe le brin d'ADN au moment de la réplication (**Fouts et al.** 1999 ; **Liu et al.** 1998 ; **Sedman & Stenlund** 1996). La région C-terminale semble impliquée dans le processus d'oligomérisation (**Titolo et al.** 2000).

La protéine E1 reconnaît des séquences d'ADN de façon spécifique, il s'agit en fait d'une séquence palindromique imparfaite de 18pb au niveau de l'origine de réplication (**Ustav et al.** 1991). En revanche si la séquence est suffisante pour permettre un accrochage spécifique de E1, une formation efficace du complexe nécessite des séquences non spécifiques flanquantes additionnelles (**Holt et al.** 1994). E1 seule n'a cependant qu'une faible affinité à l'ADN et la spécificité de la liaison est grandement accrue à l'aide du facteur de transcription viral E2 (**Frattini & Laimins** 1994) (figure 13). Les protéines E1 et E2 au travers de multiples interactions protéines-protéines se lient de façon coopérative à des sites de liaison adjacents à



Figure 13 Assemblage du complexe d'initiation de la transcription d'HPV. (A) Interactions protéine-protéine et protéine-ADN, indiquées par des doubles flèches, de E1. 1 : Le domaine de liaison à l'ADN de E1 (DLA E1) interagit spécifiquement avec les sites de liaison de E1 1-4 (SL 1-4) qui fournissent l'origine de réplication. 2 : interactions non spécifiques entre l'ADN et le domaine hélicase de E1 (E1H). (B) Etapes de formation du double hexamère de E1. Liaison à l'ADN à l'aide du domaine activateur de E2 (DAE2) et de son domaine de liaison à l'ADN (DLAE2) sur sa séquence spécifique (SLE2). E2 est libérée par hydrolyse de l'ATP, le double dimère de E1 devient double trimère puis double hexamère (d'après Stenlund, 2003, 2007).

l'origine avec pour résultat une augmentation significative de la spécificité avec laquelle E1 est liée. Cependant si la liaison de E2 à E1 permet d'expliquer la spécificité de liaison, elle ne permet pas d'expliquer la spécificité d'initiation, le complexe ainsi formé n'ayant pas d'activité autre que la liaison à l'ADN. Pour générer un complexe fonctionnel, d'autres protéines E1 doivent être ajoutées. L'hydrolyse de l'ATP par E1 rompt la liaison avec E2 et libère ainsi le facteur de transcription (Sanders & Stenlund 1998 ; Sanders & Stenlund 2000). Deux nouvelles E1 sont alors recrutées à l'origine formant ainsi un complexe de 4 molécules liées aux 4 séquences de liaison de E1 (Stenlund 2003). La protéine E2 interagit avec le domaine hélicase de E1 qui est peu affin pour l'ADN. Grâce à ce système d'interactions, la protéine E1 peut réunir deux activités normalement incompatibles, une activité de liaison à l'ADN et une activité d'ouverture de la double hélice d'ADN mais dont la proximité physique est avantageuse pour l'assemblage du complexe d'initiation. La séquence de liaisons qui s'effectuent entre les protéines pourrait être la suivante. Un dimère de E1 se lie dans un premier temps à E2 (E1₂E2₂). La liaison d'un second dimère de E1 à la deuxième paire de sites de liaison pour E1 déplace le dimère de E2 de façon ATP dépendante pour former un double tétramère de E1 (E1₃)₂. Par la suite, en présence d'ATP, deux hexamères (E1₆)₂ sont générés. Le dodécamère ainsi formé est responsable de la « fusion » de l'ADN (changement structurel de l'ADN suite à l'ouverture de sa double hélice) et forme un tube protéique autour de l'ADN. La fusion a lieu au niveau de la séquence d'ADN qui s'étend à proximité des deux sites initiateurs de liaison. Le dodécamère constitue une hélicase bidirectionnelle constituée de deux sous-unités hélicases qui sont liées et travaillent de paire et ainsi activent le déroulement des brins d'ADN. Le complexe agirait en « pompant » l'ADN, le séparant au sein du dodécamère et laissant s'échapper l'ADN simple brin pour servir de matrice à la synthèse de nouvel ADN (figure 14). E1 peut recruter la protéine de réplication A (RPA) qui se lie aux simples brins d'ADN ainsi que la protéine chaperonne hsp40 pour aider à



Figure 14 Modèle de fonctionnement du double hexamère en tant que machinerie hélicase bidirectionnelle.

Les protéines virales initiatrices de la réplication peuvent former un double hexamère sur l'origine de réplication en présence d'ADP (voir figure 13). En présence d'ATP la fusion du double brin en ADN simple brin (ADN sb) a lieu des deux côtés du site d'initiation. Le débobinage a lieu en présence de la protéine de réplication A (RPA). La présence de la machinerie de réplication de l'ADN permet la synthèse du nouvel ADN qui est expulsé du complexe (d'après Stenlund, 2003).

la prise en charge de la fourche de réplication (**Liu et al.** 1998 ; **Loo & Melendy** 2004). E1 se lie également à Ini1/hSNF5, un composant du complexe de remaniement de la chromatine SWI/SNF, interaction qui semble nécessaire à la réplication (**Gardiol et al.** 1999). Enfin il a été récemment mis en évidence que E1 possédait des sites de reconnaissance pour les caspases et que ses fragments de dégradation pourraient avoir un rôle dans la réplication du virus (**Moody et al.** 2007).

II.E. Oncoprotéines E5, E6 et E7 et processus de transformation

II.E.1. L'oncoprotéine E5

Parmi les oncoprotéines synthétisées par les HPV, le rôle de E5 est moins connu pourtant cette oncoprotéine exerce également des activités transformantes (figure 15).

HPV16 E5 est une protéine de 83 acides aminés possédant une séquence hydrophobe (**DiMaio** 2007). De ce fait elle est retrouvée dans la membrane de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, de la membrane cytoplasmique et nucléaire (**Conrad et al.** 1994 ; **Oetke et al.** 2000). Des expériences *in vitro* de transfection de HPV16 E5 ont mis en évidence des capacités transformantes et notamment la possibilité de permettre une croissance sans support des cellules (**Leechanachai et al.** 1992 ; **Pim et al.** 1992) mais aussi une coopération avec la protéine E7 et une contribution dans l'immortalisation des kératinocytes, bien que le rôle exact de E5 dans cette dernière fonction n'ait pas été précisé (**Stöppler et al.** 1996a ; **Venuti et al.** 1998).

Le rôle transformant de E5 peut être principalement attribué à son interaction avec le récepteur de l'EGF (Epidermal growth factor) et les voies de signalisation qui en découlent (**Kim et al.** 2006). E5 agirait en sensibilisant la cellule à la réponse EGF, en retardant le



Figure 15 Diagramme des cibles potentielles de E5.

L'interaction de E5 avec l'ATPase vacuolaire serait à l'origine de la majorité des effets de E5 (d'après DiMaio, 2006).

recyclage du récepteur sous l'action de la liaison au ligand et en le stabilisant à la membrane (**Tomakidi et al.** 2000). E5 pourrait également agir sur d'autres voies de signalisation et augmenterait notamment la signalisation par les protéines G couplées au récepteur à l'endothéline (**Venuti et al.** 1998). Plus récemment ont été mises en évidence des interactions avec les voies de signalisation de ErbB4 (V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4) (**Chen et al.** 2006), des récepteurs de prostaglandine 2 (**Oh et al.** 2009) et du transport nucléaire (**Krawczyk et al.** 2008a).

De plus, E5 s'associe physiquement à une ATPase vacuolaire (V-ATPase Vacuolar Adenosine Triphosphate hydrolase) de 16 kDa mais les conséquences physiologiques d'une telle liaison ne sont pas bien établies (**Conrad et al.** 1993). Cette liaison pourrait entraîner un défaut d'acidification des endosomes et ainsi éviter la dégradation du récepteur à l'EGF (**Straight et al.** 1995). La protéine E5 semble affecter davantage le transport des endosomes que leur acidification (**Thomsen et al.** 2000). E5 perturbe également les jonctions intercellulaires Gap, limitant ainsi peut-être la transmission de signaux inhibiteurs de croissance entre les cellules (**Oelze et al.** 1995). L'association entre E5 et l'ATPase vacuolaire pourrait être à l'origine de l'effet de E5 sur les jonctions GAP, la V-ATPase étant un composant de ces mêmes jonctions à la membrane plasmique (**Thomsen et al.** 1999).

En outre E5 aurait un rôle de protection du virus contre le système immunitaire. Il a été montré qu'elle perturbe la stabilité et la synthèse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (MHCI) en les retenant dans l'appareil de Golgi. Elle augmente également à la membrane la présence de cavéoline et de ganglioside GM1 qui perturbent la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (**Ashrafi et al.** 2006 ; **Suprynowicz et al.** 2007).

Plus récemment il a été montré que la protéine E5 était capable d'induire la formation de cellules binucléées, cette action pouvant participer à la carcinogenèse induite par E6/E7 (**Hu**

et al. 2009a). L'expression de E5 a été également associée à une mobilité accrue des cellules et une expression modifiée de protéines d'adhérence mais également à des modifications d'expression de signaux mitogéniques (**Kivi et al.** 2007).

La protéine E5 est cependant peut exprimée dans les cellules dans lesquelles le génome viral est intégré, son rôle dans la transformation serait limité aux premières étapes de la carcinogenèse induite par HPV (**Krawczyk et al.** 2008b ; **Regan & Laimins** 2008).

II.E.2. L'oncoprotéine E7

II.E.2.1. Caractéristiques de E7

La E7 est une protéine de 98 acides aminés (**Schwarz et al.** 1985 ; **Smotkin & Wettstein** 1986), qui a été identifiée comme une protéine cytoplasmique de 15kD (**Seedorf et al.** 1987). Plus récemment, trois isoformes ont été mises en évidence, E7a1 (17,5 kDa), E7a (17 kDa) et E7b (16 kDa) (**Valdovinos-Torres et al.** 2008).

La protéine E7 est composée d'une région conservée CR1 dans l'extrémité C-terminale, d'une région conservée CR2 dans la partie C-terminale qui contient le domaine de liaison à pRb LXCXE (**Münger et al.** 1989a) et le domaine de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII). Dans la partie N-terminale se situent les deux domaines de liaison au zinc formés des acides aminés Cys-X-Cys (**Edmonds & Vousden** 1989). Ils représentent un nouveau type de domaine à reconnaissance de zinc (**Ullman et al.** 1996) et peuvent permettre la formation d'homodimères (**Zwerschke et al.** 1996). La structure de la liaison entre E7 et pRb a été caractérisée par l'équipe de Lee et al. et montre que la liaison implique des enclaves très conservées (**Lee et al.** 1998).

Comme décrit précédemment E7 est traduit à partir d'un ARN polycistronique et si certains travaux n'ont pas mis en évidence d'effet de l'épissage alternatif de l'intron contenu dans E6 sur la traduction de E7 (**Stacey et al.** 1995), la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que

68



Figure 16 Schéma de la structure d'HPV16 E7.

Les séquences impliquées dans la transformation cellulaire sont marquées par les barres bleues transparentes, les cibles principales de E7 sont également indiquées CR (conserved region) (d'après Münger, 2006 et Mclaughlin-Drubin, 2009).

l'épissage de la région E6 favorise la traduction de E7 (**Belaguli et al.** 1995 ; **Belaguli et al.** 1992 ; **Cornelissen et al.** 1990 ; **Pater et al.** 1992 ; **Tang et al.** 2006b ; **Sedman et al.** 1991).

II.E.2.2. E7, immortalisation et transformation de cellules

L'oncoprotéine E7 est capable de transformer des cellules primaires en coopération avec E6 et un oncogène Ras activé (**Matlashewski et al.** 1987). E7 est en fait capable de transformer différentes cellules en partenariat avec Ras dont des cellules de rat 3Y1 (**Kanda et al.** 1988) et des cellules de rein de bébés rats (BRK) (**Kanda et al.** 1988 ; **Phelps et al.** 1988 ; **Storey et al.** 1988). Ras régule l'expression des oncoprotéines (**Medina-Martínez et al.** 1997) qui E6/E7 agissent fortement en synergie avec hRas (**Schreiber et al.** 2004). Ces actions pourraient expliquer les effets sur la transformation de Ras en partenariat avec E7. La transformation des cellules induite par E7 et Ras pourrait être également dépendante de la transactivation de E7 sur des membres du facteur de transcription AP1 (**Antinore et al.** 1996; **Li et al.** 1998).

L'oncoprotéine E7 possède un pouvoir transformant plus important que E6 (**Barbosa & Schlegel** 1989). E7 agirait sur la promotion de la carcinogenèse alors que E6 accélèrerait plutôt la progression tumorale (**Song et al.** 2000). Si la transformation nécessite la liaison à pRb, elle n'est en revanche pas nécessaire à l'immortalisation des cellules (**Jewers et al.** 1992). E7 est considérée également comme ayant une participation plus importante dans l'immortalisation des cellules épithéliales orales (**Sdek et al.** 2006).

Dans tous les cas, la transformation n'est pas immédiate et n'a lieu qu'après un certain nombre de passages des cellules. Des kératinocytes transfectés par HPV16 sont non tumorigènes à 12 passages, faiblement tumorigènes à 32 et capables de former des carcinomes épidermoïdes invasifs à 62 passages (**Hurlin et al.** 1991). Le potentiel de transformation de E7 est corrélé à son niveau d'expression (**Liu et al.** 1995).



Figure **17** Cibles cellulaires et activités de l'oncoprotéine E7.

Schéma des différents processus dans lesquels intervient l'oncoprotéine E7 et les protéines apparentées qu'elle cible ou dégrade (d'après Münger, 2006).

E7 est également capable d'immortaliser des cellules épithéliales humaines de kératinocytes en coopération avec E6 (**Hawley-Nelson et al.** 1989 ; **Woodworth et al.** 1989), ou des fibroblastes embryonnaires humains par elle-même (**Yamamoto et al.** 2003). E7 est en fait capable d'immortaliser des cellules simplement en combinaison avec une expression de hTERT (**Kiyono et al.** 1998). Par ailleurs, sa capacité à augmenter c-myc active le promoteur de hTert (**Liu et al.** 2008 ; **Wang et al.** 2007 ; **Jeong Seo et al.** 2004).

E7 induit une hyperplasie des cellules épithéliales lorsqu'elle est exprimée dans des souris transgéniques (**Herber et al.** 1996). Cette hyperplasie serait à la fois dépendante des propriétés du domaine CR1 de E7 et de la liaison de E7 à pRb par son domaine CR2 (**Gulliver et al.** 1997 ; **Ueno et al.** 2006), bien que des travaux aient mis en évidence que la stimulation de la prolifération était indépendante de la liaison de E7 à pRb (**Caldeira et al.** 2000). E7 agit sur la prolifération des kératinocytes humains et retarde leur différentiation (**Woodworth et al.** 1992). Récemment il a été montré que l'oncoprotéine E7 pouvait être stabilisée par USP11 (ubiquitin-specific protease 11), un membre d'une famille d'enzymes qui clive les groupements polyubiquitine, favorisant également les actions de E7 sur la prolifération cellulaire (**Lin et al.** 2008).

La plupart des actions de transformation de E7 mais aussi ses effets sur le phénotype des cellules dépendent de sa liaison à pRb (**Balsitis et al.** 2003). C'est également la liaison à pRb qui distingue les virus à haut risque, des virus à bas risque (**Gage et al.** 1990 ; **Heck et al.** 1992). Les activités biologiques des HPV à bas et haut risque diffèrent également, en particulier seule E7 des HPV à haut risque permet la croissance de fibroblastes de rongeurs en l'absence de support (**Barbosa et al.** 1991).

La liaison de E7 à pRb peut être inhibée par la méthylation des Leu22, Tyr25 et Leu28 (**Jones et al.** 1992). Elle pourrait être également dépendante d'autres régions que les acides aminés
21-29 (Jones et al. 1990). Un motif Cys-X-X-Cys intact est nécessaire à la liaison d'HPV18 E7 au zinc, à sa dimérisation et à la transformation, en revanche il n'est pas nécessaire à la liaison à pRb (McIntyre et al. 1993). L'espace entre les domaines de liaison aux métaux s'il est modifié cependant, altère la stabilité et l'activité de HPV18 E7 (Watanabe et al. 1992). La liaison à pRb peut également être inhibée par des inhibiteurs de protéases TLCK et TPCK (tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone et tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) (Stöppler et al. 1996b) qui sont aussi capables d'empêcher l'immortalisation induite par HPV18 (Stöppler et al. 1996a). La dégradation de pRb peut être inhibée par PAI-2 (Darnell et al. 2003). Enfin la liaison à pRb peut-être inhibée par la transglutaminase 2 une enzyme capable d'ajouter des groupements aminé à des substrats ou à des associations de protéines empêchant ainsi leur liaison (Jeon et al. 2006 ; Jeon et al. 2003).

L'activité transformante de E7 dépend également de sa partie N-terminale (**Banks et al.** 1990b ; **Takami et al.** 1992). Le domaine CR1 participe à l'activité biologique de E7 comme mis en évidence par expérience de mutagénèse dirigée (**Brokaw et al.** 1994).

Les activités transformantes de E7 ne sont pas exclusivement dépendante de pRb (**Balsitis et al.** 2006). E7 exerce également son activité de transformation en se liant à skip (ski interacting protein) et en inhibant son activité transcriptionnelle (**Prathapam et al.** 2001). De plus E7 avec E6 induit l'expression de Notch1 pour induire la transformation des cellules (**Weijzen et al.** 2003). E7 peut aussi coopérer avec E5 pour stimuler la prolifération des cellules (**Bouvard et al.** 1994) et peut agir en partenariat avec E5 pour transformer des cellules primaires de rongeur (**Valle & Banks** 1995). E7 se lie à MPP2 (fork head domain transciption factor m phase phosphoprotein 2), cette liaison renforçant la transformation des cellules (**Lüscher-Firzlaff et al.** 1999).

La liaison de E7 à pRb entraîne sa dégradation par le protéasome (**Boyer et al.** 1996). E7 interagit avec la sous-unité S4 du protéasome 26 ce qui pourrait contribuer à la dégradation de pRb, l'interaction étant indépendante de la liaison à pRb (**Berezutskaya & Bagchi** 1997). E7 est aussi dégradée par le système du protéasome associé à l'ubiquitine par sa partie N-terminale (**Thyrell et al.** 2005 ; **Reinstein et al.** 2000). La dégradation de pRb par E7 est nécessaire pour son inactivation fonctionnelle mais elle n'est pas liée à la dégradation de E7 par le protéasome (**Gonzalez et al.** 2001). Il a également été mis en évidence que E7 s'associait avec la cullin 2 du complexe ubiquitine ligase, cette action contribuant à la dégradation de pRb (**Huh et al.** 2007) mais E7 pourrait aussi dégrader pRb à l'aide de la calpaïne (**Darnell et al.** 2007). E7 est également ubiquitinylée par une E3 ligase composée de UbcH7, Cullin-1 et Skp2 (**Oh et al.** 2004).

Enfin une des caractéristiques des carcinomes HPV induits est la nécessité de maintenir une expression des oncoprotéines pour conserver le phénotype transformé des cellules, comme illustré pour HPV16 E7 avec Ras dans des cellules BRK (**Crook et al.** 1989). L'expression de E6/E7 est conservée dans des carcinomes cervicaux du col de l'utérus (**Cone et al.** 1992). L'inhibition de l'expression de E6/E7 par un suppresseur de tumeur entraîne la mort des cellules (**Bosch et al.** 1991), E7 est par exemple nécessaire à la survie des cellules HeLa (**Nishimura et al.** 2006). En revanche, il est possible que l'expression de E6/E7 se perde à long terme dans des cellules BRK immortalisées par EJ-ras (**Pim & Banks** 1991).

II.E.2.3. Régulation du cycle cellulaire par E7

La principale action de E7 est de remettre des cellules différenciées de l'épithélium en cycle. E7 dégrade à cet effet pRb et permet ainsi la libération de E2F pour qu'il puisse accomplir ses actions de transcription et permettre la transition G1->S (**Banks et al.** 1990a ; **Demers et al.** 1996 ; **Huang et al.** 1993). E7 réactive la machinerie de réplication de l'ADN pour remettre en cycle les cellules différenciées (**Cheng et al.** 1995). L'action de E7 n'a pas simplement pour effet d'empêcher la sortie de la phase S des cellules mais permet bien de refaire entrer des cellules différenciées en phase S (**Banerjee et al.** 2006).

Comme décrit précédemment E7 possède dans sa séquence un domaine de phosphorylation par la caséine kinase 2 (**Firzlaff et al.** 1989). La phosphorylation de E7 conditionne ses actions sur la régulation du cycle cellulaire (**Chien et al.** 2000 ; **Genovese et al.** 2008). Des mutations au niveau des sérines 31 et 71 peuvent affecter la phosphorylation de E7 (**Storey et al.** 1990). La phosphorylation peut être aussi inhibée par le complexe protéique S100 MRP-8/-14 (macrophage inhibitory-related factor protein) (**Tugizov et al.** 2005). Les protéines de la famille S100 lient le calcium et de façon intéressante il a été mis en évidence que E7 pouvait réguler l'expression d'un autre membre de cette famille, la protéine S100P (**Hellung Schønning et al.** 2000). Cet effet a cependant était contredit par une autre étude (**Jakubícková et al.** 2005). La phosphorylation de la protéine varie au cours du cycle cellulaire (**Massimi & Banks** 2000). Elle joue un rôle important à la fois dans les fonctions de E7 et dans sa localisation (**Tommasino et al.** 1992). La localisation de E7 au noyau est dépendante d'un transport non classique impliquant la protéine Ran et est indépendante des principaux récepteurs nucléaires Kap-β cytosolique (**Angeline et al.** 2003 ; **Luca et al.** 2003).

D'autre part E7 cible les protéines dites de « poche » p130 et p107 associée à pRb, cette action contribuant également à la régulation du cycle (**Collins et al.** 2005). L'interférence de E7 sur pRb et p107 participe à la résistance à l'arrêt en phase G1 (**Jones & Münger** 1997). Il est à remarquer que les oncoprotéines E7 des HPV à haut risque et à bas risque sont toutes deux capables de cibler p130 ce qui indiquerait que les effets oncogéniques de E7 dépendent plutôt des interactions avec pRb et p107 (**Zhang et al.** 2006).

En plus de libérer E2F de son complexe avec pRb, E7 s'associe directement avec les complexes formés par E2F et la cycline A qui contrôlent le passage du cycle cellulaire (Arroyo et al. 1993 ; Pagano et al. 1992 ; Liu et al. 2006 ; Martin et al. 1998). L'oncoprotéine peut aussi se lier directement avec les complexes cyclineA/cdk2 et cyclineE/cdk2 (Nguyen & Münger 2008 ; McIntyre et al. 1996 ; Zerfass et al. 1995). De plus E7 cible la tyrosine phosphatase cdc25A activatrice de cyclineA/cdk2 et cyclineE/cdk2 (Bhawal et al. 2007 ; Katich et al. 2001 ; Nguyen et al. 2002a). L'oncoprotéine peut directement activer cdk2, cette action dépend de CR1 et CR2 mais est indépendante de la phosphorylation de la protéine virale (He et al. 2003). D'autre part E7 est capable de s'associer à E2F1 (Hwang et al. 2002) et à E2F6 ce dernier a une activité inhibitrice sur les actions de E2F et son augmentation pourrait exercer un rétrocontrôle négatif sur E2F1 (McLaughlin-Drubin et al. 2008). Enfin les capacités de transactivation de E7 sur E2F sont dépendantes des cellules dans lesquelles E7 est exprimée ainsi que de son promoteur (Armstrong & Roman 1997).

La régulation du cycle cellulaire est à la fois contrôlée par l'assemblage des couples cycline/cdk mais dépend largement aussi des inhibiteurs de cyclines dépendant de kinases les CKI. E7 est capable d'inhiber la CKI p27^{KIP1} (**Zerfass-Thome et al.** 1996), elle inhibe également l'action de p21^{CIP1} (**Funk et al.** 1997). L'expression de p21^{CIP1} est régulée par p53, elle est élevée dans les cellules transfectées par E7 mais l'oncoprotéine est capable d'inhiber les effets de la CKI sur les cyclines A et E et ainsi de permettre à la fois la différenciation et la prolifération des kératinocytes infectés (**Ruesch & Laimins** 1997 ; **Jones et al.** 1997). Certains travaux en culture organotypique ont cependant mis en évidence que la réactivation de p21 suite à la transfection de E7 pouvait provoquer l'arrêt de la synthèse d'ADN (**Jian et al.** 1998 ; **Noya et al.** 2001). E7 induit dans ce système soit l'expression de la p21 et de la

cycline E, cette dernière stabilisant p21 et provoquant l'arrêt de la synthèse d'ADN, soit de la cycline E et cdk2 permettant la synthèse d'ADN (**Jian et al.** 1999).

L'oncoprotéine permet de surmonter l'arrêt en phase G1 induit par une privation en sérum et par p21^{CIP1} (**Morozov et al.** 1997 ; **Pei et al.** 1998). L'inhibition de p21 est particulièrement importante pour empêcher l'arrêt du cycle cellulaire (**Helt et al.** 2002 ; **Shin et al.** 2009). Cependant l'inhibition des CKI pourrait être également impliquée dans la réplication du virus car elle est commune aux HPV à haut et bas risque (**Zehbe et al.** 1999).

La dégradation de pRb a également pour effet d'entraîner l'augmentation de la CKI p16^{INK4} (**Kelley et al.** 1995) et la dégradation de pRb est nécessaire pour éviter l'arrêt de la croissance provoquée par p16^{INK4} (**Giarrè et al.** 2001).

De façon intéressante plusieurs observations ont mis en évidence que l'expression de E7 était également nécessaire au stade productif du cycle viral par ses actions sur la différentiation des cellules (**Flores et al.** 2000 ; **McLaughlin-Drubin et al.** 2005).

II.E.2.4. Régulation de l'apoptose, de la sénescence et de p53 par E7 La protection contre l'arrêt en phase G1 malgré la stabilisation de p53 par E7 est une conséquence des effets de E7 sur pRb et sur p21 (**Gottlieb & Oren** 1998 ; **Slebos et al.** 1994). Ainsi la transfection de E7 dans des cellules mime les conséquences d'une réponse à des dommages à l'ADN par p53 mais n'en reproduit pas les effets (**Song et al.** 1998 ; **Jones et al.** 1999), la stabilisation de p53 par E7 n'ayant pas de conséquence sur la transcription de cibles de p53 (**Eichten et al.** 2002).

Cependant si E7 à elle seule est capable de permettre le passage du cycle cellulaire, elle ne protège pas de la mort cellulaire induite par la réactivation de p53 (**Vousden et al.** 1993 ; **Jones et al.** 1997 ; **Demers et al.** 1994b ; **Demers et al.** 1994a ; **Howes et al.** 1994 ; **Wang et**

al. 1996 ; **Stöppler et al.** 1998). L'induction de l'apoptose par E7 et p21 implique la cathépsine B (**Kaznelson et al.** 2004). Le passage en phase S et l'induction de l'apoptose sont des événements qui sont séparés comme illustré par des travaux sur des fibroblastes de rongeurs transfectés par E7 (**Alunni-Fabbroni et al.** 2000). L'apoptose serait dépendante de pRb mais pas de p107 et p130 alors qu'une mutation dans CR1 inhibe l'induction de l'apoptose par E7 mais pas le passage en phase S.

Des observations ont cependant rapporté des effets divergents de E7 sur l'apoptose selon les cellules transfectées. E7 rend des astrocytes vulnérables aux ultraviolets. Cet effet est associé à une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une activation de la caspase 3 (Lee et al. 2002). Des fibroblastes normaux diploïdes transfectés par E7 et privés de facteurs de croissance sont prédisposés à l'apoptose et engagent une réponse sentinelle trophique aux oncogènes. Cette réponse ne s'accompagne pas de phosphorylation de p53 dont les capacités de liaison sont inchangées, il n'y a pas non plus d'activation des cibles transcriptionnelles de p53. La caspase 3 est activée, il n'y a cependant pas de perméabilisation de la membrane mitochondriale (Eichten et al. 2004). D'un autre côté E7 avec E6 induit l'augmentation de c-IAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2) (Yuan et al. 2005). Dans les cellules HaCat, dans lesquelles p53 est mutée, E7 interagit avec la glutathion S transférase P1 (GSTP1) et augmente la survie des cellules (Mileo et al. 2009). Dans cette même lignée, l'oncoprotéine E7 interagit avec Siva-1, un facteur pro-apototique dont il empêche la liaison avec Bcl-X(L) (Severino et al. 2007). E7 active le gène homologue de zest (Ezh2), un gène du groupe polycomb dont l'action contribue à la résistance à l'apoptose (Holland et al. 2008). L'oncoprotéine virale E7 interagit avec les suppresseurs de tumeurs NM23-H1 et h2 dans les cellules HaCat, les rendant insensibles à l'apoptose induite par le granzyme A (Mileo et al. 2006). E7 protège les cellules HaCat de l'apoptose par UVB (Magal et al. 1998). Elle les protège également du stress oxydatif par l'induction de la catalase (Shim et al. 2005) et agirait sur de nombreuses protéines impliquées dans la réponse à l'apoptose dont Bcl-W(L), Fas, cytochrome C (**Shim et al.** 2008). Enfin il a été mis en évidence que E7 agissait sur de nombreuses kinases notamment CDK6, ERBB3 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3), FYN, AAK1 (AP2 associated kinase 1) et TSSK2 (testis-specific serine kinase 2) dont les actions sont en relation avec la viabilité cellulaire (**Baldwin et al.** 2008). E7 est aussi capable de contrôler les effets des dommages à l'ADN sur la viabilité cellulaire en contrôlant le turnover de la claspine impliquée dans la réponse au stress (**Spardy et al.** 2009).

La dégradation de pRb par E7 protège également les cellules de la sénescence (**Psyrri et al.** 2004), l'inhibition de E7 dans des lignées cervicales entraîne une cascade dépendante de pRb qui aboutit à la sénescence cellulaire (**Johung et al.** 2007). E7 cible également PML (promyelocytic leukemia protein) qui active la sénescence cellulaire en forte concentration dans des fibroblastes primaires. Cet effet est dépendant de pRb (**Bischof et al.** 2005 ; **Mallette et al.** 2004). Enfin E7 augmente Dek, un proto-oncogène qui inhibe la sénescence. Dek interfère avec le programme de différentiation épithéliale (**Wise-Draper et al.** 2006 ; **Wise-Draper et al.** 2005 ; **Wise-Draper et al.** 2009).

II.E.2.5. Régulation de la transcription et actions épigénétiques de E7 Les activités de transformation de l'oncoprotéine E7 ne s'exercent pas seulement au travers de la dégradation de pRb mais également par ses nombreuses actions de transactivation sur divers facteurs de transcription et la régulation de leurs gènes cibles. Comme décrit précédemment, E7 est capable de transactiver différents composants du facteur de transcription E2F (**Huang et al.** 1993), de transactiver AP1 (**Antinore et al.** 1996) et c-myc (**Wang et al.** 2007). E7 transactive également p73 par le biais de E2F1, cette action pouvant avoir un rôle dans les processus oncogénique (**Brooks et al.** 2002). E7 est aussi capable de transactiver le promoteur E2 de l'adénovirus de façon pRb dépendante et indépendante (**Carlotti & Crawford** 1993 ; **Ibaraki et al.** 1993). L'oncoprotéine virale E7 cible également Fh12, un coactivateur transcriptionnel qui agit sur les promoteurs en relation avec AP1 et caténine-β/Lcf (**Campo-Fernández et al.** 2007).

D'autre part E7 interagit avec TFIID (Tata box binding protein) suite à la phosphorylation de son domaine CK2 (**Massimi et al.** 1996), la liaison de E7 pourrait être responsable de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 et contribuer au pouvoir transformant de E7 (**Massimi & Banks** 1997 ; **Massimi et al.** 1997). La liaison de E7 à TFIID inhibe en fait sa capacité à se lier à l'ADN (**Maldonado et al.** 2002).

Enfin, E7 est également capable de modifier l'expression de nombreux gènes grâce à sa liaison à des histones acétyle transférase (HAT). E7 se lie en effet à Mi2 β ainsi qu'à p300 et pCAF (**Avvakumov et al.** 2003 ; **Bernat et al.** 2003 ; **Brehm et al.** 1999). E7 perturbe la localisation et les fonctions de Src-1 (steroid receptor coactivateur 1) indépendamment de sa liaison à p300 ou pCAF (**Baldwin et al.** 2006). HPV31 E7 est capable de faciliter la réplication en activant la transcription par E2F2 grâce à ses interactions avec les histones déacétylases (**Longworth et al.** 2005).

II.E.2.6. Régulation de fonctions associées à l'invasion et l'angiogenèse par E7

En plus de ces actions associées à la transformation, E7 pourrait agir par différentes voies de régulation et à différents niveaux sur les processus associés à l'invasion tumorale et l'angiogenèse.

E7 active en particulier la voie de signalisation Akt. Akt est en relation avec l'attachement cellulaire et régule de nombreuses fonctions dans la cellule. Sa stimulation pourrait participer

à la migration cellulaire. E7 active AKT par un mécanisme qui implique une interaction avec PP2A, E7 séquestrant les deux sous-unités catalytiques de PP2A empêchant sa liaison à Akt et permettant ainsi de maintenir la signalisation par Akt en inhibant sa déphosphorylation (**Pim et al.** 2005). L'activation d'Akt par E7 est dépendante de la dégradation de pRb (**Menges et al.** 2006) et il a été montré que E7 était capable de stimuler la migration de kératinocytes de façon dépendante d'Akt. Cet effet est dépendant de la relocalisation de p27^{CIP1} au cytoplasme et de son action sur la petite GTPase organisatrice de cytosquelette RhoA (**Charette & McCance** 2007).

D'autre part il a été mis en évidence que E7 était capable d'induire l'expression de molécules d'adhérence dans des cellules endothéliales favorisant ainsi la progression cancéreuse (**D'Anna et al.** 2001). A l'opposé, E7 est capable d'inhiber la cadhérine-E dans des kératinocytes humains (**Caberg et al.** 2008 ; **Hellner et al.** 2009a) et inhibe la cadhérine-N dans des cellules de rats 3Y1 par la signalisation AP1 et ERK (**Yuan et al.** 2009). La co-expression de E6/E7 et ErbB-2 dans des cellules épithéliales orales est capable d'inhiber l'expression de la cadhérine-E (**Moustafa et al.** 2004).

E7 de plus se lie à p600 (retinoblastoma protein associated factor) par sa partie N-terminale et de façon indépendante de sa liaison aux protéines de « poche », p600 régulant des voies de signalisation contribuant à la croissance en l'absence de support des cellules (**Huh et al.** 2005). De façon contradictoire il a été mis en évidence que l'expression de la fibronectine, qui est associée à l'invasion tumorale, peut être augmentée par E7 (**Hellner et al.** 2009a) ou inhibée par son domaine Cys-x-x-Cys (**Rey et al.** 2000b). E7, en fonction de son état de phosphorylation, interagit également avec l'actine-F et il a été mis en évidence que l'actine polymérisée était en moindre quantité dans les cellules exprimant E7 (**Rey et al.** 2000a). E7 pourrait également contribuer à l'invasion tumorale en stimulant l'expression de la

MT1-MMP, comme mis en évidence dans des cellules HaCat et des kératinocytes primaires (**Smola-Hess et al.** 2005).

Enfin E7 et E6 induisent l'expression de facteurs pro-angiogénique dont IL-8, VEGF, maspin, thrombonspondine qui pourraient participer à la progression tumorale (**Toussaint-Smith et al.** 2004).

II.E.2.7. Régulation du métabolisme cellulaire par E7

Les voies du métabolisme cellulaire peuvent être soit aérobie ou anaérobie. La cellule régule leur utilisation en fonction des disponibilités en substrats et des besoins en énergie. La voie de la glycolyse, qui aboutit à la production de phosphoenolpyruvate par la pyruvate kinase, est régulée par la concentration dans la cellules en AMP/ATP. L'isoenzyme des mammifères de type 2 pyruvate kinase (M2-PK) a les même fonctions que la pyruvate kinase et peut être soit sous forme dimérique soit sous forme tétramérique. Lorsqu'elle est sous forme de dimère, la M2-PK a une plus faible activité sur la glycolyse conservant les carbones des sucres et donc privilégie la synthèse d'acides nucléiques (Mazurek et al. 2002 ; Mazurek et al. 2005). E7 transfectée dans des cellules se lie avec les formes dimériques de M2-PK et entraîne leur accumulation participant ainsi à la transformation des cellules (Mazurek et al. 2001a). E7 et Ras agissent de façon complémentaire pour constituer le métabolome tumoral qui est caractérisé par une forte concentration en enzyme glycolytique, une forte capacité glutaminolytique, des niveaux élevés de fructose 1,6 biphosphate et un ratio faible ATP+GTP :CTP+UTP (Mazurek et al. 2001b). Cet effet de complémentarité pourrait être une autre explication de la capacité de E7 et Ras à coopérer pour transformer les cellules.

II.E.2.8. Régulation de l'immunité et de la réponse aux cytokines et aux facteurs de croissance par E7

L'échappement à l'immunité joue un rôle important dans la progression tumorale des carcinomes HPV positifs. Le système immunitaire joue un rôle de protection contre l'infection aux HPV dans les lésions du col de l'utérus comme l'illustre la multiplicité des infections chez les sujets immunodéprimés (**Byrne et al.** 1989). L'oncoprotéine E7, par ses actions, permet aux cellules infectées par le virus d'échapper aux cellules de l'immunité. En effet E7 et E6 inhibent notamment MCP1 (monocyte cheoattractant protein 1) empêchant ainsi le recrutement des monocytes/macrophages (**Kleine-Lowinski et al.** 2003 ; **Riethdorf et al.** 1996 ; **Riethdorf et al.** 1998). Bien que E7 induise l'expression d'IL1- α avec pour effet d'augmenter l'inflammation (**Iglesias et al.** 1998), E7 induit une tolérance à l'immunité par les cellules cytotoxiques T (**Borchers et al.** 1999). L'effet sur les cellules T cytotoxiques pourrait être dépendant de la sécrétion de E7 dans le milieu extérieur, il agirait comme une toxine en stimulant la sécrétion de l'interféron α lui-même agissant comme suppresseur de l'immunité et inhibant la réponse des cellules T cytotoxiques (**Leggatt et al.** 2002 ; **Le Buanec et al.** 1999b).

Des observations contradictoires ont été rapportées sur les effets de E7 sur le complexe majeur d'histocompatibilité (**Bottley et al.** 2008 ; **Georgopoulos et al.** 2000 ; **Hoos et al.** 1996), E7 ayant ou non des actions sur celui-ci. E7 participerait également à l'échappement à l'immunité par ses actions sur NF κ B (**Huang & McCance** 2002 ; **Spitkovsky et al.** 2002) qui inhiberaient notamment l'activité du promoteur IL8. Ainsi des études en protéomique ont mis en évidence que les effets de E7 sur l'immunité pourraient impliquer de nombreuses molécules et notamment l'hsp60, Ku70BP ou encore l'alpha enolase (**Lee et al.** 2004). Enfin l'activation de la voie Akt par E7 précédemment décrite pourrait également avoir un rôle dans l'échappement à l'immunité cellulaire (**Noh et al.** 2009).

D'autre part E7 est capable de réguler la réponse des cellules infectées à différentes cytokines. E7 est en particulier capable d'inhiber la signalisation de différentes isoformes de l'interféron (IFN) et de ses signaux antiprolifératifs (**Arany et al.** 1995 ; **Arany et al.** 1994 ; **Barnard et al.** 2000). E7 inhibe l'action de l'IFN-α par plusieurs mécanismes, il peut cibler p48 le composant de liaison à l'ADN de IGSF3 (interleukin stimulated gene factor 3) (**Barnard & McMillan** 1999). L'action de E7 sur p27^{KIP1} participe à l'inhibition des effets de l'interféron (**Moro et al.** 1998). E7 inhibe également IRF-1 (interferon regulatory element 1) en recrutant des histones déacétylases à son promoteur (**Park et al.** 2000 ; **Um et al.** 2002). Enfin E7 peut se lier à IRF-9 par un nouveau domaine PEST (proline, glutamate, serine, and threonine-rich domain) (**Antonsson et al.** 2006). Les effets de l'interféron-γ sont plus ambigus, il a été rapporté que la cytokine pourrait inhiber la transcription de E6/E7 (**Woodworth et al.** 1992) potentiellement par la signalisation de Socs1 (**Kamio et al.** 2004). Cependant E7 perturbe aussi la Guanylate Binding Protein (GBP)-ISRE et ainsi l'action de l'IFN-γ (**Lee et al.** 2001), cet effet étant dépendant de l'inhibition par E7 d'IRF-1 et de NFκB (**Perea et al.** 2000). L'interféron-τ enfin possède lui une activité anti-papillomavirus (**Johnson et al.** 1999).

E7 se lie à et inhibe les effets antiprolifératifs de IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein 3) en induisant sa dégradation par le complexe du protéasome et de l'ubiquitine (**Mannhardt et al.** 2000 ; **Santer et al.** 2007) mais cet effet pourrait être dépendant du type cellulaire, IGFBP-3 étant surexprimée dans des cellules cervicales infectées par E6/E7 (**Baege et al.** 2004).

D'autre part E7 inhibe l'apoptose induite par le facteur nécrosant de tumeur TNF- α (**Basile et al.** 2001 ; **Boccardo et al.** 2004 ; **Thompson et al.** 2001). E7 dans le milieu extérieur induit cependant la libération par les macrophages de TNF- α ainsi que celle d'IL1- β , d'IL-6 et VEGF (**Le Buanec et al.** 1999a).

Les effets de TGF- β sur la régulation de l'expression des oncoprotéines des HPV sont plus difficiles à définir car ils différent selon l'état de transformation des cellules. Dans des cellules récemment immortalisées par E6/E7, ce facteur inhibe l'expression des oncoprotéines (**Braun et al.** 1992 ; **Hasskarl et al.** 2000 ; **Woodworth et al.** 1990), cet effet étant dépendant de NFI/Ski (**Baldwin et al.** 2004). Dans des cellules transfectées par E6/E7 et cultivées sur un plus grand nombre de passages, la sensibilité à TGF- β est perdue (**Creek et al.** 1995). E7 peut protéger de l'arrêt de la croissance induit par TGF- β 1 en inhibant c-myc, l'effet étant dépendant dépendant de la liaison à pRb (**Pietenpol et al.** 1990). Dans un système en culture organotypique, TGF- β induit la différentiation et augmente E7 (**Ozbun & Meyers** 1996).

E7 peut inhiber la signalisation par le TGF- β en ciblant les protéines smad 2, 3 et 4 (**Habig et al.** 2006 ; **Lee et al.** 2002 ; **Xu et al.** 2006). E7 cible également l'expression de TGF- β 2 en fonction de la différenciation (**Nees et al.** 2000). E7 inhibe le promoteur de TGF- β 2, cette action étant dépendante de la liaison à pRb et passerait par E2F1 (**Murvai et al.** 2004). Enfin, E7 est capable d'inhiber le récepteur de type II de TGF- β (**Diaz-Chavez et al.** 2008).

II.E.2.9. Instabilité chromosomique induite par E7

Parmi les nombreuses actions de l'oncoprotéine E7 en faveur de la transformation des cellules infectées, les effets de E7 sur la stabilité des chromosomes et l'aneuploïdie des cellules sont peut-être ceux qui ont le plus d'importance dans les lésions persistantes.

En effet l'expression de E7 a pour conséquence à la fois d'induire des anomalies chromosomiques et d'en augmenter le nombre par endoréplication des cellules. La majeure partie de ces actions est dépendante des effets de E7 sur le nombre de centrosomes. Ainsi E6 et E7 coopèrent pour induire des erreurs de mitose et une instabilité génomique en découplant la duplication du centrosome de la division cellulaire (**Duensing et al.** 2000 ; **Oda et al.** 1996). La synthèse de centrosome surnuméraire serait un événement précoce dans l'évolution

des lésions vers un phénotype malin (Duensing et al. 2001a ; Klingelhutz et al. 2005). Elle ne serait ainsi pas dépendante de l'intégration (Duensing et al. 2001b ; Melsheimer et al. 2004) bien que l'intégration elle-même soit associée avec une instabilité chromosomique (Pett et al. 2004) et particulièrement du fait de la réplication de l'ADN viral intégré en structure de peau d'oignon (Kadaja et al. 2009 ; Kadaja et al. 2007). Les actions de E7 sur l'instabilité des chromosomes et le nombre de centrosomes seraient indépendantes de pRb (Duensing & Münger 2003 ; Piboonniyom et al. 2003 ; Southern et al. 2004). Il a été ainsi montré que E7 pouvait s'associer de façon indépendante de sa liaison à pRb, p107 et p130 à la y-tubuline un composant des centrosomes (Nguyen et al. 2007). Les effets de E7 sur la duplication des centrosomes seraient en fait plutôt en relation avec ses actions sur les cyclines A/E et cdk2 (Steinmann et al. 1994). Ainsi l'α-amanitine, un inhibiteur de la RNA polymerase II qui régule la cycline A2, inhibe la duplication des centrosomes dans des cellules HPV16 E7 (**Duensing et al.** 2007). D'autre part un inhibiteur de CKI, l'indirubine 3' oxine, inhibe également la duplication de centrosomes mettant en évidence un rôle des couples cycline(A/E)/cdk2 (Duensing et al. 2004 ; Duensing & Münger 2002). Enfin une implication de la polo-like kinase 4 (plk4) a été mise en évidence récemment en plus de cdk2 (Duensing et al. 2009).

L'instabilité chromosomique pourrait également impliquer l'augmentation de l'expression du gène WAPL1 (**Kuroda et al.** 2005 ; **Ohbayashi et al.** 2007), la signalisation par le TGF-β1 (**Deng et al.** 2008) et l'apparition de ponts d'anaphase suite à l'action de E7 (**Duensing & Münger** 2002)

E7 perturbe également les processus de la mitose et le nombre de chromosomes dans la cellule. Ainsi E7 est capable d'induire une tétrasomie dans des kératinocytes en culture organotypique (**Southern et al.** 2001), induit une endoréplication des cellules dans un modèle

de différentiation squameux (**Chien et al.** 2002) et une aneuploïdie dans les cellules de tumeurs cutanées chez des souris transgéniques E7 (**Schaeffer et al.** 2004). Les anomalies des chromosomes et de leur nombre sont associées à des erreurs de division (**Duensing et al.** 2008) qui peuvent être la conséquence de la dérégulation par E7 de différents mécanismes de contrôle de la mitose (**Thomas & Laimins** 1998 ; **Heilman et al.** 2009). E7 en particulier perturbe la régulation des fuseaux mitotiques en se liant à la dynéine (**Nguyen & Münger** 2008) et est capable de s'associer également à Numa (nuclear mitotic apparatus protein 1), ces actions induisant un défaut de la répartition des chromosomes au moment de la mitose et des erreurs de ségrégation (**Nguyen & Münger** 2009).

De façon intéressante il a été montré que la protéine E7 était capable d'activer la voie de signalisation de l'anémie de Fanconi et ainsi d'augmenter l'instabilité chromosomique (**Spardy et al.** 2007). L'anémie de Fanconi est une maladie génétique associée à une sensibilité des cellules aux agents réticulants de l'ADN et les patients qui en sont atteints sont plus susceptibles de développer des lésions associés aux HPV. Ainsi il a été mis en évidence que la capacité de E7 à conserver la longueur des télomères en l'absence de E6 était liée à son action sur la protéine D2 de l'anémie de Fanconi et sur sa capacité à activer les mécanismes d'allongement alternatif des télomères (ALT) associés aux corps promyélotiques (**Spardy et al.** 2008).

II.E.3. L'oncoprotéine E6

E6 participe avec E7 à l'immortalisation et la transformation des cellules infectées par le virus. Sa structure s'apparente à celle de E7, ce qui pourrait être la conséquence d'une duplication de l'ADN viral au cours de son évolution. Le rôle de E6 semble être de dégrader p53 et de protéger le virus de l'apoptose, apoptose induite par la synthèse non programmée d'ADN suite à la remise en cycle des cellules. La dégradation de p53 est réalisée par sa

liaison à l'ubiquitine ligase E6AP. L'oncoprotéine cible et dégrade ainsi un nombre important de protéines. La liaison de E6 à E6AP est à l'origine de la majorité de ses actions et stabilise également E6. D'autre part E6 active la télomérase dont l'action participe à l'immortalisation des cellules infectées. L'oncoprotéine contribue aussi à la protection des cellules contre l'apoptose par des mécanismes indépendants de p53 et participe à l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte.

Parmi les protéines cibles de E6, de nombreuses protéines à domaine PDZ ont été identifiées, leur dégradation pourrait participer au processus de transformation induit par le virus. Comme décrit précédemment, E7 est capable d'induire des anomalies chromosomiques mais E6 participe également à l'accumulation de mutations et à l'altération du génome. E6 enfin au travers de ses actions sur de nombreux facteurs de transcription, coactivateurs de transcription et mécanismes de régulation épigénétique modifie l'expression de nombreux gènes cellulaires. Les nombreuses interactions de E6 mises en évidence ou encore à découvrir renseignent sur les processus complexes et multiples de transformation induits par l'oncoprotéine.

II.E.3.1. Caractéristiques structurales de E6

E6 est une protéine de 151 acides aminés contenant 4 motifs Cyx-X-Cys (Cys pour cystéine, X pour un acide aminé quelconque) qui forment deux domaines de 29 acides aminés pouvant lier le zinc et permettant la liaison à p53 (**Cole & Danos** 1987 ; **Giovane et al.** 1999 ; **Grossman et al.** 1989 ; **Kanda et al.** 1991 ; **Li & Coffino** 1996 ; **Lipari et al.** 2001 ; **Nakagawa et al.** 1995 ; **Barbosa & Schlegel** 1989). Elle se lie à E6AP par un motif riche en leucine LXXLL situé dans le second domaine de liaison au zinc situé du côté N-terminal (**Be et al.** 2001 ; **Bohl et al.** 2000 ; **Lagrange et al.** 2005 ; **Zanier et al.** 2005). Elle possède également un domaine de liaison aux protéines PDZ dans sa partie C-terminale



Figure **18** Schéma de la structure de HPV16 E6 et les domaines d'interactions avec ses cibles principales (d'après Mclaughlin-Drubin, 2009).

(PSD95/Dlg/ZO-1 motif de classe I x-T/S-x-L/V, où x est un acide aminé indéfini). La liaison aux protéines PDZ est également dépendante d'une valine en dehors de la séquence et les résidus non canoniques dans la séquence elle-même déterminent l'affinité des différents types de papillomavirus pour les différentes protéines PDZ (**Charbonnier et al.** 2008 ; **Thomas et al.** 2008). E6 possèderait un troisième motif de liaison indéterminé qui lui permet d'interagir notamment avec FADD (domaine de mort associée à Fas) (**Tungteakkhun et al.** 2008). E6 pourrait également se lier directement à l'ADN et reconnaître notamment les structures à 4 voies de type jonction Holliday (**Imai et al.** 1989 ; **Nominé et al.** 2003 ; **Ristriani et al.** 2000).

La protéine d'un poids d'environ 16,5 kDa possède une structure qui la rend difficile à analyser (**Androphy et al.** 1987 ; **Banks et al.** 1987). Elle a néanmoins était caractérisée en partie par l'ajout de cystéines stabilisant sa structure et permettant l'étude de ses repliements. La protéine modifiée conserve sa capacité à dégrader p53 (**Nominé et al.** 2005 ; **Nominé et al.** 2006 ; **Ullman et al.** 1996). L'ARNm polycistronique de E6 contenant également la séquence codante de E7 peut être épissé alternativement aux nucléotides 226 et 409 ou 226 et 526 avec pour conséquence la traduction de formes tronquées de E6 désignées par E6* (**Cornelissen et al.** 1990) (figure 5). Comme décrit précédemment, l'épissage conditionne la traduction de E7 et les formes épissées de E6 sont majoritaires dans les lignées cervicales cancéreuses HPV positives, comme dans les lésions elles-mêmes (**Hsu & McNicol** 1992 ; **Shirasawa et al.** 1991).

La protéine est phosphorylée par une protéine kinase N (PKN), une kinase possédant un domaine catalytique proche de celui de PKC et elle est activée par les acides gras et la petite GTPase Rho (**Gao et al.** 2000). Elle est également phosphorylée au niveau de son domaine PDZ par une protéine kinase A qui réduit sa liaison aux protéines PDZ (**Kühne et al.** 2000).

E6 peut être localisée dans le cytoplasme mais elle se retrouve préférentiellement dans le noyau des cellules dans lequel elle pénètre au moyen de trois séquences d'adressage nucléaire (NLS) (**Masson et al.** 2003 ; **Tao et al.** 2003). Sa localisation dans le cytoplasme serait la conséquence d'une oligomérisation (**García-Alai et al.** 2007). Son transport au noyau implique une interaction avec l'adaptateur- α 2 de la karyophérine et d'une RanGDP par une voie classique Kap- α 1- β 2 (**Le Roux & Moroianu** 2003). E6 dispose d'une demi-vie d'environ 2 heures dans le cytoplasme et 4 heures dans le noyau (**Grossman et al.** 1989). Sa dégradation est dépendante du protéasome 26S (**Kehmeier et al.** 2002 ; **Stewart et al.** 2004). Il a récemment été mis en évidence que la stabilité de E6 serait largement dépendante de sa liaison à E6AP (**Tomaić et al.** 2009).

II.E.3.2. Immortalisation et transformation des cellules par E6

L'oncoprotéine virale E6 coopère avec E7 pour immortaliser les cellules infectées, E6/E7 sont capables d'immortaliser des cellules de kératinocytes épithéliaux humains et les rendre résistantes à la différenciation induite par le sérum ou le calcium (Hudson et al. 1990 ; Kaur et al. 1989 ; Münger et al. 1989b ; Hawley-Nelson et al. 1989). L'expression des oncoprotéines permet la transformation de cellules NIH 3T3 et de cellules Rat-1, elles sont également capables de transformer des fibroblastes embryonnaires et des kératinocytes humains (Bedell et al. 1987 ; Chen et al. 1993 ; Watanabe et al. 1989 ; Barbosa & Schlegel 1989). L'acquisition de propriétés tumorigènes par les cellules infectées nécessite cependant plusieurs passage des cellules (Barbosa et al. 1989 ; Griep et al. 1993). Les effets de E6 seule sont moins évidents. E6 est capable d'inhiber la sénescence de fibroblastes (Ide et al. 1998) et d'induire des carcinomes dans des animaux transgéniques (Song et al. 1999) mais ne serait pas en mesure d'immortaliser des kératinocytes humains à elle-seule (Hudson et al. 1990). Les formes épissées de E6 en particulier ne sont pas capables de transformer des cellules en culture (Liu et al. 1994 ; Sedman et al. 1991). E6 est cependant capable en partenariat avec EJ-Ras d'immortaliser des cellules primaires de souris et des cellules BRK avec HA-Ras (Chen & Defendi 1992 ; Liu et al. 1994 ; Storey & Banks 1993). L'action de E6 est la conséquence directe de sa capacité à dégrader p53 et les effets de E6 peuvent être en partie reproduits par des mutants p53 (Dalal et al. 1996 ; McMurray & McCance 2004 ; Storey et al. 1995). Les effets de E6 sur p53 sont cependant insuffisants pour expliquer toutes ses fonctions notamment sa capacité à stimuler la prolifération des cellules (Inoue et al. 1998 ; Ishiwatari et al. 1994 ; Sedman et al. 1992 ; Spitkovsky et al. 1996). L'expression de l'oncoprotéine E6 régule et protège les cellules de la différenciation induite par le sérum et le calcium par des mécanismes dépendants ou non de p53 (Sherman & Schlegel 1996 ; Sherman et al. 2002 ; Sherman et al. 1997 ; Woodworth et al. 1992). E6 se lie à une protéine E6BP (E6 binding protein) qui lie elle-même le calcium et est localisée dans le réticulum endoplasmique, la liaison de E6 à E6BP participe à ses activités de transformation (Chen et al. 1995). E6 interagit avec la fibulin-1. Cette protéine lie le calcium dans le plasma et la matrice extracellulaire et est impliquée dans les processus de transformation et d'invasion tumorale. La surexpression de la fibulin-1 inhibe le processus de transformation de E6 (Du et al. 2002). D'autre part, une partie des actions de E6 sur la transformation des cellules est dépendante de sa capacité à dégrader les protéines PDZ. La délétion du domaine PDZ de E6 empêche l'immortalisation de cellules épithéliales de l'amygdale humaine (Spanos et al. 2008a), la transformation (Nguyen et al. 2002b ; Shai et al. 2007 ; Watson et al. 2003) et l'induction de l'hyperplasie in vivo (Nguyen et al. 2003). De plus E6 stabilise ERB-b2 au cours de la transformation de kératinocytes du col de l'utérus. ERB-b2 est un récepteur tyrosine kinase qui augmente avec la densité cellulaire dans les cellules transfectées par E6 (Narisawa-Saito et al. 2007). Enfin de même que E7, E6 doit être exprimée continuellement pour maintenir le phénotype transformé des cellules (Takebe et al. 1987; **Cone et al.** 1992) bien que des mutations de ses gènes cibles pourraient entraîner sa disparition lorsqu'elle n'a plus d'utilité dans la progression cancéreuse (**Storey et al.** 1995).

II.E.3.3. Dégradation et régulation des fonctions de p53 par E6

La dégradation de p53 est essentielle au processus de transformation induit par le virus (Crook et al. 1994 ; Pim et al. 1994 ; Werness et al. 1990). E6 lie p53 grâce à ses domaines de liaison au zinc, le domaine dans la partie N-terminale servant à la liaison, le domaine du côté C-terminal étant impliqué dans sa dégradation (Crook et al. 1991 ; Mansur et al. 1995 ; Slebos et al. 1995). E6 est capable de cibler et dégrader les différentes formes oligomériques de p53 (Gardiol & Banks 1998 ; Marston et al. 1995 ; Medcalf & Milner 1993). En revanche, les formes épissées E6*, si elles sont capables de lier p53, ne peuvent induire sa dégradation (Shally et al. 1996). De façon intéressante les formes épissées E6* inhibent la dégradation de p53 par E6 en se liant à E6 non épissée (Pim & Banks 1999 ; Pim et al. 1997). Ce contrôle est dépendant du cycle cellulaire, le niveau d'expression de E6*I augmente en phase G2/M avec le niveau de p53 (Guccione et al. 2004b).

La dégradation de p53 par E6 abaisse très fortement sa durée de vie, l'amenant de plusieurs heures à moins d'une heure (**Hubbert et al.** 1992 ; **Lechner et al.** 1992). p53 est habituellement dégradée par l'ubiquitine ligase mdm2 dans la cellule mais cette voie, bien que différente de celle de E6, est inhibée en présence de l'oncoprotéine (**Camus et al.** 2003 ; **Hengstermann et al.** 2001 ; **Marston et al.** 1994). La dégradation de p53 par E6 nécessite la liaison de E6 à p53 (**Scheffner et al.** 1992). Cette dégradation est dépendante de l'ubiquitine associée au système du protéasome (**Band et al.** 1991 ; **Scheffner et al.** 1990 ; **Thomas et al.** 1996). E6 se lie à l'ubiquitine ligase E3 E6AP (E6 associated protein) et la dégradation de p53 nécessite également les protéines E1 et E2 du complexe du protéasome (**Scheffner et al.** 1993). La dégradation de p53 nécessite la liaison à la fois de E6 à E6AP et de E6 à p53 même



Figure 19 Cibles cellulaires et activités de l'oncoprotéine E6.

Schéma des différents processus sur lesquels intervient l'oncoprotéine E6 et les protéines apparentées qu'elle cible ou dégrade (d'après Tungteakkhun, 2008).

si des interactions indépendantes entre chacune des protéines peuvent avoir lieu (**Camus et al.** 2007 ; **Daniels et al.** 1998 ; **Liu et al.** 1999).

D'autre part, en plus de dégrader p53, E6 est capable d'inhiber son activité de transactivation et de régulation de l'expression de ses gènes cibles (**Hoppe-Seyler & Butz** 1993 ; **Lechner & Laimins** 1994 ; **Mietz et al.** 1992 ; **Molinari & Milner** 1995 ; **Thomas et al.** 1995). L'oncoprotéine virale empêche la liaison de p53 à l'ADN mais est également capable d'entraîner sa délocalisation dans le cytoplasme où elle est séquestrée avant d'être dégradée (**Freedman & Levine** 1998 ; **Liang et al.** 1993 ; **Stewart et al.** 2005).

II.E.3.4. E6 associated protein (E6AP)

La liaison de E6 à E6AP n'est pas seulement un moyen pour l'oncoprotéine virale de dégrader p53. Par cet intermédiaire, E6 cible et dégrade de nombreuses protéines cellulaires, contourne son déséquilibre quantitatif en détournant de la cellule le système de dégradation par l'ubiquitine associé au protéasome. Ainsi des études utilisant des siRNA E6AP, ont mis en évidence que la majorité des effets de l'oncoprotéine virale est réalisée au travers de l'ubiquitine ligase (**Hengstermann et al.** 2005 ; **Kelley et al.** 2005 ; **Kuballa et al.** 2007). Néanmoins, de récents travaux ont également mis en évidence un rôle stabilisateur de E6AP sur E6 ce qui expliquerait aussi la forte dépendance des actions de l'oncoprotéine virale à E6AP (**Tomaić et al.** 2009).

E6AP est une protéine monomérique de 100 kDa (**Huibregtse et al.** 1991). L'ARNm issu de la transcription de son gène EB3A peut être épissé alternativement et traduit en 3 isoformes (**Yamamoto et al.** 1997). E6AP appartient à une nouvelle classe d'ubiquitines ligases E3 qui est définie par l'homologie de domaine dans la partie C-terminale (**Huibregtse et al.** 1995). Pour induire la dégradation de p53, E6AP se lie notamment avec la protéine E2 UbcH5, apparentée à l'ubiquitine ligase UBC8 d'*Arabidopsis thaliana*, du complexe ubiquitine ligase (**Nuber et al.** 1996 ; **Rolfe et al.** 1995 ; **Scheffner et al.** 1994). E6AP peut être dégradée par le complexe du protéasome et son ubiquitinylation est à la fois induite par E6 mais également par E6AP elle-même (**Kao et al.** 2000 ; **Nuber et al.** 1998). Enfin E6AP possède des fonctions de coactivation de récepteurs nucléaires aux hormones (**Nawaz et al.** 1999).

La liaison de E6 à E6AP implique un domaine riche en leucine LXXLL situé dans le second domaine de liaison au zinc de E6 (**Cooper et al.** 2003 ; **Daniels et al.** 1997 ; **Elston et al.** 1998 ; **Huibregtse et al.** 1993). De façon intéressante, il a été mis en évidence que E6*I pouvait se lier à E6AP. Ces complexes se localiseraient dans le cytoplasme alors que les complexes de E6 et E6AP se formeraient dans le noyau des cellules (**Vaeteewoottacharn et al.** 2005).

II.E.3.5. Régulation de l'activité de la télomérase par E6

A chaque division cellulaire la longueur des télomères diminue. La réduction des télomères entraîne une instabilité génomique et la sénescence des cellules lorsqu'elles atteignent la limite de Hayflick. Pour des cellules normales, cette limite n'est jamais atteinte mais pour des cellules tumorales en constante division, ce mécanisme doit être détourné pour leur permettre de continuer à croître. Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent permettre de conserver la longueur des télomères. L'oncoprotéine E6 est capable d'activer la sous-unité catalytique de la télomérase (hTert) qui entre dans la composition d'un complexe ribonucléoprotéique synthétisant les répétitions des télomères (**Klingelhutz et al.** 1996). Le maintien de la longueur des télomères est réalisé en coopération avec E7 qui participe elle aussi à la prévention de leur érosion (**Baege et al.** 2002 ; **Stöppler et al.** 1997 ; **Liu et al.** 2008).

L'action de E6 sur la télomérase est principalement réalisée par l'activation de son promoteur mais il a également été mis en évidence une interaction physique fonctionnelle de E6 directement sur le complexe télomérase (**Liu et al.** 2009).

L'activation transcriptionnelle de la télomérase par E6 est en partie dépendante de c-Myc qui se lie sur le promoteur de hTert au niveau d'un site E-box (Gewin & Galloway 2001 ; McMurray & McCance 2003 ; Oh et al. 2001 ; Veldman et al. 2001 ; Veldman et al. 2003). E6 elle-même participe à l'activation de hTert par plusieurs mécanismes, elle lève l'inhibition des facteurs USF (upstream transcription factor) et s'associerait à E6AP pour dégrader un régulateur de l'expression de la sous-unité de la télomérase (James et al. 2006b ; Liu et al. 2005). Il a en fait été mis en évidence que l'ARNm d'un gène NFX1 (nuclear transcription factor, X-box binding 1) était épissé alternativement pour être traduit en NFX1-91 et NFX1-123. NFX1-91 est inhibiteur de l'expression de hTert et il est ciblé par E6 et E6AP pour être dégradé (Gewin et al. 2004). NFX1-123 s'associe à des protéines de liaisons de queue poly(A) (PABPC) et active de façon post-transcriptionnelle hTert en se liant à ses ARNm dans le cytoplasme et augmentant leur stabilité (Katzenellenbogen et al. 2009).

II.E.3.6. Régulation de l'apoptose par E6

La dégradation de p53 n'est pas le seul mécanisme par lequel E6 protège les cellules infectées par HPV de l'apoptose (**Butz et al.** 1996 ; **Steller et al.** 1996). E6 agit sur de nombreux médiateurs de la mort cellulaire de la voie mitochondriale et des voies des récepteurs aux signaux de mort.

E6 se lie à Bak et le dégrade via E6AP (Liu et al. 2008 ; Thomas & Banks 1999 ; Thomas & Banks 1998). E6 inhibe également l'expression de l'ARNm de Bax et déstabilise sa protéine (Alfandari et al. 1999 ; Magal et al. 2005 ; Vogt et al. 2006).

D'autre part E6 intervient au niveau de la signalisation induite par les récepteurs aux TNF. Elle se lie au récepteur 1 du TNF et empêche la liaison de FADD (Fas associated death domain) (**Duerksen-Hughes et al.** 1999 ; **Filippova et al.** 2004 ; **Filippova et al.** 2002). Cependant l'effet de TNF sur l'apoptose des cellules infectées par HPV est dose dépendant, E6 pouvant protéger ou sensibiliser les cellules à l'apoptose (**Filippova et al.** 2005 ; **Filippova et al.** 2009 ; **Vikhanskaya et al.** 2002). E6 cible également les partenaires en aval de cette voie de signalisation et inhibe l'activation des caspases 3 et 8 en dégradant notamment la caspase 8 (**Filippova et al.** 2007 ; **Garnett et al.** 2006).

E6 interagit également avec des corps nucléaires dans le noyau qui colocalisent avec PML (promyelotic leukemia protein). E6 induit la dégradation de PML et protège les cellules de l'apoptose (**Guccione et al.** 2004a). De plus E6 et E7 augmentent également l'expression de C-IAP2 (inhibitor of apoptosis protein 2) par leur action sur NFκB (**James et al.** 2006a ; **Yuan et al.** 2005).

Enfin l'oncoprotéine virale inhibe les fonctions d'induction de l'apoptose de p73, un homologue de p53 avec lequel elle interagit par le même domaine de liaison que celui de p53 (**Park et al.** 2001).

II.E.3.7. Echappement au système immunitaire par l'intermédiaire de E6

A l'instar de E7, E6 participe à la protection du virus HPV contre le système immunitaire de l'hôte. Les oncoprotéines sont d'une part difficilement utilisables pour la présentation d'un antigène aux cellules T cytotoxiques (**Evans et al.** 2001). E6 est d'autre part capable de réduire l'accès des cellules du système immunitaire en réduisant l'expression de la cadhérine-E nécessaire à leur attachement et à leur migration (**Caberg et al.** 2009 ; **Matthews et al.** 2003). E6 et E7 interviennent également sur la migration des cellules de Langherans en inhibant l'expression de MIP3- α (**Guess & McCance** 2005).

L'oncoprotéine virale E6 est également capable de réguler la réponse aux cytokines et d'inhiber l'arrêt de la croissance ou la mort cellulaire. Ainsi E6 se lie à IRF-3 (interferon regulatory factor 3) et inhibe son activité de transcription (**Ronco et al.** 1998). Cet effet pourrait être la conséquence de l'association de E6 avec Tyk2, association qui empêche la phosphorylation de Tyk2 et sa liaison au récepteur de l'interféron (**Li et al.** 1999b).

L'oncoprotéine virale interagit avec le produit du gène TSC2 qui code la tubérine (tuberous sclerosis 2) et qui régule la phosphorylation de la kinase S6 par l'insuline. E6 se lie à la tubérine et entraîne sa dégradation par le protéasome perturbant ainsi la signalisation de l'insuline (**Lu et al.** 2004 ; **Zheng et al.** 2008).

E6 se lie à TIP-2/GIPC qui est impliqué dans la signalisation du TGF- β et induit sa dégradation par le protéasome. TIP-2 est une protéine PDZ qui augmente l'expression du récepteur III au TGF- β à la membrane (**Favre-Bonvin et al.** 2005).

Enfin E6 inhibe l'expression de l'IL-18 par sa liaison à la protéine p300 et la répression du promoteur d'IL-18 (**Cho et al.** 2001 ; **Huang & McCance** 2002).

II.E.3.8. Régulation de protéines d'adhérence et des protéines à domaine PDZ par E6

En plus de ses actions sur p53, la télomérase, la résistance à l'apoptose, E6 possède d'autres effets qui ne semblent pas être directement reliés au cycle du virus. En effet E6 cible et dégrade plusieurs protéines d'adhérence ou des complexes des jonctions intercellulaires et notamment un nombre important de protéines à domaine PDZ dont la disparition pourrait jouer ou avoir un rôle dans les processus associés à la progression tumorale.

Ainsi E6 est capable de dégrader la paxilline appartenant aux complexes d'adhérence focale (**Tong & Howley** 1997 ; **Tong et al.** 1997). La liaison de E6 est réalisée au travers de son motif LXXLL et entre en compétition avec la liaison à E6AP (**Pol et al.** 1998). La dégradation de la paxilline entraîne la perturbation du cytosquelette d'actine qui est dépolymérisé. E6

interagit avec un autre membre de ce complexe à savoir la zyxine et entraîne sa translocation au noyau au travers de son domaine LIM. La zyxine pourrait alors avoir des actions de transcription une fois délocalisée (**Degenhardt & Silverstein** 2001b).

L'oncoprotéine E6 cible et dégrade Dlg par l'intermédiaire du protéasome (**Gardiol et al.** 1999 ; **Gardiol et al.** 2002 ; **Matsumoto et al.** 2006). Cette protéine appartient au complexe de polarité Scrib composé de Scribble-Dlg-Lgl, les complexes de polarité sont responsables de la localisation et la formation des jonctions intercellulaires. La dégradation de Dlg est nécessaire à la transformation par E6 de cellules de rongeur (**Kiyono et al.** 1997). De façon intéressante, il a été mis en évidence que la phosphorylation de Dlg contrôlait sa localisation membranaire ou nucléaire et que E6 ciblait préférentiellement les formes phosphorylées de Dlg présentes au noyau. Cette préférence pourrait indiquer que E6 inhibe un rôle de transactivation de Dlg (**Massimi et al.** 2006 ; **Massimi et al.** 2004 ; **Narayan et al.** 2009).

L'oncoprotéine virale est également capable de dégrader Scribble par l'intermédiaire de E6AP. La dégradation de Scribble est associée à une perte de l'intégrité des jonctions serrées, Scribble étant présente avec ZO-1 à la membrane des cellules MDCK (**Nakagawa & Huibregtse** 2000).

E6 cible également PATJ qui entre dans la composition d'un second complexe de polarité formé de Crumbs-Pasl1-PATJ et régule également le troisième complexe de polarité formé par Par6-aPKC-par3. De façon intéressante elle peut-être ciblée et dégradée à la fois par E6 et E6* (**Storrs & Silverstein** 2007).

E6 cible et dégrade MUPP1 (multi-PDZ domain protein), une protéine adaptatrice qui entre également dans la composition du complexe de polarité Crumbs. Sa dégradation pourrait participer à la régulation de la prolifération cellulaire (**Lee et al.** 2000).

L'oncoprotéine cible et dégrade les protéines PDZ MAGI-1, -2, -3 faisant partie du complexe protéique cytoplasmique des jonctions serrées. La dégradation de MAGI-1 est en partie associée aux fonctions tumorigènes de E6 (Glaunsinger et al. 2000 ; Thomas et al. 2001 ; Thomas et al. 2002).

E6 cible également la protéine PDZ CAL (cystic fibrosis transmembrane regulator associated ligand) et entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation. CAL est une protéine PDZ qui est associée à l'appareil de Golgi, elle est préférentiellement dégradée par HPV16 E6 et pourrait être également une cible naturelle de E6AP en l'absence de E6 (**Jeong et al.** 2007). HPV16 E6 et HPV18 E6 dégradent la protéine Dlg4/PSD95, ce qui en fait un potentiel suppresseur de tumeur dans le cadre d'une infection par HPV (**Handa et al.** 2007). E6 pourrait accroître la mobilité cellulaire en dégradant la protéine PDZ Tip-1 (Tax interacting protein 1), un effecteur potentiel de RhoA. E6 dégrade également la protéine tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1), sa dégradation est réalisée par l'intermédiaire de E6AP (**Töpffer et al.** 2007). De même E6 cible PTPN13, sa dégradation permettant aux cellules transfectées par E6 et Ras de croître en l'absence de support (**Spanos et al.** 2008b).

E6 est donc capable de cibler de nombreuses protéines PDZ au travers du domaine qu'il contient dans sa partie C-terminale. De façon intéressante, il existe des spécificités et des préférences de substrats entre les différents HPV qui sont dépendantes des acides aminés non canoniques présents au sein du domaine PDZ (**Zhang et al.** 2007). Ainsi HPV18 E6 dégrade de façon 5 fois plus efficace hDlg que HPV16 E6 (**Liu et al.** 2007b ; **Thomas et al.** 2005). La dégradation des protéines PDZ est réalisée principalement par l'association à E6AP mais des dégradations indépendantes de E6AP ont été également mises en évidence pour Scribble, Dlg et MAGI-1 et -3 (**Grm & Banks** 2004 ; **Massimi et al.** 2008). D'autre part il a été récemment mis en évidence que les formes épissées de E6, bien que ne possédant pas de domaines PDZ

du fait de l'épissage, étaient capables d'entraîner la dégradation de protéines PDZ différemment de E6 full-length. En l'absence de E6 full-length elles abaissent les niveau de Dlg, Scribble et Akt, cette dernière étant également une cible de E7 (**Pim et al.** 2009).

II.E.3.9. Régulation transcriptionnelle et régulation épigénétique par E6

De même que l'oncoprotéine E7, l'oncoprotéine E6, en plus de ses nombreuses interactions protéiques, dispose de mécanismes de régulation de la transcription de nombreux gènes et agit également de façon post-transcriptionnelle sur certaines de ses cibles (**Desaintes et al.** 1992 ; **Lamberti et al.** 1990 ; **Akutsu et al.** 1996).

Ainsi la transfection de E6 induit un relâchement de la chromatine. Cet effet peut potentiellement survenir par plusieurs mécanismes dont la phosphorylation des histones H1, la liaison directe de l'oncoprotéine aux sites d'attachement à la matrice nucléaire ou encore la conséquence de l'inhibition de p53 et de la transcription de ses gènes cibles par E6 (**Smith et al.** 1998). D'autre part, la protéine HPV16 E6 serait capable de se lier aux ARNm et d'inhiber leur épissage alternatif dans le cas de la présence de sites d'épissage non optimaux (**Bodaghi et al.** 2009). Des études d'inhibition de l'oncoprotéine E6 ont également mis en évidence des effets de régulation de gènes dépendants de c-Myc associés à la synthèse et l'épissage des ARNm (**Kuner et al.** 2007).

Comme décrit précédemment, E6 inhibe p53 en la dégradant mais aussi en inhibant la transcription de ses gènes cibles (**Etscheid et al.** 1994). Pour réaliser cette action, E6 se lie au coactivateur transcriptionnel p300/CBP (CREB binding protein) (**Bernat et al.** 2002 ; **Patel et al.** 1999 ; **Zimmermann et al.** 1999) et par son intermédiaire inhibe l'acétylation des protéines histones et du noyau du nucléosome (**Thomas & Chiang** 2005).

E6 est également capable d'inhiber un autre coactivateur transcriptionnel de p53 hADA3. Ce coactivateur appartient au complexe activateur des récepteurs à l'acide rétinoïque et aux complexes des acétyltransférases (**Kumar et al.** 2002). Ainsi la liaison de E6 inhibe la transactivation des gènes stimulés par l'intermédiaire de RXR α (**Zeng et al.** 2002). La dégradation de hADA3 par E6 est aussi corrélée à l'arrêt de la voie p14^{ARF} p53 et à l'immortalisation des cellules épithéliales mammaires (**Shamanin et al.** 2008). La dégradation de hADA3 est réalisée par un processus dépendant de E6AP (**Hu et al.** 2009b). E6 cible BARD1 (BRCA1 associated ring domain 1) qui pourrait réguler les activités transcriptionnelles de p53 (**Yim et al.** 2007). L'oncoprotéine E6 peut également se lier au coactivateur transcriptionnel GPS2 (G protein pathway suppressor 2) et induire sa dégradation *in vivo* (**Degenhardt & Silverstein** 2001a).

De nombreuses autres régulations de la transcription de gènes par E6 ont été mises en évidence. E6 peut agir sur le promoteur de c-Myc (**Kinoshita et al.** 1997), elle active également le promoteur du VEGF de façon indépendante de p53 (**Clere et al.** 2007 ; **López-Ocejo et al.** 2000). E6 interagit avec la protéine transmembranaire 87B qui possède des fonctions de transduction du signal et de contrôle de la transcription (**Li et al.** 2008a ; **Li et al.** 2008b). E6 stimule le promoteur de TGF- β 1 au travers de séquences riches en GC et d'une séquence consensus **Sp1 (Dey et al.** 1997). E6 est capable d'induire l'expression de c-Fos (**Tomita et al.** 1998). L'oncoprotéine virale régule la transcription de la fibronectine en induisant la formation de complexes protéique qui activent l'élément de réponse à l'AMP cyclique (**Shino et al.** 1997). Il a été mis en évidence que E6 pouvait se lier à RTIP-Br1, un intégrateur transcriptionnel de E2F1/DP/Rb et un antagoniste de p16 (**Gupta et al.** 2003). E6 augmente l'expression du groupe de haute mobilité HMG-i(Y) en relation avec la confluence des cellules (**Kinoshita et al.** 1996). Elle inhibe l'expression du gène E6DG1, cette action étant corrélée avec la capacité à croître sans support (**Sakao et al.** 2002). L'expression de E6 et de E7 est également associée à une augmentation post-traductionnelle de HTRA1 (high temperature requirement 1), un membre des protéases de réponse au stress oxydatif (Clawson et al. 2008). E6 agit sur la présence du mir-34a par l'intermédiaire de son action sur p53 (Wang et al. 2009). E6 se lie à la GAP E6TP1 (E6 target protein 1) et la dégrade. E6TP1 possède une forte homologie avec les protéines activatrices de GTPase Rap, dont SPA-1, la tubérine et Rap1GAP (Gao et al. 1999 ; Gao et al. 2002a ; Singh et al. 2003). La dégradation de E6TP1 est associée à l'immortalisation des cellules par E6 et serait importante au cycle viral (Gao et al. 2001 ; Lee et al. 2007). L'oncoprotéine est également capable de réguler la localisation des précurseurs du facteur de transcription NFkB p100 et p105 (Havard et al. 2005). E6 régule la transcription de la cyclooxygénase 2 au travers d'une action sur le récepteur à l'EGF (Subbaramaiah & Dannenberg 2007). Des études en microarray ont montré que l'expression de E6 pouvait modifier celles de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, la protéolyse réalisée par l'intermédiaire de l'ubiquitine et du complexe du protéasome, la différenciation ou encore l'inflammation (Duffy et al. 2003 ; Min et al. 2009). Enfin il a été mis en évidence récemment que l'expression de E6 était associée à la transcription de gènes cibles de p63 (Teissier et al. 2007).

II.E.3.10. Instabilité génomique induite par E6

Si la protéine p53 est capable d'induire l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN, sa première action est d'activer des mécanismes de réparation des erreurs. La mort cellulaire n'intervient que lorsque ces mécanismes se sont avérés inefficaces. En dégradant p53, E6 favorise l'apparition de mutations et de dommages à l'ADN qui ne sont plus pris en charge par le contrôle de p53 (**Gu et al.** 1994 ; **Havre et al.** 1995 ; **Kessis et al.** 1993). La perte de p53 induite par E6 entraîne l'apparition de tétraploïdie dans les cellules au travers de l'augmentation de la protéine plk1 (**Incassati et al.** 2006). E6 peut également entraîner des altérations génomiques indépendamment de p53, dont des mutations (**Kim et al.** 2000), des

erreurs de réparation de rupture du double brin (**Shin et al.** 2006a), ou encore la non réparation des fourches de réplication bloquées au moment de la réplication de l'ADN (**Day & Vaziri** 2009).

D'autre part, E6 inhibe le point de contrôle du fuseau mitotique (**Thomas & Laimins** 1998) entraînant ainsi des problèmes de ségrégation des chromosomes (**Plug-Demaggio & McDougall** 2002) et de polyploïdie (**Liu et al.** 2007a). E6 et E7 induisent toutes les deux l'aneuploïdie chromosomique mais de façon différente (**Schaeffer et al.** 2004).

L'expression de l'oncoprotéine E6 a pour effet d'inactiver le point de contrôle du cycle en G2 et entraîne de cette façon des anomalies chromosomiques (**Kaufmann et al.** 1997). De façon inattendue, l'expression de la télomérase est également associée à une instabilité génomique et à l'inactivation du point de contrôle G2 (**Coursen et al.** 1997 ; **Filatov et al.** 1998 ; **Takeuchi et al.** 2007). E6 cible l'O(6)-méthyle-guanine-DNA-méthyltransferase (MGMT), une enzyme de réparation de l'ADN et augmente sa protéolyse induite par l'ubiquitine (**Srivenugopal & Ali-Osman** 2002).

Enfin E6 perturbe le contrôle du génome cellulaire au travers d'interactions protéiques. Elle se lie à la protéine de maintenance du minichromosome 7 (Hmcm7) qui est dégradée par E6AP (**Kühne & Banks** 1998 ; **Kukimoto et al.** 1998), à la protéine XRCC1, une protéine d'échafaudage régulant la composition de la machine de réparation des cassures simple brin (**Iftner et al.** 2002) et à la kinase CKH1, une kinase clef du contrôle de la réponse aux dommages à l'ADN (**Chen et al.** 2009).

II.E.3.11. Variants de E6

Comme exposé précédemment il existe différents variants pour un même génotype HPV. Les variants possèdent quasiment la même séquence que le prototype européen mais portent des variations n'excédant pas 2% sur les parties codantes (**Seedorf et al.** 1985) et 5% sur les

parties non codantes (**Bernard et al.** 2006). Une association entre les variants E6 d'HPV16, la persistance de l'infection à HPV et la progression des lésions du col de l'utérus a été mise en évidence dans plusieurs études (**Zehbe et al.** 2009 ; **Berumen et al.** 2001 ; **Grodzki et al.** 2006 ; **Sichero et al.** 2007 ; **Zehbe et al.** 1998c ; **Zehbe et al.** 1998b ; **Brady et al.** 1999 ; **Andersson et al.** 2000 ; **Pérez-Gallego et al.** 2001 ; **Kämmer et al.** 2002 ; **Costa et al.** 2002 ; **Sathish et al.** 2005) et particulièrement avec les variants L83V (chez lesquels une leucine est remplacée par une valine du fait d'une mutation du nucléotide 350).

Des études menées in vitro sur différents variants ont pu mettre en évidence des activités biochimiques différentes par rapport au prototype. Certains variants de E6 diffèrent au regard de leur capacité à dégrader p53 et Bax et ainsi à protéger les cellules infectées de l'apoptose (Asadurian et al. 2007 ; Lichtig et al. 2006 ; Stöppler et al. 1996b). Ils présentent également des capacités de liaison altérées à leurs cibles connues E6BP et hDlg (Asadurian et al. 2007 ; Lichtig et al. 2006). Cependant les différences biochimiques observées in vitro ne permettent pas d'établir un lien direct de cause à effet entre les différents polymorphismes et leur impact sur la biologie du virus. Les différences observées sur la dégradation de p53, par exemple, ne sont pas corrélées avec la formation de colonies résistantes à la différenciation (Asadurian et al. 2007 ; Stöppler et al. 1996b). Des cultures organotypiques de cellules NIKS transfectées avec différents variants montrent une coexpression des marqueurs kératine 5 et 10 en raison d'une migration des kératinocytes des couches basales vers la surface de l'épithélium, le prototype ne présentant pas ce phénotype (Zehbe et al. 2009). Les variants L83V associés à une plus forte pathogénicité ne présentent que peu de différences avec le prototype. Chakrabarti et al. ont montré et émis l'hypothèse que les particularités du variant L83V résidaient dans une modification d'induction de voies de signalisation dont la voie des MAP kinases, la voie NOTCH et la voie Ras. Ces altérations procurent au variant un avantage dans la tumorigenèse (Chakrabarti et al. 2004). Les variants de HPV18 E6 moduleraient quant à eux de façon différente la voie de signalisation PKB/PI3K (**Contreras-Paredes et al.** 2009). D'autre part il a été mis en évidence que la présence de variants affectait l'épissage alternatif de l'ARN polycistronique E6/E7 (**De la Cruz-Hernández et al.** 2005), les formes épissées E6* ayant des actions opposées ou différentes des formes non épissées (**Pim et al.** 1997 ; **Pim et al.** 2009). Bien que les variants de HPV16 E6 ne diffèrent pas dans leur domaine de reconnaissance PDZ, la séquence en acides aminés dans cette partie varie selon les types d'HPV et a un impact direct sur la liaison à leurs cibles privilégiées (**Charbonnier et al.** 2008). Ainsi les variations entre les différentes oncoprotéines E6 et leurs conséquences sur l'affinité à leurs substrats pourraient être en relation avec les variations de pathogénicité observées.

Les principales cibles des oncoprotéines E6/E7 et les conséquences liées à leur dégradation sont présentées sur la figure 20. La variété des cibles répertoriées illustre l'étendue des rôles potentiels des oncoprotéines et montre qu'au-delà de leur capacité bien connue à immortaliser les cellules infectées, les oncoprotéines sont capables de nombreuses actions en relation avec la progression tumorale. L'oncoprotéine E6 dégrade plusieurs protéines des jonctions intercellulaires et les oncoprotéines E7 agissent, au travers de leurs effets sur les facteurs de transcription, sur de nombreuses voies de signalisation. Bien que l'impact précis de ces effets n'ait pas été déterminé, ils pourraient avoir des conséquences directes dans les processus d'invasion tumorale. Les systèmes de jonctions intercellulaires ainsi que les métalloprotéinases matricielles, dont la régulation est à la base des phénomènes mis en œuvre lors de l'envahissement des tissus par les cellules tumorales, seront donc présentés dans la partie suivante.



Figure **20** Schéma des différents processus et moyens de coopération par lesquels les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV agissent sur les processus de transformation des cellules (d'après Narisawa-Saito, 2007).
III La progression tumorale

La formation de cancers d'origine épithéliale, appelés carcinomes, et leur dissémination métastatique impliquent une chaine d'événements complexes. Les cellules épithéliales subissent des altérations génétiques successives aboutissant à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces cellules ainsi transformées prolifèrent de façon anarchique et forment une tumeur primaire, appelée carcinome *in situ*, qui reste confinée au sein de la couche épithéliale. Lors du processus d'invasion tumorale, certaines cellules tumorales acquièrent la capacité de franchir la membrane basale et d'envahir la matrice extracellulaire du mésenchyme sous jacent à l'épithélium. L'acquisition de propriétés invasives par les cellules épithéliales tumorales peut ainsi aboutir à la formation d'un carcinome invasif. Enfin, les cellules épithéliales tumorales invasives peuvent atteindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques présents au sein de la tumeur et ainsi former des métastases à distance. La formation des cellules tumorales dans et hors des vaisseaux et la prolifération des cellules tumorales au sein de l'organe cible (figure 21).

La progression métastatique implique donc l'acquisition de propriétés invasives par les cellules épithéliales tumorales. L'expression de telles propriétés résulte de modifications intrinsèques importantes des cellules épithéliales tumorales. Parmi ces nombreuses modifications, on observe notamment une réorganisation ou une disparition des complexes d'adhérence intercellulaire (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes) et la capacité à dégrader et remodeler la matrice extracellulaire. De tels changements caractérisent un phénomène de transdifférenciation ou dédifférentiation impliquant la perte de caractères typiquement épithéliaux (notamment la perte de cohésion cellulaire) et le gain

109



Figure 21 Schéma des différentes étapes de la progression tumorale.

Les cellules du carcinome *in situ* perdent leur cohésion cellulaire et acquièrent des capacités protéolytiques pour franchir la membrane basale et progresser dans le tissu conjonctif sous-jacent.

de propriétés caractéristiques de cellules mésenchymateuses (motilité, expression de protéases rarement synthétises par des cellules épithéliales en conditions normales,...). Ce phénomène a donc été appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » (EMT), par analogie avec le terme initialement défini pour caractériser la transdifférenciation observée dans les cellules épithéliales migratoires et/ou invasives impliquées dans les phénomènes de morphogenèse (morphogenèse mammaire, pulmonaire,...) et d'embryogenèse (migration des cellules de la crête neurale,...) (**Thiery** 2002). Depuis, une EMT a été décrite dans bons nombre d'autres phénomènes physiologiques impliquant la migration et l'invasion de cellules épithéliales tels que la cicatrisation ou l'invasion trophoblastique.

III.A. Les jonctions intercellulaires

Il existe plusieurs types de jonctions cellulaires permettant de relier les cellules entre-elles, les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires et les desmosomes (figure 22).

III.A.1. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes forment un réseau de protéines transmembranaires s'associant les unes aux autres entre les cellules et s'ancrant dans leur cytoplasme par des intermédiaires au cytosquelette d'actine. Les protéines majeures des jonctions adhérentes sont les cadhérines qui sont reliées dans leur partie cytoplasmique par les caténines au réseau d'actine polymérisé. Ainsi les jonctions adhérentes, dont l'organisation est dépendante de la présence de calcium, sont responsables des forces de cohésion entre les cellules et maintiennent l'intégrité de l'épithélium (**Gumbiner** 1996) (figure 23).

III.A.1.1. Cadhérine-E et caténines

La queue cytoplasmique de la cadhérine forme un complexe multiprotéique avec les caténine- β , caténine- γ et caténine p120 (p120^{ctn}), toutes membres de la famille de protéines



Lumière

Figure 22 Organisation schématique des systèmes de jonctions intercellulaire et cellulematrice.

Dans un épithélium simple couche, la partie membranaire apicale (en bleu) est délimitée de la partie membranaire basolatérale (en rouge) par les jonctions serrées (en noir). L'adhérence intercellulaire est réalisée par les liaisons homophiles des cadhérines aux jonctions adhérentes (en vert) qui forment une ceinture à l'apex des cellules. Les liaisons sont renforcées par les desmosomes (en marron). La liaison à la membrane basale est réalisée par les complexes d'intégrines et les hémi-desmosomes (en jaune). Enfin les cellules peuvent communiquer entre elles à l'aide des jonctions communicantes (en bleu foncé).

contenant des domaines répétés armadillo (Gumbiner 2005 ; Halbleib & Nelson 2006 ; Perez-Moreno et al. 2003 ; Pokutta & Weis 2007 ; Ebnet 2008 ; Perez-Moreno & Fuchs 2006). La caténine- β est directement associée à la région membranaire distale, la p120 à la région membranaire proximale. Ces deux régions de la cadhérine-E sont fortement conservées indiquant l'importance des interactions ainsi réalisées. La partie cytoplasmique de la cadhérine-E liant la caténine- β est nécessaire à son transport du réticulum endoplasmique à la membrane latérale des cellules (Chen et al. 1999). La liaison de ces deux protéines est également impliquée dans les propriétés d'adhérence de la cadhérine-E (Perez-Moreno et al. 2003 ; Pokutta & Weis 2007) ainsi que dans la stabilisation de la caténine- β qui dans le cas contraire est rapidement dégradée par la voie de l'ubiquitine associée au protéasome (Aberle et al. 1997).

L'interaction entre la cadhérine-E et la p120^{ctn} est également nécessaire à la bonne localisation de la cadhérine-E (**Reynolds & Roczniak-Ferguson** 2004). La p120^{ctn} stabilise la cadhérine-E en limitant son endocytose et régulant son taux de recyclage (**Bryant & Stow** 2004 ; **Davis et al.** 2003). La protéine p120^{ctn} est un régulateur de la transcription de plusieurs gènes par son association avec des facteurs de transcription notamment des gènes de la voie Wnt (**van Roy & McCrea** 2005), p120^{ctn} régule également l'activité des protéines Rho (ras homolog) à petites GTPases.

La caténine- α a longtemps était considérée comme servant de lien entre les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine au travers d'interactions directes à la fois avec la caténine- β et l'actine-F. Il a cependant été montré que sa liaison avec l'actine-F (à laquelle elle ne se lie que par homodimère) et sa liaison avec la caténine- β étaient mutuellement exclusives (**Drees et al.** 2005 ; **Yamada et al.** 2005). Il est possible que la caténine- α sous forme d'hétérodimère avec la caténine- β associée à la cadhérine-E, se lie à d'autres protéines



Figure 23 Complexes majeurs des jonctions adhérentes (d'après Ebnet, 2008).

qui elles seraient associées à l'actine-F. La vinculine et l'actinine- α autrefois citées, ne peuvent lier l'actine au complexe cadhérine-caténine (**Yamada et al.** 2005). Parmi de nombreuses protéines des complexes d'adhérence, le candidat le plus prometteur pour réaliser le lien manquant est pour l'instant l'EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) (**Abe & Takeichi** 2008). Un modèle a également été proposé dans lequel le complexe cadhérine/caténine ne serait pas directement rattaché aux filaments d'actine, une concentration élevée de caténine- α soluble, créée par le clustering des complexes cadhérine/caténine- β , permettrait de réguler la dynamique du cytosquelette d'actine (**Niessen & Gottardi** 2008 ; **van Roy & Berx** 2008).

III.A.1.2. Nectines et afadine

L'autre complexe majeur des jonctions adhérentes est formé des membres de la famille des nectines et d'une protéine d'échafaudage associée par son domaine cytoplasmique, l'AF-6/afadine (**Takai & Nakanishi** 2003). Ce complexe joue un rôle dans l'organisation des jonctions adhérentes formées par la cadhérine-E ainsi que des jonctions serrées réalisées par les claudines dans les cellules épithéliales. Les nectines sont une famille de 4 membres (nectine 1 à 4) de protéines apparentées aux immunoglobulines et localisées au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales (**Sakisaka & Takai** 2004). A la différence des cadhérines, les nectines peuvent établir des liaisons trans-homophiles et hétérophiles. Les partenaires avec lesquels la nectine se lie sont le plus souvent d'autres nectines peuvent influencer les propriétés d'adhérence de la cadhérine-E et donc pourraient contribuer globalement aux forces de cohésion intercellulaire (**Martinez-Rico et al.** 2005 ; **Sato et al.** 2006). Une fonction importante des nectines est leur capacité à activer Cdc42 et les petites GTPases Rac1. L'activation des petites GTPases pourrait faciliter la formation des jonctions et les nectines pourraient coopérer avec les cadhérines dans la régulation du cytosquelette

d'actine aux sites d'adhérence intercellulaire (**Fukuhara et al.** 2004 ; **Kawakatsu et al.** 2005 ; **Kawakatsu et al.** 2002).

Le partenaire cytoplasmique des nectines est l'afadine, c'est une protéine d'échafaudage qui interagit avec l'actine-F liant la jonction adhérente formée par la nectine au cytosquelette d'actine (**Takahashi et al.** 1999 ; **Mandai et al.** 1997). L'afadine s'associe directement avec la caténine- α (**Pokutta et al.** 2002 ; **Tachibana et al.** 2000 ; **Yokoyama et al.** 2001), avec la vinculine par son association avec la ponsine/SH3P12 (**Mandai et al.** 1999) et avec l'actinine- α par une association réalisée au travers du domaine DIL d'interaction avec les protéines ADIP (Afadin DIL Domain-binding Protein) et du domaine LIM 7 avec LMO7 (LIM domain only 7) (**Asada et al.** 2003 ; **Ooshio et al.** 2004). Il est probable qu'au travers de ces interactions multiples, les deux protéines majeures des complexes de jonctions adhérentes soient liées physiquement et qu'elles s'influencent l'une l'autre dans leur localisation et leur activité (**Sakisaka et al.** 2007).

III.A.1.3. Complexes cadhérine-E/caténines et cancer

Au moment de la progression tumorale, il arrive fréquemment que l'expression la cadhérine-E disparaisse dans les cancers épithéliaux (**van Roy & Berx** 2008 ; **Schmalhofer et al.** 2009). De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence des rôles anti-invasifs et anti-métastasiques de la cadhérine E (**Frixen et al.** 1991 ; **Perl et al.** 1998 ; **Vleminckx et al.** 1991). Au cours de l'invasion tumorale, l'expression de la cadhérine-E peut être inhibée au niveau transcriptionnel et traductionnel. Souvent ces mécanismes sont tous les deux utilisés par les cellules tumorales pour inhiber complètement les fonctions de la cadhérine-E (figure 24).

III.A.1.3.1 Contrôle de la transcription de la cadhérine-E

Il existe de nombreux inhibiteurs de la transcription de la cadhérine-E, ils sont issus de la famille Snail dont Snail1 (Snail/SNAI1), Snail2 (Slug/SNAI2), de la famille ZEB (zinc E-box



Figure 24 Organisation schématique des liaisons réalisées par la cadhérine-E et de ses voies de signalisation.

(a) Lorsque la cadhérine-E perd ses fonctions, la caténine- β est libérée mais est dégradée par le complexe du protéasome. (b) L'activation de la voie de signalisation Wnt inhibe GSK-3 β ce qui empêche la dégradation de la caténine- β qui se relocalise au noyau. Elle joue alors un rôle de transcription avec TCF/Lef-1. (c) Lors du désassemblage de la cadhérine-E, la caténine p120 est libérée, elle inhibe RhoA et active Cdc42 et Rac1 permettant aux cellules de migrer (d'après Christofori, 2006).

binding factor) dont ZEB1 (δEF1), ZEB2 (Sip1), de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) E47 et Twist et de la famille Id (inhibitor of DNA binding) HLH (**Peinado et al.** 2007).

Tous les membres de la famille Snail possèdent dans leur partie C-terminale un domaine comprenant un nombre variable de motifs en doigt de zinc. Ces motifs sont de type CCHH où C et H représentent les résidus cystéine et histidine constituant la structure en doigt de zinc impliquée dans la fixation à l'ADN (Manzanares et al. 2001). SNAI1 et SNAI2 agissent en tant qu'inhibiteurs transcriptionnels en se liant à l'ADN sur des séquences 5'-CAGGTG ou 5'-CACCTG connues sous le nom de E-box. Ils se fixent au promoteur de la cadhérine-E au niveau d'une séquence E-pal contenant deux séquences E-box (Batlle et al. 2000 ; Bolós et al. 2003 ; Cano et al. 2000 ; Côme et al. 2004 ; De Craene et al. 2005 ; Hajra et al. 2002). SIP-1 (Smad Interacting Protein-1), comme $\delta EF1$, est caractérisé par la présence de deux domaines à doigt de zinc en région C- et N-terminales (Comijn et al. 2001 ; Remacle et al. 1999 ; Verschueren et al. 1999). Le domaine N-terminal est caractérisé par la présence de 4 motifs en doigt de zinc dont trois sont de type CCHH et un de type CCHC. Le domaine C-terminal est constitué de trois motifs en doigt de zinc de type CCHH (Verschueren et al. 1999). Comme SNAI1 et SNAI2, les facteurs de la famille ZEB se lient à l'ADN sur des séquences E-box (Comijn et al. 2001 ; Sekido et al. 1994 ; Verschueren et al. 1999). La liaison de SIP-1 et de δ EF1 s'effectue également au niveau des deux séquences E-box contenues dans l'élément de régulation E-pal de la cadhérine-E (Comijn et al. 2001 ; Remacle et al. 1999). (Jenuwein & Allis 2001 ; Kouzarides 2007 ; Zhang & Reinberg 2001).

L'EMT induite au moment de la carcinogenèse peut être activée, comme lors du développement, par différent facteurs de croissance et signaux dont le facteur de croissance épithéliale (EGF), le facteur de croissance transformant beta (TGF- β) ou encore la voie de

signalisation Wnt qui activent des récepteurs tyrosine kinase (**Thiery** 2002 ; **Thiery & Sleeman** 2006). Cette signalisation contrôle l'expression de SNAI1 et SNAI2 (**Barrallo-Gimeno & Nieto** 2005), les différentes voies s'entrecroisent en particulier celles induites par le TGF- β , Ras activé, Notch, Hedgehog et/ou la voie Wnt ou la caténine- β (**Barberà et al.** 2004 ; **Peinado et al.** 2003 ; **Zavadil et al.** 2004).

Les mécanismes par lesquels les inhibiteurs de la cadhérine-E régulent son expression, impliquent principalement des remaniements de la chromatine (**Peinado et al.** 2004). L'inhibition par SNAI2, par exemple, dépend des histones déacétylases (HDAC) (**Hemavathy et al.** 2000). Le mécanisme d'inhibition par SNAI1 implique SIN3A ainsi que HDAC1 et HDAC2 (**Peinado et al.** 2004). Des corépresseurs peuvent être également présents dont CTBP1 et CTBP2 (C-terminal binding protein), ils interagissent aussi avec les facteurs ZEB. D'autre part, l'interaction de CTBP et p300 est cruciale à l'inhibition de la cadhérine-E dans les cancers colorectaux (**Peña et al.** 2006). L'activité des complexes des corépresseurs CTBP peut être modifiée par d'autres cofacteurs dont PNN (pinin) (**Alpatov et al.** 2004). L'acétylation ou la sumoylation de CTBP modifie son efficacité d'inhibition de la cadhérine-E, CTBP est également régulée par la concentration de la NADH (**Zhang et al.** 2002).

Les inhibiteurs de la cadhérine-E sont également régulés au niveau post-traductionnel. Ainsi la localisation cellulaire de SNAI1 dépend de sa phosphorylation par PAK1 (p21 activated kinase) (**Domínguez et al.** 2003 ; **Yang et al.** 2005). GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) peut également phosphoryler le signal d'exportation du noyau (NLES) de SNAI1 et la boîte de destruction entraîne son exportation du noyau et sa dégradation par le complexe du protéasome de façon ubiquitine dépendante (**Yook et al.** 2006 ; **Zhou et al.** 2004). La stabilité de SNAI1 est également influencée par la coopération avec les lysyl-oxidase like 2 et 3

(LOXL2 et LOXL3), LOXL2 stabilisant SNAI1 en régulant son interaction avec GSK3β (**Peinado et al.** 2005 ; **Peinado et al.** 2005).

III.A.1.3.2 Contrôle post-traductionnel de la cadhérine-E

La stabilité de la cadhérine-E dépend de son état de phosphorylation. Elle peut être phosphorylée dans sa partie cytoplasmique par des tyrosines kinases activées par le récepteur à l'EGF ou l'expression anormale de proto-oncogènes c-Met et Scr (Gumbiner 2000 ; Shen et al. 2008b). La cadhérine-E phosphorylée est alors dégradée par l'ubiquitine ligase E3 Hakai en fonction de son état de phosphorylation (Fujita et al. 2002) ou par mdm2 (Yang et al. 2006). La cadhérine-E peut être également phosphorylée dans sa partie cytoplasmique au niveau de la sérine 690 par une caséine kinase I qui réduit son association avec la caténine-ß (Dupre-Crochet et al. 2007 ; Gao et al. 2002b). La caténine-β est elle-même phosphorylée (Matsuvoshi et al. 1992) aux tyrosine 489 par Abl (Rhee et al. 2007) ou 654 par EGF (Hoschuetzky et al. 1994), perturbant ainsi la liaison à la cadhérine (Lilien et al. 2002). Une phosphorylation par Src au niveau de la tyrosine 654 dans la dernière répétition amardillo de la caténine-β perturbe sa liaison à la caténine-α (Piedra et al. 2001 ; Daugherty & Gottardi 2007). La phosphorylation du complexe cadhérine survient également par la liaison de certaines protéines de la MEC, ainsi la liaison de la sous unité β 1 se liant au collagène 1 entraîne la localisation de FAK au complexe cadhérine et l'activation de la kinase Src (Koenig et al. 2006).

La cadhérine est également régulée par endocytose dans des conditions de faible concentration en calcium (**Kartenbeck et al.** 1991). L'endoyctose est réalisée par une voie dépendante de la clathrine ou de la cavéoline (**Akhtar & Hotchin** 2001 ; **Le et al.** 1999). Ce mécanisme est dépendant de la PKC et de l'interaction avec le cytosquelette d'actine (**Alexander et al.** 1998). ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) une petite GTPase recrute la

protéine NM23-H1, dont le gène a été identifié comme suppresseur de métastase (**Steeg et al.** 1988), pour faciliter l'endocytose de la cadhérine-E. ARF6 est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et est régulée préférentiellement par une GAP (GTPase activating protein) SMAP1 (**Tanabe et al.** 2005). L'activation d'ARF6 favorise l'internalisation de la cadhérine-E par la clathrine et les cavéoles. ARF6-GTP, la forme active d'ARF6, recrute NM23-H1, une kinase nucléoside diphosphate, qui apporte la source de GTP nécessaire à la fission des vésicules (**Palacios et al.** 2002). Le recrutement de NM23-H1 par ARF6 s'accompagne d'une baisse de Rac1-GTP par l'intermédiaire de la GEF (facteur d'échange de nucléotides guanylate) Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) (**Otsuki et al.** 2001).

La cadhérine-E présente à la membrane peut également être dégradée par clivage protéolytique. Elle peut être clivée par MMP3, MMP7, MMP9 ou encore MT1-MMP (**De Wever et al.** 2007 ; **Lochter et al.** 1997a ; **Noë et al.** 2001). Le système de la plasmine et l'ADAM10 (A Disintegrin And Metalloprotease domain) régule également sa dégradation (**Maretzky et al.** 2005 ; **Ryniers et al.** 2002). Le clivage de la cadhérine-E produit des fragments pouvant exercer des fonctions de signalisation. Le clivage de la cadhérine-E produit un fragment de la partie C-terminale (CTF2) qui est transporté dans le noyau grâce à la caténine p120. Dans le noyau, CFT2 module l'interaction entre la caténine p120 et Kaiso, un répresseur de transcription affectant ainsi la survie cellulaire (**Ferber et al.** 2008).

L'inhibition de la cadhérine-E n'entraîne pas seulement la destruction mécanique des jonctions adhérentes mais elle libère également les protéines cytoplasmiques associées à la jonction, protéines qui jouent des rôles ambivalents selon leur localisation dans la cellule. La caténine- β joue notamment un rôle à la fois dans l'adhérence cellulaire et la voie de signalisation Wnt (**Clevers** 2006). Lorsqu'elle est stabilisée par une signalisation active de la voie Wnt, ou lorsque sa voie de dégradation/phosphorylation est mutée, la caténine-β s'accumule dans le cytoplasme et pénètre dans le noyau dans lequel elle interagit avec les membres de la famille des facteurs de transcription Tcf/Lef. Son effet de transcription entraîne une modulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la migration, cellulaire, dont la cycline D1, la protéine d'adhérence cellulaire L1-CAM (L1 Cell Adhesion Molecule), des métalloprotéinases matricielles (MMP), la vimentine ou encore la fascine (**Vignjevic et al.** 2007 ; **Arce et al.** 2006).

De même que la caténine- β , la caténine p120 est libérée dans le cytoplasme suite à la dégradation de la cadhérine-E et s'accumule dans le cytoplasme. La p120^{ctn} peut entrer dans le noyau et se lier à l'inhibiteur de transcription Kaiso. Cependant p120^{ctn} ne possède pas de domaine de transactivation et agit plutôt en libérant Kaiso de ses sites de liaisons, activant de ce fait l'expression de gènes par dé-répression (**van Roy & McCrea** 2005).

III.A.2. Jonctions serrées

Dans les cellules épithéliales polarisées, les jonctions serrées forment une structure en forme de ceinture à la région apicale des jonctions cellulaires. Elles forment une frontière entre la partie apicale et basolatérale des domaines membranaires, domaines qui ainsi diffèrent dans leur composition lipidique et protéique (**Tsukita et al.** 2001). Les jonctions serrées apparaissent comme un réseau branché de brins qui reflètent les sites de contact directs entre les cellules. Classiquement deux fonctions sont attribuées aux jonctions serrées, la régulation de la perméabilité paracellulaire du feuillet (**Furuse & Tsukita** 2006 ; **Van Itallie & Anderson** 2006) et la formation d'une barrière physique qui prévient la diffusion des lipides et des protéines intra-membranaires (figure 25).



Figure 25 Organisation des complexes des jonctions serrées (d'après Ebnet, 2008).

III.A.2.1. Les protéines membranaires des jonctions serrées

III.A.2.1.1 Les claudines

Les claudines sont des protéines d'environ 23 kDa possédant 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires et une partie N-terminale et C-terminale localisées dans le cytoplasme. Elles possèdent un motif PDZ dans leur partie C-terminale leur permettant de se lier aux protéines du complexe des jonctions serrées. Les premières claudines 1 et 2 ont été identifiées en 1998 par l'équipe de Furuse et al. (Furuse et al. 1998a) Depuis 24 claudines ont été mises en évidence chez l'homme, chacune d'entre elles présentant une expression spécifique dans les tissus (Furuse & Tsukita 2006). Les claudines sont les protéines majeures des jonctions serrées et induisent leur formation si elles sont exprimées de façon ectopique dans une cellule (Furuse et al. 1998b). Les claudines ne se contentent pas de former les liens intercellulaires des jonctions serrées mais créent une barrière à la sélectivité perméable en formant des pores aqueux de tailles et de charges sélectives (Tsukita & Furuse 2000). Leur rôle principal est d'établir des liens appariés au travers d'interactions homophiles et hétérophiles en cis et trans et de constituer de cette façon une barrière pour les solutés ou les pathogènes (Tsukita & Furuse 2002). La perte de claudines est associée à différentes maladies, un défaut de claudine 14 entraîne par exemple une surdité, indiquant un rôle important dans la physiologie des cellules et des tissus (Heiskala et al. 2001). Le nombre important de claudines, leur capacité à créer des interactions hétérophiles, et leur sélectivité dans le transport des ions permet la création de jonctions serrées aux propriétés adaptées à la nature du tissu.

III.A.2.1.2 L'occludine

L'occludine est incorporée dans les jonctions serrées mais son expression de façon ectopique n'induit pas la formation des liens intercellulaires (**Furuse et al.** 1998b) ce qui suggère un rôle accessoire dans la formation des jonctions serrées (**Yu et al.** 2005). L'occludine interagit

directement avec les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3, ces interactions étant nécessaires à la localisation aux jonctions serrées de l'occludine. La moitié de la partie C-terminale de 250 acides aminés est responsable des interactions avec ZO-1 et ZO-2. L'occludine interagit avec le cytosquelette d'actine et les molécules d'adhérence JAM (Junction cell Adhesion Molecule) indirectement par sa liaison avec les protéines ZO (**González-Mariscal et al.** 2008 ; **Mandell & Parkos** 2005 ; **Shin et al.** 2006b). L'occludine pourrait également agir dans la régulation de divers événements de signalisation. L'expression de Raf-1 perturbe les jonctions serrées par l'inhibition de l'occludine et une surexpression d'occludine supprime la croissance tumorale induite par Raf-1 grâce à la seconde boucle extracellulaire de l'occludine (**Li & Mrsny** 2000 ; **Wang et al.** 2005). De plus l'occludine peut être impliquée dans l'activation de RhoA par GEF-H1/Lfc, un facteur d'échange de nucléotide guanine associé aux jonctions serrées (**Aijaz et al.** 2005 ; **Benais-Pont et al.** 2003). Enfin l'occludine pourrait jouer un rôle important dans la localisation des récepteurs du TGF- β aux jonctions serrées (**Barrios-Rodiles et al.** 2005).

III.A.2.1.3 Protéines JAM

Une autre classe de protéines membranaires des jonctions serrées comprend les membres de la sous famille CTX appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui sont caractérisés par un domaine apparenté aux immunoglobulines de type-V et un domaine de type C2 (Williams & Barclay 1988). Selon leur homologie de séquence, la longueur de leur queue cytoplasmique et le type des motifs de domaine PDZ à la partie C-terminale, elles peuvent encore être subdivisées en un groupe comprenant les JAM-A, JAM-B et JAM-C et un groupe comprenant CAR (Coxsackie- and Adenovirus Receptor), CLMP (Coxsackie- and Adenovirus receptor-like Membrane Protein), ESAM (Endothelial cell Adhesion Molecule) et JAM4 (Ebnet et al. 2004). Toutes sauf CLMP interagissent avec les protéines d'échafaudage associées aux jonctions serrées comme ZO-1 (CAR, JAM-A, -B, -C) (Cohen et al. 2001 ;

Ebnet et al. 2000 ; Ebnet et al. 2003), PAR-3 (Partition defective-3) (JAM-A, -B, -C) (Ebnet et al. 2001 ; Ebnet et al. 2003) ou MAGI-1 (ESAM, JAM4) (Hirabayashi et al. 2003 ; Wegmann et al. 2004) et dans certains cas leur expression ectopique augmente la résistance électrique transépithéliale (TER) ou réduit la perméabilité paracellulaire (Cohen et al. 2001 ; Hirabayashi et al. 2003 ; Mandicourt et al. 2007 ; Raschperger et al. 2004). JAM-A régule la formation des jonctions serrées par son association directe avec la protéine d'échafaudage PAR-3 (Ebnet et al. 2001 ; Itoh et al. 2001). JAM-A est rapidement localisée aux sites d'adhérence cellulaire au moment de la formation des contacts entre les cellules (Ebnet et al. 2001 ; Suzuki et al. 2002) et cette localisation sert probablement à recruter PAR-3 à ces sites pour initier la polarisation de la membrane plasmique et la formation de la jonction serrée.

III.A.2.1.4 Crumbs3

Crumbs3 (CRB3) est une protéine transmembranaire possédant un domaine extracellulaire très court de 36 acides aminés et un court domaine cytoplasmique de 41 acides aminés (**Makarova et al.** 2003 ; **Médina et al.** 2002). CRB3 s'associe avec deux protéines périphériques à la membrane par liaison directe, Pals1 (**Roh et al.** 2002a ; **Makarova et al.** 2003) et PAR-6 (**Lemmers et al.** 2004). Ces protéines font partie de deux complexes de polarité cellulaire localisés aux jonctions serrées, le complexe CRB3-Pals1-PATJ et le complexe PAR-3-aPKC-PAR-6. D'autre part la surexpression de CRB3 retarde la formation des jonctions serrées (**Roh et al.** 2003) alors que son expression ectopique dans une lignée cellulaire qui l'exprime en faible quantité entraîne le développement de jonctions serrées fonctionnelles (**Fogg et al.** 2005). Ces effets sont probablement la conséquence de son association aux protéines des complexes de polarité et à la régulation de leur localisation subcellulaire.

III.A.2.2. Les complexes multiprotéiques des jonctions serrées

Les protéines localisées au niveau des jonctions serrées comprennent des protéines d'échafaudage et adaptatrice, des protéines G, des protéines de régulation comme des petites GTPases, des kinases et phosphatases, ainsi que des facteurs de transcription. La diversité des protéines qui les composent suggère que les jonctions serrées sont un point focal de signaux entrants et sortants et que leur composition est dynamique (**Shen et al.** 2008a). De nombreuses protéines qui leurs sont associées sont retrouvées dans d'autres compartiments cellulaires dont le noyau ou le cytosquelette et sont sous le contrôle de transports actifs entre ces deux compartiments et les jonctions serrées (**Matter & Balda** 2007). L'organisation de ces réseaux est régulée par des protéines contenant des domaines multiples d'interaction protéiques dont des domaines PDZ, GuK, SH2 ou SH3 (**Pawson & Nash** 2003). Sont présents au niveau des jonctions serrées, trois complexes protéiques majeures qui impliquent une ou plusieurs protéines d'échafaudage, le complexe protéique ZO, le complexe Pals1-PATJ, et le complexe PAR-3-aPKC-PAR-6.

III.A.2.2.1 Le complexe protéique ZO

La protéine ZO-1 (220 kDa) est la première protéine associée aux jonctions serrées à avoir été identifiée (**Stevenson et al.** 1986). ZO-2 (160 kDa) et ZO-3 (130 kDa) ont par la suite été identifiée par co-immunoprécipitation avec ZO-1 (**Balda et al.** 1993 ; **Gumbiner et al.** 1991). ZO-1 est une protéine classique d'échafaudage de la famille des protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) contenant 3 domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GuK (**Funke et al.** 2005). Elle peut s'associer directement avec plusieurs protéines membranaires par des domaines indépendants aux jonctions serrées dont l'occludine, les claudines, les protéines JAM et CAR, son rôle étant probablement de regrouper les protéines

au niveau de la jonction. Elle interagit également avec d'autres protéines cytoplasmiques dont ses homologues ZO-2 et ZO-3 ainsi qu'avec le cytosquelette d'actine (**Fanning et al.** 1998 ; **Fanning et al.** 2002 ; **Wittchen et al.** 1999). ZO-1 forme des complexes indépendants avec ZO-2 et ZO-3 (**Wittchen et al.** 1999) et ZO-2 comme ZO-3 peuvent également interagir avec l'actine-F et partagent avec ZO-1 des associations avec certaines des protéines membranaires des jonctions serrées comme l'occludine et les claudines (**Itoh et al.** 1999 ; **Wittchen et al.** 1999). ZO-2 s'associe à la protéine du complexe de polarité Scrib, complexe formé par Scribble (Scrib), Discs large (Dlg) et Lethal Giant Larvae (Lgl) (**Bilder** 2004). Scrib, qui possède 4 domaines PDZ, se lie directement à la partie C-terminale de ZO-2 par ses domaines PDZ 3 et 4 (**Métais et al.** 2005).

L'ensemble du complexe ZO fournit le lien majeur entre le cytosquelette d'actine et les jonctions serrées. Il existe cependant des redondances entre les ZO. Ainsi l'absence de ZO-1 dans certaines lignées épithéliales retarde la formation des jonctions serrées mais n'empêche pas la formation de jonctions fonctionnelles (**McNeil et al.** 2006 ; **Umeda et al.** 2004). C'est seulement lorsque les 3 ZO sont absentes que la formation des jonctions s'en trouve compromise avec pour conséquence une absence des protéines membranaires occludine, claudine-3 et JAM-A et la perte de la fonction de barrière des jonctions. Les protéines ZO ont donc un rôle critique dans la formation des liens des jonctions, sans doute en servant d'échafaudage physique pour les protéines formants les liens intercellulaires. Le complexe protéique ZO forme également une plateforme de protéines de signalisation qui régule la prolifération et la morphogenèse épithéliale.

III.A.2.2.2 Le complexe PAR-3-aPKC-PAR-6

Six gènes *par* (Partition defective) ont été dans un premier temps identifiés mais ils encodent des protéines de structures et de fonctions différentes dont des protéines d'échafaudage ou

adaptatrice avec plusieurs domaines d'interaction protéique (PAR-3, PAR-6), des serines/thréonine kinases (PAR-1, PAR-4), une protéine contenant un domaine RING typique des ubiquitine ligase E3 (PAR-2) et un membre de la famille des protéines de signalisation 14-3-3 (Goldstein & Macara 2007 ; Suzuki & Ohno 2006). Deux protéines PAR, PAR-3 et PAR-6, forment une unité fonctionnelle avec l'aPKC (Atypical Protein Kinase C), soit le complexe PAR-3-aPKC-PAR-6 (Ohno 2001). Dans ce complexe, PAR-3 et PAR-6 interagissent directement avec aPKC, leur interaction est supposée réguler la localisation et l'activité d'aPKC. PAR-3 se lie spécifiquement à JAM-A, -B et -C, l'interaction avec JAM-A pouvant servir d'ancrage pour le complexe (Ebnet et al. 2001 ; Ebnet et al. 2003). En l'absence de petite GTPases comme Cdc42 ou Rac1, l'aPKC est inactive. La liaison d'une Cdc42 ou Rac1 au domaine CRIB (Cdc42/Rac-interactive Binding) de PAR-6 active l'aPKC (Lin et al. 2000; Yamanaka et al. 2001). PAR-3, selon son état de phosphorylation (Hurd et al. 2003a ; Wang et al. 2006), interagit également avec Tiam1 un facteur d'échange de nucléotides guanylate (GEF) (Mertens et al. 2006). Le complexe PAR-aPKC serait plus impliqué dans la formation des jonctions serrées que dans leur maintenance et le complexe développerait son activité de polarisation précocement au moment de la formation des contacts cellule à cellule (Ooshio et al. 2007).

III.A.2.2.3 Le complexe Crumbs-Pals1-PATJ

Pals1 (77 kDa), aussi connue sous le nom de MPP5 (membrane-associated palmitoylated protein 5), est une protéine MAGUK comprenant 2 domaines L27, un domaine PDZ, un domaine SH3, un domaine de liaison à la bande 4,1 et un domaine GUK (**Kamberov et al.** 2000). Pals1 interagit directement par son domaine PDZ avec CRB1 et se lie à PATJ par son domaine L27 (**Roh et al.** 2002a). La protéine PATJ (196 kDa) contient 10 domaines PDZ et un domaine L27 dans sa partie N-terminale. PATJ interagit avec ZO3 et la claudine1 (**Roh et al.** 2002b).

MUPP1, une autre protéine du complexe, contient un domaine N-terminal MRE et 13 domaines PDZ ce qui lui confère une organisation similaire à la protéine de polarité PATJ. Dans les cellules épithéliales, MUPP1 est présente au niveau des jonctions serrées au niveau desquelles elle interagit avec les claudines, JAM-1, CAR, Crumbs1 au travers de ses différents domaines PDZ (**Coyne et al.** 2004 ; **Hamazaki et al.** 2002 ; **Jeansonne et al.** 2003 ; **van de Pavert et al.** 2004). De plus il a été récemment montré que MUPP1 pouvait interagir avec la famille de protéines angiomotine/JEAP par ses domaines PDZ 2/3 (**Sugihara-Mizuno et al.** 2007). Plusieurs interactions protéiques ont été décrites pour les membres de la famille Amot. L'angiomotine (Amot) (**Bratt et al.** 2002), JEAP (protéine semblable à l'angiomotine) (**Nishimura et al.** 2002) et MASCOT (protéine semblable à l'angiomotine 2) (**Patrie** 2005) sont toutes 3 caractérisées par la présence d'un domaine central super enroulé et un domaine d'interaction PDZ en C-terminal et interagissent également avec PATJ. Le domaine PDZ d'Amot interagit avec PATJ et ainsi cible Amot aux jonctions serrées. De plus, il interagit de la même façon que MASCOT avec les domaines PDZ2 et PDZ3 de MUPP1 (**Sugihara-Mizuno et al.** 2007) alors que JEAP se lie seulement au domaine PDZ3 de MUPP1.

L'inhibition de Pals1 par interférence ARN induit des défauts dans la formation des jonctions serrées et est accompagnée d'une perte de l'expression de PATJ (**Straight et al.** 2004). Inversement l'inhibition de PATJ affecte les fonctions de barrière des jonctions serrées, et entraîne une perte de Pals1, une internalisation de CRB3 et une redistribution des autres composants de la jonction dont l'occludine et ZO-3 (**Michel et al.** 2005 ; **Shin et al.** 2005). Ces observations suggèrent que ce complexe joue un rôle important dans le développement de la jonction serrée fonctionnelle. Une partie des nombreuses interactions entre les protéines des jonctions serrées sont schématisées sur la figure 26.



Figure 26 Réseaux formés par les protéines des complexes des jonctions serrées dans les cellules épithéliales.

Une partie des nombreuses interactions existantes entre les protéines des jonctions serrées est représentée sur ce schéma (d'après Assémat, 2008).

III.A.2.3. Jonctions serrées et cancer

De la même manière que pour les jonctions adhérentes, les jonctions serrées sont désorganisées au moment de l'invasion tumorale et l'acquisition par les carcinomes d'un phénotype invasif (Martin & Jiang 2009). Ainsi de nombreuses molécules des jonctions serrées voient leur expression diminuer dans les cancers. L'occludine en effet est perdue au cours de la progression tumorale dans les carcinomes de la prostate et de l'endomètre (Busch et al. 2002 ; Tobioka et al. 2004). Le TGF-β l'un des plus important inducteurs de l'EMT, s'associe avec le facteur inhibiteur de transcription SNAI1 (Nieto 2002) et bloque la transcription des gènes de l'occludine (Ikenouchi et al. 2003), de claudines ou encore des protéines CAR (Vincent et al. 2009). Ainsi l'expression de la claudine 1 est réduite dans les carcinomes du sein ainsi que dans les cancers du colon (Krämer et al. 2000 ; Resnick et al. 2005 ; Tokés et al. 2005). D'autres claudines voient leurs expressions diminuées dans des cancers, cependant selon le type de cancer l'expression d'une même claudine peut être augmentée ou diminuée (Oliveira & Morgado-Díaz 2007 ; Tsukita et al. 2008). L'expression de la claudine 4 est associée à un phénotype plus invasif dans les cancers du pancréas (Sato et al. 2004), certaines claudines sont également associées avec l'expression de MMP (Miyamori et al. 2001 ; Oliveira & Morgado-Díaz 2007). La surexpression des claudines entraîne l'activation de la voie de transcription de la caténine-β/TCF (Dhawan et **al.** 2005).

Une interaction entre l'occludine et le récepteur I du TGF- β (TGF- β RI) a été récemment mis en évidence (**Barrios-Rodiles et al.** 2005). Une mutation dans le site de liaison de l'occludine pour TGF- β RI empêche la localisation du récepteur aux jonctions serrées et leur dégradation au moment de l'EMT (**Yang et al.** 2005). Il a de plus été mis en évidence que la signalisation du TGF- β affectait le complexe de polarité PAR-3-aPKC-PAR-6, le TGF- β RI interagissant directement avec PAR-6 (**Ozdamar et al.** 2005). La signalisation par le TGF- β entraîne la formation d'un complexe entre le TGF-βRI et le TGF-βRII avec pour conséquence le rapprochement de ce dernier récepteur au complexe PAR. PAR-6 est alors phosphorylé par TGF-βRII ce qui entraîne le recrutement de l'ubiquitine ligase Smurf1 qui à son tour provoque la dégradation de RhoA, cette dernière ayant un rôle critique dans l'intégrité des jonctions serrées (**Sahai & Marshall** 2002).

D'autres protéines des complexes de polarité sont associées avec la progression tumorale, les protéines du complexe Scrib-Dlg-Lgl ont notamment étaient au départ identifiées comme des suppresseurs de tumeurs chez la drosophile (**Bilder** 2004). De nombreuses études associent la baisse de leur expression avec une progression tumorale (**Gardiol et al.** 2006 ; **Nakagawa et al.** 2004 ; **Schimanski et al.** 2005). La perte de Scrib agit en coopération avec Ras pour déréguler la signalisation des MAPK et permettre l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules (**Dow et al.** 2008). Il a été également récemment mis en évidence que la vimentine, qui est induite au moment de l'invasion tumorale, interagissait avec la fraction soluble de Scribble pour la protéger de la dégradation (**Phua et al.** 2009). Enfin comme décrit précédemment, plusieurs protéines des complexes de polarité sont dégradées par l'oncoprotéine E6 des HPV à haut risque.

Le complexe PAR croise la voie de signalisation Wnt, une voie dépendante de la caténine-β. La liaison de Wnt à son récepteur stabilise la caténine-β par le recrutement de son complexe de dégradation formé par l'Axine, Dvl (disheveled), GSK3β et APC, GSK3β étant un substrat de l'aPKC (**Etienne-Manneville** 2008). Le complexe PAR est également la cible du récepteur tyrosine kinase ErbB2. La voie de signalisation ErbB2 régule le développement de l'épithélium du sein (**Linggi & Carpenter** 2006) et sa surexpression est rapportée dans 25 à 30% des cancers du sein mais est aussi associée à d'autres cancers. Quand le récepteur ErbB2 est activé par un ligand synthétique AP1510 (**Muthuswamy et al.** 1999) induisant sa dimérisation, il lie PAR-6 entraînant le recrutement d'aPKC au récepteur et la perturbation de la polarité apico-basale (**Aranda et al.** 2006).

Enfin en plus d'être dégradée par E6, la protéine PATJ, du complexe Crumb, est recrutée au bord dirigeant la migration des cellules migratoires et contrôle la localisation de PAR-3 et aPKC potentiellement par PALS1 et PAR-6 (**Hurd et al.** 2003b ; **Shin et al.** 2007 ; **Wang et al.** 2004).

La déstabilisation des protéines transmembranaires des jonctions serrées affecte les protéines des complexes sous-jacents. De nombreuses protéines de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées ont une double localisation et peuvent se retrouver aux jonctions comme dans le noyau. La localisation nucléaire est détectée le plus souvent lorsque les cellules prolifèrent activement et sont sub-confluentes, en revanche lorsque les cellules atteignent la confluence, une localisation au niveau des jonctions est observée, ainsi les jonctions serrées agissent comme une sorte de barreau aimanté en séquestrant ces facteurs en dehors du noyau (**Lopez-Bayghen et al.** 2006 ; **Matter & Balda** 2007). Il est à noter cependant que les jonctions serrées, même lorsque les cellules sont confluentes, sont en remodelage constant ce qui participe à leur plasticité (**Shen et al.** 2008a).

ZO-1 peut avoir une localisation nucléaire au moment du remodelage des contacts intercellulaires ou au cours de la progression tumorale (**Gottardi et al.** 1996 ; **Riesen et al.** 2002 ; **Polette et al.** 2005). Elle interagit avec ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding protein) qui présente aussi une double localisation aux jonctions et au noyau (**Balda & Matter** 2000). Les facteurs de transcription dont l'ubinucléine (**Aho et al.** 2000 ; **Aho et al.** 2009) et ASH1 (Absent Small and Homeotic disks protein 1) (**Nakamura et al.** 2000) ont également été retrouvés au niveau des jonctions serrées. ZO-2 qui possède des séquences d'adressage nucléaire disparait du noyau au moment de la confluence et peut s'y accumuler

lors de la rupture des contacts intercellulaires (**Islas et al.** 2002 ; **Traweger et al.** 2003). Sa localisation nucléaire peut être régulée au travers de sa phosphorylation par une PKC (**Chamorro et al.** 2009). En fait une immunolocalisation nucléaire, des signaux de localisation nucléaire et un transport nucléaire ont été mis en évidence pour ZO-2, ZO-3, PALS-1, les MAGI, PAR-6, PAR-3 et la cinguline (**Citi & Cordenonsi** 1999 ; **Cline & Nelson** 2007 ; **Dobrosotskaya et al.** 1997 ; **Johansson et al.** 2000 ; **Fang et al.** 2007).

Les protéines des jonctions serrées peuvent réguler l'expression génique et la prolifération cellulaire en établissant une interaction directe et une séquestration des facteurs de transcription au niveau des jonctions. Ainsi l'activité et la présence de ZONAB dans le noyau ou au niveau des jonctions dépendent de son interaction avec ZO-1 et RalA et dépend de l'état de confluence des cellules (**Balda et al.** 2003 ; **Frankel et al.** 2005 ; **Sourisseau et al.** 2006). De façon intéressante il a été récemment mis en évidence que ZONAB s'associait avec la (GEF)-H1/Lfc, une protéine des jonctions serrées elle aussi, la surexpression de cette dernière entraîne l'accumulation de ZONAB au noyau et donc régule son effet de transcription de façon Rho dépendante (**Nie et al.** 2009). Le même mécanisme de séquestration pourrait s'appliquer à ZO-2. ZO-2 s'associe ou se colocalise avec plusieurs protéines liant les acides nucléiques dont la protéine d'épissage d'ARN pré messager SC35/SFRS2 (Splicing Factor, arginine/serine-rich 2) (**Islas et al.** 2002), le facteur d'attachement d'échafaudage SAF-B (scaffold attachment factor B) (**Traweger et al.** 2003), les facteurs de transcription Jun, Fos, AP1 et la protéine se liant à la séquence promotrice CCAAT (C/EBP) (**Betanzos et al.** 2004).

D'autre part les protéines des jonctions peuvent constituer un échafaudage pour les facteurs de transcription dans le noyau et potentiellement réguler leur activité. Ce mécanisme est envisageable pour toutes les protéines des jonctions serrées qui ont une double présence cytoplasmique et nucléaire dont ZO-1, ZO-2 et d'autres protéines PDZ (**Lopez-Bayghen et**

al. 2006). Ainsi PAR-3 interagit avec des protéines de transport nucléaire (**Zhou et al.** 2008) et des composants Ku70/Ku80 du complexe de protéine kinase dépendant de l'ADN et pourrait être impliquée dans la réparation des cassures d'ADN double brin (**Fang et al.** 2007).

Enfin certaines protéines des jonctions sont capables de contrôler l'expression de gène par la régulation de la signalisation de la caténine- β . C'est notamment ce qui explique les effets sur l'invasion tumorale d'une non localisation de ZO-1 ou de mutants ZO-1 incapables de se localiser à la membrane dans différentes lignées cellulaires (**Polette et al.** 2005 ; **Ryeom et al.** 2000).

III.B. Métalloprotéinases matricielles

Les enzymes protéolytiques sont réparties en exopeptidases ou endopeptidases selon leur capacité à cliver les peptides externes ou internes respectivement. La plupart des endopeptidases se répartissent en protéases à sérine, protéases à cystéine, protéases à acide aspartique ou métalloprotéinases selon leur mécanisme catalytique et leur sensibilité aux inhibiteurs. Les métalloprotéinases sont également réparties en 5 superfamilles en fonction de leur séquence. Parmi celles-ci, la superfamille des metzincines regroupe 4 autres familles multigéniques que sont les serralysines, les astacines, les ADAMS/adamalysines (A Disintegrin and Metalloproteinase) et les métalloprotéinases matricielles (MMP) (**Sternlicht & Werb** 2001 ; **Stöcker et al.** 1995).

Les MMP sont des enzymes protéolytiques dont le mécanisme de base, la dégradation de protéines, régule divers comportements cellulaires certains étant liés à des processus biologiques utilisés par les cellules cancéreuses. Ces processus incluent la croissance des cellules cancéreuses, la différenciation, l'apoptose, la migration et l'invasion ainsi que la régulation de la néoangiogénèse et de la surveillance immunitaire. Les MMP peuvent réguler le microenvironnement des tumeurs et leur expression et leur activation sont augmentées dans

Enzyme	ммр	Domaines de composition												
		SS	Pro	CS	RX[R/K]R	Cat	FN2	Lk 1	Нрх	Lk 2	ТМ	GPI	Cyt	CysR-lg
Collagénases														
Collagénase interstitielle; Collagénase 1 Collagénase neutrophile:	MMP-1	٠	٠	+	-	٠	-	٠	+					
Collagénase 2	MMP-8	+	+	+	-	+	-	+	+					
Collagénase 3	MMP-13	+	+	+	-	+	-	+	+					
Gélatinases														
Gélatinase A	MMP-2	+	+	+	-	+	+	+	+					
Gélatinase B	MMP-9	+	+	+	-	+	+	+	+					
Stromelysines														
Stromélysine 1	MMP-3	+	+	+	-	+	-	+	+					
Stromélysine 2	MM P-10	+	+	+	-	+	-	+	+					
Stromélysine 3	MMP-11	(+)	(+)	+	+	+	-	+	+					
Matrilysines														
Matrilysine 1	MMP-7	+	•	+	-	+	-	-	-					
Matrilysine 2	MMP-26	+	+	+	-	+	-	-	-					
MMP de type membranaire														
(A) Type transmem	branair	e												
MT1-MMP	MM P-14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
MT2-MMP	MMP-15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
MI3-MMP	MMP-16	•	+	+	•	+	-	•	•	+	+	-		
MT5-MMP (P) Aporéos ou CDI	MMP-24	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
(D) AUCICES au OFI								-						
	MMP-17			Ī		Ξ.	-	Ξ			_		_	
Autros	MMP-20	-				-	-	-		-	-	-	-	
Macrophago álactaco	MAD 12				_		_							
micki opinaye elasiase 	MMP-12	÷		÷	_	÷.	_	÷	÷.					
Fnamelysine	MMP-20	-	-	-	_	-	_	-	-					
	MMP-21	÷			+	+	_	÷						
CA-MMP	MMP-23	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	_	_	+
	MMP-27	+	+	+	-	+	_	+	+					
Epilysine	MMP-28	+	+	+	•	+	-	+	+					



Figure **27** Tableau de la composition des différentes MMP et schéma correspondant à l'assemblage des différentes parties.

SS : peptide signal, Pro : pro-domaine ; CS : motif bascule cystéine ; RX[R/K] : séquence de reconnaissance pour la proprotéine convertase ; FN2 : motif type fribronectine II ; LK : charnière ; TM : domaine transmembranaire ; GPI : séquence d'accrochage au glycosylphosphatidylinositol ; Cyt : domaine cytoplasmique ; CyR-Ig : domaine riche en cystéine et Ig ; () indique un épissage alternatif sans SS et Pro (d'après Murphy, 2008).

la plupart des cancers humains en comparaison des tissus normaux (Murphy & Nagase 2008).

Le génome humain contient 24 gènes de MMP dont un gène *Mmp23* en duplicata, il y a donc 23 MMP différentes. Les MMP sont donc des enzymes à domaines multiples portant un atome de zinc, le critère d'appartenance à cette famille de protéines est l'homologie de séquence avec le domaine catalytique de la MMP1. Le domaine catalytique contient le motif de liaison au Zn^{2+} HEXXHXXGXXH et une méthionine conservée qui forme un coude méthionine 8 résidus plus bas et qui maintient la poche du site actif autour du Zn^{2+} . Les MMP sont synthétisées en tant que pré-proenzymes et le peptide signal est retiré au moment de la traduction pour générer des proMMP. Le propeptide possède le motif PRCGXPD portant la cystéine qui se lie au Zn^{2+} du site catalytique maintenant la proMMP inactive (**Bode et al.** 1993 ; **Van Wart & Birkedal-Hansen** 1990).

Les MMP consistent typiquement en un propeptide d'environ 80 acides aminés, un domaine métalloprotéinases catalytique d'environ 170 acides aminés, un peptide charnière de longueur variable et un domaine hémopexine d'environ 200 acides aminés. La MMP7 (matrilysin 1), MMP26 (matrilysin 2) et la MMP23 ne possèdent ni peptide charnière, ni domaine hémopexine. La MMP23 possède un domaine C-terminal unique riche en cystéine et un domaine semblable aux immunoglobulines juste après la partie C-terminale du domaine catalytique (figure 27).

Historiquement les MMP sont regroupées en catégorie comprenant les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMP de type membranaire et les MMP qui n'appartiennent à aucunes de ces précédentes catégories et qui sont classées selon l'organisation de leurs domaines et leurs spécificités de substrat (**Huxley-Jones et al.** 2007).

III.B.1. Les différents types de MMP

III.B.1.1. Les collagénases

Il y a 3 collagénases, la collagénase 1 (MMP1), la collagénase 2, également appelée collagénase neutrophile (MMP8) et la collagénase 3 (MMP13). Elles sont constituées d'un propeptide, d'un domaine catalytique et d'un domaine hémopexine. Elles jouent un rôle important dans la dégradation des fibres de collagènes dont les types I, II et III qu'elles clivent en fragments caractéristiques ³/₄ et ¹/₄ qui peuvent être par la suite dégradés par les gélatinases Elles ont également des capacités de lyse d'autres molécules de la MEC et des protéines solubles (**Nagase & Woessner** 1999 ; **Visse & Nagase** 2003). Les MMP2 et MT1-MMP sont également capables d'activité collagénase mais sont classées dans d'autres catégories du fait des domaines qui les composent. Le domaine catalytique des collagénases peut couper des substrats non collagène, mais elles sont incapables de couper les fibres de collagènes natives sans leur domaine hémopexine. La coopération entre les deux domaines est importante pour exercer leur activité collagénolytique (**Chung et al.** 2004).

III.B.1.2. Les gélatinases

Dans cette classe sont retrouvées la gélatinase A (MMP2) et la gélatinase B (MMP9). Toutes deux possèdent 3 répétitions du motif fibronectine de type II au niveau de leur domaine catalytique. Elles dégradent les collagènes dénaturés, la gélatine et diverses molécules de la MEC dont les collagènes natifs IV, V et XI, la laminine et l'aggrecane, etc. La MMP2 digère les collagènes de type I, II, III mais pas la MMP9 (**Aimes & Quigley** 1995 ; **Patterson et al.** 2001). La proMMP2 peut être recrutée à la surface cellulaire et activée par la MT1-MMP, elle y exerce une faible activité collagénolytique locale (**Butler et al.** 1998 ; **Murphy et al.** 1985).

III.B.1.3. Les stromélysines

Les MMP3, -10 et -11 sont aussi appelées respectivement stromélysine 1, 2 et 3. Elles présentent la même composition en domaine que les collagénases mais ne possèdent pas leur capacité à cliver le collagène. Les MMP3 et -10 partagent une même structure et spécificité de substrat, la MMP11 est en revanche un peu plus éloignée. La MMP3 et -10 sont sécrétées des cellules sous forme inactive proMMP, mais la MMP11 est activée intracellulairement par une furine et est secrétée de la cellule sous forme d'enzyme active (**Pei & Weiss** 1995). Les MMP3 et -10 dégradent des molécules de la MEC et participent à l'activation des pro-MMP, la MMP11 n'a qu'une très faible activité sur les protéines de la matrice (**Murphy et al.** 1993).

III.B.1.4. Les matrilysines

Il existe deux matrilysines, les MMP7 et -26, toutes deux sans domaine hémopexine. La MMP7 est la seule MMP qui soit exprimée en presque totalité par des cellules tumorales (**Harrell et al.** 2005). Elle dégrade des molécules de la matrice mais également des molécules en surface de la cellule comme le ligand FAS, le facteur α nécrosant de tumeur, le syndecan 1 et la cadhérine-E créant des formes solubles (**Parks et al.** 2004). La MMP26 est exprimée dans les cellules normales comme celle de l'endomètre et dans certains carcinomes et dégrade plusieurs composants de la matrice (**Marchenko et al.** 2004).

III.B.1.5. Les MMP membranaires (MT-MMP)

Il existe 6 MT1-MMP regroupées en deux catégories. Quatre sont des protéines transmembranaires de type 1 (MMP14, -15, -16 et -24 aussi appelées respectivement MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP) et 2 sont des protéines ancrées par des groupements gycosylphosphatidylinositol (MMP17 et -25). Toutes possèdent une séquence de reconnaissance RX[R/K]R pour la convertase de pro-protéine semblable aux furines au niveau C-terminal du propeptide. Elles sont activées intracellulairement et les enzymes actives sont

exprimées à la surface cellulaire. La pro-MMP2 peut être activée par toutes les MT-MMP, sauf la MT4-MMP (MMP17) (**English et al.** 2001). La MT1-MMP possède elle-même des activités collagénolytique envers les collagènes de type I, II et III (**Ohuchi et al.** 1997).

III.B.1.6. Les autres MMP

Un dernier groupe est composés de 7 MMP hétérogènes soit les MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28. Parmi celle-ci les MMP12, MMP20 et MMP27 possèdent un arrangement de domaine et une localisation chromosomique similaire aux stromélysines. La métalloélastase MMP12 dégrade l'élastine et d'autres molécules de la matrice et est essentielle à la migration des macrophages (Shipley et al. 1996). MMP19 est une protéine qui dégrade la membrane basale ainsi que d'autres molécules de la matrice (Stracke et al. 2000) et joue un rôle dans le remodelage des tissus, la réparation des blessures et la migration épithéliale grâce à son clivage de la chaine y-2 des laminines (Sadowski et al. 2005 ; Sadowski et al. 2003). L'énamelysine (MMP20) est une MMP retrouvée spécifiquement dans les dents (Ryu et al. 1999). La MMP21 peut être retrouvée dans des carcinomes basaux-cellulaires et épidermoïdes (Skoog et al. 2006). La MMP23 ne possède pas de cystéine dans le propeptide ni de domaine hémopexine, ce dernier est remplacé par un domaine apparenté aux immunoglobulines riche en cystéine (Velasco et al. 1999). C'est une protéine transmembranaire de type II qui possède son domaine transmembranaire dans sa partie N-terminale du propeptide, de ce fait l'enzyme est solubilisée lorsque le propeptide qui l'ancre à la membrane est clivé par une proprotéine convertase (Pei et al. 2000). MMP27 est exprimée dans les lymphocytes B, son expression augmente après traitement avec anti-IgG/IgM en culture (Bar-Or et al. 2003). L'épilysine (MMP28) est exprimée dans de nombreux tissus comme les poumons, le cœur, le tractus gastro-intestinal, le placenta, les testicules et dans les kératinocytes de la couche basale de la peau (Lohi et al. 2001). Elle a un rôle dans la réparation des blessures (Saarialho-Kere et al. 2002). De façon intéressante sa surexpression dans des cellules d'adénocarcinome induit une transition épithélio-mésenchymateuse caractérisée par une perte de la cadhérine-E, une augmentation des niveaux de TGF- β et une augmentation de l'activité invasive des MT1-MMP et MMP9 (**Illman et al.** 2006).

III.B.2. Régulation des MMP

Le contrôle de l'activité des MMP *in vivo* se déroule à plusieurs niveaux et implique des processus de régulation de l'expression génique, de l'activation des formes zymogènes ou encore de l'inhibition des enzymes actives par des inhibiteurs spécifiques. De nombreuses MMP sont régulées au niveau de leur transcription par un ensemble de facteurs de croissance, de cytokines et de chemokines (**Clark et al.** 2008 ; **Yan & Boyd** 2007) (figure 28).

III.B.2.1. Régulation de l'expression

La régulation de l'expression des MMP est dépendante du tissu et du stade de développement (**Nuttall et al.** 2004). Certains types cellulaires modulent également l'expression des gènes de MMP et TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteases) en fonction de réponses à des signaux activateurs ou inhibiteurs. Ces modes de transcription impliquent la voie des MAPK, celle de NFkB et la voie dépendante des Smads (**Baker et al.** 2002 ; **Hall et al.** 2003 ; **Overall & Lopez-Otin** 2002 ; **Reunanen et al.** 2002 ; **Vincenti & Brinckerhoff** 2002 ; **Westermarck et al.** 2001 ; **Borden & Heller** 1997). Les plus importants de ces gènes de réponse sont Fos et Jun, des composants du facteur de transcription AP1, de nombreuses MMP possèdent en effet un site de reconnaissance à ce facteur de transcription dans leur promoteur. En fait il existe de nombreuses séquences de reconnaissance pour des facteurs de transcription dans les promoteurs de MMP (notamment AP1, PEA3, Sp1, Tcf/Lef-1, NFkB, RARE).



Figure **28** Séquences de reconnaissance dans les promoteurs des MMP1, MMP2, MMP9 et MT1-MMP, TIMP1 et TIMP2 (d'après Clark, 2007).

III.B.2.1.1 Transcription des MMP

Il est possible de classer les MMP en trois groupes selon la composition de leur promoteur. Un premier groupe contenant une boîte TATA à environ -30pb et un site AP1 aux environs de -70pb (MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP19, MMP26), un second groupe réunissant des MMP qui possèdent une boîte TATA dans leur promoteur mais pas de site proximal AP1 (MMP8, MMP11 et MMP21), enfin un dernier groupe sans boîte TATA ni site AP1 (MMP2, MT1-MMP, MMP28). Les différents promoteurs de quelques MMP et TIMP et les facteurs de transcription qui s'y associent sont rapportés sur la figure 28.

Bien qu'AP1 soit un acteur majeur de la transcription des MMP, une spécificité entre les gènes et les cellules reste possible. En effet la composition du facteur de transcription AP1 détermine ses effets, ainsi c-Jun induirait MMP1 alors que JunB agirait comme inhibiteur en l'absence de c-Fos et activateur avec cette sous unité (**Angel et al.** 1987 ; **Chiu et al.** 1989).

Un autre facteur de régulation important est NFκB qui possède un site de reconnaissance sur les promoteurs de nombreuses MMP (MMP1, MMP2, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MT1-MMP, MMP15, MMP17, MMP19, MMP23, MMP25, MMP26, TIMP2 et TIMP4) (**Vincenti & Brinckerhoff** 2007).

Il est à noter que plusieurs MMP sont régulées par la voie de signalisation Wnt et donc par la caténine- β . Le site de reconnaissance Tcf/Lef-1 est en effet retrouvé sur les promoteurs des MMP1, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MT1-MMP, MMP19, MMP21, MMP23, MMP27, MMP28 et TIMP4). Ainsi les MMP7 et MT1-MMP sont des cibles de la signalisation par la caténine- β dans les cancers colorectaux notamment (**Gustavson et al.** 2004).
III.B.2.1.2 Méthylation des MMP

La méthylation est réalisée par des méthyltransférases par l'ajout de groupements méthyle sur des cytosines au sein de dinucléotides CpG. Elle est généralement associée à une inhibition de l'expression des gènes. La méthylation peut bloquer la liaison des activateurs de transcription, les protéines qui lient les méthyles peuvent également recruter d'autres inhibiteurs de la transcription dont des HDAC (**Klose & Bird** 2006).

Dans les cellules de lymphome il existe une corrélation inverse entre l'expression de MMP9 et la méthylation de son promoteur (**Chicoine et al.** 2002). Le traitement de cellules cancéreuses du colon par des agents déméthylants entraîne également une augmentation de la MMP3 (**Couillard et al.** 2006). La méthylation des promoteurs des gènes TIMP, pour en inhiber l'expression, est fréquente dans les cancers (**Ivanova et al.** 2004 ; **Sun et al.** 1995).

III.B.2.1.3 Acétylations des histones et remodelage de la chromatine L'acétylation des histones régule l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et donc l'expression des gènes (**Berger** 2002). Ces mécanismes pourraient également participer à la régulation de l'expression des MMP. Ainsi le traitement par la trichostatine A, un inhibiteur d'histone déacétylase (HDAC), module l'expression des gènes de la MMP1 et MMP13 dans des chondrocytes (**Young et al.** 2005). L'histone acétylase p300/CBP est également impliquée dans la régulation de MMP. Un traitement par l'IFN-γ dans des cellules HeLa supprime l'expression de la MMP9 par séquestration de p300/CBP (**Ma et al.** 2005) et cette HAT jouerait également un rôle dans l'augmentation de l'expression de la MMP1 après un traitement par ultraviolet (**Kim et al.** 2009).

III.B.2.1.4 Stabilité de l'ARN des MMP

L'expression génique peut être régulée au niveau de post-transcriptionnel par la stabilité des ARN messagers dans le cytoplasme. Ces processus sont contrôlés par plusieurs facteurs, des protéines liant les ARN et des micros ARN (miR) qui interagissent avec les éléments cis localisés à de nombreux sites des ARN messagers. L'élément cis le plus fréquemment décrit est la séquence AUUA qui est retrouvée en copies multiples dans la partie 3' UTR des ARNm. La liaison des facteurs protéiques à ces éléments peut stabiliser (HUR Human Antigen R) ou déstabiliser (AUF1 AU-rich element RNA binding protein 1) ces ARNm (**Garneau et al.** 2007).

Ainsi par exemple l'analogue de l'ATP ATP γ S potentialise la capacité d'IL-1 β à induire un niveau continu d'expression d'ARNm MMP9 dans les cellules mésangiales. Cet effet s'opère via trois éléments riche en AU dans la partie 3' UTR du gène MMP9 qui est lié de façon constitutive dans ces cellules au facteur stabilisateur de l'ARN HuR. La liaison des complexes contenant HuR à ces sites est augmentée par ATP γ S, et l'effet, dépendant de l'ATP sur l'UTR de MMP9, est aboli par une mutation dans les 3 AURE (Adenosine-Uridine-Rich Elements) (**Huwiler et al.** 2003).

Les micro-ARN sont des petits nucléotides de 21 à 25 bases qui régulent négativement l'expression des gènes après leur transcription, entraînant l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm. 30% du génome humain pourrait être ainsi régulé (**Lewis et al.** 2003). Des miR isolés agissent comme suppresseurs de tumeur en régulant l'expression de proto-oncogènes comme Ras, ou inversement comme miR-21 agissent comme des oncogènes lorsqu'ils sont surexprimés, en inhibant l'expression de gènes pro apoptotiques (**Chan et al.** 2005). Des analyses bioinformatiques ont mis en évidence des sites de liaisons de miR dans la partie 3' UTR de plusieurs gènes MMP et TIMP dont MMP2 (miR-29), MT1-MMP (miR-24, miR-26 et miR-181), TIMP2 (miR-30) et TIMP3 (miR-21, miR-1/206 et miR-181) (**Dalmay** & Edwards 2006). Le rôle de la régulation des miR dans l'expression des protéases est encore mal connu.

III.B.2.2. Régulation de l'activité des MMP

III.B.2.2.1 Inhibiteurs endogènes des MMP

La plupart des endopeptidases, quelque soit leur classe, sont inhibées par la capture de l'enzyme au sein de la macroglobuline (**Barrett & Starkey** 1973). Le complexe est alors rapidement évacué par endocytose via récepteur LRP (low density lipopoprotein receptor related protein 1) (**Strickland et al.** 1990). L'a2-macroglobuline et les inhibiteurs tissulaires de MMP (TIMP) sont les deux principaux inhibiteurs de MMP. L'a2-macroglobuline humaine est une glycoprotéine de 725 kDa qui est composée de 4 unités identiques de 180 kDa. Elle agit comme un inhibiteur général des protéinases et est retrouvée dans le sang et les fluides tissulaires.

III.B.2.2.2 Mécanisme d'inhibition des TIMP

Il existe 4 TIMP chez l'homme, (TIMP1 à -4) de 22 à 29 kDa. Ils inhibent toutes les MMP mais le TIMP1 est un mauvais inhibiteur des MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP et MMP19 (**Baker et al.** 2002). TIMP3 est un régulateur majeur de l'activité des métalloprotéinases *in vivo* et sa suppression entraîne chez la souris des dommages aux alvéoles de type emphysème (**Leco et al.** 2001). Les TIMP peuvent également présenter d'autres fonctions. Les TIMP1 et 2 possèdent une activité potentialisante érythroide (EPA), ils sont en fait activateur de croissance cellulaire sur de nombreux type cellulaire (**Docherty et al.** 1985 ; **Hayakawa et al.** 1992). Ils ont en outre un rôle protecteur contre l'apoptose (**Guedez et al.** 1998 ; **Valente et al.** 1998). TIMP3 en revanche entraîne la mort des cellules tumorales et des cellules musculaire lisse (**Ahonen et al.** 2003 ; **Baker et al.** 1998 ; **Smith et al.** 1997). Les TIMP empêchent la libération des récepteurs de mort cellulaire comme Fas, comme le récepteur-1 du facteur nécrosant de tumeur et comme le récepteur-1 de ligand inducteur de l'apoptose lié au TNF en inhibant TACE (Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme). TIMP3 peut également se lier au récepteur-2 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR2) et inhiber la cascade de signalisation en aval du VEGF et de l'angiogenèse (**Qi et al.** 2003).

III.B.2.2.3 Autres inhibiteurs de MMP

D'autres protéines peuvent inhiber les MMP, une forme sécrétée du précurseur de l'amyloïde-β inhibe MMP2 (**Higashi & Miyazaki** 2003); un fragment C-terminal de protéine activatrice de la C-protéinase du collagène (PCPE-1) inhibe également MMP2 (**Mott et al.** 2000); RECK (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) une glycoprotéine ancrée par un GPI qui inhibe l'angiogenèse, inhibe également MMP2, MMP9 et MT1-MMP (**Oh et al.** 2001). Tissu factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), un inhibiteur de sérines protéases, pourrait également inhiber MMP1 et -2 bien que cet effet ne soit pas confirmé (**Du et al.** 2003 ; **Herman et al.** 2001).

III.B.3. MMP et cancer

Les enzymes protéolytiques sont considérées comme étant critique à l'invasion des cellules tumorales et à la formation de métastases à distance. La vision première des MMP comme simple outil de dégradation de la matrice a néanmoins évolué ces dernières années, les MMP ayant en effet d'autres substrats que la matrice et leurs actions sont parfois anti-tumorales.

Au cours du processus d'invasion cellulaire, le microenvironnement du tissu participe de façon active à l'évolution de la tumeur. L'invasion a lieu à l'interface entre la matrice extracellulaire et la cellule, un lieu dans lequel la cellule tumorale et les cellules stromales échangent enzymes et cytokines qui modifient localement la MEC et stimulent la migration cellulaire. Le facteur limitant de la progression des cellules est la barrière formée par la lame basale puis le tissu conjonctif et les molécules qui la composent à savoir le collagène, les laminines, la fibronectine, la vitronectine, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes héparane sulfate, cette dégradation nécessite l'action des MMP. Néanmoins les cellules

tumorales peuvent également progresser dans le tissu conjonctif sans augmenter leur activité protéolytique en exercant physiquement un passage au sein des molécules de la matrice extracellulaire (Friedl & Wolf 2003). Dans le cas des carcinomes, la plupart des MMP sont produites par les cellules mésenchymateuses. Peu de MMP, hormis la MMP7, sont exclusivement exprimées par les cellules tumorales. L'expression de la MMP7 est conditionnée par la polarité de la cellule (Harrell et al. 2005) et elle régule les stages précoces de la tumorigenèse en dégradant la matrice ainsi que d'autres substrats (Ii et al. 2006). Ainsi la MMP7 régule la prolifération cellulaire et l'apoptose en dégradant l'ectodomaine de HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor precursor) (Yu et al. 2002) et affecte les interactions cellulaires en libérant des fragments solubles de la cadhérine-E (Noë et al. 2001). La surexpression de plusieurs MMP (MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MT1-MMP) est aussi associée à l'invasion tumorale (Lochter et al. 1997b ; Sternlicht et al. 1999). Les MMP peuvent contribuer à la croissance des cellules tumorales non seulement en dégradant la MEC mais également en mettant ou remettant en circulation les facteurs de croissance séquestrés ainsi que les fragments bioactifs des éléments de la matrice (Egeblad & Werb 2002 ; Noël et al. 2008 ; Polette et al. 2004). Ainsi MMP9 mobilise le VEGF de la matrice et génère (Bergers et al. 2000), en dégradant le collagène IV, de la tumstatine un inhibiteur d'angiogenèse (Hamano et al. 2003). Les substrats des MMP comprennent d'autres protéinases, des MMP, des inhibiteurs de protéases, des facteurs de croissance, des protéines liant des facteurs de croissance, des chemokines, des cytokines, des récepteurs à la surface cellulaire et des protéines d'adhérence. Les MMP sont ainsi capables de réguler des processus aussi variés que la migration cellulaire, la prolifération, l'apoptose, la croissance de la tumeur, l'angiogenèse et la dissémination des cellules tumorales (Egeblad & Werb 2002). L'ablation de MMP ou TIMP chez les souris permettent l'étude de leurs effets dans des modèles de carcinogenèse induite, étonnamment certaines MMP s'avèrent avoir un rôle protecteur au cours du développement cancéreux, ainsi les souris *MMP9 null* développent des tumeurs plus agressives de la peau et de plus haut grade (**Coussens et al.** 2000 ; **López-Otín & Matrisian** 2007 ; **Martin & Matrisian** 2007).

La MT1-MMP joue un rôle particulièrement important dans la protéolyse péricellulaire de la matrice et l'invasion tumorale. La MT1-MMP est capable de dégrader un grand nombre de substrat de la MEC. Elle peut hydrolyser des collagènes de types I, II et III, la fibrine, des laminines-1 et -5, la fibronectine, la vitronectine et l'aggrecane (d'Ortho et al. 1997 ; Pei & Weiss 1996) mais aussi des récepteurs de surfaces associés aux cellules tumorales comme CD44 (Kajita et al. 2001), la transglutaminase tissulaire (Belkin et al. 2001), le LRP (Rozanov et al. 2004), la sous unité αV des intégrines (Dervugina et al. 2002) et la protéine syndecan-1 associées aux intégrines (Barbolina & Stack 2008 ; Endo et al. 2003). En réponse aux agents promoteurs de l'invasion, les cellules projettent des invaginations membranaires dans le sens de la migration. Ces invaginations, que ce soit des lamellipodes ou des invadopodes, contiennent un arsenal de protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire, la dégradation protéolytique de la MEC, la signalisation intracellulaire, ces protéines conférant aux cellules leur capacité à migrer et envahir la barrière formée par la MEC. La MT1-MMP se retrouve localisée au front de migration ce qui permet de faciliter la dégradation de la MEC et l'invasion de la cellule. Une association relativement stable de la MT1-MMP avec le cytosquelette d'actine peut être observée quand les cellules sont traitées avec de la cytochalasine D qui perturbe la polymérisation de l'actine et entraîne la formation d'agrégats (Mori et al. 2002). Bien que la MT1-MMP possède une queue cytoplasmique, le domaine responsable de la liaison à l'actine se situe dans la partie hémopexine. L'association avec l'actine est donc réalisée par l'intermédiaire d'une autre molécule de surface possédant une queue cytoplasmique s'ancrant à l'actine. Le CD44, un récepteur de l'acide hyaluronique s'associant avec l'actine, voit sa localisation également correspondre avec le front de migration et a été identifié comme le lien entre la MT1-MMP et le cytosquelette d'actine. La MT1-MMP et le CD44 forme un complexe, le CD44 étant lié au domaine hémopexine. Ainsi le CD44 joue le rôle de pivot dans la localisation de la MT1-MMP au moment de la migration des cellules (**Itoh & Seiki** 2006). Le CD44 est clivé par la MT1-MMP ce qui génère des fragments de son ectodomaine de tailles multiples qui contrôlent eux-mêmes la migration cellulaire (**Kajita et al.** 2001). La MT1-MMP participe également à l'activation de la sous unité de intégrine α V qui avec β 3 est impliquée dans la migration tumorale (**Deryugina et al.** 2002 ; **Ratnikov et al.** 2002). D'autre part MT1-MMP active la pro-MMP2 à la membrane en formant un trimère avec le TIMP2 (**Strongin et al.** 1993).

De nombreuses études ont montré que l'expression de la MT1-MMP était associée à la progression tumorale (Polette & Birembaut 1998 ; Sato & Seiki 1996 ; Seiki 1999 ; Zhai et al. 2005). De plus la production de MT1-MMP par les cellules du carcinome est associée à une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses (Gilles et al. 1997). De nombreuses preuves attestent de l'implication de la MT1-MMP et de la MMP2 à différents stades de la progression tumorale, du développement initial à la croissance, l'angiogenèse et l'invasion (Seiki et al. 2003 ; Sounni et al. 2003 ; Sternlicht & Werb 2001). L'invasion cellulaire est un processus impliquant de multiples étapes de dégradation et de mobilité. Bien que la MEC puisse être dégradée par l'ensemble des MMP, la migration est associée de façon probablement prédominante avec l'activité de la MT1-MMP. En effet la MT1-MMP au travers de ses activités de dégradation des protéines de la matrice comme des protéines d'adhérence, régule de façon forte l'adhérence comme la mobilité cellulaire (Sounni & Noel 2004). Enfin au-delà de ses activités protéolytiques, la MT1-MMP pourrait également jouer un rôle dans l'invasion cellulaire par son domaine intra-cytoplasmique. En effet en plus de permettre un contrôle de la localisation de l'enzyme, la partie cytoplasmique de la MT1-MMP peut activer des cascades de signalisation impliquées dans l'invasion tumorale et notamment la voie ERK (**Gingras et al.** 2001). L'implication de ces événements de signalisation dans l'invasion tumorale, reste néanmoins encore à préciser (**Gingras & Béliveau** 2009).

Matériels et méthodes

I Etude des carcinomes de l'amygdale palatine associés aux HPV

I.A. Collecte des tumeurs et population étudiée.

Pour cette étude ont été sélectionnés tous les cas de carcinome épidermoïde de l'amygdale palatine entre 1987 et 2004 dans le service de chirurgie otorhinolaryngologique du CHU de Reims. Tous étaient sans traitements avant la chirurgie, 71 patients correspondant à ces critères.

Des coupes des tissus inclus en paraffine et marquées à l'hématoxyline-éosine ont été classées par des pathologistes pour confirmer le diagnostic de carcinome épidermoïde et pour s'assurer dans les expériences suivantes de la présence de la tumeur dans le bloc de paraffine. Chaque cas a été vu par deux pathologistes de façon indépendante. Le grade histologique a été déterminé en fonction de la classification selon la classification de l'OMS en tumeurs peu, moyennement et très différenciées.

Les données de la consommation de tabac sont rapportées en paquets-années soit la consommation de 1 paquet de cigarettes par jour pendant 1 an

I.B. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir de 4 sections de paraffine de 4µm à l'aide d'un kit EZ1 DNA Tissue Kit et de la station de travail EZ1 BioRobot® ainsi que du programme d'extraction en paraffine selon les instructions du fournisseur (Qiagen, Valence, CA). Les ADN ont été élués dans un volume final de 200µL.

I.C. Génotypage de l'ADN

La détection de l'ADN et la détermination du type d'HPV ont été réalisées par le test INNO-LiPA[®] HPV Genotyping *Extra* system (Innogenetics, Gent, Belgium) selon les recommandations du fabricant. Ce système de génotypage est basé sur la détection de séquences spécifiques contenu dans la région L1 du génome HPV. L'amplification est réalisée à l'aide d'un set d'amorce SPF10 qui amplifie un fragment de 65 paires de bases. La lecture des bandes de détection est réalisée de manière automatique à l'aide du système LiPA et une interprétation automatique et objective des bandes est obtenue à l'aide de l'appareil LiRAS. Les 28 génotypes détectés sont : 15 HPV-HR (16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82); 3 génotypes étant probablement à haut risque (26, 53, 66); 7 génotypes à bas risque (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70); 3 autres génotypes (69, 71, 74).

I.D. Détermination de la charge virale et de l'intégration d'HPV16

La mesure de la quantité des ARNm de E2, E6 et E7 ainsi que de l'albumine cellulaire a été réalisé par PCR en temps réel à l'aide du LightCycler LC480[™] (Roche, Mannheim, Germany) et du kit LightCycler[™] 480 Probes Master dans un volume final de 20µL. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel LC480[™] Instrument software Version 1.2. Les sondes et amorces proviennent d'Eurogentec (Seraing, Belgium) (Tableau 1). La charge virale a été déterminée dans chaque échantillon grâce à deux expériences de PCR en temps réel réalisées en parallèle et mesurant la quantité de E7 et de l'albumine. La quantité d'albumine est utilisée pour déterminer le nombre de cellules dans l'échantillon en considérant qu'une cellule possède deux copies d'albumine.

Amorces	Séquence 5'-3'	Nb de bases		
16E2-S	AAC-GAA-GTA-TCC-TCT-CCT-GAA-ATT-ATT-AG	29		
16E2-AS	CCA-AGG-CGA-CGG-CTT-TG	17		
16E6-S	GAG-AAC-TGC-AAT-GTT-TCA-GGA-CC	23		
16E6-AS	TGT-ATA-GTT-GTT-TGC-AGC-TCT-GTG-C	25		
16E7-S	AA-GTG-TGA-CTC-TAC-GCT-TCG-GTT	23		
16E7-AS	G-CCC-ATT-AAC-AGG-TCT-TCC-AAA	22		
Alb-S	GCT-GTC-ATC-TCT-TGT-GGG-CTG-T	22		
Alb-AS	ACT-CAT-GGG-AGC-TGC-TGG-TTC	21		
16E2-PRO	Cy5-CAC-CCC-GCC-GCG-ACC-CAT-A-BHQ-2	19		
16E6-PRO	6-FAM-CAG-GAG-CGA-CCC-AGA-AAG-TTA-CCA-CAG-TT-BHQ-1	29		
16E7-PRO	6-FAM-TGC-GTA-CAA-AGC-ACA-CAC-GTA-GAC-ATT-CGT-A-BHQ-1	31		
Alb-PRO	HEX-GGA-GAG-ATT-TGT-GTG-GGC-ATG-ACA-GG-BHQ-1	26		
S amongo sons (E amongo anti sons (DDO) Sanda (Alb. Albumina (DUO) Diast Hale Overshor (EAM				

Tableau 1 Sondes et amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

S, amorce sens ; F, amorce anti-sens ; PRO : Sonde ; Alb, *Albumine* ; BHQ, Black Hole Quencher ; 6-FAM, 6-carboxyfluoresceine ; HEX, Hexachloro-6-carboxyfluoresceine ; Cy5, Indodicarbocyanine

La quantification est réalisée comme décrit par Laurendeau et al. (**Laurendeau et al.** 1999). Des dilutions en série d'ADN de génome humain standardisé (Roche Diagnostics) de 12 à 120 000 d'ADN copies génomique ont été utilisées pour définir la courbe standard. La réaction albumine a été réalisé dans un mix contenant 1X du Mastermix pour sondes LightCyclerTM 480, 0,1 μ M de chaque amorce, 0,1 μ M de sonde Taqman et 2 μ L d'ADN. Les conditions de la réaction consistaient en une première étape à 95°C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles à 95°C de 15 secondes et à 65°C de 60 secondes.

La mesure de E7 a été réalisée comme décrit par Wang et al. (**Wang & Lu** 2004). La gamme étalon a été obtenue par l'amplification d'une série de concentrations de plasmide d'HPV16 allant de 200 à 2 millions de copies. La PCR a été réalisée à l'aide d'un mix contenant 1X du Mastermix pour sondes LightCyclerTM 480 et 2µL d'échantillon ADN. Les conditions de la réaction consistaient en une première étape à 50°C pendant 2 minutes, suivie de 95°C pendant 10 minutes puis 45 cycles à 95°C de 15 secondes et à 60°C de 60 secondes. Les concentrations finales des amorces et sondes étaient de 0,3 et 0,1µM respectivement.

Pour déterminer l'intégration de l'HPV16, nous avons utilisé une PCR en temps réel multiplex sur un Light Cycler 480 comme décrit par Peitsaro et al. (**Peitsaro et al.** 2002) à la différence qu'ici les sondes E6 et E2 étaient marquées par du FAM et du Cy5 respectivement. La PCR a été réalisée dans les mêmes conditions que la PCR E7, la gamme étalon étant toujours obtenue à l'aide de dilutions en série de plasmide HPV16 et les conditions de températures étant inchangées. Trois classes d'échantillons ont été mises en évidence et classées selon la description de Saunier et al. (**Saunier et al.** 2008), une première catégorie correspondant aux formes intégrées dont les valeurs des ratios E2/E6 étaient proches de 0, une seconde catégorie regroupant un mélange de formes intégrées et épisomales dont les valeurs du ratio E2/E6 étaient comprises entre 0 et 0,8 et enfin une dernière catégorie regroupant les formes épisomales avec un ratio supérieur à 0,8.

I.E. Analyse de la séquence d'HPV16 E6

La séquence de E6 a été dans un premier temps amplifiée par PCR dans un thermocycleur cycler (Perkin-Elmer, Foster City, CA) à l'aide d'une amorce sens 5'-CGAAACCGGTTAGTATAA-3' et d'une amorce anti-sens 5'-GTATCTCCATGCATGATT-3' toutes deux spécifiques de la séquence d'HPV16 E6 et à la concentration de 25µM comme décrit par Zehbe et al. (**Zehbe et al.** 1998a).

La réaction consistait en 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, suivie d'une phase d'hybridation à 55°C pendant une minute puis une phase d'élongation à 72°C pendant 2 minutes. L'amplification est précédée d'une dénaturation à 95°C pendant 10 minutes et elle est suivie d'une dernière phase d'élongation à 72°C pendant 2 minutes. Les produits d'amplification ont été contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose, marqués au bromure d'éthidium, les complexes fluorescents de 524 paires de base ont été mis en évidence à l'aide d'une caméra CCD refroidie à -25°C (LAS-1000, Fuji, Stamford, CT).

Les produits d'amplification obtenus ont été purifiés dans des colonnes de centrifugation (Qiagen), et ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific). Le séquençage en lui-même de l'oncoprotéine E6 a été réalisé à l'aide d'amorces spécifiques à la concentration de 0,16µM, d'un tampon BigDye Sequencing, d'une solution ready reaction mix et de 10ng d'amplicons. Les amorces utilisées amplifient la région de E6 52-575 soit un amplicon de 524 paires de bases. Les amorces utilisées sont les suivantes : 5'-CGA-AAC-CGG-TTA-GTA-TAA-3', 5'-GTA-TCT-CCA-TGC-ATG-ATT-3'. Le programme d'amplification consistait en 25 cycles de dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, d'une hybridation à 50°C pendant 5 secondes et d'une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

Les produits de séquençage obtenus ont été purifiés dans des colonnes de résine de Sephadex sur une plaque Multiscreen HV et ils ont été analysés à l'aide d'un séquenceur automatique Abi prism 3130[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I.F. Marquage en immunohistochimie

Les marquages en immunohistochimie ont été réalisés sur des coupes de tumeurs de 4μ m à l'aide d'un automate Dako Stainer et en utilisant le kit de détection Envision selon les instructions du fabricant (Dako, Glostrup, Denmark). Les anticorps utilisés sont les suivants : clone E6H4 p16 monoclonal (Dako), clone DO-7 p53 monoclonal (Dako), et monoclonal Ki67 (Dako). Les concentrations des anticorps étaient respectivement 1/40, 1/50 et 1/50.

I.G. Analyse d'images

La quantification des marquages en immunohistochimie pour les 3 anticorps a été réalisée à l'aide d'un microscope AXIOSkop 2 couplé à une caméra AXIOcam (MRc 5 Zeiss, Göttingen, Allemagne). Pour chaque lame, une moyenne de 5 à 10 champs a été lue et

comptée à un grossissement x20. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel KS300 (Zeiss), un système semi-automatique d'analyse d'image, de pair avec des logiciels développés dans le laboratoire. Un signal global \geq 10% et >30% a été considéré comme un marquage positif pour p53 et Ki67 respectivement. Les marquages de p16INK4a ont été évalués selon la notation de Klaes et al. (Klaes et al. 2001) et répartis en négatif (<1%), positif avec un signal focal (5-25%), positif avec un signal diffus (>25%).

I.H. Analyse statistique

Les variables quantitatives sont exprimées en moyennes +/- la déviation standard et elles sont comparées selon le test t de student. Les variables qualitatives sont exprimées en pourcentage et sont testées à l'aide du test du χ^2 ou du test exact de Fisher. L'analyse de la survie a été réalisée à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et comparée avec un test du Log-Rank. Le seuil de significativité a été placé à p≤0,05, les calculs ont été réalisés sur le logiciel de statistiques STATA (Version 10.0, Stata, College Station, TX).

II Etude des effets de l'expression transitoire des oncoprotéines E6/E7 ou de leur inhibition ou dans des lignées cellulaires tumorales

II.A. Culture cellulaire

II.A.1. Lignées cellulaires

La lignée tumorale CaSki nous a été fournie par le laboratoire du Professeur Christiane Mougin et provient de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Les lignées SiHa et HBE4-E6/E7 proviennent de l'ATCC. CaSki et SiHa sont des lignées dérivées d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus, la lignée HBE4-E6/E7 est dérivée d'un épithélium bronchique. Les lignées 16HBE (ATCC), A549 (ATCC) et BZR (ATCC) sont des cellules épithéliales bronchiques, 16HBE et BZR sont infectées par le virus SV40, BZR est obtenue à partir des lignées Beas2B transfectées par l'oncogène v-Ha *Ras*. MCF7 (ATCC) est une lignée épithéliale mammaire.

II.A.2. Conditions de culture

Les cellules 16HBE, A549, BZR, SiHa sont cultivées en milieu DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium, GIBCO-BRL), la lignée CaSki est cultivée en RPMI (GIBO). Les milieux contiennent du GLUTAMAXTM et sont supplémentés avec 10% du sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, ainsi qu'avec de la pénicilline (100U/mL) et de la streptomycine (100µg/mL). Les cellules HBE4-E6/E7 sont cultivées en milieu Kératinocyte Serum Free Medium (KSFM, GIBCO) supplémenté avec de l'extrait pituitaire bovin (30µg/mL), de l'EGF recombinant (0,2ng/mL), de la pénicilline (100U/mL) et de la streptomycine (100µg/mL). Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C.

Les cellules sont cultivées en boîtes de Pétri en polystyrène à fond plat de 8cm de diamètre (Falcon, becton Dickinson, Ca). A 80% de confluence les cellules sont rincées deux fois au PBS, détachées par trypsine EDTA 0,05% 1X (GIBCO) et réensemencées au 1/10^{ième}.

II.B. Transfections transitoires

II.B.1. Transfection transitoire de cDNA

Les cellules sont mises en culture la veille de la transfection dans leur milieu d'entretien respectif, dans des plaques 6 puits en plastique (Falcon) et ensemencées à 100K cellules par puits et 2mL de milieu.

Le vecteur d'expression utilisé est le pEF-SHA pour la transfection de l'ADN complémentaire (ADNc) des oncoprotéines E6/E7 (don du laboratoire du Professeur Philippe Delvenne), le vecteur vide sert de contrôle négatif de transfection est le pIRES pour la transfection de l'ADNc de l'EGFP sert de contrôle de l'efficacité de transfection. Les transfections sont réalisées 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture est au préalable changé 1 heure avant la transfection. La transfection est réalisée à l'aide de lipide cationique Fugène (Roche). Dans chaque puits est ajouté un mélange contenant les plasmides (concentration finale de 1µg/mL dans un puits de la plaque 6 puits contenant 2mL de milieu), 3µL de Fugène et 100µL de DMEM sans sérum.

Le mélange est réalisé de la façon suivante, les plasmides sont déposés dans un tube de polypropylène auquel on ajoute la moitié du volume final correspondant au nombre de puits à transfecter. Un mélange de DMEM et Fugène pour tous les plasmides est préparé à part, puis est ajouté pour compléter le volume de chaque mélange de plasmide à déposer. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante à l'issue de quoi le mélange est ajouté aux puits.

Les cellules sont rincées deux fois au PBS 48 heures après transfection avant d'être extraites.

II.B.2. Transfection d'ARN interférents

Quatre séquences de siRNA (silencing RNA) de 19 nucléotides et deux thymidines ont été sélectionnées pour inhiber les oncoprotéine E6 et E7 d'HPV16 (GeneID : 1489078 et GeneID : 1489079), les séquences sont rapportées dans le tableau 2. Un mélange aléatoire de nucléotides de chacune des séquences (scrambled), préalablement vérifiées par BLAST pour éviter toute reconnaissance de séquences existantes, est utilisé comme témoin. Les siRNA utilisés proviennent d'Eurogentec (EUROGENTEC, Liège, Belgique).

Gènes ciblés	siRNA		Scrambled	
E6si_118	Sens	5'-GAAUGUGUGUACUGCAAGCdTdT-3'	5'-GCGGAAUCGAGCAUGUAUUdTdT-3'	
(Yoshinouchi et al. 2003)	Anti-sens	5'-GCUUGCAGUACACACAUUCdTdT-3'	5'-AAUACAUGCUCGAUUCCGCdTdT-3'	
E6si_224	S	5'-GAGGUAUAUGACUUUGCUUdTdT-3'	5'-GACUUGAUUUAGGUGUCAUdTdT-3'	
(Jiang & Milner 2002)	AS	5'-AAGCAAAGUCAUAUACCUCdTdT-3'	5'-AUGACACCUAAAUCAAGUCdTdT-3'	
E6si_378	S	5'-UACAACAAACCGUUGUGUGdTdT-3'	5'-GGACCUAUGAAAUGUCUCAdTdT-3'	
(Butz et al. 2003)	AS	5'-CACACAACGGUUUGUUGUAdTdT-3'	5'-UGAGACAUUUCAUAGGUCCdTdT-3'	
E6a: 452	S	5'-AGACAUCUGGACAAAAAGCdTdT-3'	5'-GCUUUUUGUCCAGAUGUCUdTdT-3'	
E081_432	AS	5'-GGAAGAGCCCAUAAUCAAAdTdT-3'	5'-UUUGAUUAUGGGCUCUUCCdTdT-3'	
E7.; 662	S	5'-AGGAGGAUGAAAUAGAUGGdTdT-3'	5'-GAGGGAAUGAAUGGUAGAAdTdT-3'	
E781_002	AS	5'-CCAUCUAUUUCAUCCUCCUdTdT-3'	5'-UUCUACCAUUCAUUCCCUCdTdT-3'	
E7.: 700	S	5'-GCAACAAAAGGUUACAAUAdTdT-3'	5'-UGAUAACCAGAAUAAGAACdTdT-3'	
E/SI_/20	AS	5'-UAUUGUAACCUUUUGUUGCdTdT-3'	5'-GUUCUUAUUCUGGUUAUCAdTdT-3'	
E7si_773	S	5'-GGCCAAGACCCAUUAGACUdTdT-3'	5'-GGCCAAGACCCAUUAGACUdTdT-3'	
(Tang et al. 2006a)	AS	5'-CGAAUGUCUACGUGUGUGCdTdT-3'	5'-AGUCUAAUGGGUCUUGGCCdTdT-3'	

Tableau 2 Séquences des siRNA utilisés

II.B.2.1. Hybridation des siRNA

Les siRNA sont hybridés dans une solution contenant 30μ L d'eau, 15μ L de siRNA sens, 15μ L de siRNA anti-sens et 15μ L de tampon d'hybridation (Eurogentec). La solution est

portée à 95°C pendant 2 minutes puis laissée refroidir à température ambiante pendant une heure pour être ensuite conservée à -20°C. Les siRNA sont ainsi conservés à la concentration de 20µM.

II.B.2.2. Transfection par CaCl₂

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits avec 200k cellules par puits et 2mL de milieu. La transfection est réalisée 24 heures après l'ensemencement, le milieu des cellules est changé 1 heure avant pour du DMEM 10% SVF 1% pénicilline/streptomycine.

Pour chaque siRNA le mélange suivant est réalisé dans un tube de polypropylène, 880μ L d'H₂O, 100μ L de CaCl₂, 20μ L de siRNA et 1mL d'HBSP 2X ajouté en faisant un tourbillon dans le tube. Le mélange est alors incubé 90 secondes à température ambiante puis 200μ L sont déposés dans chaque puits. Seize heures après l'ajout des siRNA, les cellules sont rincées au PBS à deux reprises et remises en présence de 2mL de leur milieu d'entretien. Les cellules sont rincées 48 heures après transfection à deux reprises au PBS et extraites.

II.B.2.3. Transfection à l'aide de la transfectine

Les cellules sont ensemencées en début de semaine avec 250k cellules par puits. La transfection est réalisée 24 heures après ensemencement. Dans un tube en polystyrène 2µL de siRNA sont mélangés avec 500µL d'Opti-MEM (GIBCO) par puits de plaque 6 puits. Un volume de 3µL de transfectineTM est mélangé avec 500 µL d'Opti-MEM par puits de plaque 6 puits. La moitié du volume final du mélange de transfectineTM est ajouté à la solution contenant les siRNA, le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante. Le milieu des cellules est aspiré et dans chaque puits est déposé 1mL du mélange siRNA/transfectineTM, 4 heures après l'ajout des siRNA est ajouté 1mL de milieu avec 20% de SVF. Les cellules sont incubées en présence de siRNA 48 heures avant d'être rincées deux fois au PBS et extraites.

Dans le cas des traitements par l'inhibiteur de TGF- β SB-505124 (SIGMA), les cellules sont transfectées par les siRNA comme précédemment décrit à la différence qu'elles sont maintenues en milieu sans sérum après transfection, l'inhibiteur est ajouté au milieu de transfection contenant les siRNA. Le volume d'inhibiteur de TGF- β est calculé pour obtenir la concentration de 1µM dans le volume final de 2mL.

II.C. Analyse de l'expression des ARNm

II.C.1. Extraction des ARN

A partir des culots secs, 200µL de PBS est ajouté aux cellules. L'ARN est extrait à l'aide du kit High Pure RNA Isolation kit (Roche) selon les instructions du fabricant. Les cellules sont lysées et les ARNm sont fixés sur une colonne pour être purifiés, ils sont élués dans 50µL d'eau autoclavée et conservés à -80°C 24 heures avant dosage. Le dosage des ARNm est réalisé à l'aide d'un NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific) par spectrophotométrie.

II.C.2. Transcription inverse et amplification par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

Les ARN totaux sont dilués dans de l'eau pour réaliser des solutions à 4ng/µL d'ARN. Des aliquots de 10ng d'ARN sont préparés à partir de ces solutions, et les RT-PCR sont réalisées à partir de ces aliquots. La réaction de transcription est réalisée à l'aide d'un kit rTth DNA polymérase (Applied Biosystem) selon les indications du fabricant. Pour toutes les expériences, l'ARNm du gène de ménage GAPDH sert de référence.

La transcription inverse est réalisée à l'aide d'une amorce anti-sens spécifique de la séquence à amplifier (tableau 3), le mélange est porté à 70°C pendant 15 minutes, la réaction est ensuite bloquée par refroidissement des échantillons à 4°C. Le mix de PCR est alors ajouté aux échantillons, toujours selon les informations du fabricant, les ADNc obtenus à partir des



Figure 29 Schéma des étapes de RT-PCR.

ARNm du gène d'intérêt sont alors amplifiés par plusieurs cycles de dénaturation, hybridation et élongation.

Gènes	Amplicons	Amorces
E6	194	S= 5'-GAA-CAG-CAA-TAC-AAC-AAA-CCG-3' AS= 5'-TGA-TTA-CAG-CTG-GGT-TTC-TCT-3'
E7	197	S= 5'-GCA-ACC-AGA-GAC-AAC-TGA-TCT-CTA-C-3' AS= 5'-GGT-CTT-CCA-AAG-TAC-GAA-TGT-CTA-CG-3'
MT1-MMP	221	S= 5'-GGA-TAC-CCA-ATG-CCC-ATT-GGC-CA-3' AS= 5'-CCA-TTG-GGC-ATC-CAG-AAG-AGA-GC-3'
MT2-MMP	221	S= 5'-CTT-GCA-GAG-ATG-CAG-CGC-TTC-TAC-3 AS= 5'-CTG-GAT-GCT-AAA-GGT-CAG-ATG-GTG-3''
MT3-MMP	209	S= 5'-GGT-TGG-ATT-TCG-TGC-ATC-ATT-CGG-3' AS= 5'-ATA-GAA-CTG-CTG-CAT-GGC-AGC-TAG-3'
MMP2	225	S= 5'-AGA-TCT-TCT-TCT-TCA-AGG-ACC-GGT-T-3' AS= 5'GGC-TGG-TCA-GTG-GCT-TGG-GGT-A-3'
TIMP1	143	S= 5'-CAT-CCT-GTT-GTT-GCT-GTG-GCT-GAT-3' AS= 5'- GTC-ATC-TTG-ATC-TCA-TAA-CGC-TGG-3'
TIMP2	161	S= 5'-CTC-GCT-GGA-CGT-TGG-AGG-AAA-GAA-3' AS= 5'-AGC-CCA-TCT-GGT-ACC-TGT-GGT-TCA-3'
TIMP3	211	S= 5'-CTT-CTG-CAA-CTC-CGA-CAT-CGT-GAT-3' AS= 5'-CAG-CAG-GTA-CTG-GTA-CTT-GTT-GAC-3'
GAPDH	196	S= 5'- GCT-GCC-ATT-TGC-AGT-GGC-AAA-GT-3' AS= 5'- TTG-ATG-TTA-GTG-GGG-TCT-CGC-TC-3'
TGF-β	201	S= 5'-ACT-ACT-ACG-CCA-AGG-AGG-TCA-C-3' AS= 5'-ACG-TGC-TGC-TCC-ACT-TTT-AAC-T-3'
EMMPRIN	204	S= 5'-TGA-AGT-CGT-CAG-AAC-ACA-TCA-ACG-3' AS= 5'-GCC-TCC-ATG-TTC-AGG-TTC-TCA-ATG-3'
Cadhérine-E	174	S= 5'-CCC-ATC-AGC-TGC-CCA-GAA-AAT-GAA-3' AS= 5'-CTG-TCA-CCT-TCA-GCC-ATC-CTG-TTT-3'

Tableau 3 Séquences des amorces et tailles des amplicons des gènes cibles.

Les temps des étapes du cycle et les températures varient en fonction du gène et des lignées étudiés comme indiqué ci-dessous (tableau 4). Les conditions de réactions sont déterminées pour maintenir la réaction dans la phase d'amplification exponentielle (figure 29).

	utilisées.			_
Gènes	Dénaturation	Hybridation	Elongation	
E6 et E7	30 sec à 94°C	30 sec à 56°C	45 sec à 72°C	
GAPDH, TGF-β, MMP7	15 sec à 94°C	20 sec à 60°C	10 sec à 72°C	
MMP3	15 sec à 94°C	30 sec à 63°C	30 sec à 72°C	
EMMPRIN	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	
MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP,	15 and à 04°C	20 soo à 68°C	10 see à 72°C	
MMP2, TIMP1, TIMP2, Cadhérine-E	15 sec a 94 C	20 sec a 68 C	10 sec a 72 C	

Tableau 4 Durée des cycles et températures d'hybridation pour les différentes amorces

II.C.3. Migration et révélation des produits de RT-PCR

Les produits de RT-PCR obtenus sont mélangés avec un tampon de charge (eau, 10% [m/v] Ficoll et 0,125% [m/v] xylène cyanol ; Sigma) et sont séparés en gel d'acrylamide 10% (Euromedex). Du SyberGold (Invitrogen), un agent intercalant des acides nucléiques, est utilisé pour marquer l'ADN. L'image des gels est obtenue à l'aide d'une caméra CCD refroidie à -25°C (LAS-1000, Fuji, Stamford, CT). L'analyse des bandes obtenues est réalisée à l'aide du logiciel Aïda (Raytest, Courbevoie, France). Les valeurs obtenues (unité arbitraire de densité de pixel) pour les produits de PCR sont normalisées à l'aide des valeurs obtenues pour le gène de ménage.

II.C.4. Analyse de l'expression des ARNm par membrane de SuperArray

Des ARN de bonne qualité, ratio $DO^{260/280} \ge 2$ et $DO^{260/230} \ge 1,7$ et ne présentant pas de bandes de dégradation ni contamination génomique sur gel d'agarose, sont sélectionnés. A partir de 3µg de ces ARN sont synthétisés des ARNc biotinylés selon les instructions du fabricant grâce au kit Oligo GEArray® System (SABiosciences, Frederick, USA). Les ARNc obtenus sont purifiés sur colonne, toujours selon les instructions du fabricant, puis hybridés, à 60°C et sous agitation, sur une membrane sur laquelle sont réparties des sondes pour l'ensemble des gènes étudiés. Les membranes sont ensuite rincées et bloquées pour éviter les marquages aspécifiques. La réaction de chimioluminescence est obtenue par ajout de CDP-star (SABiosciences) aux membranes pendant 5 minutes. Les images des membranes sont ensuite acquises grâce à une caméra CCD refroidie à -25°C (Las1000, Fuji).

II.C.5. Analyse de l'expression des ARNm par puce Affymetrix[™]

L'analyse du transcriptome par microarray et en particulier grâce à l'utilisation de puces « GeneChips » Affymetrix™ (Santa Clara, CA, USA) permet d'étudier de façon simultanée le niveau d'expression de milliers de gènes à partir d'un même échantillon.

Les puces Affymetrix[™] sont des supports solides sur lesquels, par un procédé de photolithographie, ont été fixées des sondes ADN à très forte densité. Ces sondes sont complémentaires de gènes cibles. Différentes puces sont disponibles selon l'organisme étudié. Selon les modèles de puce, le nombre de transcrits pouvant être analysés simultanément peut atteindre 47000. Les gènes étudiés sont sélectionnés à partir de données disponibles dans les banques Genbank[®], dbEST et RefSeq.

Chaque transcrit est identifié à l'aide d'un set de sondes qui est constitué de 20 oligonucléotides différents répartis sur les 600 pb de l'extrémité 3' de la séquence du transcrit analysé. Les oligonucléotides eux-mêmes ont une longueur de 25 mers. Plusieurs centaines de millions d'oligonucléotides sont disposés sur une cellule de 20µM de côté, une cellule représentant une unité d'hybridation ou « spot » sur la puce. La densité des spots peut atteindre 25000 au cm². D'autre part, chaque set d'oligonucléotides est composé d'une paire de sondes avec une sonde de parfait appariement et une sonde présentant un mauvais appariement. Ce couplage permet d'identifier et de minimiser les interactions aspécifiques et le signal de fond.

Il est donc ainsi possible d'étudier l'expression transcriptionnelle des gènes à partir d'un extrait cellulaire, les puces Affymetrix[™] permettant de quantifier de façon absolue l'abondance des transcrits.

L'analyse du transcriptome par puces recquiert une excellente qualité d'ARNm. La première étape est la fabrication d'ADNc biotynylés à partir des ARNm. Dans le cas des puces Affymetrix[™] un seul type de fluorescence est utilisé, en l'occurrence le conjugué streptavidine-phycoerythrine, par conséquent les ARN complémentaires issus de chaque échantillon biologique seront hybridés individuellement sur chaque puce. Après hybridation et révélation, les microarrays sont scannés et l'image est quantifiée pour chaque sonde. La fluorescence détectée est directement proportionnelle au niveau d'expression du gène. Les données obtenues sont normalisées par des témoins internes pour limiter les variations entre les différentes puces et conditions.



Figure **30** Schéma d'organisation d'une puce Affymetrix[™].

Les échantillons que nous avons analysés par puce Affymetrix[™] sont des ARN qui ont été isolés à partir de lignées CaSki transfectées par des siRNA E7 ou transfectées avec des cDNA E6, ainsi que leurs témoins respectifs. Le traitement des échantillons a été réalisé dans le laboratoire du GIGA à Liège. Des ARNc biotinylés sont obtenus à partir de 10µg d'ARN de départ à la concentration de 1µg/µL. Les ARNc marqués sont ensuite hybridés sur les puces Affymetrix[™]. Les puces sont ensuite lavées et révélées par incubation avec la streptavidine couplée à la phycoérythrine. Chaque condition expérimentale est réalisée en triplicat et chaque échantillon est hybridé sur une puce différente. Les puces sont ensuite scannées et l'intensité du signal de chaque sonde, qui correspond à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon, est mesurée. Le profil d'expression a été déterminé grâce à la puce Affymetrix[™] U133A 2.0 selon les instructions du fabricant. La puce utilisée regroupe 14500 gènes bien caractérisés. Les valeurs en Log2 des ratios entre les conditions traitées et témoins ont été évaluées et les gènes dont le ratio est supérieur ou inférieur à 1 sont considérés comme ayant une expression modifiée.

II.D. Analyse des protéines

II.D.1. Extraction et dosage des échantillons protéiques

A partir des culots secs, les cellules sont dégradées par un tampon RIPA (Tris 50mM [ph7,4], NaCL 150mM, Igepal 1% [v/], sodium déoxycholate 1% [m/v], iodoacetamide 5mM, SDS 0,1% [m/v]) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete (Roche). Le lysat est incubé sur glace 20 minutes puis centrifugé à 4°C 10 minutes à 10000g pour culoter les débris cellulaires. Le surnageant est conservé à -20°C avant dosage et utilisation.

La concentration des protéines est déterminée à l'aide du kit Uptima (Interchim, Montluçon, France) selon les instructions du fabricant. La lecture est réalisée par un spectrophotomètre à microplaque (Multiskan® EX, ThermoScientific, Waltham, MA) à 562nm. Des dilutions en série de BSA (Bovine Serum Albumin) sont utilisées pour obtenir la gamme étalon.

II.D.2. Western Blotting

Pour toutes les lignées et protéines détectées, 10μg d'échantillon protéique sont mélangés à du tampon Laemmli 5X contenant 5% de β-mercaptoéthanol (Biorad, hercules, CA) et dénaturés

5 minutes à 100°C. Ils sont alors séparés par électrophorèse SDS PAGE dans un gel d'acrylamide 10 ou 6% (Euromedex) à ampérage constant de 20mA. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) (Perkin Elmer, Boston, MA) préalablement activée par du méthanol, le transfert s'effectue 1 heures à 100V. Les membranes sont ensuite bloquées en tampon PBT 5% lait (PBS + 0,1% Tween-20) pendant 2 heures, puis incubées sur la nuit à 4°C en présence d'anticorps primaire dans du tampon PBS 5% lait, ou sur 1 heure à température ambiante pour l'actine qui sert de témoin de dépôt. Les anticorps suivant ont été utilisés :

- anticorps monoclonal de souris anti-pRb humain clone G3-245 à 2µg/mL (BD Biosciences, San Jose, CA)

- anticorps monoclonal de souris anti-p21 humaine clone 6B6 à 2µg/mL (BD Biosciences),

- anticorps monoclonal de souris anti-p53 humaine clone DO-1 à 2µg/mL (BD Biosciences)

- anticorps monoclonal de souris anti-MT1-MMP humaine clone 2D7 au 1/1000^{ième} (gracieusement fourni par le Dr Rio, IGBMC, Illkirch, France)

anticorps monoclonal de souris anti-cadhérine-E humaine clone 36 au 1/2500^{ième}
 (Transductions Laboratories, San Jose, CA)

- anticorps monoclonal de souris anti-caténine- β humaine clone 14 au 1/2500^{ième} (Transduction Laboratories)

 anticorps monoclonal de souris anti-occludine humaine clone OC-3F10 au 1/10000^{ième} (Invitrogen)

- anticorps monoclonal de souris anti-ZO1 humaine clone ZO1-1A12 au 1/1000^{ième} (Invitrogen)

170

- anticorps polyclonal de lapin anti-PARP humaine 2,5µL pour 5mL (Roche)

- anticorps polyclonal de lapin anti-actine humaine au 1/1000^{ième} (Sigma).

Les membranes sont ensuite rincées à trois reprises au PBT lait, puis incubées en présence d'anticorps secondaire conjugué à une HRP (horse raddish peroxydase) au 1/1000^{ième} (DakoCytomation, Glostrup, Danemark) pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. La révélation est réalisée par l'ajout du kit ECL+ (Ammersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant. Le signal chimioluminescent est détecté à l'aide d'une caméra CCD refroidie à -25°C (LAS1000, Fuji).

II.D.3. Analyse par zymographie

Les cellules sont rincées 24 heures après transfection, mises en présence de milieu sans sérum pendant une heure, puis mises en présence d'un nouveau milieu sans sérum pendant 24 heures, le surnagent est alors récolté et congelé à -20°C. Pour révéler les enzymes gélatinolytiques présentes dans le milieu, les échantillons sont mélangés à du tampon Laemmli 5X et soumis à une électrophorèse SDS PAGE 10% avec 1mg/mL de gélatine (Sigma) à ampérage constant 20mA et à 4°C. Après migration, le gel est lavé deux fois 30 minutes dans un bain de Triton X-100 2% pour réactiver les enzymes en éliminant le SDS. Les gels sont ensuite incubés sur la nuit à 37°C dans du tampon d'incubation (Tris 50mM pH 7,6, CaCl₂ 5mM et triton X-100 0,1%). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie R250 contenant 10% d'acide acétique et 20% de méthanol puis les gels sont décolorés dans des bains d'acide acétique (10%) et méthanol (40%). La présence des gélatinases est visualisée par l'absence de coloration bleue sur les plages de lyse indiquant la protéolyse du substrat.

II.D.4. Immunohistochimie

Les cellules sur lesquelles sont réalisés les marquages en immunohistochimie sont cultivées comme précédemment décrit à la différence qu'elles reposent sur 4 lames de verres de 8mm de diamètre dans chaque puits de plaque 6 puits. A l'issue des expériences, les lamelles sont rincées et fixées 10min au méthanol à -20°C, puis conservées, après aspiration du méthanol, à -20°C avant utilisation. Les lamelles sont dans un premier temps réhydratées au PBS, puis incubées 10min à température ambiante dans du PBS-BSA 3%. Les lamelles sont ensuite mises en contact avec 40µL de PBS-BSA 1% contenant les anticorps pendant une heure à température ambiante en chambre humide. Les anticorps suivant ont été utilisés (pour le détail des anticorps utilisés, voir paragraphe Western Blotting). Anticorps anti-occludine au 1/25^{ième}, anti-ZO1 au 1/25^{ième}, anti-cadhérine-E au 1/100^{ème}, anti-caténine-β au 1/250^{ième}. Les lamelles sont rincées deux fois au PBS et remises 5 minutes dans du PBS-BSA 3% à température ambiante. Les lamelles sont ensuite incubées pendant 1 heure à l'obscurité dans 40µL de PBS-BSA 1% contenant l'anticorps secondaire au 1/200^{ième} (10µg/mL) Alexa Fluor 594 (Fluorescence rouge) (Molecular Probes, Eugene, OR). Les lamelles sont à nouveau rincées deux fois au PBS et mises en présence de Dapi au 1/1000^{ième} dans du PBS pendant 5min à température ambiante pour contre colorer les noyaux. Les lamelles sont remises en présence de PBS puis sont montées sur lame à l'aide du milieu de montage anti-fading Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA).

Les lames sont ensuite conservées à -4°C à l'obscurité pour préserver la fluorescence. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope AxioImager (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une caméra Coolsnap FX (Roper Scientific, Duluth, GA). Les images acquises ont été traitées avec les logiciels AxioVision (Zeiss) et ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA)



Figure **301** Schéma d'une chambre de Boyden.

II.E. Analyse du comportement cellulaire

II.E.1. Mesure de la capacité invasive des cellules en chambre de Boyden

Des plaques BD BioCoat[™] Matrigel[™] (BD Biosciences) aux membranes de pore de diamètre 8µm sont utilisées pour mesurer la capacité invasive des cellules. Les transwells de la plaque sont dans un premier temps réhydratés. Les expériences de transfection sont réalisées comme précédemment décrit à la différence qu'après environ 24 heures de transfection, les cellules sont trypsinées et ensemencées à 150k cellules par puits transwell dans le compartiment supérieur en présence de 500µL de milieu sans SVF, le compartiment inférieur contenant du milieu avec 10% de SVF. Les transwells sont mis à incuber à 37°C pendant un temps qui varie selon les lignées. Les membranes sont alors rincées dans du PBS et fixées 10 minutes dans du méthanol à -20°C. Elles sont ensuite colorées à l'hématoxyline de Meyer (Dako) pendant 10min, puis séchées et montées sur lame à l'aide du milieu de montage aquaous mounting medium (Dako). La quantification du test d'invasion est réalisée en comptant le nombre de cellules sur la face inférieure de la membrane du transwell (30 champs avec un objectif X40) (figure 31).

II.E.2. Numération cellulaire

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 24 puits et transfectées par siRNA avec des concentrations préparées proportionnellement au ratio entre la surface des puits de la plaque 24 puits et celle des puits d'une plaque 6 puits. A chaque temps de mesure, les cellules ont été rincées deux fois en PBS, trypsinées puis comptées à l'aide d'un compteur cellulaire par marquage de toutes les cellules présentes.

II.F. Analyse statistique des données

Les données chiffrées obtenues ont été soumises au test non paramétrique univarié. Une probabilité d'erreur inférieure à 5% (p>0,05) est considérée comme révélatrice d'une différence significative. Les résultats obtenus en RT-PCR et Western Blotting sont représentés sous forme de médianes et quartiles (quartiles 1 et 3). Les résultats obtenus en chambre de Boyden sont représentés sous la forme de moyenne \pm écart type.

Résultats

I Etude de 58 cas de carcinomes épidermoïde de l'amygdale palatine

I.A. Caractéristiques des patients et des tumeurs

A partir de 71 cas sélectionnés, nous avons retenu 58 cas, 13 tumeurs ne présentant pas d'ADN de suffisamment bonne qualité pour procéder aux expériences suivantes. Parmi les 58 cas, il y a une forte proportion d'hommes avec 54 cas (soit 93,1%) (Tableau 5).

La moyenne d'âge des patients au moment du diagnostic était de 56,2 ans, les âges s'étalant de 29,2 à 90,7 ans. 94,8% des patients avaient pour habitude de fumer, avec une moyenne de 34,4 paquets-années de cigarettes. 91,4% des patients buvaient régulièrement de l'alcool, leur consommation estimée étant en moyenne de 45,7 grammes d'alcool par jour. Selon le système TNM de classification de l'International Union Against Cancer, 26 cas (44,8%) appartenaient aux catégories Tis/T1/T2 et 31 cas (53,4%) ne présentaient pas d'envahissement ganglionnaire. La recherche de métastases n'a pas été menée. 6 patients présentaient un cancer synchrone dont 3 dans l'œsophage, 1 dans le larynx, 1 dans la vessie et 1 dans le poumon. La présence des HPV n'était pas associée au grade histologique de la tumeur. Les HPV n'étaient pas non plus associés à l'existence d'un cancer synchrone ni à celle de métastases ganglionnaires. 53 tumeurs (91,4%) étaient histologiquement gradées comme moyennement à très différenciées, 5 d'entre elles étaient peu différenciées.

	Total	HPV +	HPV –	p obtenu
	(n=58)	(n=12)	(n=46)	
Age	56,2 ±9,8	56,5 ±12,8	55,5 ±8,3	0,16
Genre				
Homme	54 (93,1%)	11 (91,7%)	43 (93,5%)	1
Femme	4 (6,9%)	1 (8,3%)	3 (6,5%)	
Consommation de tabac	a			0,11
Non	3 (5,2%)	2 (16,7%)	1 (2,2%)	
Oui	55 (94,8%)	10 (88,3%)	45 (97,8%)	
Paquets-années	$34,4 \pm 14,2$	$30,8 \pm 16,2$	35,4 ±13,6	
Consommation d'alcool	b			0,05
Non	5 (8,6%)	3 (25,0%)	2 (4,3%)	
Oui	53 (91,4%)	9 (75,0%)	44 (95,7%)	
Gramme/jour ^c	45,7 ±24,2	43,3 ±31,7	46,3 ±22,3	
рТ				0,11
TisT1T2	26 (44,8%)	8 (66,7%)	18 (39,1%)	
T3T4	32 (55,2%)	4 (33,3%)	28 (60,9%)	
pN				0,76
NO	31 (53,4%)	7 (58,3%)	24 (52,2%)	
N1 to N3	27 (46,6%)	5 (41,7%)	22 (47,8%)	
Cancer synchrone				1
Non	52 (89,7%)	11 (91,7%)	41 (89,1%)	
Oui	6 (10,3%)	1 (8,3%)	5 (10,9%)	
Œsophage	3	1	2	
Larynx	1	0	1	
Vessie	1	0	1	
Poumon	1	0	1	
Grade histologique				0,27
PD	5 (8,6%)	2 (16,7%)	3 (6,5%)	
MD/TD	53 (91,4%)	10 (83,3%)	43 (93,5%)	

Tableau 5. Caractéristiques des 58 patients sélectionnés en fonction du statut HPV.

^aUne absence de consommation équivaut à ne pas fumer et/ou ne pas avoir fumé précédemment, les valeurs observées pour les fumeurs oscillaient entre 12 et 90 paquets-années ; ^bla non consommation d'alcool équivaut à ne pas boire ou ne pas avoir bu précédemment, les valeurs observées pour les consommateurs d'alcool allaient de 20 à 80 grammes/jour ; ^cun verre de vin ou 25cl équivalent à 10 grammes d'éthanol pur ; PD, peu différencié ; MD/TD, moyennement à très différencié.

Il n'y avait pas d'association significative entre la présence d'HPV et le grade des tumeurs, ni d'association avec la consommation de tabac, en revanche une faible différence entre la présence d'HPV et la consommation d'alcool été observée (p=0,05). Les résultats sont rapportés dans le tableau 5.

I.B. Marqueurs viraux et cellulaires

L'ADN d'HPV a été retrouvé dans 12 des 58 échantillons (20,7%). Dans 8 cas sur 12 (66,7%) l'ADN correspondait au génotype HPV16, dans 2 cas au génotype HPV18 (16,7%), dans 1 cas au génotype HPV39 (8,3%) et dans 1 cas au génotype HPV52 (8,3%). La moyenne d'âge n'était pas significativement différente dans le groupe HPV positif par rapport au groupe HPV négatif. La présence d'HPV n'était pas associée significativement avec le sexe des patients.

Echantillons	Variants	p16	p53	Intégration	Charge virale
1	L83V, R10G	négatif	positif	*	1
2	Prototype	diffus	négatif	intégré	6
3	L83V, D64N	diffus	positif	mélange	249
4	L83V	diffus	positif	mélange	621
5	*	négatif	positif	*	*
6	L83V, S71C	diffus	négatif	mélange	150
7	Prototype	diffus	négatif	mélange	20
8	L83V, I52V	diffus	positif	mélange	9

Tableau **6** Immunohistochimie et caractéristiques des variants des cas de carcinomes de l'amygdale positifs aux HPV16.

*Matériel insuffisant.

La charge virale d'HPV16 a été estimée par le nombre de copies E6 d'HPV16 par cellule, et ne prends donc pas en compte l'aneuploïdie et un nombre aberrant possible de chromosomes des cellules infectées. Parmi les 8 cas d'HPV16, la mesure de la charge virale a pu être réalisée sur 7 tumeurs. Les valeurs retrouvées allaient de 1 à 621 copies avec un nombre de copies médian de 20 (tableau 6). L'intégration virale a été estimée grâce au ratio de E6/E2 et réalisée sur 6 cas (la qualité des ADN était insuffisante dans les 2 autres cas), les 6 cas présentaient des formes intégrées mais tous sauf un possédaient également des formes épisomales.

uu myeuu des delaes nucleiques et delaes annies.				
Variants	Acide aminés	Nucléotide	Code génétique	
L83V	Leucine->Valine	350	TTG->GTG	
D64N	Acide aspartique ->Asparagine	293	GAT->AAT	
I52V	Isoleucine-> Valine	257	ATA->GTA	
R10G	Arginine->Glycine	131	AGA->GGA	
S71C	Serine-> Cysteine	315	TCT->TGT	

Tableau 7 Variants de HPV16 E6 détectés et les modifications correspondantes au niveau des acides nucléiques et acides aminés.

Le séquençage de E6 d'HPV16 a mis en évidence la présence de variants dans 5 des 7 échantillons sur lesquels l'analyse a été effectuée (ADN de qualité insuffisante dans un cas). Tous les variants possédaient le polymorphisme L83V, dans 4 cas il était associé à d'autres polymorphismes tels que R10G, D64N, S71C et I52V les résultats sont rapportés dans les tableaux 6 et 7.

 Tableau 8 Caractéristiques immunohistochimiques et statut HPV.

Marqueurs	Total	HPV +	HPV –	р
moléculaires	N=58	N=12	N=46	
p16				
Positif	12 (20,7%)	7 (58,3%)	5 (10,9%)	0,001
Négatif	46 (79,3%)	5 (41,7%)	41 (89,1%)	
p53				
Positif	30 (51,7%)	8 (66,7%)	22 (47,8%)	0,34
Négatif	28 (48,3%)	4 (33,3%)	24 (52,2%)	
Ki67				
>30%	31 (53,4%)	6 (50,0%)	25 (54,3%)	1
≤30%	27 (46,6%)	6 (50,0%)	21 (45,7%)	

L'étude en immunohistochimie des tumeurs indique que 20,7% des tumeurs étaient positives au marquage p16, 51,7% au marquage p53 et 53,4% au marquage Ki67 (tableau 8). Parmi les tumeurs HPV positives, 58,3% présentaient un marquage p16, 66,7% un marquage p53 et 50% un marquage Ki67. L'analyse statistique n'a pas mis en évidence d'association de la présence d'HPV avec un marquage Ki67 ou p53, en revanche la présence d'HPV était associée au marquage p16 (p=0,001) et encore plus à la présence d'HPV16 (p<0,0001) (tableau 8).

I.C. Survie cellulaire

Le temps de suivie médian des patients étaient de 15 mois et s'échelonnait de 1 à 118 mois (figure 32). Les taux de survie étaient respectivement de 60,3% à un an, 43,4% à deux ans, 25,9% à cinq ans. Une tendance à une meilleure survie globale a été observée pour les patients présentant un carcinome de l'amygdale positif aux HPV, mais cette association n'était pas significative (p=0,086). Le taux de survie pour les patients aux tumeurs HPV positives était de 91,7% à un an et 75% à deux ans comparé à 52,2% et 35,8% pour les patients HPV négatif.



Figure 32 Analyse de la survie des patients sélectionnés en fonction du statut HPV (p=0,086).
II Etude du rôle des oncoprotéines E6/E7 sur le phénotype invasif des lignées tumorales

II.A. Effets de la transfection transitoire d'ADNc E6/E7

II.A.1. Lignées cellulaires utilisées

Dans le but d'étudier le rôle des oncoprotéines E6/E7 d'HPV16 sur le phénotype invasif des cellules, nous avons dans un premier temps fait exprimer de façon ectopique les séquences codantes pour E6/E7 en transfectant l'ADN complémentaire correspondant dans différentes lignées. Plusieurs lignées ont été utilisées pour estimer les effets des oncoprotéines virales (tableau 9). Des lignés HPV négatives réparties en deux catégories à savoir les 16HBE et BZR immortalisées par SV40 et les lignées A549 et MCF7 présentant une protéine p53 et pRb sauvages. Les lignées 16HBE et MCF7 sont des lignées peu invasives alors qu'à l'opposé la lignée BZR est très invasive et possède également un oncogène Ras activé. Les lignées A549, CaSki et SiHa possèdent une capacité invasive qui se situe entre celles des 16HBE et BZR.

Lignées	SV40 présent	Ras activé	HPV16 présent	Invasivité	
MCF7	Non	Non	Non	-	
A549	Non	Oui	Non	++	
16HBE	Oui	Non	Non	-	
BZR	Oui	Oui	Non	+++	
CaSki	Non	Non	Oui	++	
SiHa	Non	Non	Oui	++	
HBE4-E6/E7	Non	Non	Oui	++	

Tableau 9 Caractéristiques des différentes lignées utilisées pour la transfection des ADNc des oncoprotéines.

II.A.2. Effets des oncoprotéines E6/E7 sur les lignées tumorales A549 et MCF7

Pour analyser les effets des oncoprotéines, nous avons transfecté leurs ADNc dans des lignées tumorales MCF7 et A549. La transfection ne modifie pas la capacité invasive des cellules MCF7. Nous avons analysé l'expression par RT-PCR des MMP2 et MT1-MMP qui sont particulièrement impliquées lors des premières étapes de l'invasion tumorale ainsi que celle de l'inhibiteur de MMP, le TIMP2 qui intervient également dans l'activation de la MMP2 par MT1-MMP. La transfection des oncoprotéines n'a pas d'effets sur l'expression de ces MMP (figure 33). Nous n'avons pas non plus observé d'effets de la transfection des oncoprotéines virales sur la capacité invasive des cellules MCF7, aucunes n'ayant traversé la membrane des chambres de Boyden après 26 heures d'incubation.



Figure **33** Expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées A549 et MCF7 transfectées par les plasmides E6, E7 et témoin.

II.A.3. Effets des oncoprotéines E6/E7 sur des lignées tumorales immortalisées par SV40

Le rôle majeur des oncoprotéines E6/E7 consiste à remettre les cellules en cycles en dégradant pRb et à prévenir la mort cellulaire par apoptose déclenchée par l'augmentation de p53 suite à la remise en cycle non programmée des cellules. La protéine Tag de SV40 remplit les mêmes fonctions que E6/E7 et la transfection des oncoprotéines d'HPV dans ces lignées permet donc d'estimer leurs effets sur le phénotype invasif des cellules par leurs actions sur leurs autres cibles. D'autre part, les cellules BZR sont des cellules qui en plus d'être immortalisées par SV40 ont été également transfectées par l'oncogène v-Ha-ras, un oncogène qui pourrait agir en synergie avec les oncoprotéines des HPV pour permettre aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype invasif (**Yoshida et al.** 2008).



Figure **34** Mesure de la capacité invasive des cellules BZR après transfection transitoire des plasmides E6, E7 et Témoin en chambre de Boyden.

Après transfection, une légère augmentation de la capacité invasive des BZR a été observée par test en chambre de Boyden mais sans être significative, il n'y a pas d'effet en revanche sur les 16HBE (aucune cellule n'ayant franchi la membrane après 26 heures) (figure 34).

La transfection des oncoprotéines dans les lignées 16HBE et BZR n'a pas d'effet sur l'expression des MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 (figure 35).



Figure **35** Etude de l'expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées BZR et 16HBE transfectées par les plasmides E6, E7 et Témoin.

II.A.4. Effets des oncoprotéines E6/E7 sur des lignées tumorales

HPV16 positives

La progression vers un stade lésionnel de plus haut grade est corrélée à l'intégration du génome viral des HPV dans les cancers du col de l'utérus (**Saunier et al.** 2008). L'intégration a pour conséquence une hyperexpression des oncoprotéines E6/E7 par rupture de la séquence

E2 au moment et donc l'abolition de son effet inhibiteur sur la LCR du fragment intégré. La transfection des oncoprotéines E6/E7 dans des lignées HPV positives a pour but de reproduire cet effet ; d'autre part, bien que de nombreuses cibles des oncoprotéines soient identifiées, la disponibilité de E6/E7 n'est pas normalement suffisante pour permettre une action sur toutes les cibles potentielles répertoriées, la transfection permet également de contourner ce problème.

La transfection des oncoprotéines dans les cellules CaSki entraîne une légère augmentation de la capacité invasive des cellules mais de façon non significative (figure 36).



Figure **36** Mesure de la capacité invasive des cellules CaSki après transfection transitoire des plasmides E6, E7 et Témoin en chambre de Boyden.



Figure **37** Etude de l'expression de MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 par RT-PCR dans les lignées HPV16 positives CaSki et SiHa transfectées par les plasmides E6, E7 et témoin.

L'expression des MT1-MMP, MMP2 et TIMP2 n'est pas modifiée après surexpression des oncoprotéines (figure 37).

Nous avons recherché d'autres cibles potentielles en utilisant, dans un premier temps, une membrane de SuperArray[™] qui permet d'étudier l'expression de gènes de toutes les MMP ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'invasion tumorale. Les membranes n'ont pas permis de mettre en évidence de variation de l'expression des MMP mais font apparaître des variations d'expression d'autres molécules de la matrice extracellulaire (tableau 10).

Gènes	Expression E6/T	Expression E7/T
CTNNA1	1,00	0,82
FN1	0,80	0,66
ITGA3	1,17	1,02
ITGA5	1,08	0,93
ITGB1	1,40	0,91
ITGB4	0,99	0,75
LAMA5	1,62	1,36
LAMB1	1,08	0,85
MMP2	0,71	0,83
TGFBI	0,93	0,78
TIMP1	0,84	0,88

Tableau **10** Effets de la transfection des oncoprotéines E6 ou E7 sur l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale. Données obtenues par membrane de superArrayTM.

Les cellules transfectées par des plasmides E6 ou plasmides témoin vides, ont été, dans un deuxième temps, analysées par puce AffymetrixTM. L'analyse de l'expression des ARNm grâce à la puce a mis en évidence notamment une augmentation d'expression de 37 gènes et une diminution d'expression de 24 gènes (tableau 11).

Gènes	Expression E6/T (log2)	Gènes	Expression E6/T (log2)	Gènes	Expression E6/T (log2)
C10orf59	1,89	VPRBP	1,09	COL4A6	-1,01
SRY	1,73	NFIC	1,09	NFRKB	-1,02
PGGT1B	1,70	KIAA1033	1,08	SFRS15	-1,03
ANKRD12	1,61	ATRX	1,07	TELO2	-1,03
ZCCHC4	1,57	TSPAN2	1,05	PPARD	-1,03
TACSTD2	1,56	NCOA3	1,04	CPEB1	-1,04
RBM25	1,47	ENOX2	1,04	BAT2D1	-1,05
GNL3L	1,44	ANKRD36B	1,03	AGT	-1,05
THBS1	1,44	HAMP	1,02	HS3ST2	-1,06
PARG	1,38	GALK2	1,02	ERAP1	-1,07
HIST1H4E	1,37	PDPK1	1,02	CHPF	-1,07
CLCN5	1,36	KRAS	1,01	PLXDC1	-1,09
ZMYM2	1,31	RPS20	1,00	GPR1	-1,09
ABLIM1	1,31			ACCN2	-1,09
REL	1,29			KIAA0644	-1,10
PTMAP4	1,26			ZFP161	-1,11
SMC3	1,24			ITK	-1,13
GPR157	1,22			TBC1D9B	-1,16
KCNK10	1,19			TOX	-1,25
MYO6	1,19			ARL3	-1,29
CLTC	1,18			CNOT4	-1,36
ZNF770	1,13			PRKAG2	-1,40
ACVR1B	1,12			ENPP1	-1,41
ITGB5	1,12			SYDE1	-2,39

Tableau 11 Expression des gènes altérés suite à la transfection de l'oncoprotéine E6. Données obtenues par puces Affymetrix[™]

II.B. Effets de l'inhibition des oncoprotéines virales E6/E7

II.B.1. Lignées utilisées

Nous avons voulu dans un second temps explorer les effets de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 dans des lignées HPV16 positives et déterminer les effets de l'expression des oncoprotéines sur le phénotype invasif des cellules.

Les lignes cervicales CaSki et SiHa ainsi qu'une lignée épithéliale bronchique HBE4-E6/E7, immortalisée par les oncoprotéines E6/E7 d'HPV16, ont été utilisées.



Figure **38** Inhibition des oncoprotéines E6/E7 par siRNA. (A) Un mélange de 4 siRNA a été utilisé pour inhiber E6 et E7, les séquences et les transcrits qui les ciblent sont représentés en jaune. (B) Effets des siRNA sur l'expression des ARNm E6/E7 en RT-PCR et sur leurs protéines cible en Western Blot. (C) Effets des siRNA utilisés individuellement.

Nous avons séquencé l'oncoprotéine E6 des lignées CaSki et Siha et confirmé la présence de variants L83V R10G dans les cellules CaSki et L83V dans les cellules SiHa comme rapporté par la littérature. La majeure partie des expériences décrites dans ce travail ont été réalisées sur les cellules CaSki.

II.B.2. Inhibition des oncoprotéines E6/E7 par siRNA

Nous avons utilisé un mélange de siRNA pour cibler et dégrader l'ARNm de E6/E7 comme présenté sur la figure 38. Du fait de la nature polycistronique du pré ARNm et du mode de fonctionnement de la dégradation induite par les siRNA, les siRNA E7 ont une action à la fois sur E7 et E6. Les siRNA E6 utilisés ciblent la partie épissée de E6, sachant qu'il a été montré que la traduction de E7 se faisait préférentiellement à partir des ARNm épissés (**Tang et al.** 2006b), ils sont en partie spécifique de E6.

L'inhibition des oncoprotéines à 48 heures à été contrôlée en RT-PCR (figure 38) ainsi qu'en Western Blot à partir des cibles des oncoprotéines p53, pRb et p21. Nous avons vérifié les effets des traitements sur la mort cellulaire à 48 heures et après plusieurs jours de culture (figure 39) et nous n'avons pas observé de différence entre les traitements. L'étude du clivage de PARP, une protéine dégradée lors de l'apoptose, ne met pas en évidence d'effet proapoptotique des siRNA sur les cellules au moment de l'extraction (figure 39). Nous avons confirmé l'absence d'apoptose par marquage des cellules à l'aide de colorants vitaux yopro et iodure de propidium ce dernier marquant la mort cellulaire ; nous avons observé que si le traitement par la transfectine induit une mort cellulaire importante, il n'y a pas d'effet notable des différents siRNA sur l'apoptose cellulaire.



Figure **39** Effets des siRNA sur l'apoptose et la prolifération cellulaire. (A) Images en microscopie à contraste de phase et à fluorescence prises à 48 heures après transfection, le yopro marque les cellules en apoptose, l'iodure de propidium marque les cellules mortes. (B) Western blotting pour étudier le clivage de PARP, une bande de clivage à 89 kDa révèle une présence d'apoptose (C) Comptage des cellules après transfection, les moyennes des valeurs obtenues et leurs écarts types sont reportés sur le graphique.

II.B.3. Effets de l'inhibition des oncoprotéines sur le phénotype invasif des cellules tumorales

Nous avons étudié la capacité invasive des cellules transfectées par les siRNA en chambre de Boyden et mis en évidence que le traitement par les siRNA E7 induisait une baisse du nombre de cellules qui traverse la membrane. Des résultats identiques ont été obtenus en utilisant un seul des siRNA du mélange, le siRNA 773 (figure 40).



Figure **40** Mesure de la capacité invasive des cellules CaSki transfectées par siRNA E6, E7 et E7 773 en chambre de Boyden.

II.B.4. Effets de l'inhibition des oncoprotéines sur l'expression des

gènes de l'invasion

Nous avons étudié le profil d'expression des cellules transfectées par siRNA pour déterminer les variations d'expression de gènes associés à l'invasion tumorale. Dans un premier temps nous avons pour cela utilisé des membranes de SuperArray et observé que l'inhibition des oncoprotéines E7 était associée à une augmentation d'expression de gènes de facteurs de transcription, de protéines d'adhérences et de protéines de la MEC (tableau 12). En revanche il n'y avait pas d'effets sur l'expression de protéases.

Gènes	Expression siE6/scrE6	Expression siE7/scrE7	Gènes	Expression siE6/scrE6	Expression siE7/scrE7
CD44	2,4	1,9	TUBA1B	1,3	1,5
CDKN1A	2,6	0,2	LAMB1	1,6	1,7
CLNS1A	1,1	1,6	NOTCH1	2,7	1,7
FN1	2,0	1,0	NOTCH2	1,1	0,2
FOSL1	1,0	-0,2	PHB	-3,5	-1,2
FZD2	1,2	0,6	PLK2	1,9	1,6
HDAC1	1,5	0,3	PPARD	2,1	0,0
IGFBP4	2,5	1,9	SNAI2	7,1	1,2
JUNB	2,6	0,5	THBS1	2,0	2,1
JUND	1,7	1,1	TNFRSF1A	3,0	2,2

 Tableau 12 Effets de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 sur un panel de gènes associés au cancer.

Nous avons donc voulu par RT-PCR et en zymographie vérifier les variations d'expression de MMP, d'inhibiteur de MMP et de gènes dont l'expression régule le phénotype invasif des cellules dont TGF-β et Cadhérine-E (figure 41).



Figure **41** Effets des siRNA sur l'expression des MMP, inhibiteurs de MMP et gènes associés à l'invasion tumorale dans les cellules CaSki. (A) Expression des gènes en RT-PCR (B) Analyse des gélatinases MMP2 et MMP9 en zymogramme.



Figure **42** Effets des siRNA sur l'expression des ARNm de la MT1-MMP dans les cellules CaSki. (A) siRNA E7 en mix ou individuellement. (B) siRNA E6 en mix ou individuellement (C) Effets sur les lignées SiHa et HBE4-E6/E7 (* p<0,05)

A partir de cellules traitées par les siRNA E7 et leurs témoins, la même étude a été réalisée à l'aide de puces Affymetrix[™] et nous a également permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de gènes associés à l'invasion tumorale et notamment MT1-MMP après traitement par les siRNA (tableau 13).

Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)
SERPINB4	3,25	SCNN1A	1,75	ACSL4	1,50	FZD6	1,25
CLCA2	3,25	GPR1	1,72	NFIB	1,47	CDKN1A	1,25
SERPINB3	3,17	DCP2	1,71	ADAM23	1,46	ROCK1	1,24
HSPG2	3,05	TRIAP1	1,70	JAG1	1,43	CDC42EP3	1,24
ITGB6	3,05	AKR1C3	1,70	THBS1	1,43	FAS	1,23
CCND1	2,92	SRD5A1	1,70	ITGB4	1,43	CTSB	1,23
MAP3K2	2,64	EIF4B	1,69	SERPINE1	1,43	TGFB2	1,22
CALD1	2,63	PPAP2B	1,69	MYLK	1,38	ITGB2	1,21
TNFSF10	2,43	CUL5	1,68	BLZF1	1,36	WNT7A	1,19
TGFBI	2,38	COL4A1	1,65	MT1X	1,35	COL4A6	1,17
ITGAV	2,33	COL7A1	1,62	TMEM41B	1,35	CD44	1,16
TLL2	2,25	LTBP2	1,61	ATXN1	1,34	ZNF14	1,16
TMBIM1	2,19	HS2ST1	1,60	PLA2G6	1,34	RIN2	1,16
BNIP3L	2,16	CREG1	1,60	ACTA2	1,34	TNFSF9	1,16
WNT5A	2,12	NOTCH1	1,60	DDB2	1,33	MCAM	1,14
TP53AP1	2,05	CASP1	1,59	AFAP1	1,33	ARHGAP4	1,13
FLG	2,04	TSPAN1	1,55	STK38L	1,32	MT1-MMP	1,13
TLL2	1,97	DLAT	1,55	PLD1	1,29	CARD8	1,11
RAB14	1,94	FAM115A	1,54	STMN1	1,29	NET1	1,10
TNFAIP2	1,92	F2R	1,54	MT1G	1,29	FRK	1,08
C3	1,88	ZMYM6	1,54	RRAS2	1,28	MYO1E	1,07
TM7SF2	1,85	MR1	1,54	ENOPH1	1,28	CASP1	1,07
ADAM10	1,84	IL6ST	1,53	RPS27L	1,28	MAP4K5	1,06
AKT3	1,83	EFEMP2	1,51	TUBB	1,27	PRKAR2A	1,04
TLR3	1,83	CXCL1	1,51	LAMB3	1,27	ID3	1,04
NXT2	1,83	RALB	1,50	CD59	1,26	PIK3C2A	1,04

Tableau **13** Gènes dont l'expression est affectée d'un facteur 2 au moins après transfection de siRNA E7. Données obtenues par puce Affymetrix[™].

La variation de l'expression de la MT1-MMP induite par les siRNA E7 a été confirmée par

RT-PCR et Western Blot et augmente de façon significative (figures 42 et 43).



Figure **43** Effets des siRNA sur les MT1-MMP en western Blot dans les cellules CaSki. (A) siE6 en mix ou individuellement (B) siE7 en mix ou individuellement (* p<0.05).

Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)	Gènes	Expression siE7/scrE7 (log2)
ARF4	1,04	E2F1	-1,10	STAC	-1,24	MYBL2	-1,63
PLAU	1,03	TFR2	-1,11	SMC4	-1,25	CYP24A1	-1,63
TMEM30A	1,03	SF3A1	-1,11	LHX2	-1,29	DUSP10	-1,64
EFHD1	1,03	COX4NB	-1,12	PLK1	-1,35	PIK3CD	-1,66
CYFIP1	1,03	GRB14	-1,13	SRPK2	-1,36	RCAN2	-1,66
ENO3	1,03	ITGB5	-1,13	AKAP12	-1,37	CDKN1C	-1,68
LAMB2	1,02	TREX2	-1,14	SNAPC1	-1,37	IL24	-1,68
DDX8	1,00	STYK1	-1,15	DYRK2	-1,37	DR1	-1,69
PPP1R15A	-1,01	H2AFY	-1,15	WAPAL	-1,38	ZBTB7A	-1,70
ZSCAN12	-1,03	RFC3	-1,17	CLDN4	-1,38	POLR3G	-1,70
GATA6	-1,03	E2F8	-1,17	STIP1	-1,39	ZBTB43	-1,71
RBM47	-1,04	EFNB1	-1,19	S100A13	-1,39	GPRC5B	-1,72
PPM1G	-1,05	EIF4EBP1	-1,19	UBE2J1	-1,39	MAP4	-1,74
CEP55	-1,06	CLTB	-1,20	FBXO21	-1,40	RC3H2	-1,98
NDC80	-1,06	RAB11FIP1	-1,20	ARHGDIA	-1,42	SCEL	-1,98
HDAC9	-1,06	RCAN3	-1,21	CDCA3	-1,42	TAF5	-1,98
TMEM186	-1,07	CCNA2	-1,21	ANKRD12	-1,42	TGFBR3	-2,09
NCOA3	-1,07	EIF5B	-1,21	EXO1	-1,42	KLHDC3	-2,17
RAB38	-1,07	AVEN	-1,22	CENPN	-1,47	GATAD2A	-2,18
UBE3B	-1,08	PCAF	-1,24	PTPN21	-1,54	ATP6V0E1	-2,22
GRK5	-1,08	CENPA	-1,24	AURKB	-1,56	PLP2	-2,34
PPP1CB	-1,08	PAK4	-1,24	MKI67	-1,57	IL1RN	-2,42
CAPNS1	-1,09	ELL3	-1,24	RAD51AP1	-1,59		
ENO2	-1,10	MCM10	-1,24	BRCA2	-1,59		

Tableau **13** (suite) Gènes dont l'expression est affectée d'un facteur 2 au moins après transfection de siRNA E7. Données obtenues par puce Affymetrix[™].

Une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de MMP2 a également été constatée en RT-PCR bien qu'il n'y ait pas d'effet sur la quantité de la protéine en zymogramme (figure 44). Le TGF- β est un facteur de croissance aux actions doubles. Il peut inhiber la croissance des cellules tumorales mais il peut également favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules résistantes à ces signaux anti-prolifératifs. C'est également un inhibiteur de l'expression des oncoprotéines virales dans la cellule nouvellement infectée ainsi que dans les cellules tumorales (**Baldwin et al.** 2004 ; **Donalisio et al.** 2008).



Figure 44 Effets des siRNA sur l'expression de la MMP2 dans les cellules CaSki.

Cependant ces effets sur les cellules et ses voies de signalisation sont aussi inhibés par les oncoprotéines E6/E7 (**Favre-Bonvin et al.** 2005 ; **Lee et al.** 2002).



Figure 45 Effets des siRNA sur l'expression de MT1-MMP dans les cellules CaSki en présence d'inhibiteur de TGF- β .

Nous avons alors voulu étudier les effets de l'inhibition du TGF- β , à l'aide d'un inhibiteur spécifique, après traitement par les siRNA. Les cellules traitées par siRNAE7 et inhibiteur présentent toujours une augmentation de l'expression de MT1-MMP mais non significative. Il n'y a pas en revanche pas de différence significative entre l'augmentation constatée avec ou sans inhibiteur (figure 45).

II.B.5. Effets de l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 sur les protéines d'adhérence

Un des aspects importants de l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules cancéreuses est la dégradation des complexes d'adhérence et la délocalisation des protéines de jonctions.



Figure 46 Effets des siRNA sur les complexes des protéines de jonction intercellulaires. (A) Analyse en immunohistochimie de la localisation des protéines des jonctions serrées occludine et ZO-1 et de l'expression des protéines des jonctions adhérentes cadhérine-E et caténine- β dans les cellules CaSki (B) Analyse des protéines des jonctions par Western Blot après transfection de siRNA.



Figure 47 Effets de la transfection par siRNA E7 sur la protéine de jonction serrée occludine. (A) Analyse de l'expression de l'occludine par immunohistochimie après traitement par différents siRNA E7 utilisés individuellement. (B) Effets des siRNA E7 en Western Blot. (* p<0,05)



Figure **48** Effets des siRNA sur la protéine de jonction serrée occludine. (A) Effets de la transfection des siRNA E6 en mix ou individuellement dans les cellules CaSki. (B) Effets de la transfection des siRNA E6 ou E7 en mix dans les cellules HBE4-E6/E7 (* p<0,05)

Nous avons étudié la localisation des protéines des jonctions serrées, Occludine/ZO1, et des jonctions adhérentes, cadhérine-E/caténine-β, après traitement par siRNA des cellules CaSki. Nous mettons en évidence par immunohistochimie (figures 46 et 47) une baisse d'expression de l'occludine après traitement par siRNA et particulièrement dans les cellules traitées par les siRNA E7. Les autres protéines des complexes jonctionnels ne sont pas affectées. L'étude des extraits protéiques montre que la quantité de la protéine occludine est diminuée de façon significative après traitement par siRNA par les mélange siE6 et siE7 mais également par des siRNA utilisés de manière individuelle (figure 48). Nous observons également une diminution dans les cellules HBE4-E6/E7 mais non significative.

Discussion

I Etude du rôle des papillomavirus dans les carcinomes de l'amygdale palatine.

Cette étude porte sur le rôle des HPV dans les carcinomes de l'amygdale (TC) dans une population française présentant un risque élevé de développer un cancer des voies aériennes et digestives supérieures (VADS). Dans notre étude, la prévalence observée des HPV (21%) était inférieure aux valeurs qui sont habituellement rapportées par la littérature. Ainsi une étude récente sur une population française mettait ainsi en évidence une prévalence de 62% des HPV dans les carcinomes de l'amygdale (Charfi et al. 2008). D'autre part les patients présentant un carcinome HPV positif sont le plus souvent non fumeurs et ne présentent pas de consommation régulière d'alcool à la différence des patients atteints d'un carcinome HPV négatif (Kuo et al. 2008). Ici seule une différence entre le statut HPV et la consommation de tabac a été mise en évidence. Notre population a été sélectionnée dans une zone géographique dans laquelle le taux de cancer de l'oropharynx est l'un des plus élevés au monde et la consommation de tabac et d'alcool très élevée (Franceschi et al. 2000 ; Remontet et al. 2003). Le poids important de ces deux facteurs de risque dans notre population pourrait expliquer la prévalence plus faible de carcinomes HPV positifs. Les carcinomes dont l'apparition est attribuable à une imprégnation alcoolo-tabagique sont souvent très différenciés et présentent une kératinisation importante. Nous trouvons ainsi une forte proportion de carcinomes moyennement à très différenciés à la fois dans les carcinomes HPV positifs et négatifs (Hafkamp et al. 2008 ; Wilczynski et al. 1998). Par conséquent nous ne retrouvons pas d'association entre la présence d'HPV au sein des carcinomes et le grade histologique des lésions. Nous n'avons notamment pas observé de carcinomes épidermoïdes basaloïdes associés aux infections HPV comme il est classiquement rapporté dans la littérature (Gillison **et al.** 2000 ; **Wilczynski et al.** 1998). Il est possible que la kératinisation des lésions induites par le tabac empêchent l'accès du virus aux cellules basales et protège ainsi de l'infection mais des études supplémentaires seraient nécessaires pour le prouver (**Hafkamp et al.** 2008).

L'HPV 16 est le type prédominant dans les carcinomes de l'amygdale infectés par HPV comme c'est habituellement le cas pour les cancers de cette localisation (Gillison et al. 2000 ; Herrero et al. 2003). La charge virale de l'HPV16 était relativement variable avec des valeurs proches de celles rapportés dans des travaux précédents effectués sur des tissus en paraffine (Klussmann et al. 2001 ; Weinberger et al. 2006) ou congelés (Badaracco et al. 2007 ; Koskinen et al. 2003 ; Mellin et al. 2002 ; Smeets et al. 2007). Cependant la détermination de la charge virale repose fortement sur les conditions d'expérimentation et notamment la conservation des tissus, l'hétérogénéité des échantillons ou encore les méthodes de calcul employées; de ce fait les comparaisons entre études sont difficiles et les protocoles nécessiteraient d'être standardisés pour être véritablement comparables. De façon intéressante Mellin et al. ont montré que les patients présentant une charge virale plus élevée avaient également un plus long taux de survie globale (Mellin et al. 2002), le nombre limité de cas étudiés ne permet de pas de tirer de conclusions quant à la valeur pronostique de ce paramètre. L'intégration du génome de l'HPV au génome de la cellule hôte indique l'implication du virus dans la carcinogenèse du cancer du col de l'utérus, c'est un événement également potentiellement important dans le développement du cancer de l'oropharynx associé aux HPV (Zur Hausen 2002). Nous avons détecté des formes intégrés dans tous les cas analysés contenant de l'ADN d'HPV16, dont un ne présentant que des formes intégrées. Un pourcentage élevé d'intégration a également été constaté dans d'autres études récentes, cette intégration fréquente suggère qu'il s'agit, comme dans le cancer du col de l'utérus, d'un événement important dans le développement des carcinomes de l'amygdale (Badaracco et al. 2007 ; Hafkamp et al. 2008 ; Kim et al. 2007 ; Kuo et al. 2008).

Peu d'études ont été menées sur la présence de variants d'HPV16 E6 au sein des carcinomes de l'amygdale HPV positifs. Gillison et al. ont retrouvé 33 cas de variants parmi 52 carcinomes HPV16 positifs, l'équipe de Boscolo-Rizzo et al. a elle mis en évidence la présence de 5 variants parmi les 8 cas de leur étude (Boscolo-Rizzo et al. 2009 ; Gillison et al. 2000). De même que dans ces précédents travaux, nous mettons en évidence un nombre important de variants de E6 dans les 7 cas analysés, en particulier le polymorphisme L83V est fréquemment retrouvé seul ou accompagné par d'autres polymorphismes. Il y a de plus en plus d'arguments cliniques qui indiquent que la présence de variant de E6 affecte la persistance du virus et sa pathogénicité dans le cancer du col de l'utérus. Le variant L83V notamment est associé à un risque accru de progression de cancer cervical dans certaines populations (Zehbe et al. 2009). L'impact biochimique et biologique des variants restent encore mal connu bien que plusieurs travaux réalisés in vitro ont mis en évidence des différences de dégradation des protéines cibles de E6 entre les variants et les formes prototypes. Certains variants présentent des capacités altérées de dégradation de p53 ou Bax et affectent la différentiation des kératinocytes et leurs réactions face à l'apoptose (Asadurian et al. 2007 ; Chakrabarti et al. 2004 ; Lichtig et al. 2006). Il serait donc nécessaire d'étudier l'impact des variants sur le pronostic des cancers dans de plus grandes séries de cas et en particulier l'impact du variant L83V dans les carcinomes de l'amygdale.

Nous avons utilisé plusieurs marqueurs biologiques (Ki67, p53, p16) afin de déterminer s'ils étaient associés à l'infection aux HPV. Dans une précédente étude, Rittà et al. ont mis en évidence une association des HPV avec une expression réduite de Ki67 dans les carcinomes oropharyngés et de la cavité orale (**Rittà et al.** 2009). Cependant nous ne retrouvons pas cette association, l'association entre les HPV et Ki67 n'a pas non plus été observée dans une précédente étude de Charfi et al (**Charfi et al.** 2008). Notre population est majoritairement composée de fumeurs réguliers, les composants du tabac étant carcinogènes il n'est pas surprenant de retrouver une surexpression de Ki67 dans les tumeurs infectées ou non par HPV. Le marqueur moléculaire Ki67 n'est donc pas un marqueur permettant de distinguer les TC HPV positifs.

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre le signal p53 et le statut HPV des tumeurs. En effet 66,7% des tumeurs infectées par HPV étaient également p53 positive, un pourcentage plus élevé que celui qui est habituellement rapporté dans littérature (**Charfi et al.** 2008 ; **Dahlstrand & Dalianis** 2005 ; **Hafkamp et al.** 2008 ; **Smith et al.** 2008b). Compte tenu de la capacité de l'oncoprotéine E6 à dégrader p53, cette observation est surprenante. Une hypothèse serait que la présence de certains variants incapables de dégrader p53 explique une partie des cas dans lesquels est retrouvé un signal p53 malgré la présence d'HPV. L'oncoprotéine E7 induit en effet la stabilisation de p53 en l'absence de l'oncoprotéine E6 (**McLaughlin-Drubin & Münger** 2009). Cependant si l'on prend en compte les caractéristiques de notre population qui présente une forte consommation d'alcool et de tabac, il est possible que le signal de p53 détecté en immunohistochimie soit dû à des mutations de p53 et à sa stabilisation de la protéine induite par le tabac (**Bode & Dong** 2004). Compte tenu de nos résultats, nous ne pouvons exclure le fait que la surexpression de p53 associée à la présence des HPV représente une autre voie de tumorigenèse induite par HPV, voie par laquelle l'alcool, le tabac et les HPV agiraient en synergie pour compléter leurs actions.

L'expression de p16 était significativement associée à la présence d'HPV. Cette association a été largement rapportée dans littérature. La stabilisation de p16 étant la conséquence directe de l'expression de l'oncoprotéine E7, les cas présentant une surexpression traduisent la présence d'une infection active par HPV (**Klaes et al.** 2001 ; **Münger & Howley** 2002). Les cancers étant à la fois HPV 16 négatif et p16 positif constituaient la majorité des cas étudiés et peuvent être la conséquence de la forte consommation d'alcool et de tabac des patients.

Cependant nous avons également retrouvé 5 cas de tumeurs positives aux HPV mais ne présentant pas de surexpression de p16, deux d'entre eux étant associés à HPV16. De façon intéressante ces cas présentaient également une faible charge virale et une surexpression de p53 ce qui peut suggérer que l'ADN du virus était simplement présent dans ces tumeurs sans jouer de rôle actif dans les processus de la carcinogenèse. Il a été récemment proposé que la détection de p16 puisse servir pour trier les carcinomes de l'oropharynx, notamment les carcinomes basaloïdes, pour distinguer les cas infectés par HPV (**Smeets et al.** 2007). Cependant comme l'expression de p16 et la présence d'HPV peuvent diverger dans une partie non négligeable de cas, ces deux marqueurs devraient être évalués de pair et non séparément pour prédire le diagnostic et orienter le traitement (**Smith et al.** 2008a ; **Weinberger et al.** 2006).

Dans notre étude nous mettons en évidence une légère association bien que non significative entre la présence d'HPV et une meilleure survie globale après traitement (p=0,09). De nombreuses études ont mis en évidence cet effet paradoxal de l'association entre la présence d'HPV et un meilleur pronostic (**Dahlstrand & Dalianis** 2005 ; **Charfi et al.** 2008 ; **Kuo et al.** 2008 ; **Smith et al.** 2008a ; **Smith et al.** 2008b). La présence d'ADN d'HPV est habituellement utilisée pour détecter une infection à HPV, cependant des faux positifs, ou plutôt des tumeurs infectées par des HPV dans lesquelles le virus n'est pas actif sont détectées parmi les autres tumeurs HPV positives. C'est pourquoi un meilleur moyen d'identifier l'influence des HPV et ainsi définir de façon plus efficace le sous-groupe de patients meilleurs répondeurs à des traitements spécifiques est nécessaire. Les caractéristiques virales comme la charge virale ou l'intégration évoluent parallèlement au grade de la lésion dans le cancer du col de l'utérus et pourraient être également de bons indicateurs pour déterminer la "force" de l'infection à HPV dans les carcinomes de l'amygdale (**Saunier et al.** 2008). Mellin et al. ont rapporté précédemment que les patients présentant une charge virale plus élevée possédaient

une meilleure survie globale après traitement alors que Kuo et al ont montré que les tumeurs dans lesquelles l'ADN d'HPV était intégré étaient de meilleur pronostic (Mellin et al. 2002 ; Kuo et al. 2008). Cependant les variations entre les techniques utilisées et leurs limitations rendent difficile toute conclusion basée sur l'utilisation des caractéristiques virales de l'infection. Les marqueurs moléculaires cellulaires ont également été très utilisés pour définir des catégories de tumeurs pour les relier à une évolution clinique, marqueurs utilisés avec ou sans la détection d'HPV. L'important est que certains marqueurs, comme p16, sont des moyens indirects de mettre en évidence une infection dans laquelle le virus est actif (Münger & Howley 2002). Récemment Smith et al. ont montré que le groupe de patients qui présentait à la fois une infection à HPV16 et un marquage p16 positif avait la meilleure survie globale (Smith et al. 2008a). D'autres études utilisant des cibles différentes de E7 comme pRB, p21 ou la cycline D1, ont également mis en évidence une meilleure survie globale dans le groupe de patients infectés par HPV et pour lesquels l'expression de ces marqueurs est en accord avec un rôle actif de l'oncoprotéine E7 (Hafkamp et al. 2009). Un autre marqueur qui semble évident serait p53 puisqu'il est dégradé par E6 par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase E6AP (Beaudenon & Huibregtse 2008). Encore une fois l'équipe de Smith a montré que les patients infectés par HPV sans surexpression de p53 avaient un meilleur pronostic après traitement et présentaient moins de risque de récurrence (Smith et al. 2008b). Cependant la présence d'HPV mise en évidence par la détection de son ADN n'est pas associée à l'expression en immunohistochimie de p53 dans cette étude comme dans d'autres travaux (Hafkamp et al. 2003 ; Snijders et al. 1994). L'anticorps utilisé ne peut théoriquement mettre en évidence p53 que dans le cas où elle est mutée et stabilisée mais la présence de marquage p53 ne reflète pas forcément la présence de mutations de p53 et vice-versa. D'autres part une surexpression de p53 n'est peut être pas incompatible avec une infection active à HPV (Sekaric et al. 2008). Certaines études ont suggéré que E6 pouvait avoir un rôle mineur dans le développement des cancers des VADS (**Strati & Lambert** 2007 ; **Sdek et al.** 2006). Comme déjà décrit précédemment, E6 et E7 sont encodés à partir d'un ARN bicistronique qui peut être épissé alternativement dans la région de E6. E7 est préférentiellement traduit quand l'épissage intervient et la protéine E6*I qui en résulte est incapable de dégrader p53 (**Pim et al.** 1997). Certains variants de E6 pourraient avoir une capacité altérée à dégrader p53 comme mis en évidence *in vitro* et sans que cela ne remettent en cause leur capacité à protéger les cellules de l'apoptose (**Asadurian et al.** 2007 ; **Stöppler et al.** 1996b). D'autre part l'équipe de De La Cruz-Hernandez a mis en évidence un épissage modifié dans le cas de variants d'HPV18 avec une transcription accrue de formes E6*I (**De la Cruz-Hernández et al.** 2005). L'ensemble de ces observations indique que la détection de l'ADN d'HPV doit être associée à l'étude des marqueurs moléculaires ciblés par E7 pour déterminer la réelle implication des HPV dans la progression tumorale.

L'effet bénéfique de la présence d'HPV sur la survie globale après traitement dans les carcinomes de l'amygdale n'est pas entièrement compris. Une meilleure réponse au traitement pourrait être attribuée à une réponse immunitaire accrue du fait de la présence du virus, ou à une réduction du nombre des champs de cancérisation (**Dahlstrand & Dalianis** 2005 ; **Braakhuis et al.** 2003). Il a également été mis en évidence que les tumeurs HPV positives étaient radiosensibles (**Lindel et al.** 2001). Comme p53 constitue l'élément clef dans la réponse à la radiothérapie, il a été proposé que dans les cellules infectées p53 pourrait conserver une partie de son activité n'étant dégradée que partiellement et ainsi expliquer la radiosensibilité des cellules tumorales infectées par HPV (**Obata et al.** 2000). Cette théorie n'a cependant pas encore était clairement confirmée par des observations cliniques. Une meilleure compréhension des conséquences de l'infection par HPV nécessiterait l'étude conjointe de la transcription des HPV, de la présence de variants de E6 et de la recherche de

marquages p16 et p53 ainsi que d'éventuelles mutations pour en déterminer l'impact sur le pronostic des patients après traitements.

II Effets des oncoprotéines E6/E7 d'HPV16 sur le phénotype invasif des lignées tumorales

Dans la suite de notre travail nous nous sommes intéressés aux effets de l'expression des oncoprotéines dans des lignées tumorales. La progression vers un cancer invasif du col est rare et n'a lieu qu'après une latence d'environ 5 à 10 ans après l'infection (**Chang** 1990). Il est donc probable qu'une ou plusieurs modifications des cellules immortalisées par les oncoprotéines virales sont nécessaires pour permettre l'acquisition d'un phénotype invasif et que ces modifications sont dépendantes des effets oncogéniques du virus. Une des caractéristiques des lésions persistantes aux HPV est l'intégration du génome virale au sein de la cellule infectée ce qui aurait pour conséquence d'entraîner une surexpression des oncoprotéines E6/E7 du fait de la perte d'inhibition de E2 exercée sur leur transcription (**Chow & Broker** 2007). Notre hypothèse est donc que la surexpression des protéines virales virales des participerait à l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules tumorales.

En modulant l'expression des oncoprotéines E6/E7, soit par surexpression soit par inhibition, nous avons mesuré les effets sur la capacité invasive de différentes lignées tumorales en chambre de Boyden. Nos résultats montrent que la surexpression des oncoprotéines E6/E7 dans la lignée BZR et dans la lignée CaSki a pour effet d'augmenter le potentiel invasif des cellules dans des tests en chambre de Boyden. De précédents travaux ont mis en évidence une augmentation de la capacité invasive de cellules transfectées par les oncoprotéines E6/E7 et par l'oncogène Ras (**Yoshida et al.** 2008 ; **Spanos et al.** 2008b). Une des hypothèses proposées pour expliquer la latence entre l'apparition d'un carcinome invasif et l'infection aux

HPV, serait l'activation nécessaire d'une autre voie oncogénique venant agir en synergie ou en complément des oncoprotéines virales E6/E7 (Alonio et al. 2003 ; Perez-Plasencia et al. 2008 ; Córdova-Alarcón et al. 2005). Les cellules BZR possèdent notamment un oncogène Ras activé mais ce n'est pas le cas des cellules CaSki dans lesquelles la présence du variant E6 L83V agirait même comme antagoniste de la voie Ras (Chakrabarti et al. 2004). Il est également intéressant de noter qu'il a été récemment mis en évidence que la présence d'une pRb non mutée dans les cancers colorectaux était due à l'effet inhibiteur de E2F1 dans ces cancers sur la voie Wnt (Morris et al. 2008). Nos résultats mettent donc en évidence que si une coopération des oncoprotéines E6/E7 avec un autre oncogène est possible, ce n'est pas la seule explication envisageable d'un effet des oncoprotéines E6/E7 sur l'acquisition d'un phénotype invasif. Par ailleurs nous n'avons pas observé d'augmentation de la capacité invasive des cellules MCF-7 et 16HBE après transfection des oncoprotéines E6/E7, aucune cellule n'ayant traversé les membranes de Boyden après 26 H d'expérience que ce soit pour les conditions traitées ou témoins. La lignée MCF7 est une lignée épithéliale du sein, or les cancers du sein ne sont pas reconnus comme étant associés aux HPV bien que certaines études récentes aient évoqué certaines possibilités d'infection (Amarante & Watanabe 2009 ; Lawson et al. 2009 ; Heng et al. 2009). Des travaux réalisés sur ces mêmes cellules ont montré que une transfection des oncoprotéines E6/E7 de façon conjointe entraînait une augmentation de leur capacité invasive en relation avec l'augmentation de l'expression du gène de la famille HLH (Helix Loop Helix) ID1 (Inhibitor of DNA binding), un inhibiteur de transcription dont l'expression est modifiée dans de nombreux cancers (Yasmeen et al. 2007). Dans le cas de ces cellules MCF7 qui possèdent des protéines p53 et pRb non mutées, nous pouvons émettre l'hypothèse que les oncoprotéines E6/E7 aient dégradé en priorité ces cibles sans exercer d'action sur d'autres protéines. Il est également possible que seule l'action en synergie des oncoprotéines puisse être capable d'avoir un effet significatif sur la capacité invasive des cellules ou plus simplement que les MCF7 possèdent un phénotype qui n'est pas suffisamment transformé pour permettre d'accroître leur capacité invasive par une simple surexpression de E6 ou E7. Cette dernière explication pourrait également s'appliquer aux cellules 16HBE qui possède un phénotype très différencié.

L'inhibition des oncoprotéines E6/E7 par ajout de siRNA E7 dans les cellules CaSki met en évidence une baisse significative de la capacité invasive des cellules à 48 heures après transfection. L'inhibition des oncoprotéines E6 par notre mélange de siRNA n'entraîne cependant pas d'effets sur le potentiel invasif des cellules. Bien que nos siRNA soient désignés comme siE6 et siE7, la nature polycistronique de l'ARNm exprimant les oncoprotéines empêche dans ce modèle une inhibition véritablement spécifique. De précédents travaux ont néanmoins mis en évidence que la traduction de l'oncoprotéine E7 était préférentiellement réalisée à partir de formes épissées de l'ARNm (Tang et al. 2006b). Il est possible de réaliser une certaine spécificité d'inhibition de E6 en ciblant une séquence épissée. Il n'est donc pas possible de savoir si l'effet observé sur la capacité invasive des cellules est spécifique de E7 ou dû à la baisse d'expression simultanée des oncoprotéines. D'autre part l'expression des oncoprotéines virales est nécessaire à la réplication des cellules infectées et à leur survie (Jabbar et al. 2009 ; DeFilippis et al. 2003 ; Lea et al. 2007 ; Rampias et al. 2009 ; Psyrri et al. 2004), leur inhibition entraînant la mort cellulaire ou la sénescence. Nous avons recherché les effets éventuels sur l'apoptose et n'avons pas observé d'effets du traitement à 48 heures après transfection ni d'effets sur la prolifération après plusieurs jours de culture. La baisse de capacité invasive observée n'est donc pas liée à l'augmentation de la mort cellulaire.

Nous observons donc que l'expression des oncoprotéines virales est corrélée à la capacité invasive des cellules. Les processus qui sont à l'origine de l'invasion tumorale sont largement

dépendants de l'expression de protéases et en particulier de métalloprotéinases matricielles capables de dégrader la matrice extracellulaire qui entoure les cellules, afin de permettre à celles-ci d'envahir le tissu conjonctif sous-jacent (**Noël et al.** 2008). Parmi les MMP, la MT1-MMP joue un rôle un rôle particulièrement important dans l'invasion tumorale (**Barbolina & Stack** 2008). En effet cette protéase est présente à la membrane des cellules cancéreuses et permet une protéolyse péricellulaire. En particulier elle est retrouvée au niveau des invaginations qui permettent aux cellules cancéreuses de progresser dans le tissu conjonctif, les invadopodes (**Poincloux et al.** 2009). D'autre part de précédentes études ont mis en évidence une association des cancers liés aux HPV et notamment des cancers du col de l'utérus avec l'expression de MT1-MMP (**da Silva Cardeal et al.** 2006 ; **Libra et al.** 2009 ; **Zhai et al.** 2005 ; **Gilles et al.** 1996). La MT1-MMP est également capable d'activer la MMP2 à la membrane en présence de TIMP2 (**Strongin et al.** 1993), nous avons donc étudié l'expression de ces différentes MMP dans nos différents systèmes de lignées cellulaires.

Nous ne mettons pas en évidence d'effets des oncoprotéines E6/E7 sur l'expression des MT1-MMP et MMP2 aussi bien sur les lignées MCF7 et A549 possédant des protéines p53 et pRb sauvages, que sur les lignées 16HBE et BZR infectées par SV40 ou encore les lignées CaSki et SiHa HPV16 positives. Pourtant de précédents travaux ont observé une corrélation entre l'expression des oncoprotéines et celle de MMP. Ainsi une étude réalisée sur des cellules HaCat, dans lesquelles la protéine p53 est mutée mais qui conservent un phénotype proche de cellules primaires, a montré que la transfection de l'oncoprotéine E7 entraînait une augmentation de la MT1-MMP ainsi que l'activation de la MMP2, cette étude obtenait les mêmes résultats en transfectant des kératinocytes primaires (**Smola-Hess et al.** 2005). L'équipe de Yoshida et al. a également mis en évidence une augmentation des MT1-MMP et MMP9 dans des cellules transfectées par les oncoprotéines E6/E7 et par Ras (**Yoshida et al.** 2008). Les lignées A549 et BZR possèdent également un oncogène Ras activé. L'absence

d'effets sur l'expression des MMP dans nos expériences pourrait être due à un état de transformation trop avancé des cellules, les cellules BZR en particulier étant déjà très invasives à l'état basal. Les cellules 16HBE et A549 sont également infectées par SV40 dont la protéine antigène grand T a les mêmes actions que les oncoprotéines E6/E7 sur p53 et pRb (**Pipas** 2009). L'hyperexpression des oncoprotéines E6/E7 dans ces cellules permettait donc d'étudier leurs effets lorsque leurs cibles principales sont dégradées par Tag mais nous n'avons pas observé là non plus d'effets sur l'expression des MT1-MMP et MMP2.

Les MMP ne sont pas les seules protéines capables de dégrader la matrice extracellulaire et d'autres mécanismes peuvent expliquer les variations de capacité invasive observées dans nos expériences. Ainsi de précédentes études également réalisées sur des cellules A549 transfectées par les oncoprotéines n'ont pas mis en évidence d'augmentation d'expression de gènes de MMP mais ont observé une augmentation d'IL6 (Cheng et al. 2008), de l'expression des gènes et des protéines CDK5, de Bak et Itraf (Yim et al. 2004) ansi que de l'expression d'Hsp27, d'annexine III, d'annexine IV, de gp96 et TPT1 (Ciotti et al. 2009), plusieurs de ces gènes avant des actions dans la tumorigenèse. Cette dernière étude met en évidence un rôle des oncoprotéines E6/E7 surtout dans des réseaux impliquant la prolifération et la mort cellulaire. L'équipe de Watson et al. a montré que la transfection d'oncoprotéines E6 dans des kératinocytes immortalisés par SV40 était associée à une délocalisation de la cadhérine-E et à une baisse des jonctions adhérentes et des desmosomes (Watson et al. 2003). Ces effets étaient accompagnés de l'apparition de vimentine, marqueur associé à l'EMT, et étaient dépendants du motif de liaison aux protéines PDZ contenu dans la séquence de E6. De façon semblable Hellner et al. ont mis en évidence que la transfection de E7 dans des kératinocytes primaires était associée à des changements moléculaire en relation avec la transition épithélio-mésenchymateuse (Hellner et al. 2009b). En effet en plus d'observer une réduction de la cadhérine-E, ils observent l'apparition de vimentine ainsi que d'autres marqueurs

associés à l'EMT comme la fibronectine ou encore des inhibiteurs de la transcription de la cadhérine-E Twist et Snail (Hellner et al. 2009a). L'équipe de Spanos et al. a quant à elle, mis en évidence dans des cellules épithéliales primaires de l'amygdale que la dégradation par E6 de PTPN13, une protéine tyrosine phosphatase, agissait en synergie avec Ras pour augmenter la capacité invasive de tumeurs in vivo (Spanos et al. 2008b). Nous avons recherché les variations d'expression d'un nombre plus important de gènes dans les cellules CaSki transfectées par les oncoprotéines E6/E7. L'utilisation de membrane de SuperArray™ regroupant des sondes correspondant à des gènes impliqués dans l'invasion tumorale montre que plusieurs d'entre eux sont augmentés de façon modérée suite à la transfection des oncoprotéines E6/E7 et notamment des gènes d'intégrines et des constituants de la matrice extracellulaire. L'utilisation de puces Affymetrix[™] pour comparer les profils d'expression entre des cellules traitées avec les oncoprotéines E6 par rapport à des cellules témoins met en évidence une augmentation de 37 gènes et une diminution de 24 autres gènes. De façon intéressante nous observons que la transfection des oncoprotéines virales induit notamment la baisse d'expression de ERAP1 (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1), une protéine appartenant à la machinerie de présentation des antigènes et dont la diminution est associée à un mauvais pronostic dans les cancers du col de l'utérus (Mehta et al. 2009). Nous constatons également une baisse d'expression d'AGT (Angiotensinogen), un précurseur de l'angiotensine II. Ce résultat est surprenant car il a été mis en évidence que la transcription de l'AGT était dépendant notamment de l'interleukine 6 et d'HIF-1a (Hypoxia-Inducible Factor 1α) tous deux ayant été identifiés comme augmentés par l'expression de E6 (Cheng et al. 2008 ; Tang et al. 2007). De précédents travaux utilisant l'hyperexpression de E6 dans des lignées HPV-18 ont mis en évidence une augmentation du VEGF suite à l'augmentation d'HIF-1a (Tang et al. 2007 ; Clere et al. 2007). Nous remarquons également une baisse de l'expression de CPEB1 (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1) une protéine se liant aux ARNm et participant à leur polyadénylation et dont la diminution est associée aux cancers cervicaux HPV positifs (Hansen et al. 2009). Nous constatons de plus une diminution de l'expression de PPARD (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta) un facteur de transcription et récepteur hormonal dont l'expression est associée à la synthèse de protéines de la MEC (Kim et al. 2009) et qui est un inhibiteur de PPARy luimême associé à de nombreux cancers (Ikezoe et al. 2001). Nous mettons également en évidence une baisse de l'expression du COL4A6 (collagène, type IV, alpha 6) protéine de la MEC dont la diminution est associée à une augmentation de l'invasion dans les cancers colorectaux (Skovbjerg et al. 2009). D'autre part la transfection de l'oncoprotéine E6 est associée à une augmentation de l'expression de KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) qui pourrait agir en synergie avec l'oncoprotéine E6 comme décrit précédemment. D'autres facteurs de transcription sont également augmentés dont NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3), REL (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog), un constituant du complexe de transcription NFkB, ANKRD12 (Ankyrin repeat domain 12) cofacteur de transcription et NFIC (Nuclear Factor I/C) ce dernier étant également impliqué dans la régulation des oncoprotéines virales (Bernard 2002). Nous mettons en évidence une augmentation de PDPK1 (3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1) une protéine kinase dont l'activité est augmentée dans les cancers du sein (Lin et al. 2005) et dont l'expression est associée à la migration des cellules endothéliales (Primo et al. 2007). Nous observons également une augmentation de l'expression de ENOX2 (Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2) une protéine de surface liée à la croissance cellulaire et dont l'inhibition entraîne une baisse de prolifération et de migration des cellules HeLa (Liu et al. 2008) et de TACSTD2 (Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2) un marqueur de cellules cancéreuses et un oncogène dont l'expression est augmentée dans plusieurs cancers dont ceux de l'oropharynx (Fong et al. 2008). L'expression de ACVR1B (Activin A Receptor, type IB) un récepteur des facteurs de croissance de la superfamille TGF-ß et de SMC3 (structural maintenance of chromosomes 3) est également augmentée, ce dernier gène codant une protéine cible de la voie caténine-ß et étant augmenté dans les cancers du colon (Ghiselli et al. 2003). La transfection de E6 entraîne l'augmentation de l'expression de PGGT1B (Protein GeranylGeranylTransferase Type I, Beta subunit) une enzyme ayant un rôle clef dans l'invasion tumorale par le transfert de groupements geranylgeranyl à la protéine RhoA (Kusama et al. 2003). Enfin nous constatons l'augmentation de l'expression de protéines d'adhérence dont ITGB5 (Integrin Beta5) qui peut jouer un rôle dans l'invasion en association avec la sous-unité alphaV (Vocca et al. 2009), THBS1 (Thrombospondin 1) qui joue un rôle dans l'invasion tumorale (Sid et al. 2008) et TSPAN2 (Tetraspanin) une protéine transmembranaire. Bien que les résultats obtenus par puces AffymetrixTM nécessiteraient d'être confirmés par PCR en temps réel, l'ensemble de ces données montre que si la transfection de l'oncoprotéine E6 n'est pas associée à une augmentation de protéases elle est néanmoins associée à une augmentation d'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale et suggère donc un rôle de l'oncoprotéine dans l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules tumorales CaSki.

A l'opposé nous avons étudié les effets de l'inhibition des siRNA E6/E7 dans des lignées HPV16 positives. De façon surprenante nous mettons en évidence une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la MT1-MMP comme de la protéine après transfection par siRNA au lieu de la baisse attendue. Nous avons étudié la localisation et l'expression des protéines des jonctions serrées et adhérentes après traitement par siRNA. En effet l'autre phénomène important ayant lieu au moment de l'invasion tumorale est la perte d'adhérence intercellulaire. Nous n'observons pas de différence sur l'expression des protéines des jonctions net nous observons une diminution de l'expression de l'occludine. La baisse de l'occludine, comme l'augmentation de la MT1-MMP suggère une

216
capacité invasive accrue à la différence de ce qui était attendu. Il est possible que l'augmentation de l'expression de MT1-MMP soit une conséquence d'une voie de signalisation induite par TGF- β (Kuo et al. 2009), en effet les siRNA E7 pourraient lever l'inhibition exercée par les oncoprotéines E6/E7 sur la signalisation du TGF-B (Blobe et al. 2001). Nous montrons effectivement que le traitement par inhibiteur de TGF-B réduit l'augmentation de MT1-MMP, le récepteur I du TGF-ß est lié à l'occludine et la diminution de l'occludine pourrait être la conséquence de la déstabilisation des jonctions serrées par le TGF-β (Barrios-Rodiles et al. 2005). D'autre part en plus des effets observés sur l'expression de la cadhérine-E après transfection des oncoprotéines, une précédente étude a mis en évidence une augmentation de la cadhérine-E après traitement par siRNAE7 (Caberg et al. 2008). Nos résultats ne concordant pas avec la littérature, nous avons recherché les gènes dont l'expression était modifiée après inhibition des oncoprotéines par les siRNA et isolé ceux qui pouvaient avoir un rôle dans l'invasion tumorale au moyen de techniques à plus haut débit. L'utilisation d'une membrane de SuperArray regroupant environ 400 sondes ciblant des gènes impliqués dans le cancer met en évidence des augmentations modérées de marqueurs d'invasion tumorale et d'EMT après traitement par siRNA. Nous constatons effectivement une augmentation de FN1 (fibronectine1), de CD44 ainsi que de SNAI2 (slug) un inhibiteur de la cadhérine-E. Nous observons également l'augmentation de gènes composant le facteur AP1 dont JunB, JunD, FOSL1. L'augmentation de l'expression de FOSL1 est associée à une plus grande mobilité et une invasion accrue des cellules épithéliales cancéreuses du poumon (Adiseshaiah et al. 2008). L'étude a également été réalisée par puces Affymetrix[™] à partir de cellules traitées par les siRNA E7. Nous observons des variations d'expression de gènes associés aux effets de l'oncoprotéine E7 dont la cycline A2, D1, p21 E2F1, Wapal (Oikawa et al. 2008), ainsi que des gènes inversement régulés par l'expression transitoire de E6 dans les cellules CaSki dont NCOA3, intégrine béta 5, collagène de type IV alpha 6. D'autre part nous mettons en évidence, comme précédemment rapporté par l'équipe de Tessier et al, une expression modifiée de nombreux gènes cibles de p63 dont ADAM10, ARHGDIA (Rho GDP dissociation inhibitor GDI alpha), CD44, CLDN4 (claudine 4), COL4A6 (collagène de type IV alpha 6), COL7A1 (collagène de type VII alpha 1), HSPG2 (Heparan Sulfate Proteoglycan 2), ITGB2 (Integrine, beta 2), ITGB4 (Integrine, beta 4), ITGB6 (Integrine, beta 6), LAMB2 (laminine beta 2), LAMB3 (laminine beta 3), MCAM (Melanoma Cell Adhesion molecule), MT1-MMP, NFIB (Nuclear Factor I/B), Serpine E1/PAI-1, TGFBI (Transforming Growth factor, beta-induced), THSB1 (Thrombospondin 1). L'augmentation de l'expression de gènes cibles de p63 est attribuée à l'activation de la transcription de ce dernier par p53 (Teissier et al. 2007). Il a été mis en évidence que l'expression de p63 et de ses gènes cibles active un programme favorisant l'adhérence intercellulaire et l'adhérence à la matrice par l'expression de protéines de la MEC et de protéines transmembranaires (Carroll et al. 2006). Cependant son expression est également associée à celle de gènes associés à l'invasion tumorale comme MT1-MMP, ADAM10, serpine E1 et THS1 (Gu et al. 2008). De même nous observons des variations d'expression de gènes ayant été rapportés comme étant pro-invasifs dans certains cancers en particulier des gènes codant des protéines de signalisation dont TGFB2 (Transforming Growth Factor, Beta 2), RRAS2 (related RAS viral oncogene homolog 2), JAG1 (Jagged 1), WNT5A (Wingless-type MMTV integration site family, member 5A) (Erdogan et al. 2007 ; Leong et al. 2007 ; Ishihara et al. 2008 ; Medrek et al. 2009). L'inhibition des oncoprotéines par les siRNAE7 a également pour conséquence d'entraîner la modulation de l'expression gènes inhibiteurs de l'invasion ou de gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi nous observons des augmentations d'expression de gènes codant des protéines de signalisation dont ID3 (Inhibitor of DNA Binding 3), WNT7A (Wingless-type MMTV Integration site family, member 7A), FZD6 (Frizzled Homolog 6) (Golan et al. 2004 ; Higgins et al. 2009 ; Winn et al. 2005). Les variations de l'expression des gènes observées en puce Affymetrix[™], en plus d'être vérifiées en PCR temps réel, devraient être interprétées dans des études fonctionnelles pour en déterminer la balance des effets sur l'invasion tumorale. Il ressort néanmoins de ces techniques à grande échelles comme de nos expériences en Boyden et Western Blotting que des effets anti-invasifs et pro-invasifs sont induits suite à l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 d'HPV16.

En se replacant dans le contexte d'une infection persistante il est peut-être possible de réunir ces deux orientations contradictoires. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour le mettre en évidence, il est probable que l'oncoprotéine E7 exerce un pouvoir pro-invasif sur les cellules tumorales et que sa surexpression soit associée à l'acquisition d'un phénotype invasif des cellules infectées. Il a en effet été mis en évidence que l'inhibition de pRb par siRNA était associée à une augmentation du pouvoir invasif des cellules (Arima et al. 2008). Plusieurs travaux ont lié la protéine E7 à des phénomènes associés à l'invasion tumorale et notamment une diminution de la cadhérine-E quand E7 est surexprimée (Hellner et al. 2009a ; Smola-Hess et al. 2005). Il est possible que cet effet ne soit pas dépendant de E7 mais de sa conséquence indirecte sur l'augmentation et la stabilisation de p53 (McLaughlin-Drubin & Munger 2009). Ainsi dans leur étude Hellner et al. mettent en évidence en puce Affymetrix[™] que la transfection de l'oncoprotéine E6 a des effets opposés à la transfection de E7 sur l'expression de plusieurs gènes, E6 induisant la dégradation de p53 dans les cellules transfectées et E7 son augmentation. D'autre part si p63 favorise l'expression de nombreuses protéines d'adhérence et protéines de la matrice, il augmente également des protéases liées à l'invasion tumorale (Gu et al. 2008). De plus la migration est aussi dépendante de l'expression de protéines d'adhérence qui permettent aux cellules de se mouvoir (Friedl & Wolf 2003), ou qui permettent l'adressage des MMP au front de migration comme c'est le cas pour CD44 (Kuo et al. 2009 ; Marrero-Diaz et al. 2009 ; Mori et al. 2002). L'activation de p63 pourrait donc avoir un effet global pro-invasif. D'autre part p63 n'est pas la seule voie potentiellement activée par l'augmentation de p53, NOTCH1 en effet est également une cible de p53 dont l'activation peut avoir pour conséquence une augmentation du pouvoir invasif des cellules (Leong et al. 2007; Yugawa et al. 2007). Dans le processus de tumorigenèse HPV-induit, il est peu probable que l'oncoprotéine E7 puisse être amenée à disparaître, son expression étant nécessaire au maintien du phénotype transformé des cellules (Jabbar et al. 2009). L'oncoprotéine E6 en revanche, dont l'une des cibles est p53 et qui entraîne sa dégradation, voit son profil d'expression évoluer au cours de la tumorigenèse. L'épissage de l'ARNm polycistronique E6/E7 est en effet plus fréquent dans les lésions de haut grade et la traduction des formes E6*I s'en trouve augmentée (Cricca et al. 2009 ; Kösel et al. 2007 ; Fujii et al. 1995). La protéine E6*I est un paradoxe de l'action du virus. Des études *in vitro* ont en effet mis en évidence qu'elle empêchait la dégradation de p53 par E6 (Pim et al. 1997), l'hypothèse étant que cet effet permet une meilleure réplication de l'ADN viral en conservant une partie des fonctions de p53. Il est donc possible de supposer qu'avec le grade de la lésion, la capacité de transactivation conservée par p53 augmente et puisse agir sur les voies NOTCH et p63 favorisant l'acquisition d'un phénotype invasif. D'autre part, il a été récemment mis en évidence que les protéines E6*I, bien que ne possédant pas de site de liaison PDZ, entraînent la dégradation de certaines protéines PDZ cibles de E6 mais de façon différente de l'oncoprotéine E6 non épissée (Pim et al. 2009 ; Storrs & Silverstein 2007). Les effets sur les protéines PDZ de E6 dans la transformation ne sont pas bien compris. Cependant de part leur rôle important dans la polarité cellulaire, il est probable que leur dégradation favorise la déstabilisation des complexes d'adhérence intercellulaire. La régulation très spécifique qui s'établit entre les protéines PDZ dégradées par E6 et E6* pourrait être également à l'origine d'une évolution vers un phénotype plus invasif. Nous avons mis en évidence dans notre étude sur 58 cas de carcinomes de la tonsille, une forte proportion de variants E6 d'HPV16. Des travaux ont montré dans le cas d'HPV18 que la présence de variants favorisait l'épissage de E6 (**De la Cruz-Hernández et al.** 2005). Nous remarquons d'autre part que certains cas HPV positifs dans lesquels p16 est augmentée, sans doute suite à l'action de E7, présentent également un signal p53. Il est ainsi possible que la présence de variants soit à l'origine d'un signal p53 et que cette dernière soit à l'origine d'un caractère plus invasif des tumeurs ce qui expliquerait en partie l'association de certains variants avec une pathogénicité accrue. Enfin E6 pourrait également exercer une activité pro-invasive par l'intermédiaire de hTERT (**Park et al.** 2009 ; **Yu et al.** 2009), l'augmentation de hTERT par E6 n'étant pas dépendante de sa capacité à dégrader p53 (**Liu et al.** 2007 ; **Sekaric et al.** 2008).

Nos expériences et ces observations pourraient donc indiquer que la latence entre l'infection et l'apparition d'un cancer invasif est dépendante de variations d'expression des oncoprotéines virales mais également de variations de l'épissage de l'ARNm E6/E7. Ces variations pourraient non seulement résulter de l'intégration du génome viral mais également des phénomènes de multiplication des copies aux sites d'intégration en structure dite en peau d'oignon (**Kadaja et al.** 2007 ; **Kadaja et al.** 2009). Si E6/E7 ont bien un effet sur la capacité invasive des cellules, les mécanismes et les voies de signalisation par lesquels les oncoprotéines virales agissent sur l'acquisition du phénotype invasif des cellules restent donc à être déterminé en particulier au regard des caractéristiques de l'expression des oncoprotéines E6/E7 et de l'épissage de E6 au cours des infections persistantes.

Conclusions et perspectives

Nous avons montré dans une étude clinique de 58 cas de carcinomes de l'amygdale palatine dans une population à forte imprégnation alcoolo-tabagique que la présence d'HPV est associée à un marquage p16 mais pas à un marquage p53 et qu'elle tend à être de meilleur pronostic après traitement. De plus nous avons mis en évidence une proportion importante de variants dans les tumeurs HPV positives. La forte proportion de marquage p53 dans les tumeurs HPV positives nous amène à formuler deux hypothèses : (1) que l'alcool et le tabac pourraient avoir une action synergique à celles du virus dans la carcinogenèse ; (2) et/ou que la présence de variants d'HPV16 E6 influence la capacité du virus à dégrader p53. En effet si la présence des HPV est habituellement associée à celle d'un marquage p16, le groupe présentant ces deux caractéristiques étant de meilleur pronostic après traitement, le statut HPV n'est pas lié au marquage p53 (Charfi et al. 2008 ; Smith et al. 2008b ; Gillison et al. 2000). Cependant si le marquage p16 et la détection des HPV permettent aisément de définir un sous-groupe de patients en pratique clinique, d'autres marqueurs des effets des HPV et surtout de l'oncoprotéine E7 permettraient d'affiner ce tri. D'autre part et afin de mieux comprendre les différences qui existent entre les carcinomes de l'amygdale HPV positifs et négatifs, il serait intéressant d'étudier plus en détail la présence de p53 associée à HPV et ainsi définir au mieux le traitement. De précédents travaux ont montré que la transcription des ARNm de E6/E7 n'était pas associée à des mutations de p53 (Wiest et al. 2002) et/ou que si des mutations de p53 existaient dans des carcinomes HPV positifs elles n'affectaient pas la capacité de transactivation de p53 (Westra et al. 2008). Cependant des observations par marquage immunohistochimique de p53 en l'absence de mutations ont également été rapportées, ayant potentiellement pour cause un défaut de dégradation par E6 (Hafkamp et al. 2003 ; Snijders et al. 1994). Il serait donc intéressant de rechercher la présence de mutations de p53, leurs effets sur la fonction de la protéine et sur le marquage immunohistochimique de p53 au regard de la présence d'HPV, des transcrits de E6/E7 et de la présence de variants de E6. Une meilleure compréhension des liens qui existent entre la présence d'HPV et le marquage p53 apporterait à la fois un éclairage sur les processus de carcinogenèse HPV induite dans l'amygdale, associés ou non à l'alcool et le tabac, mais également sur l'efficacité thérapeutique dans les tumeurs associées aux HPV. Enfin il n'existe que très peu d'études sur la présence d'HPV au niveau de l'amygdale avant l'apparition d'un carcinome. Des études épidémiologiques seraient intéressantes à mener pour mieux comprendre l'histoire naturelle de l'infection à HPV à cette localisation. Il serait intéressant de déterminer si elle s'apparente à celle du virus au niveau du col de l'utérus, notamment si on retrouve le même délai entre l'infection et l'apparition d'un carcinome infiltrant. La mise en parallèle des observations, l'étude des marqueurs associés aux HPV et des différences qui existent entre ces cancers apporteraient un nouvel éclairage sur les processus qui sont à l'origine de l'apparition d'un phénotype invasif des cellules tumorales infectées par HPV.

Dans notre étude *in vitro* nous mettons en évidence que les oncoprotéines E6/E7 influencent le phénotype invasif de lignées tumorales. La transfection de leur cDNA a pour effet d'augmenter la capacité invasive des cellules, cet effet n'étant pas dépendant de l'expression des protéases principalement responsables de la protéolyse péricellulaire telles que MT1-MMP et la MMP2. Notre étude par puces Affymetrix[™] montre que la transfection de E6 a pour effet d'entraîner des variations de nombreux gènes associés à la progression tumorale et en particulier des intégrines et des protéines de la MEC dont le profil d'expression varie pour promouvoir l'invasion tumorale. A l'inverse l'inhibition des oncoprotéines E6/E7 dans la lignée HPV16 positive CaSki diminue de façon significative le potentiel invasif des cellules. Les oncoprotéines E6/E7 permettant de maintenir les cellules en cycle, il serait cependant nécessaire d'étudier les effets de cette inhibition sur le cycle cellulaire. De façon surprenante cet effet est accompagné d'une augmentation de l'expression de la MT1-MMP et d'une diminution de l'occludine, des changements qui seraient plutôt associés à l'invasion tumorale. L'étude de l'expression des gènes par puce Affymetrix[™] montre que de nombreuses variations d'expression sont dépendantes de l'augmentation de p53 et de p63 induites par l'inhibition des oncoprotéines E6/E7. p63 induit une augmentation d'expression de gènes de protéines d'adhérence et de gènes de protéases qui peuvent jouer un rôle à la fois pro et anti-invasif (Carroll et al. 2006 ; Gu et al. 2008 ; Teissier et al. 2007). L'épissage de l'ARN polycistronique de E6/E7 régule la traduction des oncoprotéines E7 et E6 mais également des formes épissées de E6 capables d'inhiber la dégradation de p53 induite par les formes non épissées de E6 et capables de dégrader des protéines PDZ des complexes de polarité (Pim et al. 1997 ; Pim et al. 2009). L'épissage des ARNm de E6/E7 varie au cours de l'infection et augmente avec le grade de la lésion (Cricca et al. 2009 ; Kösel et al. 2007). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'oncoprotéine E6* sur le phénotype invasif d'une lignée tumorale dont le profil d'épissage, à la différence des cellules CaSki, est composé majoritairement de formes non épissées et observer les effets sur l'invasion tumorale. L'inhibition des oncoprotéines met également en évidence une augmentation de gènes du système du plasminogène à savoir l'activateur de l'urokinase plasminogène (UPA/PLAU) et de l'inhibiteur de l'activation du plasminogène (PAI-1) dont les expressions sont associées à l'invasion tumorale (Binder & Mihaly 2008). L'étude de la relation de ce système protéasique dans la régulation du phénotype invasif par les oncoprotéines E6/E7 serait donc intéressante. De précédents travaux ont également mis en évidence des effets des oncoprotéines sur l'expression de la cadhérine-E (Caberg et al. 2008 ; Hellner et al. 2009a ; Watson et al. 2003). Nos résultats en membrane de SuperArray mettent en évidence une augmentation de slug un inhibiteur de la transcription de la cadhérine-E. Il a été récemment mis en évidence que la transcription de slug pouvait être régulée par Notch qui lui-même est dépendant de p53 (**Dotto** 2009 ; **Leong et al.** 2007). Il serait ici encore intéressant de rechercher la contribution des formes E6*. Enfin il serait intéressant de déterminer s'il existe une contribution directe des oncoprotéines E6/E7 sur des voies de signalisation associée à l'invasion tumorale, en particulier la voie Wnt qui pourrait être régulée de façon particulièrement spécifique dans le cas des carcinomes HPV-induits. De récents travaux ont en effet montré que hTERT et E2F1, cibles respectives de E6 et E7, agissent pour réguler ou inhiber cette voie de signalisation (**Park et al.** 2009 ; **Morris et al.** 2008).

Références

- Abbey K, & Kawabata I 1988. Computerized three-dimensional reconstruction of the crypt system of the palatine tonsil. Acta Oto-Laryngologica. Supplementum, 454, 39-42.
- Abe K, & Takeichi M 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(1), 13-19.
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO Journal*, 16(13), 3797-3804.
- Adiseshaiah P, Vaz M, Machireddy N, et al. 2008. A Fra-1-dependent, matrix metalloproteinase driven EGFR activation promotes human lung epithelial cell motility and invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 216(2), 405-412.
- Aho S, Buisson M, Pajunen T, et al. 2000. Ubinuclein, a Novel Nuclear Protein Interacting with Cellular and Viral Transcription Factors. J. *Cell Biol.*, 148(6), 1165-1176.
- Aho S, Lupo J, Coly P, et al. 2009. Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 101(6), 319-334.
- Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, et al. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene*, 22(14), 2121-2134.
- Aijaz S, D'Atri F, Citi S, et al. 2005. Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition. *Developmental Cell*, 8(5), 777-786.
- Aimes R, & Quigley J 1995. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4 -length fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5872-5876.
- Akhtar N, & Hotchin NA 2001. RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), 847-862.
- Akutsu N, Shirasawa H, Asano T, et al. 1996. p53-Dependent and -independent transactivation by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *The Journal of General Virology*, 77 (Pt 3), 459–463.
- Alexander JS, Jackson SA, Chaney E, et al. 1998. The role of cadherin endocytosis in endothelial barrier regulation: involvement of protein kinase C and actin-cadherin interactions. *Inflammation*, 22(4), 419-433.
- Alfandari J, Magal SS, Jackman A, et al. 1999. HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes. *Virology*, 257(2), 383–396.
- Alonio LV, Picconi MA, Dalbert D, et al. 2003. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 27(3), 263-269.
- Alpatov R, Munguba GC, Caton P, et al. 2004. Nuclear speckle-associated protein Pnn/DRS binds to the transcriptional corepressor CtBP and relieves CtBP-mediated repression of the E-cadherin gene. *Molecular and Cellular Biology*, 24(23), 10223-10235.
- Alunni-Fabbroni M, Littlewood T, Deleu L, et al. 2000. Induction of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts. Oncogene, 19(19), 2277-2285.
- Amarante MK, & Watanabe MAE 2009. The possible involvement of virus in breast cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 135(3), 329-337.
- Amin AA, Titolo S, Pelletier A, et al. 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology*, 272(1), 137-150.
- Andersson S, Alemi M, Rylander E, et al. 2000. Uneven distribution of HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *British Journal of Cancer*, 83(3), 307–310.
- Andrews E, Seaman WT, & Webster-Cyriaque J 2009. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. Oral Oncology, 45(6), 486-491.
- Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, & Lowy DR 1987. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *The EMBO Journal*, 6(4), 989–992.
- Angel P, Baumann I, Stein B, et al. 1987. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Molecular and Cellular Biology*, 7(6), 2256-2266.
- Angeline M, Merle E, & Moroianu J 2003. The E7 oncoprotein of high-risk human papillomavirus type 16 enters the nucleus via a nonclassical Ran-dependent pathway. *Virology*, 317(1), 13–23.

- Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, et al. 1996. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *The EMBO Journal*, 15(8), 1950-1960.
- Antonsson A, Payne E, Hengst K, & McMillan NAJ 2006. The human papillomavirus type 16 E7 protein binds human interferon regulatory factor-9 via a novel PEST domain required for transformation. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 26(7), 455-461.
- Apt D, Chong T, Liu Y, & Bernard HU 1993. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 67(8), 4455-4463.
- Apt D, Liu Y, & Bernard HU 1994. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Research*, 22(19), 3825-3833.
- Apt D, Watts RM, Suske G, & Bernard HU 1996. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology*, 224(1), 281-291.
- Aranda V, Haire T, Nolan ME, et al. 2006. Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol*, 8(11), 1235-1245.
- Arany I, Goel A, & Tyring SK 1995. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. Anticancer Research, 15(6B), 2865-2869.
- Arany I, Rady P, & Tyring SK 1994. Interferon treatment enhances the expression of underphosphorylated (biologically-active) retinoblastoma protein in human papilloma virus-infected cells through the inhibitory TGF beta 1/IFN beta cytokine pathway. Antiviral Research, 23(2), 131-141.
- Arce L, Yokoyama NN, & Waterman ML 2006. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. Oncogene, 25(57), 7492-7504.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, & Ferris RL 2008. Head and neck cancer. Lancet, 371(9625), 1695-709.
- Arias-Pulido H, Peyton C, Joste N, et al. 2006. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1755-1762.
- Arima Y, Inoue Y, Shibata T, et al. 2008. Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research*, 68(13), 5104-5112.
- Armstrong DJ, & Roman A 1997. The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology*, 239(1), 238-246.
- Arroyo M, Bagchi S, & Raychaudhuri P 1993. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2Fcyclin A complex. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6537-6546.
- Asada M, Irie K, Morimoto K, et al. 2003. ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4103-4111.
- Asadurian Y, Kurilin H, Lichtig H, et al. 2007. Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes. *Journal* of Medical Virology, 79(11), 1751-1760.
- Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, & Campo MS 2006. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International Journal of Cancer*, 119(9), 2105-2112.
- Avvakumov N, Torchia J, & Mymryk JS 2003. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene*, 22(25), 3833–3841.
- Badal V, Chuang LSH, Tan EH, et al. 2003. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of Virology*, 77(11), 6227-6234.
- Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, et al. 2007. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep*, 17(4), 931-939.
- Baege AC, Berger A, Schlegel R, et al. 2002. Cervical epithelial cells transduced with the papillomavirus E6/E7 oncogenes maintain stable levels of oncoprotein expression but exhibit progressive, major increases in hTERT gene expression and telomerase activity. *The American Journal of Pathology*, 160(4), 1251–1257.
- Baege AC, Disbrow GL, & Schlegel R 2004. IGFBP-3, a marker of cellular senescence, is overexpressed in human papillomavirusimmortalized cervical cells and enhances IGF-1-induced mitogenesis. *Journal of Virology*, 78(11), 5720-5727.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, & Newby AC 1998. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 101(6), 1478-1487.
- Baker AH, Edwards DR, & Murphy G 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci, 115(19), 3719-3727.

- Balda MS, Garrett MD, & Matter K 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. J. Cell Biol., 160(3), 423-432.
- Balda MS, & Matter K 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*, 19(9), 2024-2033.
- Balda M, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, et al. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. J. Cell Biol., 123(2), 293-302.
- Baldwin A, Pirisi L, & Creek K 2004. NFI-Ski Interactions Mediate Transforming Growth Factor β Modulation of Human Papillomavirus Type 16 Early Gene Expression. *Journal of Virology*, 78(8), 3953-3964.
- Baldwin A, Huh K, & Münger K 2006. Human papillomavirus E7 oncoprotein dysregulates steroid receptor coactivator 1 localization and function. *Journal of Virology*, 80(13), 6669-6677.
- Baldwin A, Li W, Grace M, et al. 2008. Kinase requirements in human cells: II. Genetic interaction screens identify kinase requirements following HPV16 E7 expression in cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(43), 16478-16483.
- Baldwin A, Pirisi L, & Creek KE 2004. NFI-Ski interactions mediate transforming growth factor beta modulation of human papillomavirus type 16 early gene expression. *Journal of Virology*, 78(8), 3953–3964.
- Balsitis S, Dick F, Dyson N, & Lambert PF 2006. Critical roles for non-pRb targets of human papillomavirus type 16 E7 in cervical carcinogenesis. *Cancer Research*, 66(19), 9393-9400.
- Balsitis SJ, Sage J, Duensing S, et al. 2003. Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 23(24), 9094–9103.
- Band V, Caprio JAD, Delmolino L, et al. 1991. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 65(12), 6671–6676.
- Banerjee NS, Genovese NJ, Noya F, et al. 2006. Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. *Journal of Virology*, 80(13), 6517-6524.

Banks L, Barnett SC, & Crook T 1990a. HPV-16 E7 functions at the G1 to S phase transition in the cell cycle. Oncogene, 5(6), 833-837.

- Banks L, Edmonds C, & Vousden KH 1990b. Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. Oncogene, 5(9), 1383-1389.
- Banks L, Spence P, Androphy E, et al. 1987. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 5), 1351–1359.
- Bannister AJ, & Kouzarides T 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. Nature, 384(6610), 641-643.
- Barberà MJ, Puig I, Domínguez D, et al. 2004. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*, 23(44), 7345-7354.
- Barbolina MV, & Stack MS 2008. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: Substrate diversity in pericellular proteolysis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(1), 24-33.
- Barbosa MS, Lowy DR, & Schiller JT 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology*, 63(3), 1404–1407.
- Barbosa MS, & Schlegel R 1989. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*, 4(12), 1529-1532.
- Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, & Schiller JT 1991. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *Journal of Virology*, 65(1), 292-298.
- Barksdale S, & Baker CC 1995. Differentiation-specific alternative splicing of bovine papillomavirus late mRNAs. Journal of Virology, 69(10), 6553-6556.
- Barnard P, & McMillan NA 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, 259(2), 305-313.
- Barnard P, Payne E, & McMillan NA 2000. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology*, 277(2), 411-419.
- Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, et al. 2003. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, 126(12), 2738-2749.
- Barrallo-Gimeno A, & Nieto MA 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151-3161.

- Barrett A, & Starkey P 1973. The interaction of α2 macroglobulin with proteinases: characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochemical Journal*, 133(4), 709-724.
- Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, et al. 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. Science (New York, N.Y.), 307(5715), 1621-1625.
- Basile JR, Zacny V, & Münger K 2001. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22522-22528.
- Batlle E, Sancho E, Francí C, et al. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2(2), 84-89.
- **Be X, Hong Y, Wei J, et al.** 2001. Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry*, 40(5), 1293–1299.
- Beaudenon S, & Huibregtse JM 2008. HPV E6, E6AP and cervical cancer. BMC Biochemistry, 9 Suppl 1, S4.
- Bechtold V, Beard P, & Raj K 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *Journal of Virology*, 77(3), 2021-8.
- Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, et al. 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of Virology*, 65(5), 2254-2260.
- Bedell MA, Jones KH, & Laimins LA 1987. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *Journal of Virology*, 61(11), 3635–3640.
- Belaguli NS, Pater MM, & Pater A 1992. Nucleotide 880 splice donor site required for efficient transformation and RNA accumulation by human papillomavirus type 16 E7 gene. *Journal of Virology*, 66(5), 2724-2730.
- Belaguli NS, Pater MM, & Pater A 1995. Splice sites of human papillomavirus type 16 E6 gene or heterologous gene required for transformation by E7 and accumulation of E7 RNA. *Journal of Medical Virology*, 47(4), 445-453.
- Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, et al. 2001. Matrix-dependent Proteolysis of Surface Transglutaminase by Membrane-type Metalloproteinase Regulates Cancer Cell Adhesion and Locomotion. J. Biol. Chem., 276(21), 18415-18422.
- Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique*, 56(3), 159-175.
- Benais-Pont G, Punn A, Flores-Maldonado C, et al. 2003. Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *The Journal of Cell Biology*, 160(5), 729-740.
- Berezutskaya E, & Bagchi S 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30135-30140.
- Berger SL 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. Current Opinion in Genetics & Development, 12(2), 142-148.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.
- Bernard H 2002. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. Antiviral Therapy, 7(4), 219-237.
- Bernard H, Calleja-Macias IE, & Dunn ST 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 118(5), 1071-1076.
- Bernat A, Avvakumov N, Mymryk JS, & Banks L 2003. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. *Oncogene*, 22(39), 7871–7881.
- Bernat A, Massimi P, & Banks L 2002. Complementation of a p300/CBP defective-binding mutant of adenovirus E1a by human papillomavirus E6 proteins. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 4), 829–833.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, et al. 2001. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. J. Natl. Cancer Inst., 93(17), 1325-1330.
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, et al. 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 292(1), 51-66.
- Bhawal UK, Sugiyama M, Nomura Y, et al. 2007. High-risk human papillomavirus type 16 E7 oncogene associates with Cdc25A overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 450(1), 65-71.
- Bilder D 2004. Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes & Development*, 18(16), 1909-1925.
- Binder BR, & Mihaly J 2008. The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. Immunology Letters, 118(2), 116-124.

- Bischof O, Nacerddine K, & Dejean A 2005. Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 1013– 1024.
- Blobe GC, Liu X, Fang SJ, et al. 2001. A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39608-39617.
- Boccardo E, Noya F, Broker TR, et al. 2004. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology*, 328(2), 233–243.
- Bodaghi S, Jia R, & Zheng Z 2009. Human papillomavirus type 16 E2 and E6 are RNA-binding proteins and inhibit in vitro splicing of premRNAs with suboptimal splice sites. *Virology*, 386(1), 32-43.
- Bode AM, & Dong Z 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. Nature Reviews. Cancer, 4(10), 793-805.
- Bode W, Gomis-Rüth F, & Stöckler W 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zincbinding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the []metzincins'. *FEBS Letters*, 331(1-2), 134-140.
- Bohl J, Das K, Dasgupta B, & Pol SBV 2000. Competitive binding to a charged leucine motif represses transformation by a papillomavirus E6 oncoprotein. *Virology*, 271(1), 163–170.
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, et al. 2003. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 3), 499-511.
- Borchers A, Braspenning J, Meijer J, et al. 1999. E7-specific cytotoxic T cell tolerance in HPV-transgenic mice. Archives of Virology, 144(8), 1539-1556.
- Borden P, & Heller R 1997. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 7(1-2), 159-178.
- Bosch FX, Dürst M, Schwarz E, et al. 1991. The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression? *Behring Institute Mitteilungen*, (89), 108-121.
- Boscolo-Rizzo P, Da Mosto M, Fuson R, et al. 2009. HPV-16 E6 L83V variant in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. J Cancer Res Clin Oncol, 135(4), 559-566.
- Bossis I, Roden RBS, Gambhira R, et al. 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *Journal of Virology*, 79(11), 6723-6731.
- Bottley G, Watherston OG, Hiew Y, et al. 2008. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene*, 27(12), 1794-1799.
- Bousarghin L, Touzé A, Combita-Rojas A, & Coursaget P 2003. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 1), 157-164.
- Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, et al. 1994. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology*, 203(1), 73-80.
- Boyer SN, Wazer DE, & Band V 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*, 56(20), 4620-4624.
- Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, et al. 2003. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Research*, 63(8), 1727-1730.
- Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, et al. 1999. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *The Journal of General Virology*, 80 (Pt 12), 3233–3240.
- Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, et al. 2002. Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene*, 298(1), 69-77.
- Braun L, Dürst M, Mikumo R, et al. 1992. Regulation of growth and gene expression in human papillomavirus-transformed keratinocytes by transforming growth factor-beta: Implications for the control of papillomavirus infection. *Molecular Carcinogenesis*, 6(2), 100–111.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, et al. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO Journal*, 18(9), 2449-2458.
- Brokaw JL, Yee CL, & Münger K 1994. A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*, 205(2), 603-607.
- Brooks LA, Sullivan A, O'Nions J, et al. 2002. E7 proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical

intraepithelial neoplasia. British Journal of Cancer, 86(2), 263-268.

Bryant DM, & Stow JL 2004. The ins and outs of E-cadherin trafficking. Trends in Cell Biology, 14(8), 427-434.

- Buck CB, Cheng N, Thompson CD, et al. 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of Virology*, 82(11), 5190-5197.
- Busch C, Hanssen TA, Wagener C, & OBrink B 2002. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Human Pathology*, 33(3), 290-298.
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, et al. 1998. The TIMP2 Membrane Type 1 Metalloproteinase "Receptor" Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A. A KINETIC STUDY. J. Biol. Chem., 273(2), 871-880.
- Butz K, Geisen C, Ullmann A, et al. 1996. Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 68(4), 506–513.
- Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, et al. 2003. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomaviruspositive cancer cells. *Oncogene*, 22(38), 5938-5945.
- Byrne MA, Taylor-Robinson D, Munday PE, & Harris JR 1989. The common occurrence of human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia in women infected by HIV. *AIDS (London, England)*, 3(6), 379-382.
- Caberg J, Hubert P, Herman L, et al. 2009. Increased migration of Langerhans cells in response to HPV16 E6 and E7 oncogene silencing: role of CCL20. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 58(1), 39–47.
- Caberg JD, Hubert PM, Begon DY, et al. 2008. Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. *Carcinogenesis*, 29(7), 1441-1447.
- Caldeira S, de Villiers EM, & Tommasino M 2000. Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene*, 19(6), 821-826.
- Campo-Fernández B, Morandell D, Santer FR, et al. 2007. Identification of the FHL2 transcriptional coactivator as a new functional target of the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 81(2), 1027-1032.
- Camus S, Menéndez S, Cheok CF, et al. 2007. Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. *Oncogene*, 26(28), 4059–4070.
- Camus S, Higgins M, Lane DP, & Lain S 2003. Differences in the ubiquitination of p53 by Mdm2 and the HPV protein E6. *FEBS Letters*, 536(1-3), 220–224.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76-83.
- Carlotti F, & Crawford L 1993. Trans-activation of the adenovirus E2 promoter by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by retinoblastoma-dependent and -independent pathways. *The Journal of General Virology*, 74 (Pt 11), 2479-2486.
- Carroll DK, Carroll JS, Leong C, et al. 2006. p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 8(6), 551-561.
- Casini GL, Graham D, Heine D, et al. 2004. In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology*, 325(2), 320-327.
- Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, et al. 2004. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *Journal of Virology*, 78(11), 5934-45.
- Chamorro D, Alarcón L, Ponce A, et al. 2009. Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C{varepsilon} regulates its nuclear exportation. *Molecular Biology of the Cell*, 20(18), 4120-4129.
- Chan JA, Krichevsky AM, & Kosik KS 2005. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. Cancer Res, 65(14), 6029-6033.
- Chan WK, Klock G, & Bernard HU 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *Journal of Virology*, 63(8), 3261-3269.
- Chang A 1990. Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential. A lesson from New Zealand. Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology, 1(6), 321-328.
- Charbonnier S, Stier G, Orfanoudakis G, et al. 2008. Defining the minimal interacting regions of the tight junction protein MAGI-1 and HPV16 E6 oncoprotein for solution structure studies. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 64–73.
- Charette ST, & McCance DJ 2007. The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Aktdependent manner. Oncogene, 26(52), 7386-7390.

- Charfi L, Jouffroy T, de Cremoux P, et al. 2008. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer Letters*, 260(1-2), 72-78.
- Chen B, Simpson DA, Zhou Y, et al. 2009. Human papilloma virus type16 E6 deregulates CHK1 and sensitizes human fibroblasts to environmental carcinogens independently of its effect on p53. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(11), 1775–1787.
- Chen F, MacDonald CC, & Wilusz J 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2614-2620.
- Chen G, & Stenlund A 2001. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *Journal* of Virology, 75(1), 292-302.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, & Androphy EJ 1995. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. Science (New York, N.Y.), 269(5223), 529–531.
- Chen L, Ashe S, Singhal MC, et al. 1993. Metastatic conversion of cells by expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(14), 6523–6527.
- Chen S, Lin S, Tsai T, et al. 2006. ErbB4 (JM-b//CYT-1)-induced expression and phosphorylation of c-Jun is abrogated by human papillomavirus type 16 E5 protein. Oncogene, 26(1), 42-53.
- Chen TM, & Defendi V 1992. Functional interaction of p53 with HPV18 E6, c-myc and H-ras in 3T3 cells. Oncogene, 7(8), 1541–1547.
- Chen YT, Stewart DB, & Nelson WJ 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *The Journal of Cell Biology*, 144(4), 687-699.
- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, et al. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & Development*, 9(19), 2335-2349.
- Cheng Y, Lee H, Shiau M, et al. 2008. Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 14(15), 4705-4712.
- **Chicoine É, Estève P, Robledo O, et al.** 2002. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), 765-772.
- Chien WM, Parker JN, Schmidt-Grimminger DC, et al. 2000. Casein kinase II phosphorylation of the human papillomavirus-18 E7 protein is critical for promoting S-phase entry. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 425-435.
- Chien W, Noya F, Benedict-Hamilton HM, et al. 2002. Alternative fates of keratinocytes transduced by human papillomavirus type 18 E7 during squamous differentiation. *Journal of Virology*, 76(6), 2964-2972.
- Chinenov Y, & Kerppola TK 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. Oncogene, 20(19), 2438-2452.
- Chiu R, Angel P, & Karin M 1989. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. Cell, 59(6), 979-986.
- Cho YS, Kang JW, Cho M, et al. 2001. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Letters*, 501(2-3), 139–145.
- Chong T, Chan WK, & Bernard HU 1990. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Research*, 18(3), 465-470.
- Chow L, & Broker T 2007. Human Papillomavirus Transcription. In *The Papillomaviruses*. pp. 109-144. Available at: http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1007/978-0-387-36523-7_7 [Accessed October 19, 2009].
- Chung L, Dinakarpandian D, Yoshida N, et al. 2004. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J*, 23(15), 3020-3030.
- Ciotti M, Marzano V, Giuliani L, et al. 2009. Proteomic investigation in A549 lung cell line stably infected by HPV16E6/E7 oncogenes. Respiration; International Review of Thoracic Diseases, 77(4), 427-439.
- Citi S, & Cordenonsi M 1999. The Molecular Basis for the Structure, Function, and Regulation of Tight Junctions. In *The Adhesive Interaction of Cells*. Elsevier, pp. 203-233. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CTF-4SK66K3-C/2/1997e790eceb944de3c17bc656d99a94.
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, & Edwards DR 2008. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), 1362-1378.
- Clawson GA, Bui V, Xin P, et al. 2008. Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(1), 81–88.

Clere N, Bermont L, Fauconnet S, et al. 2007. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Experimental Cell Research*, 313(15), 3239–3250.

Clevers H 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell, 127(3), 469-480.

Cline EG, & Nelson WJ 2007. Characterization of Mammalian Par 6 as a Dual-Location Protein. Mol. Cell. Biol., 27(12), 4431-4443.

Cognetti DM, Weber RS, & Lai SY 2008. Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. Cancer, 113(7 Suppl), 1911-1932.

- Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, et al. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15191-15196.
- Cole ST, & Danos O 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *Journal of Molecular Biology*, 193(4), 599–608.
- Colgan DF, & Manley JL 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. Genes & Development, 11(21), 2755-2766.
- Collier B, Oberg D, Zhao X, & Schwartz S 2002. Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 L1 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells. *Journal of Virology*, 76(6), 2739-2752.
- Collins AS, Nakahara T, Do A, & Lambert PF 2005. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *Journal of Virology*, 79(23), 14769–14780.
- Côme C, Arnoux V, Bibeau F, & Savagner P 2004. Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(2), 183-193.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*, 7(6), 1267-1278.
- Cone RW, Minson AC, Smith MR, & McDougall JK 1992. Conservation of HPV-16 E6/E7 ORF sequences in a cervical carcinoma. Journal of Medical Virology, 37(2), 99-107.
- Conrad M, Bubb VJ, & Schlegel R 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *Journal of Virology*, 67(10), 6170-6178.
- Conrad M, Goldstein D, Andresson T, & Schlegel R 1994. The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology*, 200(2), 796-800.
- Contreras-Paredes A, Cruz-Hernández EDL, Martínez-Ramírez I, et al. 2009. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology*, 383(1), 78–85.
- Cooper B, Schneider S, Bohl J, et al. 2003. Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology*, 306(1), 87–99.
- Córdova-Alarcón E, Centeno F, Reyes-Esparza J, et al. 2005. Effects of HRAS oncogene on cell cycle progression in a cervical cancerderived cell line. Archives of Medical Research, 36(4), 311-316.
- **Cornelissen MT, Smits HL, Briët MA, et al.** 1990. Uniformity of the splicing pattern of the E6/E7 transcripts in human papillomavirus type 16-transformed human fibroblasts, human cervical premalignant lesions and carcinomas. *The Journal of General Virology*, 71 (Pt 5), 1243-1246.
- Costa MMD, Hogeboom CJ, Holly EA, & Palefsky JM 2002. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(9), 1229–1237.
- Couillard J, Demers M, Lavoie G, & St-Pierre Y 2006. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 342(4), 1233-1239.
- Coursen JD, Bennett WP, Gollahon L, et al. 1997. Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Experimental Cell Research*, 235(1), 245–253.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, & Werb Z 2000. MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481-490.
- Coyne CB, Voelker T, Pichla SL, & Bergelson JM 2004. The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Interacts with the Multi-PDZ Domain Protein-1 (MUPP-1) within the Tight Junction. J. Biol. Chem., 279(46), 48079-48084.
- Creek KE, Geslani G, Batova A, & Pirisi L 1995. Progressive loss of sensitivity to growth control by retinoic acid and transforming growth factor-beta at late stages of human papillomavirus type 16-initiated transformation of human keratinocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 375, 117-135.
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, et al. 2009. Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *Journal of Medical Virology*, 81(7), 1276-1282.

- Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, et al. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocytedependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *The EMBO Journal*, 6(12), 3745-3753.
- Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, & Banks L 1989. Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *The EMBO Journal*, 8(2), 513-519.
- Crook T, Fisher C, Masterson PJ, & Vousden KH 1994. Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. Oncogene, 9(4), 1225–1230.
- Crook T, Tidy JA, & Vousden KH 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 67(3), 547–556.
- Crum C, Nuovo G, Friedman D, & Silverstein S 1988. Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *Journal of Virology*, 62(1), 84-90.
- Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, et al. 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *Journal of Virology*, 80(18), 8940-8950.
- Dahlstrand HM, & Dalianis T 2005. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in Tonsillar cancer. Advances in Cancer Research, 93, 59-89.
- Dalal S, Gao Q, Androphy EJ, & Band V 1996. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 70(2), 683–688.
- Dalmay T, & Edwards DR 2006. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. Oncogene, 25(46), 6170-6175.
- Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, et al. 1995. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 10), 2589-2593.
- Daniels PR, Sanders CM, Coulson P, & Maitland NJ 1997. Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6associated protein. *FEBS Letters*, 416(1), 6–10.
- Daniels PR, Sanders CM, & Maitland NJ 1998. Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6associated protein in insect and human cells. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 3), 489–499.
- D'Anna R, Le Buanec H, Bizzini B, et al. 2001. Human papillomavirus-16-E7 oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Human Virology*, 4(2), 85-95.
- **Darnell GA, Antalis TM, Johnstone RW, et al.** 2003. Inhibition of retinoblastoma protein degradation by interaction with the serpin plasminogen activator inhibitor 2 via a novel consensus motif. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6520–6532.
- Darnell GA, Schroder WA, Antalis TM, et al. 2007. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37492-37500.
- Daugherty RL, & Gottardi CJ 2007. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22, 303-309.
- Davis MA, Ireton RC, & Reynolds AB 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of Cell Biology*, 163(3), 525-534.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, & Schiller JT 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14252-14257.
- Day PM, Thompson CD, Buck CB, et al. 2007. Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. *Journal of Virology*, 81(16), 8784-8792.
- Day T, & Vaziri C 2009. HPV E6 oncoprotein prevents recovery of stalled replication forks independently of p53 degradation. Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 8(14), 2138.
- De Craene B, Gilbert B, Stove C, et al. 2005. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Research*, 65(14), 6237-6244.
- De la Cruz-Hernández E, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, et al. 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 9), 2459-2468.
- De Wever O, Derycke L, Hendrix A, et al. 2007. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clinical & Experimental Metastasis*, 24(8), 685-697.
- **DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, & DiMaio D** 2003. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Journal of Virology*, 77(2), 1551-1563.

Degenhardt YY, & Silverstein SJ 2001a. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. Journal of Virology, 75(1), 151-

160.

- Degenhardt YY, & Silverstein S 2001b. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *Journal of Virology*, 75(23), 11791–11802.
- Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, & Thierry F 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of Virology*, 71(12), 9343-9349.
- Demers GW, Espling E, Harry JB, et al. 1996. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *Journal of Virology*, 70(10), 6862-6869.
- **Demers GW, Foster SA, Halbert CL, & Galloway DA** 1994a. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4382-4386.
- Demers GW, Halbert CL, & Galloway DA 1994b. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology*, 198(1), 169-174.
- Deng W, Tsao SW, Kwok YK, et al. 2008. Transforming growth factor beta1 promotes chromosomal instability in human papillomavirus 16 E6E7-infected cervical epithelial cells. *Cancer Research*, 68(17), 7200-7209.
- Deng W, Lin BY, Jin G, et al. 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. Journal of Virology, 78(24), 13954-13965.
- Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, et al. 2002. Processing of Integrin alpha v Subunit by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Stimulates Migration of Breast Carcinoma Cells on Vitronectin and Enhances Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. J. Biol. Chem., 277(12), 9749-9756.
- Desaintes C, Hallez S, Alphen PV, & Burny A 1992. Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 66(1), 325–333.
- Deshpande AM, & Wong DT 2008. Molecular mechanisms of head and neck cancer. Expert Review of Anticancer Therapy, 8(5), 799-809.
- Dey A, Atcha IA, & Bagchi S 1997. HPV16 E6 oncoprotein stimulates the transforming growth factor-beta 1 promoter in fibroblasts through a specific GC-rich sequence. *Virology*, 228(2), 190–199.
- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. 2005. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1765-1776.
- Diaz-Chavez J, Hernandez-Pando R, Lambert PF, & Gariglio P 2008. Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Molecular Cancer*, 7, 3.
- DiMaio D, & Mattoon D 2001. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. Oncogene, 20(54), 7866-7873.
- DiMaio D 2007. Papillomavirus E5 Proteins. In *The Papillomaviruses*. pp. 175-196. Available at: http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1007/978-0-387-36523-7_9 [Accessed December 1, 2009].
- Dobrosotskaya I, Guy RK, & James GL 1997. MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of proteinprotein interaction domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31589-31597.
- Docherty AJP, Lyons A, Smith BJ, et al. 1985. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroidpotentiating activity. *Nature*, 318(6041), 66-69.
- Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, et al. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 5078-5089.
- **Donalisio M, Cornaglia M, Landolfo S, & Lembo D** 2008. TGF-beta1 and IL-4 downregulate human papillomavirus-16 oncogene expression but have differential effects on the malignant phenotype of cervical carcinoma cells. *Virus Research*, 132(1-2), 253-256.
- **Doorbar J, Parton A, Hartley K, et al.** 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*, 178(1), 254-262.
- Doorbar J 2005. The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 32 Suppl 1, S7-15.
- d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, et al. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 250(3), 751-757.
- Dotto GP 2009. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. Nature Reviews. Cancer, 9(8), 587-595.
- Dow LE, Elsum IA, King CL, et al. 2008. Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling. *Oncogene*, 27(46), 5988-6001.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, et al. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-

filament assembly. Cell, 123(5), 903-915.

- D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, et al. 2009. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(9), 1263-1269.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 356(19), 1944-1956.
- Du M, Fan X, Hong E, & Chen JJ 2002. Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 296(4), 962–969.
- Du X, Chand HS, & Kisiel W 2003. Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1621(3), 242-245.
- **Duensing A, Liu Y, Spardy N, et al.** 2007. RNA polymerase II transcription is required for human papillomavirus type 16 E7- and hydroxyurea-induced centriole overduplication. *Oncogene*, 26(2), 215-223.
- **Duensing A, Chin A, Wang L, et al.** 2008. Analysis of centrosome overduplication in correlation to cell division errors in high-risk human papillomavirus (HPV)-associated anal neoplasms. *Virology*, 372(1), 157-164.
- **Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, et al.** 2009. Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(8), 741-747.
- **Duensing S, Duensing A, Crum CP, & Münger K** 2001a. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Research*, 61(6), 2356-2360.
- **Duensing S, Duensing A, Flores ER, et al.** 2001b. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *Journal of Virology*, 75(16), 7712-7716.
- Duensing S, Lee LY, Duensing A, et al. 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(18), 10002-10007.
- **Duensing S, Duensing A, Lee DC, et al.** 2004. Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene*, 23(50), 8206–8215.
- **Duensing S, & Münger K** 2002. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Research*, 62(23), 7075–7082.
- **Duensing S, & Münger K** 2003. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *Journal of Virology*, 77(22), 12331–12335.
- Duerksen-Hughes PJ, Yang J, & Schwartz SB 1999. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. Virology, 264(1), 55–65.
- **Duffy CL, Phillips SL, & Klingelhutz AJ** 2003. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology*, 314(1), 196–205.
- **Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, et al.** 2007. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3804-3816.
- Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, et al. 2000. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27979-27988.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, et al. 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *The EMBO Journal*, 20(14), 3738-3748.
- Ebnet K 2008. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. Histochemistry and Cell Biology, 130(1), 1-20.
- Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, et al. 2003. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 19), 3879-3891.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, & Vestweber D 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of Cell Science*, 117(Pt 1), 19-29.
- Edmonds C, & Vousden KH 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. Journal of Virology, 63(6), 2650-2656.
- Egeblad M, & Werb Z 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Reviews Cancer, 2(3), 161-174.
- Eichten A, Rud DS, Grace M, et al. 2004. Molecular pathways executing the "trophic sentinel" response in HPV-16 E7-expressing normal human diploid fibroblasts upon growth factor deprivation. *Virology*, 319(1), 81–93.
- Eichten A, Westfall M, Pietenpol JA, & Münger K 2002. Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the

human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Virology, 295(1), 74-85.

- El-Mofty SK, & Patil S 2006. Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 101(3), 339-345.
- Elston RC, Napthine S, & Doorbar J 1998. The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 2), 371–374.
- Endo K, Takino T, Miyamori H, et al. 2003. Cleavage of Syndecan-1 by Membrane Type Matrix Metalloproteinase-1 Stimulates Cell Migration. J. Biol. Chem., 278(42), 40764-40770.
- English WR, Holtz B, Vogt G, et al. 2001. Characterization of the Role of the "MT-loop". AN EIGHT-AMINO ACID INSERTION SPECIFIC TO PROGELATINASE A (MMP2) ACTIVATING MEMBRANE-TYPE MATRIX METALLOPROTEINASES. J. Biol. Chem., 276(45), 42018-42026.
- Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, et al. 2007. Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27713-27720.
- Etienne-Manneville S 2008. Polarity proteins in migration and invasion. Oncogene, 27(55), 6970-6980.
- Etscheid BG, Foster SA, & Galloway DA 1994. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein, p53. *Virology*, 205(2), 583–585.
- Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, et al. 2001. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 167(9), 5420–5428.
- Fang L, Wang Y, Du D, et al. 2007. Cell polarity protein Par3 complexes with DNA-PK via Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. *Cell Res*, 17(2), 100-116.
- Fanning A, Jameson B, Jesaitis L, & Anderson J 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29745-29753.
- Fanning AS, Ma TY, & Anderson JM 2002. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 16(13), 1835-1837.
- Fauquet C, Mayot M, Maniloff J, et al. 2005. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,
- Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, & Jalinot P 2005. Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *Journal of Virology*, 79(7), 4229–4237.
- Fay A, Yutzy WH, Roden RBS, & Moroianu J 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *Journal of Virology*, 78(24), 13447-13454.
- Fearon ER, & Vogelstein B 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61(5), 759-767.
- Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, et al. 2005. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(4), 273-282.
- Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, et al. 2008. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12691-12700.
- Ferran MC, & McBride AA 1998. Transient viral DNA replication and repression of viral transcription are supported by the C-terminal domain of the bovine papillomavirus type 1 E1 protein. *Journal of Virology*, 72(1), 796-801.
- Filatov L, Golubovskaya V, Hurt JC, et al. 1998. Chromosomal instability is correlated with telomere erosion and inactivation of G2 checkpoint function in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Oncogene*, 16(14), 1825–1838.
- Filippova M, Brown-Bryan TA, Casiano CA, & Duerksen-Hughes PJ 2005. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. *Cell Death and Differentiation*, 12(12), 1622–1635.
- Filippov VA, Kagoda M, et al. 2009. Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Journal of Virology*, 83(1), 210–227.
- Filippova M, Johnson MM, Bautista M, et al. 2007. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *Journal of Virology*, 81(8), 4116–4129.
- Filippova M, Parkhurst L, & Duerksen-Hughes PJ 2004. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25729–25744.
- Filippova M, Song H, Connolly JL, et al. 2002. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21730–21739.

- Firzlaff JM, Galloway DA, Eisenman RN, & Lüscher B 1989. The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *The New Biologist*, 1(1), 44-53.
- Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, & Lambert PF 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *Journal of Virology*, 74(14), 6622-6631.
- Florin L, Becker KA, Lambert C, et al. 2006. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *Journal of Virology*, 80(13), 6691-6696.
- Fogg VC, Liu C, & Margolis B 2005. Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 13), 2859-2869.
- Fong D, Spizzo G, Gostner JM, et al. 2008. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 21(2), 186-191.
- Fouts ET, Yu X, Egelman EH, & Botchan MR 1999. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4447-4458.
- Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, & Muñoz N 2000. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. Oral Oncology, 36(1), 106-115.
- Francis DA, Schmid SI, & Howley PM 2000. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *Journal of Virology*, 74(6), 2679-2686.
- Frankel P, Aronheim A, Kavanagh E, et al. 2005. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J*, 24(1), 54-62.
- Frattini MG, & Laimins LA 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(26), 12398-12402.
- Freedman DA, & Levine AJ 1998. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 7288–7293.

Friedl P, & Wolf K 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nature Reviews. Cancer, 3(5), 362-374.

- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*, 113(1), 173-185.
- Fujii T, Tsukazaki K, Kiguchi K, et al. 1995. The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynecologic Oncology*, 58(2), 210-215.
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, et al. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, 4(3), 222-231.
- Fukuhara T, Shimizu K, Kawakatsu T, et al. 2004. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *The Journal of Cell Biology*, 166(3), 393-405.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, et al. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Development*, 11(16), 2090-2100.
- Funke L, Dakoji S, & Bredt DS 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. Annual Review of Biochemistry, 74, 219-245.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, et al. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539-1550.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, & Tsukita S 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 143(2), 391-401.
- Furuse M, & Tsukita S 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. Trends in Cell Biology, 16(4), 181-188.
- Gage JR, Meyers C, & Wettstein FO 1990. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of Virology*, 64(2), 723-730.
- Gao Q, Kumar A, Srinivasan S, et al. 2000. PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. The Journal of Biological Chemistry, 275(20), 14824–14830.
- Gao Q, Singh L, Kumar A, et al. 2001. Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 75(9), 4459–4466.
- Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, et al. 1999. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 733–744.

- Gao Q, Kumar A, Singh L, et al. 2002a. Human papillomavirus E6-induced degradation of E6TP1 is mediated by E6AP ubiquitin ligase. *Cancer Research*, 62(11), 3315–3321.
- Gao Z, Seeling JM, Hill V, et al. 2002b. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(3), 1182-1187.
- García-Alai MM, Dantur KI, Smal C, et al. 2007. High-risk HPV E6 oncoproteins assemble into large oligomers that allow localization of endogenous species in prototypic HPV-transformed cell lines. *Biochemistry*, 46(2), 341–349.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, et al. 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 18(40), 5487-5496.
- Gardiol D, & Banks L 1998. Comparison of human papillomavirus type 18 (HPV-18) E6-mediated degradation of p53 in vitro and in vivo reveals significant differences based on p53 structure and cell type but little difference with respect to mutants of HPV-18 E6. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 8), 1963–1970.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, et al. 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 18(40), 5487–5496.
- Gardiol D, Galizzi S, & Banks L 2002. Mutational analysis of the discs large tumour suppressor identifies domains responsible for human papillomavirus type 18 E6-mediated degradation. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 2), 283–289.
- Gardiol D, Zacchi A, Petrera F, et al. 2006. Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 119(6), 1285-1290.
- Garneau NL, Wilusz J, & Wilusz CJ 2007. The highways and byways of mRNA decay. Nat Rev Mol Cell Biol, 8(2), 113-126.
- Garnett TO, Filippova M, & Duerksen-Hughes PJ 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 13(11), 1915–1926.
- Genovese NJ, Banerjee NS, Broker TR, & Chow LT 2008. Casein kinase II motif-dependent phosphorylation of human papillomavirus E7 protein promotes p130 degradation and S-phase induction in differentiated human keratinocytes. *Journal of Virology*, 82(10), 4862-4873.
- Genther S, Sterling S, Duensing S, et al. 2003. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *Journal of Virology*, 77(5), 2832-2842.
- Georgopoulos NT, Proffitt JL, & Blair GE 2000. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene*, 19(42), 4930-4935.
- Gewin L, & Galloway DA 2001. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *Journal of Virology*, 75(15), 7198–7201.
- Gewin L, Myers H, Kiyono T, & Galloway DA 2004. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. Genes & Development, 18(18), 2269–2282.
- Ghiselli G, Coffee N, Munnery CE, et al. 2003. The cohesin SMC3 is a target the for beta-catenin/TCF4 transactivation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20259-20267.
- Giarrè M, Caldeira S, Malanchi I, et al. 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *Journal of Virology*, 75(10), 4705-4712.
- Gilles C, Polette M, Piette J, et al. 1996. High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 65(2), 209-213.
- Gilles C, Polette M, Seiki M, et al. 1997. Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 76(5), 651-660.
- Gillison M, Koch W, Capone R, et al. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 709-720.
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. 2008. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(6), 407-420.
- Gingras D, & Béliveau R 2009. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, In Press, Corrected Proof. Available at: http://www.sciencedirect.com.gate2.inist.fr/science/article/B6T20-4W6Y5DH-1/2/0776d4e5e92a9981337679d7b5a16315.
- Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, et al. 2001. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Letters*, 507(2), 231-236.
- Giovane C, Trave G, Briones A, et al. 1999. Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with

monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53. Journal of Molecular Recognition: JMR, 12(2), 141-152.

- Giri I, & Danos O 1986. Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. Trends in Genetics, 2, 227-232.
- Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, et al. 2000. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*, 19(46), 5270–5280.
- Gloss B, & Bernard HU 1990. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *Journal of Virology*, 64(11), 5577-5584.
- Gloss B, Chong T, & Bernard HU 1989a. Numerous nuclear proteins bind the long control region of human papillomavirus type 16: a subset of 6 of 23 DNase I-protected segments coincides with the location of the cell-type-specific enhancer. *Journal of Virology*, 63(3), 1142-1152.
- Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterenst M, et al. 1989b. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3519-3533.
- Golan T, Yaniv A, Bafico A, et al. 2004. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14879-14888.
- Goldenberg D, Lee J, Koch WM, et al. 2004. Habitual risk factors for head and neck cancer. Otolaryngology-Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 131(6), 986-993.
- Goldstein B, & Macara IG 2007. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. Developmental Cell, 13(5), 609-622.
- **Gonzalez SL, Stremlau M, He X, et al.** 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *Journal of Virology*, 75(16), 7583-7591.
- González-Mariscal L, Tapia R, & Chamorro D 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1778(3), 729-756.
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, & Louvard D 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10779-10784.
- Gottlieb E, & Oren M 1998. p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53. *The EMBO Journal*, 17(13), 3587-3596.
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, et al. 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of Virology*, 70(4), 2339-2349.
- Griep AE, Herber R, Jeon S, et al. 1993. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *Journal of Virology*, 67(3), 1373–1384.
- Grm HS, & Banks L 2004. Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP-independent. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 10), 2815–2819.
- Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. 2006. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16 E6-350G Variant. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(4), 820-822.
- Grossman SR, Mora R, & Laimins LA 1989. Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *Journal of Virology*, 63(1), 366–374.
- Gu W, Li M, Zhao WM, et al. 2004. tRNASer(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes. *Nucleic Acids Research*, 32(15), 4448-4461.
- Gu X, Coates PJ, Boldrup L, & Nylander K 2008. p63 contributes to cell invasion and migration in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Letters*, 263(1), 26-34.
- **Gu Z, Pim D, Labrecque S, et al.** 1994. DNA damage induced p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene*, 9(2), 629–633.
- Guccione E, Lethbridge KJ, Killick N, et al. 2004a. HPV E6 proteins interact with specific PML isoforms and allow distinctions to be made between different POD structures. *Oncogene*, 23(27), 4662–4672.
- Guccione E, Pim D, & Banks L 2004b. HPV-18 E6*I modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 110(6), 928–933.
- Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, et al. 1998. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Journal of Clinical Investigation*, 102(11), 2002-2010.
- Guess JC, & McCance DJ 2005. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3alpha production. *Journal of*

Virology, 79(23), 14852–14862.

- Gulliver GA, Herber RL, Liem A, & Lambert PF 1997. Both conserved region 1 (CR1) and CR2 of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene are required for induction of epidermal hyperplasia and tumor formation in transgenic mice. *Journal of Virology*, 71(8), 5905-5914.
- Gumbiner B, Lowenkopf T, & Apatira D 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(8), 3460-3464.

Gumbiner BM 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell, 84(3), 345-357.

Gumbiner BM 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. The Journal of Cell Biology, 148(3), 399-404.

- Gumbiner B 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(8), 622-634.
- Gupta S, Takhar PPS, Degenkolbe R, et al. 2003. The human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell-cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. *Virology*, 317(1), 155–164.
- Gustavson MD, Crawford HC, Fingleton B, & Matrisian LM 2004. Tcf binding sequence and position determines beta-catenin and Lef-1 responsiveness of MMP-7 promoters. *Molecular Carcinogenesis*, 41(3), 125-139.
- Habig M, Smola H, Dole VS, et al. 2006. E7 proteins from high- and low-risk human papillomaviruses bind to TGF-beta-regulated Smad proteins and inhibit their transcriptional activity. *Archives of Virology*, 151(10), 1961-1972.
- Hafkamp H, Manni J, Haesevoets A, et al. 2008. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*, 122(12), 2656-2664.
- Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SMH, et al. 2009. P21 Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(5), 686-698.
- Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, et al. 2003. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. International Journal of Cancer, Journal International Du Cancer, 107(3), 394-400.
- Häfner N, Driesch C, Gajda M, et al. 2008. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*, 27(11), 1610-7.
- Hagensee ME, Yaegashi N, & Galloway DA 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *Journal of Virology*, 67(1), 315-322.
- Hajra KM, Chen DY, & Fearon ER 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Research, 62(6), 1613-1618.
- Halbleib JM, & Nelson WJ 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes & Development, 20(23), 3199-3214.
- Hall M, Young DA, Waters JG, et al. 2003. The Comparative Role of Activator Protein 1 and Smad Factors in the Regulation of Timp-1 and MMP-1 Gene Expression by Transforming Growth Factor-beta 1. J. Biol. Chem., 278(12), 10304-10313.
- Hall WS, Goto-Mandeville R, Shih HA, et al. 1997. Molecular analysis of episomal human papillomavirus type 16 DNA in a cervical carcinoma cell line. *Virus Research*, 51(2), 183-195.
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. 2003. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV [alpha]3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via [alpha]V[beta]3 integrin. *Cancer Cell*, 3(6), 589-601.
- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, et al. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 455-461.
- Hanahan D, & Weinberg RA 2000. The hallmarks of cancer. Cell, 100(1), 57-70.
- Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, et al. 2007. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *Journal of Virology*, 81(3), 1379–1389.
- Hansen CN, Ketabi Z, Rosenstierne MW, et al. 2009. Expression of CPEB, GAPDH and U6snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 117(1), 53-59.
- Harrell PC, McCawley LJ, Fingleton B, et al. 2005. Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells. *Experimental Cell Research*, 303(2), 308-320.
- Hasskarl J, Butz K, Whitaker N, et al. 2000. Differential cell cycle response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomaviruspositive keratinocytes towards transforming growth factor-beta1. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 78(2), 94-101.
- Havard L, Rahmouni S, Boniver J, & Delvenne P 2005. High levels of p105 (NFKB1) and p100 (NFKB2) proteins in HPV16-

transformed keratinocytes: role of E6 and E7 oncoproteins. Virology, 331(2), 357-366.

- Havre PA, Yuan J, Hedrick L, et al. 1995. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Research*, 55(19), 4420–4424.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, et al. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO Journal*, 8(12), 3905-3910.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, et al. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS Letters*, 298(1), 29-32.
- He W, Staples D, Smith C, & Fisher C 2003. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. Journal of Virology, 77(19), 10566–10574.
- Heck DV, Yee CL, Howley PM, & Münger K 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4442-4446.
- Hegde RS 2002. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 31, 343-360.
- Heilman SA, Nordberg JJ, Liu Y, et al. 2009. Abrogation of the postmitotic checkpoint contributes to polyploidization in human papillomavirus E7-expressing cells. *Journal of Virology*, 83(6), 2756-2764.
- Heiskala M, Peterson PA, & Yang Y 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(2), 93-98.
- Hellner K, Mar J, Fang F, et al. 2009a. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology*, 391(1), 57-63.
- Hellner K, Mar J, Fang F, et al. 2009b. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology*, 391(1), 57-63.
- Hellung Schønning B, Bévort M, Mikkelsen S, et al. 2000. Human papillomavirus type 16 E7-regulated genes: regulation of S100P and ADP/ATP carrier protein genes identified by differential-display technology. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 4), 1009-1015.
- Helt A, Funk JO, & Galloway DA 2002. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *Journal of Virology*, 76(20), 10559-10568.
- Hemavathy K, Guru SC, Harris J, et al. 2000. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 5087-5095.
- Heng B, Glenn WK, Ye Y, et al. 2009. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 101(8), 1345-1350.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, et al. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(3), 1218–1223.
- Hengstermann A, D'silva MA, Kuballa P, et al. 2005. Growth suppression induced by downregulation of E6-AP expression in human papillomavirus-positive cancer cell lines depends on p53. *Journal of Virology*, 79(14), 9296–9300.
- Herber R, Liem A, Pitot H, & Lambert PF 1996. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Journal of Virology*, 70(3), 1873-1881.
- Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, et al. 2001. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 107(9), 1117-1126.
- Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, et al. 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(23), 1772-1783.
- Higashi S, & Miyazaki K 2003. Novel Processing of β -Amyloid Precursor Protein Catalyzed by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Releases a Fragment Lacking the Inhibitor Domain against Gelatinase A⁺. *Biochemistry*, 42(21), 6514-6526.
- Higgins S, Wong SHX, Richner M, et al. 2009. Fibroblast growth factor 2 reactivates G1 checkpoint in SK-N-MC cells via regulation of p21, inhibitor of differentiation genes (Id1-3), and epithelium-mesenchyme transition-like events. *Endocrinology*, 150(9), 4044-4055.
- Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, et al. 2003. JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(12), 4267-4282.
- Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, et al. 2008. Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Cancer Research*, 68(23), 9964-9972.

- Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, & Lambert PF 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Journal of Virology*, 79(7), 3938-3948.
- Holt SE, Schuller G, & Wilson VG 1994. DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *Journal of Virology*, 68(2), 1094-1102.
- Hoos A, D'Incan C, Gissmann L, et al. 1996. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) E7 and major histocompatibility complex (MHC) class I and II expression in human keratinocytes in culture. *Archives of Virology*, 141(3-4), 449-458.
- Hoppe-Seyler F, & Butz K 1993. Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human mdm-2, and mutant p53. *Journal of Virology*, 67(6), 3111–3117.
- Hoschuetzky H, Aberle H, & Kemler R 1994. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), 1375-1380.
- Howes KA, Ransom N, Papermaster DS, et al. 1994. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes & Development*, 8(11), 1300-1310.
- Hsu EM, & McNicol PJ 1992. Characterization of HPV-16 E6/E7 transcription in CaSki cells by quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 6(6), 459–466.
- Hu L, Plafker K, Vorozhko V, et al. 2009a. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology*, 384(1), 125-134.
- Hu Y, Ye F, Lu W, et al. 2009b. HPV16 E6-induced and E6AP-dependent inhibition of the transcriptional coactivator hADA3 in human cervical carcinoma cells. *Cancer Investigation*, 27(3), 298–306.
- Huang PS, Patrick DR, Edwards G, et al. 1993. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 953-960.
- Huang S, & McCance DJ 2002. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *Journal of Virology*, 76(17), 8710-8721.
- Hubbert NL, Sedman SA, & Schiller JT 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *Journal of Virology*, 66(10), 6237–6241.
- Hudson JB, Bedell MA, McCance DJ, & Laiminis LA 1990. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *Journal of Virology*, 64(2), 519–526.
- Huh K, Zhou X, Hayakawa H, et al. 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Virology*, 81(18), 9737-9747.
- Huh K, DeMasi J, Ogawa H, et al. 2005. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(32), 11492–11497.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, & Howley PM 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2563–2567.
- Huibregtse JM, Scheffner M, & Howley PM 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO Journal*, 10(13), 4129–4135.
- Huibregtse JM, Scheffner M, & Howley PM 1993. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4918–4927.
- Hurd TW, Fan S, Liu CJ, et al. 2003a. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. *Current Biology: CB*, 13(23), 2082-2090.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, et al. 2003b. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*, 5(2), 137-142.
- Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, et al. 1991. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), 570-574.
- Huwiler A, Akool E, Aschrafi A, et al. 2003. ATP Potentiates Interleukin-1{beta}-induced MMP-9 Expression in Mesangial Cells via Recruitment of the ELAV Protein HuR. J. Biol. Chem., 278(51), 51758-51769.
- Huxley-Jones J, Clarke T, Beck C, et al. 2007. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from Ciona intestinalis and Danio rerio. BMC Evolutionary Biology, 7(1), 63.
- Hwang SG, Lee D, Kim J, et al. 2002. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2923-2930.
- Ibaraki T, Satake M, Kurai N, et al. 1993. Transacting activities of the E7 genes of several types of human papillomavirus. Virus Genes,

7(2), 187-196.

- Ide A, Fujii M, Nakababashi K, & Ayusawa D 1998. Suppression of senescence in normal human fibroblasts by introduction of dominantnegative p53 mutants or human papilloma virus type 16 E6 protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(7), 1458– 1460.
- Iftner T, Elbel M, Schopp B, et al. 2002. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *The EMBO Journal*, 21(17), 4741–4748.
- Iglesias M, Yen K, Gaiotti D, et al. 1998. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. *Oncogene*, 17(10), 1195-1205.
- Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, et al. 2006. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 231(1), 20-27.
- Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, & Tsukita S 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci, 116(10), 1959-1967.
- Ikezoe T, Miller CW, Kawano S, et al. 2001. Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in human malignancies. *Cancer Research*, 61(13), 5307-5310.
- Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, & Lohi J 2006. Epilysin (MMP-28) induces TGF-{beta} mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci*, 119(18), 3856-3865.
- Imai Y, Tsunokawa Y, Sugimura T, & Terada M 1989. Purification and DNA-binding properties of human papillomavirus type 16 E6 protein expressed in Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164(3), 1402–1410.
- Incassati A, Patel D, & McCance DJ 2006. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene*, 25(17), 2444–2451.
- Inoue T, Oka K, Yong-Il H, et al. 1998. Dispensability of p53 degradation for tumorigenicity and decreased serum requirement of human papillomavirus type 16 E6. *Molecular Carcinogenesis*, 21(3), 215–222.
- Ishihara H, Kubota H, Lindberg RLP, et al. 2008. Endothelial cell barrier impairment induced by glioblastomas and transforming growth factor beta2 involves matrix metalloproteinases and tight junction proteins. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(5), 435-448.
- Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, et al. 1992. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *The EMBO Journal*, 11(6), 2271-2281.
- Ishiwatari H, Hayasaka N, Inoue H, et al. 1994. Degradation of p53 only is not sufficient for the growth stimulatory effect of human papillomavirus 16 E6 oncoprotein in human embryonic fibroblasts. *Journal of Medical Virology*, 44(3), 243–249.
- Islas S, Vega J, Ponce L, & González-Mariscal L 2002. Nuclear Localization of the Tight Junction Protein ZO-2 in Epithelial Cells. Experimental Cell Research, 274(1), 138-148.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, et al. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1351-1363.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, et al. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 154(3), 491-497.
- Itoh Y, & Seiki M 2006. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. Journal of Cellular Physiology, 206(1), 1-8.
- Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, et al. 2004. Frequent hypermethylation of 5prime flanking region of <I>TIMP-2</I> gene in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 108(6), 882-886.
- Jabbar SF, Abrams L, Glick A, & Lambert PF 2009. Persistence of high-grade cervical dysplasia and cervical cancer requires the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Cancer Research*, 69(10), 4407-4414.
- Jakubícková L, Baráthová M, Pastoreková S, et al. 2005. Expression of S100P gene in cervical carcinoma cells is independent of E7 human papillomavirus oncogene. *Acta Virologica*, 49(2), 133–137.
- James MA, Lee JH, & Klingelhutz AJ 2006a. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *Journal of Virology*, 80(11), 5301–5307.
- James MA, Lee JH, & Klingelhutz AJ 2006b. HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 119(8), 1878– 1885.
- Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, & Chen YH 2003. Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 49(1), 13-21.
- Jenuwein T, & Allis CD 2001. Translating the histone code. Science (New York, N.Y.), 293(5532), 1074-1080.

- Jeon J, Cho S, Kim C, et al. 2006. Alteration of Rb binding to HPV 18 E7 modified by transglutaminase 2 with different type of polyamines. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, 1540-1548.
- Jeon J, Choi K, Cho S, et al. 2003. Transglutaminase 2 inhibits Rb binding of human papillomavirus E7 by incorporating polyamine. *The EMBO Journal*, 22(19), 5273-5282.
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, & Lambert PF 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*, 69(5), 2989-2997.
- Jeon S, & Lambert PF 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1654-1658.
- Jeong Seo E, Jung Kim H, Jae Lee C, et al. 2004. The role of HPV oncoproteins and cellular factors in maintenance of hTERT expression in cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 94(1), 40-47.
- Jeong KW, Kim H, Kim S, et al. 2007. Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulatorassociated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene*, 26(4), 487–499.
- Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, et al. 1992. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *Journal of Virology*, 66(3), 1329-1335.
- Jian Y, Schmidt-Grimminger DC, Chien WM, et al. 1998. Post-transcriptional induction of p21cip1 protein by human papillomavirus E7 inhibits unscheduled DNA synthesis reactivated in differentiated keratinocytes. *Oncogene*, 17(16), 2027-2038.
- Jian Y, Van Tine BA, Chien WM, et al. 1999. Concordant induction of cyclin E and p21cip1 in differentiated keratinocytes by the human papillomavirus E7 protein inhibits cellular and viral DNA synthesis. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(2), 101-111.
- Jiang M, & Milner J 2002. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, 21(39), 6041-6048.
- Johansson A, Driessens M, & Aspenstrom P 2000. The mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Journal of Cell Science*, 113(18), 3267-3275.
- Johnson JA, Hochkeppel HK, & Gangemi JD 1999. IFN-tau exhibits potent suppression of human papillomavirus E6/E7 oncoprotein expression. Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 19(10), 1107-1116.
- Johung K, Goodwin EC, & DiMaio D 2007. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. *Journal of Virology*, 81(5), 2102-2116.
- Jones DL, Alani RM, & Münger K 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development*, 11(16), 2101-2111.
- Jones DL, & Münger K 1997. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Journal of Virology*, 71(4), 2905-2912.
- Jones DL, Thompson DA, & Münger K 1997. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*, 239(1), 97-107.
- Jones DL, Thompson DA, Suh-Bürgmann E, et al. 1999. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology*, 258(2), 406-414.
- Jones PA, & Takai D 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science (New York, N.Y.), 293(5532), 1068-1070.
- Jones RE, Heimbrook DC, Huber HE, et al. 1992. Specific N-methylations of HPV-16 E7 peptides alter binding to the retinoblastoma suppressor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 908–912.
- Jones RE, Wegrzyn RJ, Patrick DR, et al. 1990. Identification of HPV-16 E7 peptides that are potent antagonists of E7 binding to the retinoblastoma suppressor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 12782-12785.
- Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, et al. 2009. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(4). Available at: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-66349112294&partnerID=40 [Accessed August 30, 2009].
- Kadaja M, Sumerina A, Verst T, et al. 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO Journal*, 26(8), 2180-2191.
- Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, et al. 2009. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000397.
- Kadaja M, Sumerina A, Verst T, et al. 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication

machinery. The EMBO Journal, 26(8), 2180-2191.

- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. 2001. Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Cleaves CD44 and Promotes Cell Migration. J. Cell Biol., 153(5), 893-904.
- Kamberov E, Makarova O, Roh M, et al. 2000. Molecular Cloning and Characterization of Pals, Proteins Associated with mLin-7. Journal of Biological Chemistry, 275(15), 11425-11431.
- Kamio M, Yoshida T, Ogata H, et al. 2004. SOCS1 [corrected] inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein. *Oncogene*, 23(17), 3107–3115.
- Kämmer C, Tommasino M, Syrjänen S, et al. 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *British Journal of Cancer*, 86(2), 269–273.
- Kämper N, Day PM, Nowak T, et al. 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of Virology*, 80(2), 759-768.
- Kanda T, Furuno A, & Yoshiike K 1988. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *Journal of Virology*, 62(2), 610-613.
- Kanda T, Watanabe S, Zanma S, et al. 1991. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metalbinding motif. *Virology*, 185(2), 536–543.
- Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL, et al. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitinprotein ligase. *Journal of Virology*, 74(14), 6408–6417.
- Karin M, Liu ZG, & Zandi E 1997. AP-1 function and regulation. Current Opinion in Cell Biology, 9(2), 240-246.
- Kartenbeck J, Schmelz M, Franke WW, & Geiger B 1991. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca2+ ion medium. *The Journal of Cell Biology*, 113(4), 881-892.
- Katich SC, Zerfass-Thome K, & Hoffmann I 2001. Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. Oncogene, 20(5), 543-550.
- Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, et al. 2007. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *Journal of Virology*, 81(8), 3786–3796.
- Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, & Galloway DA 2009. NFX1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes. *Journal of Virology*, 83(13), 6446–6456.
- Kaufmann WK, Schwartz JL, Hurt JC, et al. 1997. Inactivation of G2 checkpoint function and chromosomal destabilization are linked in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6. Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research, 8(10), 1105–1114.
- Kaur P, McDougall JK, & Cone R 1989. Immortalization of primary human epithelial cells by cloned cervical carcinoma DNA containing human papillomavirus type 16 E6/E7 open reading frames. *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 5), 1261–1266.
- Kawakatsu T, Ogita H, Fukuhara T, et al. 2005. Vav2 as a Rac-GDP/GTP exchange factor responsible for the nectin-induced, c-Src- and Cdc42-mediated activation of Rac. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4940-4947.
- Kawakatsu T, Shimizu K, Honda T, et al. 2002. Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50749-50755.
- Kaznelson DW, Bruun S, Monrad A, et al. 2004. Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and cdk inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. *Virology*, 320(2), 301–312.
- Kehmeier E, Rühl H, Voland B, et al. 2002. Cellular steady-state levels of "high risk" but not "low risk" human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities. Virology, 299(1), 72–87.
- Kelley MJ, Otterson GA, Kaye FJ, et al. 1995. CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical-carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 63(2), 226-230.
- Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, & Huibregtse JM 2005. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *Journal of Virology*, 79(6), 3737–3747.
- Kennedy IM, Haddow JK, & Clements JB 1991. A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *Journal of Virology*, 65(4), 2093-2097.
- Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, et al. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 3988–3992.
- Kim HJ, Guo W, & Park NH 2000. HPV-16 E6 oncoprotein induces mutations via p53-dependent and -independent pathways. Oncology Reports, 7(4), 707–712.

- Kim HJ, Kim MY, Jin H, et al. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} regulates extracellular matrix and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the activation of transforming growth factor-{beta}1/Smad3. Circulation Research, 105(1), 16-24.
- Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, et al. 2003. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *Journal of Virology*, 77(23), 12450-12459.
- Kim M, Shin J, Eun HC, & Chung JH 2009. The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PloS One*, 4(3), e4864.
- Kim S, Juhnn Y, Kang S, et al. 2006. Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(7), 930-938.
- Kim S, Koo B, Kang S, et al. 2007. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*, 120(7), 1418-1425.
- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, et al. 1997. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology*, 232(1), 53–61.
- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, et al. 1996. Human papillomavirus type 16 E6 protein up-regulates the expression of the high mobility group protein HMG-I(Y) gene in mouse 10T1/2 cells. *Virus Research*, 42(1-2), 119–125.
- Kivi N, Greco D, Auvinen P, & Auvinen E 2007. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*, 27(18), 2532-2541.
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 396(6706), 84-88.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, et al. 1997. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(21), 11612–11616.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. 2001. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 92(2), 276-284.
- Kleine-Lowinski K, Rheinwald JG, Fichorova RN, et al. 2003. Selective suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in human cervical epithelial and epidermal cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 107(3), 407–415.
- Klingelhutz AJ, Foster SA, & McDougall JK 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569), 79–82.
- Klingelhutz AJ, Qian Q, Phillips SL, et al. 2005. Amplification of the chromosome 20q region is associated with expression of HPV-16 E7 in human airway and anogenital epithelial cells. *Virology*, 340(2), 237–244.
- Klose RJ, & Bird AP 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends in Biochemical Sciences, 31(2), 89-97.
- Klussmann J, Weissenborn S, Wieland U, et al. 2001. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, 92(11), 2875-2884.
- Knappe M, Bodevin S, Selinka H, et al. 2007. Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27913-27922.
- von Knebel Doeberitz M, Spitkovsky D, & Ridder R 1997. Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Pathologie, 81, 233-239.
- von Knebel DM 2002. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *EurJ Cancer*, 38(17), 2229-2242.
- Koenig A, Mueller C, Hasel C, et al. 2006. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Research*, 66(9), 4662-4671.
- Kösel S, Burggraf S, Engelhardt W, & Olgemöller B 2007. Increased levels of HPV16 E6*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification. *Cytopathology: Official Journal of the British Society* for Clinical Cytology, 18(5), 290-299.
- Koskinen W, Chen R, Leivo I, et al. 2003. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*, 107(3), 401-406.
- Kouzarides T 2007. Chromatin modifications and their function. Cell, 128(4), 693-705.
- Krämer F, White K, Kubbies M, et al. 2000. Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Human Genetics*, 107(3), 249-256.

- Krawczyk E, Hanover JA, Schlegel R, & Suprynowicz FA 2008a. Karyopherin [beta]3: A new cellular target for the HPV-16 E5 oncoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), 684-688.
- Krawczyk E, Suprynowicz FA, Liu X, et al. 2008b. Koilocytosis: A Cooperative Interaction between the Human Papillomavirus E5 and E6 Oncoproteins. *Am J Pathol*, 173(3), 682-688.
- Kuballa P, Matentzoglu K, & Scheffner M 2007. The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ domain-containing proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 65–71.
- Kühne C, & Banks L 1998. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34302–34309.
- Kühne C, Gardiol D, Guarnaccia C, et al. 2000. Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene*, 19(51), 5884–5891.
- Kukimoto I, Aihara S, Yoshiike K, & Kanda T 1998. Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(1), 258–262.
- Kumar A, Zhao Y, Meng G, et al. 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. Molecular and Cellular Biology, 22(16), 5801–5812.
- Kuner R, Vogt M, Sultmann H, et al. 2007. Identification of cellular targets for the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes by RNA interference and transcriptome analyses. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 85(11), 1253–1262.
- Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, et al. 2008. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinomamolecular basis and predicting favorable outcome. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(4), 376-386.
- Kuo Y, Su C, Liu C, et al. 2009. Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *International Journal of Cancer. Journal International* Du Cancer, 124(11), 2568-2576.
- Kuroda M, Kiyono T, Oikawa K, et al. 2005. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. *British Journal of Cancer*, 92(2), 290–293.
- Kusama T, Mukai M, Tatsuta M, et al. 2003. Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(6), 561-567.
- Ladd AN, & Cooper TA 2002. Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. Genome Biology, 3(11), reviews0008.
- Lagrange M, Charbonnier S, Orfanoudakis G, et al. 2005. Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 4), 1001–1007.
- Lambert PF 1991. Papillomavirus DNA replication. Journal of Virology, 65(7), 3417-3420.
- Lamberti C, Morrissey LC, Grossman SR, & Androphy EJ 1990. Transcriptional activation by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein. *The EMBO Journal*, 9(6), 1907–1913.
- Laniosz V, Holthusen KA, & Meneses PI 2008. Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *Journal of Virology*, 82(13), 6288-6298.
- Laurendeau I, Bahuau M, Vodovar N, et al. 1999. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clinical Chemistry*, 45(7), 982-6.
- Lawson JS, Glenn WK, Heng B, et al. 2009. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. British Journal of Cancer, 101(8), 1351-1356.
- Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, et al. 1999a. HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 53(9), 424-431.
- Le Buanec H, Lachgar A, D'Anna R, et al. 1999b. Induction of cellular immunosuppression by the human papillomavirus type 16 E7 oncogenic protein. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 53(7), 323-328.
- Le Roux LG, & Moroianu J 2003. Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *Journal of Virology*, 77(4), 2330-2337.
- Le TL, Yap AS, & Stow JL 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 146(1), 219-232.
- Lea JS, Sunaga N, Sato M, et al. 2007. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 14(1), 20-28.
- Lechner MS, & Laimins LA 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. Journal of Virology, 68(7), 4262-

4273.

- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, et al. 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *The EMBO Journal*, 11(8), 3045–3052.
- Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, et al. 2001. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 817-829.
- Lee C, Wooldridge TR, & Laimins LA 2007. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. *Virology*, 358(1), 201–210.
- Lee DK, Kim B, Kim IY, et al. 2002. The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38557-38564.
- Lee JO, Russo AA, & Pavletich NP 1998. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*, 391(6670), 859-865.
- Lee K, Shim J, Kho CW, et al. 2004. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics. *Proteomics*, 4(3), 839–848.
- Lee SJ, Cho YS, Cho MC, et al. 2001. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(1), 497-504.
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, et al. 2000. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *Journal of Virology*, 74(20), 9680–9693.
- Lee WT, Lee SH, Carriedo SG, et al. 2002. UV-vulnerability of human papilloma virus type-16 E7-expressing astrocytes is associated with mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation. *Molecules and Cells*, 14(2), 288-294.
- Leechanachai P, Banks L, Moreau F, & Matlashewski G 1992. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*, 7(1), 19-25.
- Legatt GR, Dunn LA, De Kluyver RL, et al. 2002. Interferon-gamma enhances cytotoxic T lymphocyte recognition of endogenous peptide in keratinocytes without lowering the requirement for surface peptide. *Immunology and Cell Biology*, 80(5), 415-424.
- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, et al. 2004. CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1324-1333.
- Lentz MR, Pak D, Mohr I, & Botchan MR 1993. The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site. *Journal of Virology*, 67(3), 1414-1423.
- Leong KG, Niessen K, Kulic I, et al. 2007. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Sluginduced repression of E-cadherin. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 2935-2948.
- Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, et al. 2003. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell, 115(7), 787-798.
- Li D, & Mrsny RJ 2000. Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. *The Journal of Cell Biology*, 148(4), 791-800.
- Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, et al. 1998. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene*, 16(21), 2711-2721.
- Li S, Moy L, Pittman N, et al. 1999a. Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7803-7815.
- Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, et al. 1999b. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene*, 18(42), 5727–5737.
- Li S, Liu P, Xi L, et al. 2008a. Expression of TMEM87B interacting with the human papillomavirus type 18 E6 oncogene in the Hela cDNA library by a yeast two-hybrid system. *Oncology Reports*, 20(2), 421–427.
- Li S, Liu P, Xi L, et al. 2008b. Screening for novel binding proteins interacting with human papillomavirus type 18 E6 oncogene in the Hela cDNA library by yeast two-hybrid system. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 28(1), 93–96.
- Li X, & Coffino P 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of Virology*, 70(7), 4509–4516.
- Liang XH, Volkmann M, Klein R, et al. 1993. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*, 8(10), 2645–2652.
- Libra M, Scalisi A, Vella N, et al. 2009. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). International Journal of Oncology, 34(4), 897-903.

- Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, et al. 2006. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. Virology, 350(1), 216-27.
- Lilien J, Balsamo J, Arregui C, & Xu G 2002. Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 224(1), 18-29.
- Lin C, Chang H, & Yu WCY 2008. USP11 stabilizes HPV-16E7 and further modulates the E7 biological activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15681-15688.
- Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, et al. 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biology*, 2(8), 540-547.
- Lin H, Hsieh F, Song H, & Lin J 2005. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. British Journal of Cancer, 93(12), 1372-1381.
- Lindel K, Beer KT, Laissue J, et al. 2001. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*, 92(4), 805-13.
- Linggi B, & Carpenter G 2006. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. Trends in Cell Biology, 16(12), 649-656.
- Lipari F, McGibbon GA, Wardrop E, & Cordingley MG 2001. 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*, 40(5), 1196–1204.
- Liu HC, Chen GG, Vlantis AC, et al. 2008. Inhibition of apoptosis in human laryngeal cancer cells by E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(4), 1125–1143.
- Liu JS, Kuo SR, Makhov AM, et al. 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30704-30712.
- Liu S, Yang J, Shao K, & Chueh PJ 2008. RNA interference targeting tNOX attenuates cell migration via a mechanism that involves membrane association of Rac. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(4), 672-677.
- Liu X, Clements A, Zhao K, & Marmorstein R 2006. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 578–586.
- Liu X, Dakic A, Zhang Y, et al. 2009. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843693.
- Liu X, Disbrow GL, Yuan H, et al. 2007. Myc and human papillomavirus type 16 E7 genes cooperate to immortalize human keratinocytes. Journal of Virology, 81(22), 12689-12695.
- Liu X, Roberts J, Dakic A, et al. 2008. HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*, 375(2), 611-623.
- Liu X, Yuan H, Fu B, et al. 2005. The E6AP ubiquitin ligase is required for transactivation of the hTERT promoter by the human papillomavirus E6 oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10807–10816.
- Liu Y, Chen JJ, Gao Q, et al. 1999. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 73(9), 7297–7307.
- Liu Y, Heilman SA, Illanes D, et al. 2007a. p53-independent abrogation of a postmitotic checkpoint contributes to human papillomavirus E6-induced polyploidy. *Cancer Research*, 67(6), 2603–2610.
- Liu Y, Henry GD, Hegde RS, & Baleja JD 2007b. Solution structure of the hDlg/SAP97 PDZ2 domain and its mechanism of interaction with HPV-18 papillomavirus E6 protein. *Biochemistry*, 46(38), 10864–10874.
- Liu Z, Ghai J, Ostrow RS, & Faras AJ 1995. The expression levels of the human papillomavirus type 16 E7 correlate with its transforming potential. *Virology*, 207(1), 260-270.
- Liu Z, Ghai J, Ostrow RS, et al. 1994. The E6 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for transformation of baby rat kidney cells in cotransfection with activated Ha-ras. *Virology*, 201(2), 388–396.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, et al. 1997a. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), 1861-1872.
- Lochter A, Srebrow A, Sympson CJ, et al. 1997b. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5007-5015.
- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, & Parks WC 2001. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. J. Biol. Chem., 276(13), 10134-10144.

- Longworth MS, Wilson R, & Laimins LA 2005. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO Journal*, 24(10), 1821–1830.
- Loo Y, & Melendy T 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *Journal of Virology*, 78(4), 1605-1615.
- Lopez-Bayghen E, Jaramillo B, Huerta M, et al. 2006. TJ Proteins That Make Round Trips to the Nucleus. In *Tight Junctions*. pp. 76-100. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/0-387-36673-3_7 [Accessed September 2, 2009].
- López-Ocejo O, Viloria-Petit A, Bequet-Romero M, et al. 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene*, 19(40), 4611–4620.
- López-Otín C, & Matrisian LM 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. Nature Reviews. Cancer, 7(10), 800-808.
- Lu Z, Hu X, Li Y, et al. 2004. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35664–35670.
- Luca AD, Mangiacasale R, Severino A, et al. 2003. E1A deregulates the centrosome cycle in a Ran GTPase-dependent manner. *Cancer Research*, 63(6), 1430–1437.
- Lüscher-Firzlaff JM, Westendorf JM, Zwicker J, et al. 1999. Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene*, 18(41), 5620-5630.
- Ma Z, Chang MJ, Shah RC, & Benveniste EN 2005. Interferon-gamma-activated STAT-1alpha suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/p300. Journal of Leukocyte Biology, 78(2), 515-523.
- Magal SS, Jackman A, Pei XF, et al. 1998. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *International Journal of Cancer, Journal International Du Cancer*, 75(1), 96-104.
- Magal SS, Jackman A, Ish-Shalom S, et al. 2005. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 3), 611–621.
- Makarova O, Roh MH, Liu C, et al. 2003. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, 302(1-2), 21-29.
- Maldonado E, Cabrejos ME, Banks L, & Allende JE 2002. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(4), 663-669.
- Mallette FA, Goumard S, Gaumont-Leclerc M, et al. 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene*, 23(1), 91-99.
- Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, et al. 1999. Ponsin/SH3P12: an l-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cellmatrix adherens junctions. *The Journal of Cell Biology*, 144(5), 1001-1017.
- Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, et al. 1997. Afadin: A Novel Actin Filament-binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junction. J. Cell Biol., 139(2), 517-528.
- Mandell KJ, & Parkos CA 2005. The JAM family of proteins. Advanced Drug Delivery Reviews, 57(6), 857-867.
- Mandicourt G, Iden S, Ebnet K, et al. 2007. JAM-C regulates tight junctions and integrin-mediated cell adhesion and migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1830-1837.
- Mannhardt B, Weinzimer SA, Wagner M, et al. 2000. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growthinhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6483-6495.
- Mansur CP, Marcus B, Dalal S, & Androphy EJ 1995. The domain of p53 required for binding HPV 16 E6 is separable from the degradation domain. *Oncogene*, 10(3), 457–465.
- Mantovani F, & Banks L 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene, 20(54), 7874-7887.
- Manzanares M, Locascio A, & Nieto MA 2001. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends in Genetics: TIG*, 17(4), 178-181.
- Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, et al. 2004. [beta]-Catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), 942-956.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, et al. 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9182-9187.
- Marrero-Diaz R, Bravo-Cordero JJ, Megías D, et al. 2009. Polarized MT1-MMP-CD44 interaction and CD44 cleavage during cell retraction reveal an essential role for MT1-MMP in CD44-mediated invasion. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(1), 48-61.

- Marston NJ, Crook T, & Vousden KH 1994. Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function. *Oncogene*, 9(9), 2707–2716.
- Marston NJ, Jenkins JR, & Vousden KH 1995. Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6. *Oncogene*, 10(9), 1709–1715.
- Martin LG, Demers GW, & Galloway DA 1998. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. Journal of Virology, 72(2), 975-985.
- Martin MD, & Matrisian LM 2007. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(3-4), 717-724.
- Martin TA, & Jiang WG 2009. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(4), 872-891.
- Martinez-Rico C, Pincet F, Perez E, et al. 2005. Separation force measurements reveal different types of modulation of E-cadherin-based adhesion by nectin-1 and -3. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4753-4760.
- Marur S, & Forastiere AA 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic*, 83(4), 489-501.
- Massimi P, & Banks L 1997. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. Virology, 227(1), 255-259.
- Massimi P, & Banks L 2000. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. Virology, 276(2), 388-394.
- Massimi P, Pim D, & Banks L 1997. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 10), 2607-2613.
- Massimi P, Pim D, Storey A, & Banks L 1996. HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. *Oncogene*, 12(11), 2325-2330.
- Massimi P, Narayan N, Cuenda A, & Banks L 2006. Phosphorylation of the discs large tumour suppressor protein controls its membrane localisation and enhances its susceptibility to HPV E6-induced degradation. *Oncogene*, 25(31), 4276–4285.
- Massimi P, Shai A, Lambert P, & Banks L 2008. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. Oncogene, 27(12), 1800–1804.
- Massimi P, Gammoh N, Thomas M, & Banks L 2004. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 23(49), 8033–8039.
- Masson M, Hindelang C, Sibler A, et al. 2003. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 8), 2099–2104.
- Matlashewski G, Schneider J, Banks L, et al. 1987. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *The EMBO Journal*, 6(6), 1741-1746.
- Matsumoto Y, Nakagawa S, Yano T, et al. 2006. Involvement of a cellular ubiquitin-protein ligase E6AP in the ubiquitin-mediated degradation of extensive substrates of high-risk human papillomavirus E6. *Journal of Medical Virology*, 78(4), 501–507.
- Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, et al. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 118(3), 703-714.
- Matter K, & Balda MS 2007. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. J Cell Sci, 120(9), 1505-1511.
- Matthews K, Leong CM, Baxter L, et al. 2003. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *Journal of Virology*, 77(15), 8378–8385.
- Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, et al. 2002. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *The British Journal of Nutrition*, 87 Suppl 1, S23-29.
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, & Eigenbrodt E 2001a. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *The Biochemical Journal*, 356(Pt 1), 247-256.
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, & Eigenbrodt E 2001b. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene*, 20(47), 6891-6898.
- Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, & Eigenbrodt E 2005. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4), 300-308.
- McBride AA, Romanczuk H, & Howley PM 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(28), 18411-18414.
- McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, & Laimins LA 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *Journal of Virology*, 67(6), 3142-3150.
- McIntyre MC, Ruesch MN, & Laimins LA 1996. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*, 215(1), 73-82.
- McLaughlin-Drubin ME, Bromberg-White JL, & Meyers C 2005. The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle. *Virology*, 338(1), 61–68.
- McLaughlin-Drubin ME, Huh K, & Münger K 2008. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. Journal of Virology, 82(17), 8695-8705.

McLaughlin-Drubin ME, & Münger K 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. Virology, 384(2), 335-44.

- McLaughlin-Drubin ME, & Munger K 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. Virology, 384(2), 335-344.
- McMurray HR, & McCance DJ 2003. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *Journal of Virology*, 77(18), 9852–9861.
- McMurray HR, & McCance DJ 2004. Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7. *Journal of Virology*, 78(11), 5698–5706.
- McNeil E, Capaldo CT, & Macara IG 2006. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1922-1932.
- Medcalf EA, & Milner J 1993. Targeting and degradation of p53 by E6 of human papillomavirus type 16 is preferential for the 1620+ p53 conformation. *Oncogene*, 8(10), 2847–2851.
- Médina E, Lemmers C, Lane-Guermonprez L, & Le Bivic A 2002. Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in Drosophila and mammalian epithelial cells. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 94(6), 305-313.
- Medina-Martínez O, Vallejo V, Guido MC, & García-Carrancá A 1997. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Molecular Carcinogenesis*, 19(2), 83-90.
- Medrek C, Landberg G, Andersson T, & Leandersson K 2009. Wnt-5a-CKI{alpha} signaling promotes {beta}-catenin/E-cadherin complex formation and intercellular adhesion in human breast epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10968-10979.
- Mehta AM, Jordanova ES, Corver WE, et al. 2009. Single nucleotide polymorphisms in antigen processing machinery component ERAP1 significantly associate with clinical outcome in cervical carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 48(5), 410-418.
- Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, et al. 2002. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 102(2), 152-158.
- Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, et al. 2004. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(9), 3059–3063.
- Menges CW, Baglia LA, Lapoint R, & McCance DJ 2006. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Research*, 66(11), 5555-5559.
- Mertens AEE, Pegtel DM, & Collard JG 2006. Tiam1 takes PARt in cell polarity. Trends in Cell Biology, 16(6), 308-316.
- Métais J, Navarro C, Santoni M, et al. 2005. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Letters*, 579(17), 3725-3730.
- Michel D, Arsanto J, Massey-Harroche D, et al. 2005. PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 17), 4049-4057.
- Middleton K, Peh W, Southern S, et al. 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of Virology*, 77(19), 10186-10201.
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, & Howley PM 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *The EMBO Journal*, 11(13), 5013–5020.
- Mileo AM, Abbruzzese C, Mattarocci S, et al. 2009. Human papillomavirus-16 E7 interacts with glutathione S-transferase P1 and enhances its role in cell survival. *PloS One*, 4(10), e7254.
- Mileo AM, Piombino E, Severino A, et al. 2006. Multiple interference of the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein with the functional role of the metastasis suppressor Nm23-H1 protein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(3-4), 215-225.
- Min W, Wen-li M, Zhao-hui S, et al. 2009. Microarray analysis identifies differentially expressed genes induced by human papillomavirus type 18 E6 silencing RNA. International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society, 19(4), 547-563.
- Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, et al. 2001. Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-

type matrix metalloproteinases. The Journal of Biological Chemistry, 276(30), 28204-28211.

- Molinari M, & Milner J 1995. p53 in complex with DNA is resistant to ubiquitin-dependent proteolysis in the presence of HPV-16 E6. Oncogene, 10(9), 1849–1854.
- Moody CA, Fradet-Turcotte A, Archambault J, & Laimins LA 2007. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19541-19546.
- Mori H, Tomari T, Koshikawa N, et al. 2002. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *The EMBO Journal*, 21(15), 3949-3959.
- Moro A, Calixto A, Suárez E, et al. 1998. Differential expression of the p27Kip1 mRNA in IFN-sensitive and resistant cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications, 245(3), 752-756.
- Morozov A, Shiyanov P, Barr E, et al. 1997. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *Journal of Virology*, 71(5), 3451-3457.
- Morris EJ, Ji J, Yang F, et al. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature*, 455(7212), 552-6.
- Moscicki A, Schiffman M, Kjaer S, & Villa LL 2006. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. Vaccine, 24 Suppl 3, S3/42-51.
- Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, et al. 2000. Post-translational Proteolytic Processing of Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer Releases a Metalloproteinase Inhibitor. J. Biol. Chem., 275(2), 1384-1390.
- Moustafa AA, Foulkes WD, Benlimame N, et al. 2004. E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. *Oncogene*, 23(2), 350–358.
- Münger K, Werness BA, Dyson N, et al. 1989a. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal*, 8(13), 4099-4105.
- Münger K, Phelps WC, Bubb V, et al. 1989b. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*, 63(10), 4417–4421.
- Münger K, & Howley PM 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Research, 89(2), 213-228.
- Murphy G, Segain J, O'Shea M, et al. 1993. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15435-15441.
- Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, & Reynolds JJ 1985. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology*, 831(1), 49-58.
- Murphy G, & Nagase H 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. Molecular Aspects of Medicine, 29(5), 290-308.
- Murvai M, Borbély AA, Kónya J, et al. 2004. Effect of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes on the activity of the transforming growth factor-beta2 (TGF-beta2) promoter. *Archives of Virology*, 149(12), 2379–2392.
- Muthuswamy SK, Gilman M, & Brugge JS 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6845-6857.
- Nagase H, & Woessner JF 1999. Matrix metalloproteinases. The Journal of Biological Chemistry, 274(31), 21491-21494.
- Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, et al. 2004. Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer*, 90(1), 194-199.
- Nakagawa S, & Huibregtse JM 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8244–8253.
- Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, et al. 1995. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro. *Virology*, 212(2), 535–542.
- Nakamura T, Blechman J, Tada S, et al. 2000. huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the Drosophila ash1 gene, localizes to both nuclei and cell–cell tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7284-7289.
- Narayan N, Subbaiah VK, & Banks L 2009. The high-risk HPV E6 oncoprotein preferentially targets phosphorylated nuclear forms of hDlg. Virology, 387(1), 1–4.
- Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, et al. 2007. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, 26(21), 2988–2996.
- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. 2009. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125(2),

362-366.

- Nasseri M, Hirochika R, Broker TR, & Chow LT 1987. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. Virology, 159(2), 433-439.
- Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, et al. 1999. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), 1182–1189.
- Nees M, Geoghegan JM, Munson P, et al. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Research*, 60(15), 4289-4298.
- Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML, & Münger K 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *Journal of Virology*, 81(24), 13533-13543.
- Nguyen CL, & Münger K 2008. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. Virology, 380(1), 21-25.
- Nguyen CL, & Münger K 2009. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. *Journal of Virology*, 83(4), 1700-1707.
- Nguyen DX, Westbrook TF, & McCance DJ 2002a. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. *Journal of Virology*, 76(2), 619-632.
- Nguyen M, Song S, Liem A, et al. 2002b. A mutant of human papillomavirus type 16 E6 deficient in binding alpha-helix partners displays reduced oncogenic potential in vivo. *Journal of Virology*, 76(24), 13039–13048.
- Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, et al. 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *Journal of Virology*, 77(12), 6957–6964.
- Nie M, Aijaz S, Leefa Chong San IV, et al. 2009. The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rhostimulated transcription. *EMBO Reports*, 10(10), 1125-1131.
- Niessen CM, & Gottardi CJ 2008. Molecular components of the adherens junction. Biochimica Et Biophysica Acta, 1778(3), 562-571.
- Nieto MA 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol, 3(3), 155-166.
- Nishimura A, Nakahara T, Ueno T, et al. 2006. Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 8(4), 984-993.
- Nishimura M, Kakizaki M, Ono Y, et al. 2002. JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5583-5587.
- Noë V, Fingleton B, Jacobs K, et al. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *Journal* of Cell Science, 114(Pt 1), 111-118.
- Noël A, Jost M, & Maquoi E 2008. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. Seminars in Cell & Developmental Biology, 19(1), 52-60.
- Noh KH, Kang TH, Kim JH, et al. 2009. Activation of Akt as a mechanism for tumor immune evasion. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(3), 439-447.
- Nominé Y, Charbonnier S, Miguet L, et al. 2005. 1H and 15N resonance assignment, secondary structure and dynamic behaviour of the Cterminal domain of human papillomavirus oncoprotein E6. *Journal of Biomolecular NMR*, 31(2), 129–141.
- Nominé Y, Charbonnier S, Ristriani T, et al. 2003. Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 Cterminal DNA-binding domain. *Biochemistry*, 42(17), 4909–4917.
- Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, et al. 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular Cell*, 21(5), 665–678.
- Noya F, Chien W, Broker T, & Chow L 2001. p21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *Journal of Virology*, 75(13), 6121-6134.
- Nuber U, Schwarz SE, & Scheffner M 1998. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. European Journal of Biochemistry / FEBS, 254(3), 643–649.
- Nuber U, Schwarz S, Kaiser P, et al. 1996. Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2795–2800.
- Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, et al. 2004. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Letters*, 563(1-3), 129-134.
- O'Connor M, Chan S, & Bernard H 2005. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. Available at: http://www.stdgen.lanl.gov/COMPENDIUM_PDF/95PDF/3/oconnor.pdf.

- **Obata A, Eura M, Sasaki J, et al.** 2000. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 89(2), 187-193.
- **Oberg D, Collier B, Zhao X, & Schwartz S** 2003. Mutational inactivation of two distinct negative RNA elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region induces production of high levels of L2 in human cells. *Journal of Virology*, 77(21), 11674-11684.
- O'Connor M, & Bernard HU 1995. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology*, 207(1), 77-88.
- **O'Connor MJ, Stünkel W, Koh CH, et al.** 2000. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *Journal of Virology*, 74(1), 401-410.
- O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, & Bernard HU 1996. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *Journal of Virology*, 70(10), 6529-6539.
- Oda D, Bigler L, Mao EJ, & Disteche CM 1996. Chromosomal abnormalities in HPV-16-immortalized oral epithelial cells. *Carcinogenesis*, 17(9), 2003-2008.
- Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, & Alonso A 1995. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *Journal of Virology*, 69(7), 4489-4494.
- Oetke C, Auvinen E, Pawlita M, & Alonso A 2000. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. Archives of Virology, 145(10), 2183-2191.
- Oh J, Kim S, Lee Y, et al. 2009. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(1), 141-149.
- Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. 2001. The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. *Cell*, 107(6), 789-800.
- Oh K, Kalinina A, Wang J, et al. 2004. The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by UbcH7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase. *Journal of Virology*, 78(10), 5338–5346.
- Oh ST, Kyo S, & Laimins LA 2001. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal of Virology*, 75(12), 5559–5566.
- **Ohbayashi T, Oikawa K, Yamada K, et al.** 2007. Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), 699-704.
- Ohno S 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5), 641-648.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, et al. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2446-2451.
- Oikawa K, Akiyoshi A, Tanaka M, et al. 2008. Expression of various types of alternatively spliced WAPL transcripts in human cervical epithelia. *Gene*, 423(1), 57-62.
- Oliveira S, & Morgado-Díaz J 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(1), 17-28.
- Ooshio T, Fujita N, Yamada A, et al. 2007. Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *Journal* of Cell Science, 120(Pt 14), 2352-2365.
- **Ooshio T, Irie K, Morimoto K, et al.** 2004. Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and alpha-actinin in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31365-31373.
- Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S, et al. 2001. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(8), 4385-4390.
- Overall CM, & Lopez-Otin C 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2(9), 657-672.
- Ozbun MA, & Meyers C 1996. Transforming growth factor beta1 induces differentiation in human papillomavirus-positive keratinocytes. *Journal of Virology*, 70(8), 5437-5446.
- **Ozbun MA, & Meyers C** 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *Journal of Virology*, 71(7), 5161-5172.
- Ozbun M, & Meyers C 1998a. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*, 248(2), 218-230.
- Ozbun M, & Meyers C 1998b. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. Journal of Virology, 72(4), 2715-2722.

- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, et al. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1603-1609.
- Pagano M, Dürst M, Joswig S, et al. 1992. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. Oncogene, 7(9), 1681-1686.
- Pai SI, & Westra WH 2009. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. Annual Review of Pathology, 4, 49-70.
- Palacios F, Schweitzer JK, Boshans RL, & D'Souza-Schorey C 2002. ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nature Cell Biology*, 4(12), 929-936.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, et al. 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 6764-6769.
- Park JS, Kim EJ, Lee JY, et al. 2001. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 91(6), 822–827.
- Park J, Venteicher AS, Hong JY, et al. 2009. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 460(7251), 66-72.
- Parks WC, Wilson CL, & Lopez-Boado YS 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 4(8), 617-629.
- Partridge M, Costea DE, & Huang X 2007. The changing face of p53 in head and neck cancer. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 36(12), 1123-1138.
- Patel D, Huang SM, Baglia LA, & McCance DJ 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO Journal*, 18(18), 5061–5072.
- Pater A, Belaguli NS, Gardner HA, et al. 1992. Glucocorticoid-dependent transformation by human papillomavirus type 16 E7 coding and 3' noncoding sequences. *Virology*, 188(1), 369-372.
- Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, et al. 1988. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papilloma virus DNA. *Nature*, 335(6193), 832-835.
- Patrie KM 2005. Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, 1745(1), 131-144.
- Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, & Murphy G 2001. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Letters*, 503(2-3), 158-162.
- van de Pavert SA, Kantardzhieva A, Malysheva A, et al. 2004. Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci*, 117(18), 4169-4177.
- Pawson T, & Nash P 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. Science (New York, N.Y.), 300(5618), 445-452.
- Peh W, Middleton K, Christensen N, et al. 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. Journal of Virology, 76(20), 10401-10416.
- Pei D, & Weiss SJ 1996. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(15), 9135-9140.
- Pei D, Kang T, & Qi H 2000. Cysteine Array Matrix Metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 Is a Type II Transmembrane Matrix Metalloproteinase Regulated by a Single Cleavage for Both Secretion and Activation. J. Biol. Chem., 275(43), 33988-33997.
- Pei D, & Weiss S 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature, 375(6528), 244-247.
- Pei XF, Sherman L, Sun YH, & Schlegel R 1998. HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis*, 19(8), 1481-1486.
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, & Cano A 2004. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 306-319.
- Peinado H, Quintanilla M, & Cano A 2003. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21113-21123.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, et al. 2005. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *The EMBO Journal*, 24(19), 3446-3458.
- Peinado H, Olmeda D, & Cano A 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews. Cancer*, 7(6), 415-428.

- Peinado H, Portillo F, & Cano A 2004. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), 365-375.
- Peinado H, Portillo F, & Cano A 2005. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 4(12), 1749-1752.
- Peitsaro P, Johansson B, & Syrjänen S 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 886-891.
- Peña C, García JM, García V, et al. 2006. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 119(9), 2098-2104.
- Perea SE, Massimi P, & Banks L 2000. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. International Journal of Molecular Medicine, 5(6), 661-666.
- Pereira R, Hitzeroth II, & Rybicki EP 2009. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. Archives of Virology, 154(2), 187-197.
- Pérez-Gallego L, Moreno-Bueno G, Sarrió D, et al. 2001. Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(1), 143–148.
- Perez-Moreno M, Jamora C, & Fuchs E 2003. Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell, 112(4), 535-548.
- Perez-Moreno M, & Fuchs E 2006. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. Developmental Cell, 11(5), 601-612.
- Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A, & Alatorre-Tavera B 2008. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *International Archives of Medicine*, 1(1), 10.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392(6672), 190-193.
- Perry ME 1994. The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *Journal of Anatomy*, 185 (Pt 1), 111-127.
- Pett MR, Alazawi WOF, Roberts I, et al. 2004. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Research*, 64(4), 1359–1368.
- Phelps WC, Yee CL, Münger K, & Howley PM 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, 53(4), 539-547.
- Phua DC, Humbert PO, & Hunziker W 2009. Vimentin Regulates Scribble Activity by Protecting It from Proteasomal Degradation. Mol. Biol. Cell, 20(12), 2841-2855.
- Piboonniyom S, Duensing S, Swilling NW, et al. 2003. Abrogation of the retinoblastoma tumor suppressor checkpoint during keratinocyte immortalization is not sufficient for induction of centrosome-mediated genomic instability. *Cancer Research*, 63(2), 476–483.
- Piedra J, Martinez D, Castano J, et al. 2001. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20436-20443.
- Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, et al. 1990. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell*, 61(5), 777-785.
- Pim D, & Banks L 1991. Loss of HPV-16 E7 dependence in cells transformed by HPV-16 E7 plus EJ-ras correlates with increased c-myc expression. Oncogene, 6(4), 589-594.
- Pim D, Collins M, & Banks L 1992. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, 7(1), 27-32.
- Pim D, Massimi P, & Banks L 1997. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. Oncogene, 15(3), 257-64.
- Pim D, & Banks L 1999. HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. Oncogene, 18(52), 7403–7408.
- Pim D, Massimi P, & Banks L 1997. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene*, 15(3), 257–264.
- Pim D, Storey A, Thomas M, et al. 1994. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*, 9(7), 1869–1876.
- Pim D, Massimi P, Dilworth SM, & Banks L 2005. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. Oncogene, 24(53), 7830–7838.

- Pim D, Tomaic V, & Banks L 2009. The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *Journal of Virology*, 83(19), 9863–9874.
- Pipas JM 2009. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. Virology, 384(2), 294-303.
- Plug-Demaggio AW, & McDougall JK 2002. The human papillomavirus type 16 E6 oncogene induces premature mitotic chromosome segregation. Oncogene, 21(49), 7507–7513.
- Poincloux R, Lizárraga F, & Chavrier P 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal* of Cell Science, 122(Pt 17), 3015-3024.
- Pokutta S, Drees F, Takai Y, et al. 2002. Biochemical and structural definition of the l-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18868-18874.
- Pokutta S, & Weis WI 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 23, 237-261.
- Pol SBV, Brown MC, & Turner CE 1998. Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*, 16(1), 43–52.
- Polette M, Gilles C, Nawrocki-Raby B, et al. 2005. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 65(17), 7691-7698.
- Polette M, & Birembaut P 1998. Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 30(11), 1195-1202.
- Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, et al. 2004. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 49(3), 179-186.
- Prathapam T, Kühne C, & Banks L 2001. The HPV-16 E7 oncoprotein binds Skip and suppresses its transcriptional activity. Oncogene, 20(52), 7677-7685.
- Primo L, di Blasio L, Roca C, et al. 2007. Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 176(7), 1035-1047.
- **Psyrri A, DeFilippis RA, Edwards APB, et al.** 2004. Role of the retinoblastoma pathway in senescence triggered by repression of the human papillomavirus E7 protein in cervical carcinoma cells. *Cancer Research*, 64(9), 3079–3086.
- Psyrri A, & DiMaio D 2008. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nature Clinical Practice. Oncology, 5(1), 24-31.
- Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, et al. 2003. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med*, 9(4), 407-415.
- Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, & Psyrri A 2009. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16positive oropharyngeal cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(6), 412-423.
- Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, & Fuxe J 2004. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 796-804.
- **Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, et al.** 2002. An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7377-7385.
- Regan JA, & Laimins LA 2008. Bap31 Is a Novel Target of the Human Papillomavirus E5 Protein. J. Virol., 82(20), 10042-10051.
- Reinstein E, Scheffner M, Oren M, et al. 2000. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*, 19(51), 5944-5950.
- Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, et al. 1999. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *The EMBO Journal*, 18(18), 5073-5084.
- Remm M, Remm A, & Ustav M 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *Journal of Virology*, 73(4), 3062-3070.
- Remontet L, Estève J, Bouvier A, et al. 2003. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique*, 51(1 Pt 1), 3-30.
- Resnick MB, Konkin T, Routhier J, et al. 2005. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18(4), 511-518.
- Reunanen N, Li S, Ahonen M, et al. 2002. Activation of p38alpha MAPK Enhances Collagenase-1 (Matrix Metalloproteinase (MMP)-1) and Stromelysin-1 (MMP-3) Expression by mRNA Stabilization. J. Biol. Chem., 277(35), 32360-32368.
- Rey O, Lee S, Baluda MA, et al. 2000a. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 interacts with F-actin in vitro and in vivo. *Virology*, 268(2), 372-381.

- Rey O, Lee S, & Park NH 2000b. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin. *Journal of Virology*, 74(10), 4912-4918.
- Reynolds AB, & Roczniak-Ferguson A 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. Oncogene, 23(48), 7947-7956.
- Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, et al. 2007. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slitinduced modulation of adhesion and transcription. *Nature Cell Biology*, 9(8), 883-892.
- Riesen F, Rothen-Rutishauser B, & Wunderli-Allenspach H 2002. A ZO1-GFP fusion protein to study the dynamics of tight junctions in living cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(4), 307-315.
- Riethdorf L, Riethdorf S, Gützlaff K, et al. 1996. Differential expression of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in human papillomavirus-16-infected squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix uteri. *The American Journal of Pathology*, 149(5), 1469-1476.
- Riethdorf S, Riethdorf L, Richter N, & Löning T 1998. Expression of the MCP-1 gene and the HPV 16 E6/E7 oncogenes in squamous cell carcinomas of the cervix uteri and metastases. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 66(6), 260-267.
- Ristriani T, Masson M, Nominé Y, et al. 2000. HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes fourway junctions. *Journal of Molecular Biology*, 296(5), 1189–1203.
- Ristriani T, Nominé Y, Masson M, et al. 2001. Specific recognition of four-way DNA junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 729–739.
- Rittà M, De Andrea M, Mondini M, et al. 2009. Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression. *Head & Neck*, 31(3), 318-327.
- Rocque WJ, Porter DJ, Barnes JA, et al. 2000. Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. Protein Expression and Purification, 18(2), 148-159.
- Roh MH, Fan S, Liu C, & Margolis B 2003. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 14), 2895-2906.
- Roh MH, Makarova O, Liu C, et al. 2002a. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *The Journal of Cell Biology*, 157(1), 161-172.
- Roh MH, Liu C, Laurinec S, & Margolis B 2002b. The Carboxyl Terminus of Zona Occludens-3 Binds and Recruits a Mammalian Homologue of Discs Lost to Tight Junctions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27501-27509.
- Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, et al. 1995. Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3264–3268.
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, & Howley PM 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes & Development*, 12(13), 2061–2072.
- van Roy F, & Berx G 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 65(23), 3756-3788.
- van Roy FM, & McCrea PD 2005. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? Nature Reviews. Cancer, 5(12), 956-964.
- Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, & Strongin AY 2004. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4260-4268.
- Ruesch MN, & Laimins LA 1997. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *Journal of Virology*, 71(7), 5570-5578.
- Rush M, Zhao X, & Schwartz S 2005. A splicing enhancer in the E4 coding region of human papillomavirus type 16 is required for early mRNA splicing and polyadenylation as well as inhibition of premature late gene expression. *Journal of Virology*, 79(18), 12002-12015.
- Ryeom S, Paul D, & Goodenough D 2000. Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. Molecular Biology of the Cell, 11(5), 1687-1696.
- Ryniers F, Stove C, Goethals M, et al. 2002. Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biological Chemistry*, 383(1), 159-165.
- Ryu O, Fincham A, Hu C, et al. 1999. Characterization of Recombinant Pig Enamelysin Activity and Cleavage of Recombinant Pig and Mouse Amelogenins. *Journal of Dental Research*, 78(3), 743-750.
- Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jahkola T, et al. 2002. Epilysin (MMP-28) Expression is Associated with Cell Proliferation During Epithelial Repair. , 119(1), 14-21.
- Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, et al. 2005. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces

epithelial cell migration. Cellular and Molecular Life Sciences, 62(7), 870-880.

- Sadowski T, Dietrich S, Muller M, et al. 2003. Matrix Metalloproteinase-19 Expression in Normal and Diseased Skin: Dysregulation by Epidermal Proliferation., 121(5), 989-996.
- Sahai E, & Marshall CJ 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature Cell Biology*, 4(6), 408-415.
- Sakao S, Hashimoto T, Shino Y, et al. 2002. Expression of the potential novel gene E6DG1 downregulated by the E6 protein of human papillomavirus type 16 is correlated with anchorage-independent growth. *International Journal of Oncology*, 21(2), 273–279.
- Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, et al. 2007. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 593-602.
- Sakisaka T, & Takai Y 2004. Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. Current Opinion in Cell Biology, 16(5), 513-521.
- Sanders CM, & Stenlund A 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *The EMBO Journal*, 17(23), 7044-7055.
- Sanders CM, & Stenlund A 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3522-3534.
- Santer FR, Moser B, Spoden GA, et al. 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation. *Carcinogenesis*, 28(12), 2511-2520.
- Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, et al. 2005. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Letters*, 229(1), 93–99.
- Sato H, & Seiki M 1996. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *Journal of Biochemistry*, 119(2), 209-215.
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. 2004. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 903-914.
- Sato T, Fujita N, Yamada A, et al. 2006. Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5288-5299.
- Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, et al. 2008. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3678-3685.
- Schaeffer AJ, Nguyen M, Liem A, et al. 2004. E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice. *Cancer Research*, 64(2), 538–546.
- Scheffner M, Huibregtse JM, & Howley PM 1994. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-APdependent ubiquitination of p53. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(19), 8797– 8801.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, & Howley PM 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3), 495–505.
- Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM, et al. 1992. Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *Journal of Virology*, 66(8), 5100–5105.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6), 1129–1136.
- Schimanski CC, Schmitz G, Kashyap A, et al. 2005. Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. , 24(19), 3100-3109.
- Schmalhofer O, Brabletz S, & Brabletz T 2009. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. Cancer Metastasis Reviews, 28(1-2), 151-166.
- Schreiber K, Cannon RE, Karrison T, et al. 2004. Strong synergy between mutant ras and HPV16 E6/E7 in the development of primary tumors. *Oncogene*, 23(22), 3972–3979.
- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. 1998. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(21), 1626-1636.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314(6006), 111-114.
- Sdek P, Zhang ZY, Cao J, et al. 2006. Alteration of cell-cycle regulatory proteins in human oral epithelial cells immortalized by HPV16 E6 and E7. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 35(7), 653-657.

- Sedman J, & Stenlund A 1996. The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure. *The EMBO Journal*, 15(18), 5085-5092.
- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, et al. 1991. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and transactivating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *Journal of Virology*, 65(9), 4860-4866.
- Sedman SA, Hubbert NL, Vass WC, et al. 1992. Mutant p53 can substitute for human papillomavirus type 16 E6 in immortalization of human keratinocytes but does not have E6-associated trans-activation or transforming activity. *Journal of Virology*, 66(7), 4201– 4208.

Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, et al. 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology, 145(1), 181-185.

- Seedorf K, Oltersdorf T, Krämmer G, & Röwekamp W 1987. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *The EMBO Journal*, 6(1), 139-144.
- Seiki M 1999. Membrane-type matrix metalloproteinases. APMIS, 107(1-6), 137-143.
- Seiki M, Koshikawa N, & Yana I 2003. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22(2), 129-143.
- Sekaric P, Cherry JJ, & Androphy EJ 2008. Binding of human papillomavirus type 16 E6 to E6AP is not required for activation of hTERT. *Journal of Virology*, 82(1), 71-76.
- Sekido R, Murai K, Funahashi J, et al. 1994. The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 5692-5700.
- Severino A, Abbruzzese C, Manente L, et al. 2007. Human papillomavirus-16 E7 interacts with Siva-1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 212(1), 118-125.
- Shai A, Brake T, Somoza C, & Lambert PF 2007. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Research*, 67(4), 1626–1635.
- Shally M, Alloul N, Jackman A, et al. 1996. The E6 variant proteins E6I-E6IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria and study of their interaction with p53. *Virus Research*, 42(1-2), 81–96.
- Shamanin VA, Sekaric P, & Androphy EJ 2008. hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *Journal of Virology*, 82(8), 3912–3920.
- Shen L, Weber CR, & Turner JR 2008a. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. J. Cell Biol., 181(4), 683-695.
- Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA, & Wu WJ 2008b. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5127-5137.
- Sherman L, & Alloul N 1992. Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology*, 191(2), 953-959.
- Sherman L, Alloul N, Golan I, et al. 1992. Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 50(3), 356-364.
- Sherman L, Jackman A, Itzhaki H, et al. 1997. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: Role of p53 inactivation. *Virology*, 237(2), 296-306.
- Sherman L, & Schlegel R 1996. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, 70(5), 3269–3279.
- Sherman L, Itzhaki H, Jackman A, et al. 2002. Inhibition of serum- and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology*, 292(2), 309–320.
- Shim J, Kim K, Cho Y, et al. 2008. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids*, 34(1), 135-141.
- Shim J, Cho K, Lee K, et al. 2005. E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics*, 5(8), 2112–2122.
- Shin K, Ahn JH, Kang MK, et al. 2006a. HPV-16 E6 oncoprotein impairs the fidelity of DNA end-joining via p53-dependent and independent pathways. *International Journal of Oncology*, 28(1), 209–215.

Shin K, Fogg VC, & Margolis B 2006b. Tight junctions and cell polarity. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 22, 207-235.

Shin K, Straight S, & Margolis B 2005. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. The Journal of Cell Biology, 168(5), 705-711. Shin K, Wang Q, & Margolis B 2007. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. EMBO reports, 8(2), 158-164.

- Shin M, Balsitis S, Brake T, & Lambert PF 2009. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Research*, 69(14), 5656-5663.
- Shino Y, Shirasawa H, Kinoshita T, & Simizu B 1997. Human papillomavirus type 16 E6 protein transcriptionally modulates fibronectin gene expression by induction of protein complexes binding to the cyclic AMP response element. *Journal of Virology*, 71(6), 4310–4318.
- Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, et al. 1996. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 3942-3946.
- Shirasawa H, Tanzawa H, Matsunaga T, & Simizu B 1991. Quantitative detection of spliced E6-E7 transcripts of human papillomavirus type 16 in cervical premalignant lesions. *Virology*, 184(2), 795–798.
- Sibbet GJ, Cuthill S, & Campo MS 1995. The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *Journal of Virology*, 69(7), 4006-4011.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, et al. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. International Journal of Cancer, 120(8), 1763-1768.
- Sid B, Langlois B, Sartelet H, et al. 2008. Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(9), 1890-1900.
- **da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TCS, et al.** 2006. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 84(5), 713-719.
- Singh L, Gao Q, Kumar A, et al. 2003. The high-risk human papillomavirus type 16 E6 counters the GAP function of E6TP1 toward small Rap G proteins. *Journal of Virology*, 77(2), 1614–1620.
- Sinha S, Degenstein L, Copenhaver C, & Fuchs E 2000. Defining the regulatory factors required for epidermal gene expression. Molecular and Cellular Biology, 20(7), 2543-2555.
- Skoog T, Ahokas K, Orsmark C, et al. 2006. MMP-21 is expressed by macrophages and fibroblasts in vivo and in culture. *Experimental Dermatology*, 15(10), 775-783.
- Skovbjerg H, Anthonsen D, Lothe IMB, et al. 2009. Collagen mRNA levels changes during colorectal cancer carcinogenesis. BMC Cancer, 9, 136.
- Slebos RJ, Kessis TD, Chen AW, et al. 1995. Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology*, 208(1), 111–120.
- Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, et al. 1994. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5320-5324.
- Smeets S, Hesselink A, Speel E, et al. 2007. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 121(11), 2465-2472.
- Smith EM, Wang D, Kim Y, et al. 2008a. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. Oral Oncology, 44(2), 133-142.
- Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, et al. 2008b. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 17(2), 421-427.
- Smith JL, Campos SK, & Ozbun MA 2007. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *Journal of Virology*, 81(18), 9922-9931.
- Smith ML, Bortnick RA, Sheikh MS, & Fornace AJ 1998. Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Experimental Cell Research*, 242(1), 235–243.
- Smith MR, Kung H, Durum SK, et al. 1997. TIMP-3 INDUCES CELL DEATH BY STABILIZING TNF-[alpha] RECEPTORS ON THE SURFACE OF HUMAN COLON CARCINOMA CELLS. *Cytokine*, 9(10), 770-780.
- Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, et al. 2005. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 5), 1291–1296.
- Smotkin D, & Wettstein FO 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(13), 4680-4684.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Top B, et al. 1994. Analysis of p53 status in tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. The

Journal of General Virology, 75 (Pt 10), 2769-2775.

- Sokolowski M, Zhao C, Tan W, & Schwartz S 1997. AU-rich mRNA instability elements on human papillomavirus type 1 late mRNAs and c-fos mRNAs interact with the same cellular factors. *Oncogene*, 15(19), 2303-2319.
- Song S, Gulliver GA, & Lambert PF 1998. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53-independent pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(5), 2290-2295.
- Song S, Liem A, Miller JA, & Lambert PF 2000. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology*, 267(2), 141-150.
- Song S, Pitot HC, & Lambert PF 1999. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *Journal of Virology*, 73(7), 5887–5893.
- Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, & Noel A 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. Matrix Biology, 22(1), 55-61.
- Sounni N, & Noel A 2004. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. Biochimie, 87(3-4), 329-342.
- Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, et al. 2006. Regulation of PCNA and Cyclin D1 Expression and Epithelial Morphogenesis by the ZO-1-Regulated Transcription Factor ZONAB/DbpA. *Mol. Cell. Biol.*, 26(6), 2387-2398.
- Southern SA, Lewis MH, & Herrington CS 2004. Induction of tetrasomy by human papillomavirus type 16 E7 protein is independent of pRb binding and disruption of differentiation. *British Journal of Cancer*, 90(10), 1949–1954.
- Southern SA, Noya F, Meyers C, et al. 2001. Tetrasomy is induced by human papillomavirus type 18 E7 gene expression in keratinocyte raft cultures. *Cancer Research*, 61(12), 4858-4863.
- Spanos WC, Geiger J, Anderson ME, et al. 2008a. Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorageindependent growth in human tonsil epithelial cells. *Head & Neck*, 30(2), 139–147.
- Spanos WC, Hoover A, Harris GF, et al. 2008b. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *Journal of Virology*, 82(5), 2493–2500.
- Spardy N, Covella K, Cha E, et al. 2009. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Research*, 69(17), 7022-7029.
- Spardy N, Duensing A, Charles D, et al. 2007. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. *Journal of Virology*, 81(23), 13265-13270.
- Spardy N, Duensing A, Hoskins EE, et al. 2008. HPV-16 E7 reveals a link between DNA replication stress, fanconi anemia D2 protein, and alternative lengthening of telomere-associated promyelocytic leukemia bodies. *Cancer Research*, 68(23), 9954-9963.
- Spitkovsky D, Aengeneyndt F, Braspenning J, & Doeberitz MVK 1996. p53-independent growth regulation of cervical cancer cells by the papillomavirus E6 oncogene. *Oncogene*, 13(5), 1027–1035.
- Spitkovsky D, Hehner SP, Hofmann TG, et al. 2002. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25576-25582.
- Srivenugopal KS, & Ali-Osman F 2002. The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*, 21(38), 5940–5945.
- Stacey SN, Jordan D, Snijders PJ, et al. 1995. Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *Journal of Virology*, 69(11), 7023-7031.
- Stacey S, Jordan D, Williamson A, et al. 2000. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *Journal of Virology*, 74(16), 7284-7297.
- Stanley M, Browne H, Appleby M, & Minson A 1989. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. International Journal of Cancer, 43(4), 672-676.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. 1988. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *Journal of the National Cancer Institute*, 80(3), 200-204.
- Steinmann KE, Pei XF, Stöppler H, et al. 1994. Elevated expression and activity of mitotic regulatory proteins in human papillomavirusimmortalized keratinocytes. *Oncogene*, 9(2), 387-394.
- Steller MA, Zou Z, Schiller JT, & Baserga R 1996. Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Cancer Research*, 56(21), 5087–5091.

Stenlund A 2003. Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(10), 777-785.

Stenlund A 2007. DNA Replication of Papillomaviruses. In *The Papillomaviruses*. pp. 145-174. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-36523-7_8 [Accessed August 28, 2009].

- Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, et al. 1999. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, 98(2), 137-146.
- Sternlicht MD, & Werb Z 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 17, 463-516.
- Stevenson B, Siliciano J, Mooseker M, & Goodenough D 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J. Cell Biol., 103(3), 755-766.
- Stewart D, Ghosh A, & Matlashewski G 2005. Involvement of nuclear export in human papillomavirus type 18 E6-mediated ubiquitination and degradation of p53. Journal of Virology, 79(14), 8773–8783.
- Stewart D, Kazemi S, Li S, et al. 2004. Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 6), 1419–1426.
- Stöcker W, Grams F, Baumann U, et al. 1995. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Science: A Publication of the Protein Society, 4(5), 823-840.
- Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, et al. 1989. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology*, 172(1), 331-340.
- Stöppler H, Koval D, & Schlegel R 1996a. The serine protease inhibitors TLCK and TPCK inhibit the in vitro immortalization of primary human keratinocytes by HPV-18 DNA. Oncogene, 13(7), 1545-1548.
- Stöppler H, Stöppler MC, Adduci A, et al. 1996b. The serine protease inhibitors TLCK and TPCK react with the RB-binding core of HPV-18 E7 protein and abolish its RB-binding capability. *Virology*, 217(2), 542-553.
- Stöppler H, Stöppler MC, Johnson E, et al. 1998. The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *Oncogene*, 17(10), 1207-1214.
- Stöppler H, Hartmann DP, Sherman L, & Schlegel R 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13332–13337.
- Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, et al. 1996a. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. Virology, 223(1), 251-254.
- Stöppler M, Ching K, Stöppler H, et al. 1996b. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *Journal of Virology*, 70(10), 6987-6993.
- Storey A, Almond N, Osborn K, & Crawford L 1990. Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *The Journal of General Virology*, 71 (Pt 4), 965-970.
- Storey A, Pim D, Murray A, et al. 1988. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *The EMBO Journal*, 7(6), 1815-1820.
- Storey A, & Banks L 1993. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene*, 8(4), 919–924.
- Storey A, Massimi P, Dawson K, & Banks L 1995. Conditional immortalization of primary cells by human papillomavirus type 18 E6 and EJ-ras defines an E6 activity in G0/G1 phase which can be substituted for mutations in p53. *Oncogene*, 11(4), 653–661.
- Storrs CH, & Silverstein SJ 2007. PATJ, a Tight Junction-Associated PDZ Protein, Is a Novel Degradation Target of High-Risk Human Papillomavirus E6 and the Alternatively Spliced Isoform 18 E6. J. Virol., 81(8), 4080–4090.
- Stracke JO, Hutton M, Stewart M, et al. 2000. Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19. EVIDENCE FOR A ROLE AS A POTENT BASEMENT MEMBRANE DEGRADING ENZYME. J. Biol. Chem., 275(20), 14809-14816.
- Straight SW, Herman B, & McCance DJ 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *Journal of Virology*, 69(5), 3185-3192.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, et al. 2004. Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1981-1990.
- Strati K, & Lambert PF 2007. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer Research*, 67(24), 11585-11593.
- Strickland D, Ashcom J, Williams S, et al. 1990. Sequence identity between the α2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17401-17404.
- Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, & Goldberg GI 1993. Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14033-14039.

- Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, & Laimins LA 2000. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *Journal of Virology*, 74(3), 1178-1186.
- Stünkel W, & Bernard HU 1999. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *Journal of Virology*, 73(3), 1918-1930.
- Stünkel W, Huang Z, Tan SH, et al. 2000. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *Journal of Virology*, 74(6), 2489-2501.
- Sturgis E, & Cinciripini P 2007. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 110(7), 1429-1435.
- Subbaramaiah K, & Dannenberg AJ 2007. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Research*, 67(8), 3976–3985.
- Sugihara-Mizuno Y, Adachi M, Kobayashi Y, et al. 2007. Molecular characterization of angiomotin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes to Cells*, 12(4), 473-486.
- Sun Y, Hegamyer G, Kim H, et al. 1995. Molecular cloning of mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and its promoter. Specific lack of expression in neoplastic JB6 cells may reflect altered gene methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), 19312-19319.
- Suprynowicz FA, Disbrow GL, Krawczyk E, et al. 2007. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene*, 27(8), 1071-1078.
- Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, et al. 2002. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 18), 3565-3573.
- Suzuki A, & Ohno S 2006. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. Journal of Cell Science, 119(Pt 6), 979-987.
- Syrjänen S 2004. HPV infections and tonsillar carcinoma. Journal of Clinical Pathology, 57(5), 449-455.
- Tachibana K, Nakanishi H, Mandai K, et al. 2000. Two cell adhesion molecules, nectin and cadherin, interact through their cytoplasmic domain-associated proteins. *The Journal of Cell Biology*, 150(5), 1161-1176.
- Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, et al. 1999. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherinbased adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 539-549.
- Takai Y, & Nakanishi H 2003. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. Journal of Cell Science, 116(Pt 1), 17-27.
- **Takami Y, Sasagawa T, Sudiro TM, et al.** 1992. Determination of the functional difference between human papillomavirus type 6 and 16 E7 proteins by their 30 N-terminal amino acid residues. *Virology*, 186(2), 489-495.
- Takebe N, Tsunokawa Y, Nozawa S, et al. 1987. Conservation of E6 and E7 regions of human papillomavirus types 16 and 18 present in cervical cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143(3), 837–844.
- Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, et al. 2007. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 43(3-4), 129–138.
- Tan SH, Bartsch D, Schwarz E, & Bernard HU 1998. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *Journal of Virology*, 72(5), 3610-3622.
- Tan SH, Gloss B, & Bernard HU 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Research*, 20(2), 251-256.
- Tan W, & Schwartz S 1995. The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 counteracts the effect of an AU-rich negative element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region. *Journal of Virology*, 69(5), 2932-2945.
- Tanabe K, Torii T, Natsume W, et al. 2005. A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1617-1628.
- Tang S, Tao M, McCoy JP, & Zheng ZM 2006a. Short-term induction and long-term suppression of HPV16 oncogene silencing by RNA interference in cervical cancer cells. Oncogene, 25(14), 2094-2104.
- Tang S, Tao M, McCoy J, & Zheng ZM 2006b. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *Journal of Virology*, 80(9), 4249-4263.
- Tang X, Zhang Q, Nishitani J, et al. 2007. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(9), 2568-2576.

- Tao M, Kruhlak M, Xia S, et al. 2003. Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type 16 oncoprotein E6 in living cells. *Journal of Virology*, 77(24), 13232–13247.
- Teissier S, Ben Khalifa Y, Mori M, et al. 2007. A new E6/P63 pathway, together with a strong E7/E2F mitotic pathway, modulates the transcriptome in cervical cancer cells. *Journal of Virology*, 81(17), 9368-9376.
- Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, & Howley P 1992. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *Journal of Virology*, 66(6), 3740-3748.
- Thierry F 2009. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, 384(2), 375-379.
- Thiery JP 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2(6), 442-454.
- Thiery JP, & Sleeman JP 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 7(2), 131-142.
- Thomas JT, & Laimins LA 1998. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *Journal of Virology*, 72(2), 1131-1137.
- Thomas M, & Banks L 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene, 17(23), 2943–2954.
- Thomas M, & Banks L 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *The Journal of General Virology*, 80 (Pt 6), 1513–1517.
- Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, et al. 2001. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*, 20(39), 5431–5439.
- Thomas M, Massimi P, & Banks L 1996. HPV-18 E6 inhibits p53 DNA binding activity regardless of the oligomeric state of p53 or the exact p53 recognition sequence. *Oncogene*, 13(3), 471–480.
- Thomas M, Massimi P, Jenkins J, & Banks L 1995. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene*, 10(2), 261–268.
- Thomas MC, & Chiang C 2005. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Molecular Cell*, 17(2), 251–264.
- Thomas M, Dasgupta J, Zhang Y, et al. 2008. Analysis of specificity determinants in the interactions of different HPV E6 proteins with their PDZ domain-containing substrates. *Virology*, 376(2), 371–378.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, et al. 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, 21(33), 5088–5096.
- Thomas M, Massimi P, Navarro C, et al. 2005. The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene*, 24(41), 6222–6230.
- Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, et al. 2001. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*, 20(28), 3629-3640.
- Thomsen P, van Deurs B, Norrild B, & Kayser L 2000. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. Oncogene, 19(52), 6023-6032.
- Thomsen P, Rudenko O, Berezin V, & Norrild B 1999. The HPV-16 E5 oncogene and bafilomycin A(1) influence cell motility. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1452(3), 285-295.
- Thyrell L, Sangfelt O, Zhivotovsky B, et al. 2005. The HPV-16 E7 oncogene sensitizes malignant cells to IFN-alpha-induced apoptosis. Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 25(2), 63–72.
- Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, et al. 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *Journal of Virology*, 74(16), 7349-7361.
- Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, et al. 2004. Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma. *Human Pathology*, 35(2), 159-164.
- Tokés A, Kulka J, Paku S, et al. 2005. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Research: BCR*, 7(2), R296-305.
- Tomaić V, Pim D, & Banks L 2009. The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. Virology, 393(1), 7–10.
- Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, et al. 2000. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 79(6), 407-412.
- Tomita Y, Asano Y, & Shirasawa H 1998. Trans-activating activity of the E6 proteins of the human papillomavirus (HPV) type-11 and -16 on the PE1E4 promoter of HPV-11 in C33A cells. *International Journal of Oncology*, 13(6), 1253–1258.

- Tommasino M, Contorni M, & Cavalieri F 1992. HPV16 E7 phosphorylation in fission yeast: characterization and biological effects. *Gene*, 111(1), 93-98.
- Tong X, & Howley PM 1997. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(9), 4412–4417.
- Tong X, Salgia R, Li JL, et al. 1997. The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33373–33376.
- Töpffer S, Müller-Schiffmann A, Matentzoglu K, et al. 2007. Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of highrisk genital human papillomaviruses. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 11), 2956–2965.
- Toussaint-Smith E, Donner DB, & Roman A 2004. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene*, 23(17), 2988–2995.
- Traweger A, Fuchs R, Krizbai IA, et al. 2003. The Tight Junction Protein ZO-2 Localizes to the Nucleus and Interacts with the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Scaffold Attachment Factor-B. J. Biol. Chem., 278(4), 2692-2700.
- Tsukita S, & Furuse M 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *The Journal of Cell Biology*, 149(1), 13-16.
- Tsukita S, Furuse M, & Itoh M 2001. Multifunctional strands in tight junctions. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2(4), 285-293.
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, et al. 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, 27(55), 6930-6938.
- Tsukita S, & Furuse M 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. Current Opinion in Cell Biology, 14(5), 531-536.
- Tugizov S, Berline J, Herrera R, et al. 2005. Inhibition of human papillomavirus type 16 E7 phosphorylation by the S100 MRP-8/14 protein complex. *Journal of Virology*, 79(2), 1099–1112.
- Tungteakkhun SS, Filippova M, Neidigh JW, et al. 2008. The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain. *Journal of Virology*, 82(19), 9600–9614.
- Ueno T, Sasaki K, Yoshida S, et al. 2006. Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene*, 25(30), 4155-4164.
- Ullman CG, Haris PI, Galloway DA, et al. 1996. Predicted alpha-helix/beta-sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7. *The Biochemical Journal*, 319 (Pt 1), 229-239.
- Um S, Rhyu J, Kim E, et al. 2002. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. Cancer Letters, 179(2), 205-212.
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, et al. 2004. Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1. J. Biol. Chem., 279(43), 44785-44794.
- Ustav M, Ustav E, Szymanski P, & Stenlund A 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *The EMBO Journal*, 10(13), 4321-4329.
- Vaeteewoottacharn K, Chamutpong S, Ponglikitmongkol M, & Angeletti PC 2005. Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein. Virology Journal, 2, 50.
- Valdovinos-Torres H, Orozco-Morales M, Pedroza-Saavedra A, et al. 2008. Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. *The Open Virology Journal*, 2, 15-23.
- Valente P, Fassina G, Melchiori A, et al. 1998. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *International Journal of Cancer*, 75(2), 246-253.
- Valle GF, & Banks L 1995. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 5), 1239-1245.
- Van Itallie CM, & Anderson JM 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. Annual Review of Physiology, 68, 403-429.
- Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, et al. 2004. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *Journal of Virology*, 78(20), 11172-11186.
- Van Wart H, & Birkedal-Hansen H 1990. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(14), 5578-5582.
- Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, et al. 1999. Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in Other Family Members. J. Biol. Chem., 274(8), 4570-4576.

- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, & Schlegel R 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of Virology*, 75(9), 4467–4472.
- Veldman T, Liu X, Yuan H, & Schlegel R 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* United States of America, 100(14), 8211–8216.
- Venuti A, Salani D, Poggiali F, et al. 1998. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. Virology, 248(1), 1-5.
- Verschueren K, Remacle JE, Collart C, et al. 1999. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20489-20498.
- Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, et al. 2007. Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Research*, 67(14), 6844-6853.
- Vikhanskaya F, Falugi C, Valente P, & Russo P 2002. Human papillomavirus type 16 E6-enhanced susceptibility to apoptosis induced by TNF in A2780 human ovarian cancer cell line. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 97(6), 732–739.
- de Villiers E, Fauquet C, Broker TR, et al. 2004. Classification of papillomaviruses. Virology, 324(1), 17-27.
- Vincent T, Neve EPA, Johnson JR, et al. 2009. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-[beta] mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 11(8), 943-950.
- Vincenti M, & Brinckerhoff C 2002. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: Integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. Arthritis Research, 4(3), 157-164.
- Vincenti MP, & Brinckerhoff CE 2007. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you? *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 355-364.
- Visse R, & Nagase H 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827-839.
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, et al. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66(1), 107-119.
- Vocca I, Franco P, Alfano D, et al. 2009. Inhibition of migration and invasion of carcinoma cells by urokinase-derived antagonists of alphavbeta5 integrin activation. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 124(2), 316-325.
- Vogt M, Butz K, Dymalla S, et al. 2006. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. Oncogene, 25(29), 4009–4015.
- Vousden KH, Vojtesek B, Fisher C, & Lane D 1993. HPV-16 E7 or adenovirus E1A can overcome the growth arrest of cells immortalized with a temperature-sensitive p53. Oncogene, 8(6), 1697-1702.
- Wain SL, Kier R, Vollmer RT, & Bossen EH 1986. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Human Pathology*, 17(11), 1158-1166.
- Wang HL, & Lu DW 2004. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *The American Journal of Surgical Pathology*, 28(7), 901-8.
- Wang Q, Hurd TW, & Margolis B 2004. Tight Junction Protein Par6 Interacts with an Evolutionarily Conserved Region in the Amino Terminus of PALS1/Stardust. J. Biol. Chem., 279(29), 30715-30721.
- Wang X, Wang H, McCoy JP, et al. 2009. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. RNA (New York, N.Y.), 15(4), 637–647.
- Wang Y, Okan I, Pokrovskaja K, & Wiman KG 1996. Abrogation of p53-induced G1 arrest by the HPV 16 E7 protein does not inhibit p53-induced apoptosis. Oncogene, 12(12), 2731-2735.
- Wang Y, Du D, Fang L, et al. 2006. Tyrosine phosphorylated Par3 regulates epithelial tight junction assembly promoted by EGFR signaling. *The EMBO Journal*, 25(21), 5058-5070.
- Wang Y, Chang H, Lin C, & Yu WCY 2007. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(2), 402-412.
- Wang Z, Mandell KJ, Parkos CA, et al. 2005. The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. Oncogene, 24(27), 4412-4420.
- Watanabe S, Sato H, Furuno A, & Yoshiike K 1992. Changing the spacing between metal-binding motifs decreases stability and transforming activity of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein. *Virology*, 190(2), 872-875.
- Watanabe S, Kanda T, & Yoshiike K 1989. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts

requires expression of open reading frames E6 and E7. Journal of Virology, 63(2), 965-969.

- Watson RA, Thomas M, Banks L, & Roberts S 2003. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 24), 4925–4934.
- Wegmann F, Ebnet K, Du Pasquier L, et al. 2004. Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Experimental Cell Research*, 300(1), 121-133.
- Wei X, Samarabandu J, Devdhar RS, et al. 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. Science (New York, N.Y.), 281(5382), 1502-1506.
- Weijzen S, Zlobin A, Braid M, et al. 2003. HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation. *Journal of Cellular Physiology*, 194(3), 356–362.
- Weinberger P, Yu Z, Haffty B, et al. 2006. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. J Clin Oncol, 24(5), 736-747.
- Weinberger PM, Yu Z, Kountourakis P, et al. 2009. Defining molecular phenotypes of human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: Validation of three-class hypothesis. Otolaryngology-Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 141(3), 382-389.e1.
- Werness BA, Levine AJ, & Howley PM 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science (New York, N.Y.), 248(4951), 76–79.
- Westermarck J, Li S, Kallunki T, et al. 2001. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of Protein Phosphatases 1 and 2A Inhibits MEK1 and MEK2 Activity and Collagenase 1 (MMP-1) Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.*, 21(7), 2373-2383.
- Westra WH, Taube JM, Poeta M, et al. 2008. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 14(2), 366-369.
- Wiest T, Schwarz E, Enders C, et al. 2002. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21(10), 1510-1517.
- Wilczynski S, Lin B, Xie Y, & Paz I 1998. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 152(1), 145-156.
- Williams AF, & Barclay AN 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. Annual Review of Immunology, 6, 381-405.
- Wilson V, West M, Woytek K, & Rangasamy D 2002. Papillomavirus E1 proteins: Form, function, and features. Virus Genes, 24(3), 275-290.
- Winn RA, Marek L, Han S, et al. 2005. Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19625-19634.
- Wise-Draper TM, Allen HV, Jones EE, et al. 2006. Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7506-7519.
- Wise-Draper TM, Allen HV, Thobe MN, et al. 2005. The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *Journal of Virology*, 79(22), 14309–14317.
- Wise-Draper TM, Morreale RJ, Morris TA, et al. 2009. DEK proto-oncogene expression interferes with the normal epithelial differentiation program. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 71-81.
- Wittchen ES, Haskins J, & Stevenson BR 1999. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 35179-35185.
- Wolffe AP 2001. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. Essays in Biochemistry, 37, 45-57.
- Woodworth CD, Cheng S, Simpson S, et al. 1992. Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. *Oncogene*, 7(4), 619-626.
- Woodworth CD, Doniger J, & DiPaolo JA 1989. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *Journal of Virology*, 63(1), 159-164.
- Woodworth CD, Lichti U, Simpson S, et al. 1992. Leukoregulin and gamma-interferon inhibit human papillomavirus type 16 gene transcription in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. *Cancer Research*, 52(2), 456-463.
- Woodworth CD, Notario V, & DiPaolo JA 1990. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. *Journal of Virology*, 64(10), 4767-4775.
- Xu Q, Wang S, Xi L, et al. 2006. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta1 signaling pathway. *Gynecologic Oncology*, 101(1), 132–139.

Yamada S, Pokutta S, Drees F, et al. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. Cell, 123(5), 889-901.

- Yamamoto A, Kumakura S, Uchida M, et al. 2003. Immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 106(3), 301-309.
- Yamamoto Y, Huibregtse JM, & Howley PM 1997. The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics*, 41(2), 263–266.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, et al. 2001. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(8), 721-731.
- Yan C, & Boyd DD 2007. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. Journal of Cellular Physiology, 211(1), 19-26.
- Yang J, Zong CS, Xia W, et al. 2006. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7269-7282.
- Yang Z, Rayala S, Nguyen D, et al. 2005. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Research*, 65(8), 3179-3184.
- Yao YL, Yang WM, & Seto E 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5979-5991.
- Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M, et al. 2007. E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. Cell Cycle (Georgetown, Tex.), 6(16), 2038-42.
- Yim E, Lee K, Myeong J, et al. 2007. Novel interaction between HPV E6 and BARD1 (BRCA1-associated ring domain 1) and its biologic roles. *DNA and Cell Biology*, 26(10), 753–761.
- Yim E, Meoyng J, Namakoong S, et al. 2004. Genomic and proteomic expression patterns in HPV-16 E6 gene transfected stable human carcinoma cell lines. *DNA and Cell Biology*, 23(12), 826-835.
- Yokoyama S, Tachibana K, Nakanishi H, et al. 2001. alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1595-1609.
- Yook JI, Li X, Ota I, et al. 2006. A Wnt-Axin2-GSK3[beta] cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*, 8(12), 1398-1406.
- Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, et al. 2008. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. *Journal of Virology*, 82(17), 8820-8827.
- Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, et al. 2003. In Vitro and in Vivo Growth Suppression of Human Papillomavirus 16-Positive Cervical Cancer Cells by E6 siRNA. *Mol Ther*, 8(5), 762-768.
- You J, Croyle J, Nishimura A, et al. 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 117(3), 349-360.
- Young DA, Lakey RL, Pennington CJ, et al. 2005. Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Research & Therapy*, 7(3), R503-512.
- Yu ASL, McCarthy KM, Francis SA, et al. 2005. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 288(6), C1231-1241.
- Yu S, Chen L, Wang H, et al. 2009. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells in vitro. International Journal of Oncology, 35(2), 329-336.
- Yu W, Woessner JF, McNeish JD, & Stamenkovic I 2002. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes & Development*, 16(3), 307-323.
- Yuan H, Ito S, Senga T, et al. 2009. Human papillomavirus type 16 oncoprotein E7 suppresses cadherin-mediated cell adhesion via ERK and AP-1 signaling. *International Journal of Oncology*, 35(2), 309-314.
- Yuan H, Fu F, Zhuo J, et al. 2005. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*, 24(32), 5069–5078.
- Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, et al. 2007. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3732-3742.
- Zanier K, Charbonnier S, Baltzinger M, et al. 2005. Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. *Journal of Molecular Biology*, 349(2), 401–412.
- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, & Böttinger EP 2004. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-tomesenchymal transition. *The EMBO Journal*, 23(5), 1155-1165.

- Zehbe I, Rätsch A, Alunni-Fabbroni M, et al. 1999. Overriding of cyclin-dependent kinase inhibitors by high and low risk human papillomavirus types: evidence for an in vivo role in cervical lesions. *Oncogene*, 18(13), 2201-2211.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, & Tommasino M 1998a. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Research*, 58(4), 829-833.
- Zehbe I, Voglino G, Delius H, et al. 1998b. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, 352(9138), 1441–1442.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, & Tommasino M 1998c. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Research*, 58(4), 829–833.
- Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, et al. 2009. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383(1), 69-77.
- Zeng M, Kumar A, Meng G, et al. 2002. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein inhibits retinoic X receptor-mediated transactivation by targeting human ADA3 coactivator. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45611-45618.
- Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, et al. 1995. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*, 69(10), 6389-6399.
- Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, et al. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13(11), 2323-2330.
- Zhai Y, Hotary KB, Nan B, et al. 2005. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Research*, 65(15), 6543-50.
- Zhang B, Chen W, & Roman A 2006. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(2), 437-442.
- Zhang J, Martins CR, Fansler ZB, et al. 2005. DNA methylation in anal intraepithelial lesions and anal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(18), 6544-6549.
- Zhang P, Nouri M, Brandsma J, et al. 1999. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. Virology, 263(2), 388-394.
- Zhang Q, Piston DW, & Goodman RH 2002. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. Science (New York, N.Y.), 295(5561), 1895-1897.
- Zhang Y, & Reinberg D 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343-2360.
- Zhang Y, Dasgupta J, Ma RZ, et al. 2007. Structures of a human papillomavirus (HPV) E6 polypeptide bound to MAGUK proteins: mechanisms of targeting tumor suppressors by a high-risk HPV oncoprotein. *Journal of Virology*, 81(7), 3618–3626.
- Zhao K, Gu W, Fang NX, et al. 2005. Gene codon composition determines differentiation-dependent expression of a viral capsid gene in keratinocytes in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), 8643-8655.
- Zhao X, Rush M, & Schwartz S 2004. Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene. *Journal of Virology*, 78(20), 10888-10905.
- Zheng L, Ding H, Lu Z, et al. 2008. E3 ubiquitin ligase E6AP-mediated TSC2 turnover in the presence and absence of HPV16 E6. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 13(3), 285–294.
- Zheng Z 2004. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. Journal of Biomedical Science, 11(3), 278-294.
- Zheng Z, & Baker CC 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, 2286-2302.
- Zheng Z, Tao M, Yamanegi K, et al. 2004. Splicing of a cap-proximal human Papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA 5' cap. *Journal of Molecular Biology*, 337(5), 1091-1108.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3[beta]-mediated phosphorylation in control of epithelialmesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 6(10), 931-940.
- Zhou J, Liu WJ, Peng SW, et al. 1999. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *Journal of Virology*, 73(6), 4972-4982.
- Zhou Y, Fang L, Du D, et al. 2008. Proteome identification of binding-partners interacting with cell polarity protein Par3 in Jurkat cells. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 40(8), 729-739.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, & O'Connor MJ 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-

regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. Journal of Virology, 73(8), 6209-6219.

Zur Hausen H 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews. Cancer, 2(5), 342-50.

Zwerschke W, Joswig S, & Jansen-Dürr P 1996. Identification of domains required for transcriptional activation and protein dimerization in the human papillomavirus type-16 E7 protein. *Oncogene*, 12(1), 213-220.