

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE (BIOLOGIE APPLIQUÉE ET ENTREPRISE)

L'impact du statut P53 sur l'expression d'Apobec3b durant une infection adénovirale

Decloux, Alexandra

Award date:
2020

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**L'IMPACT DU STATUT P53 SUR L'EXPRESSION D'APOBEC3B DURANT UNE
INFECTION ADENOVIRALE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Alexandra Decloux

Janvier 2020

Remerciements

Je tiens à commencer par remercier mon promoteur, le Dr Nicolas Gillet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire mais également pour avoir suivi l'évolution de mon mémoire et pour le temps consacré à la relecture de ce travail.

Je remercie aussi mon encadrante Noémie Lejeune pour m'avoir soutenue et poussée tout au long de la réalisation de mon mémoire. Merci pour toutes les corrections et pour le temps passé à m'enseigner les techniques de laboratoire. Merci aussi de m'avoir fait confiance et pour les bons moments passés au sein du laboratoire.

Je voudrais aussi remercier l'unité de recherche en médecine vétérinaire intégré (URVI) pour m'avoir accueilli et intégré à l'équipe.

J'aimerais aussi dire merci à Olivier, Gabrielle et Alexis pour leur soutien et leur bonne humeur malgré parfois le manque de résultat ou de motivation.

Merci à mes parents et à ma petite sœur pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon parcours universitaire. Merci pour m'avoir aidé durant les moments difficiles de découragement.

Enfin, j'aimerais dire un tout grand merci à mes amies, Marie, Lucie, Anaïs et Adélie pour leur soutien et leurs encouragements. Merci beaucoup pour les moments de détente bienvenus et mérités tout au long de ce parcours.

L'impact du statut p53 sur l'expression d'APOBEC3B durant une infection adénovirale

Résumé

Les protéines APOBEC3 (Apolipoprotein B Editing Catalytic subunits 3) sont des enzymes qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire innée contre les virus et les rétro éléments endogènes. Chez l'homme, la famille A3 comprend sept membres (A3A, B, C, DE, F, G et H). Les A3s sont des désaminases de cytosines, elles catalysent la désamination des cytosines, ce qui les convertit en uraciles. Les A3s sont capables de se lier aux génomes de certains virus et d'y introduire des mutations qui limitent leur réplication. Cette capacité mutagénique nécessaire à leur action antivirale a un effet pervers, en effet certains membres de la famille A3 comme A3B peuvent muter l'ADN cellulaire. Aussi, il a été observé récemment que le génome de nombreuses tumeurs était massivement altéré par l'introduction de mutations par les A3s. La charge mutationnelle attribuée aux A3s est très abondante dans certains cancers comme par exemple les cancers du col de l'utérus. Il a été établi que l'infection par les papillomavirus avait pour effet d'induire l'expression d'A3B dont l'action mutagénique sur le génome cellulaire participe à la transformation. Il reste cependant un grand nombre de cancers où la présence des mutations induites par les A3s ne trouve pas encore d'explications. C'est le cas pour le cancer du poumon non à petites cellules où la charge mutationnelle associée aux A3s peut être même plus importante que celle induite par les carcinogènes du tabac. La compréhension de ce mécanisme est au cœur des objectifs de notre laboratoire.

Nous avons démontré récemment que l'infection de cellules bronchiques par l'adénovirus C2 induisait une forte expression d'A3B. Sachant que p53 est un régulateur négatif de la transcription d'A3B, nous avons décidé d'investiguer l'impact de l'infection adénovirale sur des cellules déficientes pour p53. La question à laquelle ce mémoire se propose de répondre est : est-ce que la perturbation du statut p53 influence l'induction d'A3B par l'infection adénovirale ? En d'autres termes, est-ce qu'une cellule dont le fonctionnement de p53 est altéré (comme c'est souvent le cas lors de processus de transformation) est moins capable de contrôler son expression d'A3B lors d'une infection adénovirale ? Pour ce faire, p53 a été modifié en diminuant son expression (shRNA p53), en utilisant des mutants (*TP53* R175H et R273H) et en induisant sa stabilisation par l'emploi d'agents chimiothérapeutiques (cisplatine et doxorubicine) utilisés dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules.

L'expression d'A3B semble peu influencée par le statut p53 dans les conditions non infectées. L'infection par l'adénovirus induit une diminution rapide de p53 comme cela a déjà été démontré par d'autres études. De manière intéressante, nous observons que cette diminution se fait aussi dans les cellules soumises à un stress génotoxique (agents chimiothérapeutiques). La production d'A3B n'est donc pas freinée par la présence de ces drogues, c'est même l'inverse qui est observé. La doxorubicine et la cisplatine promeuvent la production d'A3B lors de l'infection virale. L'infection semble aussi induire une expression plus forte d'A3B en présence de p53 R273H.

Notre modèle d'étude récapitule le cycle lytique de l'adénovirus ce qui exclut de faire l'étude de possibles mutations introduites par A3B dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, il serait pertinent d'étudier l'effet d'une infection adénovirale persistante sur l'expression d'A3B et le rôle du statut p53 dans ce contexte.

Alexandra Decloux

Promoteur : Dr Nicolas Gillet

Liste des abréviations

%	Pourcent
°C	Degré Celsius
μ	Micro
A	Ampère
A3	APOBEC3
A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
<i>apoB</i>	Apolipoprotéine B
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like
AID	Activation induced deaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Adv	Adénovirus
BSA	Bovine serum albumin
BKPyV	BK polyomavirus
bp	Paire de base
CAR	Coxsackie/Adenovirus recepteur
CCD	Charge coupled devices
CDK	Cyclin-dependent kinase
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CP	Cisplatine
CPNPC	Cancer du poumon non à petites cellules
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
Doxo	Doxorubicine
EBV	Epstein Barr virus
eIF	Facteur d'initiation de la traduction
FCS	Fetal chicken serum
g	gramme
h	heure
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
HBEC3-KT	Human bronchial epithelial cells
HPV	Human papillomavirus
hTERT	Human telomerase
KD	Knock-down
kDa	kiloDalton
L	Litre
LINE	Long interspersed nuclear element
LTR	Long terminal repeat
Luc	Luciférase
m	mètre
m-	milli
M	Molaire
MOI	Multiplicity of infection
n	nano

NKK	4-(méthylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanone
p53 RE	p53 response element
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PKR	Protein kinase R
PMSF	Phénylméthylsulfonyl
pRB	Protéine du rétinoblastome
PVDF	PolyVinylDene Fluoride
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerisation chain reaction
RNAi	RNA interferent
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
Scr	Scrambled
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
SINE	Short interspersed nuclear element
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween 20
TEAD	Transcription enhancer factor domain
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TP	Terminal protein
V	Volt
VA ARN	Virus associated ARN
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
UDG	Uracil-DNA glycosidase
WB	Western Blot
WT	Wild type
ZDD	Zinc-dependent catalytic domain

Table des figures

Figure 1 : Activité désaminase d'A3B

Figure 2 : Conséquences d'une mutation induite par A3B

Figure 3 : Structure des adénovirus

Figure 4 : Cycle de réplication de l'adénovirus C2

Figure 5 : L'activation de p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire

Figure 6 : Voie intrinsèque de l'apoptose

Figure 7 : Expression d'A3B pendant une infection adénovirale de cellules bronchiques
HBEC3-KT WT et *TP53* KD

Figure 8 : Expression d'A3B pendant une infection adénovirale dans des cellules bronchiques
HBEC3-KT possédant une protéine p53 mutée (*TP53* R175H ou R273H)

Figure 9 : L'exposition des cellules à la cisplatine potentialise l'induction d'A3B par
l'adénovirus C2

Figure 10 : L'exposition des cellules à la doxorubicine potentialise l'induction d'A3B par
l'adénovirus C2

Figure S1 : Niveaux d'expression des transcrits A3s pendant une infection adénovirale dans les
HBEC3-KT WT ET *TP53* KD

Figure S2 : Niveaux d'expression de la protéine p53 en fonction de différentes doses des agents
chimiothérapeutiques doxorubicine et cisplatine

Table des matières

Introduction	1
1. La famille des APOBECs.....	1
2. APOBEC3B.....	3
3. Le cancer du poumon non à petites cellules.....	4
4. L'adénovirus C2.....	6
5. La protéine p53.....	8
Matériels et méthodes.....	11
1. Lignées cellulaires.....	11
2. Culture cellulaire.....	11
3. Production de l'adénovirus humain C2.....	11
4. Infection des cellules.....	12
5. Carcinogènes.....	12
6. Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	12
7. Extraction protéique et Western Blot.....	13
Résultats	14
1. L'infection de cellules bronchiques (HBEC3-KT) par l'adénovirus C2 induit l'expression de la protéine APOBEC3B de façon similaire dans les cellules p53 sauvage (WT) que p53 atténué (KD) 14	
2. L'infection de cellules bronchiques (HBEC3-KT) par l'adénovirus C2 semble induire une plus forte expression de la protéine APOBEC3B dans les cellules p53 muté (R273H) que p53 sauvage (WT).....	15
3. L'induction de l'expression de la protéine A3B par l'adénovirus C2 est renforcée par la présence d'agents chimiothérapeutiques cisplatine et doxorubicine.....	16
Discussion	18
Conclusion et perspectives	21
Bibliographie.....	22
Annexes.....	26
1. Résultats RT-qPCR des 7 A3s et de TP53 dans les HBEC3-KT WT, Scr et TP53 KD après 2 et 4 jours d'infection adénovirale.....	26
2. Détermination des doses et du temps d'exposition des cellules à la cisplatine et à la doxorubicine.....	27
3. Amorces qPCR.....	28

Introduction

1. La famille des APOBECs

Les APOBECs (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like) représentent une large famille d'enzymes intervenant dans le système immunitaire inné. Les membres de cette famille sont des cytidines désaminases c'est-à-dire qu'ils sont capables de muter les cytidines en uraciles. Chez l'homme, les APOBECs sont divisés en 5 sous-familles : AID (activation induced deaminase), APOBEC1 (A1), APOBEC2 (A2), les sept APOBEC3s (A3A-A3H) et APOBEC4 (A4) (Smith *et al.*, 2012). La famille APOBEC a évolué au cours du temps. AID et A2 sont des gènes ancestraux présents chez les poissons. Chez la lamproie, une cytosine désaminase associée à AID est déjà présente. Un ancêtre commun entre la lamproie et les vertébrés aurait eu le gène codant pour cette protéine. Au cours de l'évolution des vertébrés, ce gène se serait dupliqué et aurait divergé afin d'obtenir A1. Ensuite, le locus ancestral AID/A1 se serait dupliqué afin de produire les prémisses de la famille A3 présente uniquement chez les mammifères. Afin d'obtenir les sept membres de cette famille chez l'homme, huit autres événements de duplication ont été nécessaires et ont eu lieu sur 100 millions d'années (Refsland et Harris, 2013). Tous les APOBECs désaminent l'ADN sous forme simple brin sauf A1 qui désamine de l'ARN et A3A qui cible à la fois de l'ADN et de l'ARN. La capacité de muter les cytosines en uraciles est due à la présence de domaines cytidine dépendante du zinc (ZDD). Les APOBECs ne possèdent pas tous le même nombre de ZDD. Par exemple, A3B, A3DE, A3F et A3G ont deux ZDD alors que A1, AID, A3C et A3H n'en possèdent qu'un seul (Smith *et al.*, 2012).

AID est situé sur le chromosome 12 et est exprimé dans les lymphocytes B. Il est responsable de mutations C vers U qui sont ensuite converties. Cette conversion fait intervenir une réparation par excision qui induit des mutations ponctuelles ou des cassures dans l'ADN. La mutagenèse provoquée par AID induit une hypermutation somatique et des événements de recombinaison du gène de l'immunoglobuline. Ces événements ont pour but de diversifier les immunoglobulines des lymphocytes B afin d'exprimer un anticorps de forte affinité de liaison à un antigène. Les personnes ne possédant pas cette protéine souffrent d'une rare immunodéficiência appelée le syndrome hyper IgM. Ce dernier est caractérisé par des hauts niveaux d'IgM et par l'absence des autres immunoglobulines (IgG, IgA et IgE). Par contre une augmentation de l'expression d'AID a été observée chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique. Cette observation suggère que cette hyperactivité induit à une instabilité du génome (Smith *et al.*, 2012).

APOBEC1, également situé sur le chromosome 12, est la première protéine APOBEC découverte et est impliqué dans le métabolisme des lipides. Il est capable d'éditer l'ARN messager (ARNm) de l'apolipoprotéine B (*apoB*), d'où le nom de la protéine, au nucléotide 6666. La mutation introduite par A1 induit la désamination du codon glutamine CAA en codon stop prématuré UAA (Smith *et al.*, 2012).

APOBEC2 est situé sur le chromosome 6 et est exprimé dans les cellules composant le tissu cardiaque et dans les cellules musculaires squelettiques. L'activité de A2 sur l'ADN génomique suppose un rôle essentiel au développement musculaire (Smith *et al.*, 2012). Un papier récent suggère que l'activité mutagène de A2 pourrait cibler certains gènes suppresseurs de tumeur comme le facteur d'initiation de la traduction 4 gamma 2 (eIF4g2). De plus, chez les souris, la

surexpression de A2 serait impliquée dans le développement de cancer du foie et du poumon (Okuyama *et al.*, 2012).

APOBEC4 est le dernier membre de la famille APOBEC à avoir été découvert suite à une recherche d'homologie. Il se situe sur le chromosome 1 et serait exprimé spécifiquement dans les testicules. Pour l'instant, aucune fonction n'a été attribuée à cette protéine mais son activité mutagène serait liée à un cofacteur. Elle pourrait aussi posséder une fonction indépendante de son activité de désamination (Smith *et al.*, 2012).

APOBEC3 représente une famille d'enzymes spécifique aux mammifères impliquée dans le système immunitaire inné. Ces protéines sont capables de muter les rétro éléments endogènes et les virus exogènes afin de les inactiver. Le nombre d'A3s diffère selon les espèces : les rongeurs, les chats, les moutons et les cochons possèdent un A3, les bovins en ont deux, les chevaux et les chiens en ont trois et les primates en possèdent sept. L'augmentation du nombre d'A3s est lié à la diminution des rétro éléments actifs chez les primates. Les rétro éléments ont la capacité de se copier et de s'intégrer dans le génome ce qui induit une instabilité. Suite à la présence des sept A3s chez les primates, seuls les rétro éléments dits non-longue répétition terminale (LTR) sont actifs (LINEs et SINEs). Cette capacité permet de limiter la néo insertion de rétro éléments dans le génome. Par exemple, chez la souris qui ne possède qu'un A3, les maladies causées par les rétro éléments LINE-1 sont 35% plus élevés par rapport aux humains. Chez l'homme les sept A3s sont situés sur le chromosome 22 et sont organisés en tandem. Le premier A3 à avoir été découvert est A3G grâce à son activité antivirale qui permet d'induire des mutations dans le génome du virus d'immunodéficience humaine (VIH) durant la formation d'ADN complémentaire. Ces mutations peuvent diminuer voire annuler la capacité infectieuse du virus. A3F, A3DE et A3H sont aussi capables de muter le génome du VIH en ciblant d'autres sites. En effet, les A3s ont une préférence pour certains motifs. Par exemple, A3G cible la cytosine dans les motifs dCC alors que les autres A3s préfèrent les motifs dTC. Les A3s ont une localisation cytoplasmique, à l'exception du membre A3B qui est exclusivement nucléaire et A3A et A3C qui sont relocalisés dans le noyau sous certaines conditions. Cette position permet à ces derniers d'inhiber de façon direct la rétrotranscription des rétro éléments mais aussi de certains rétrovirus (Smith *et al.*, 2012). Cette inhibition peut se faire de manière indépendante à l'activité désaminase. Par exemple, les A3s peuvent se lier directement sur l'ARN génomique viral et bloquer la progression de la reverse transcriptase. Lors de l'encapsidation des virions, les A3s peuvent être incorporés dans la capsid. De cette manière, ils sont relâchés dans la cellule en même temps que le génome du virus et peuvent ainsi directement agir au plus tôt dans l'infection virale. En réponse à l'activité désaminase de ces enzymes, les virus ciblés par les A3s ont développés des moyens de défenses contre celles-ci. Par exemple, le VIH possède la protéine Vif qui se lie aux A3s et recrute le complexe E3 ligase afin de les dégrader. Une autre stratégie utilisée par les virus est la séquestration d'A3s. Par exemple, la protéine Bet des foamy virus se lie aux A3s ce qui induit une séquestration et une inactivation de ceux-ci. En plus du VIH, les A3s ont pour cible les rétrovirus, les herpès virus, le virus de l'hépatite B, les alpha papillomavirus, *etc.* (Harris et Dudley, 2015). Bien que les A3s soient d'abord décrits comme possédant une activité antivirale, ils peuvent également représenter un avantage évolutif pour les virus. Les APOBEC3s permettent une évolution des virus puisque ceux-ci acquièrent des mutations qui sont susceptibles de leur procurer un avantage. Par exemple, A3G peut faciliter le développement du VIH résistant à certains traitements antiviraux (Mulder, Harari, et Simon, 2008).

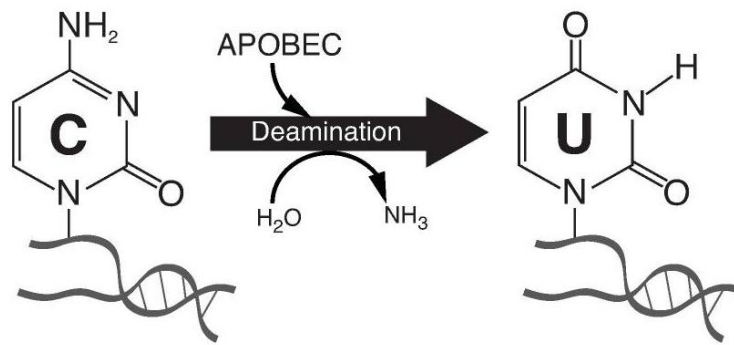


Figure 1 : Activité désaminase d'A3B (Swanton *et al.*, 2015).

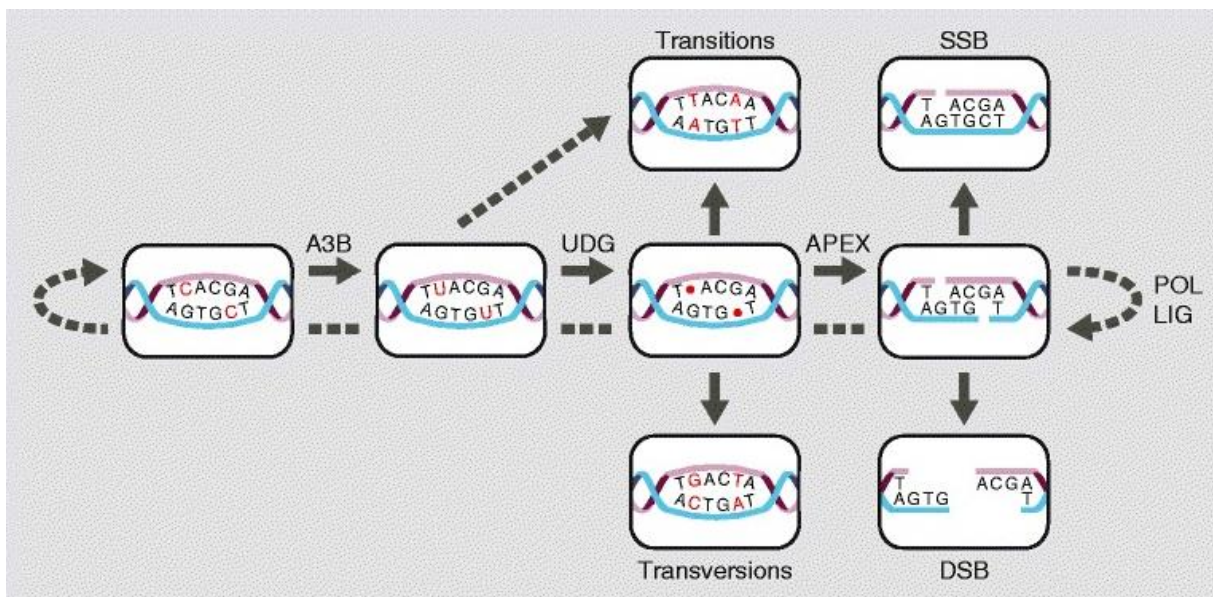


Figure 2 : Conséquences d'une mutation induite par A3B (Harris, 2015). Le processus principal de réparation est montré par la ligne centrale. Durant les étapes intermédiaires du processus de réparation, d'autres mécanismes peuvent intervenir et induire des mutations différentes. Pour commencer, A3B désamine les cytosines en uraciles. Ensuite, soit l'uracile-ADN glycosylase (UDG) excise les uraciles et crée des sites abasiques soit l'ADN polymérase insert une désoxyadénosine en face d'un uracile et induit une mutation C vers T. Les sites abasiques peuvent être pris en charge par REV1 qui induit des mutations C vers G, par l'ADN polymérase ou par APEX qui induit des cassures simples brins. Ces dernières sont prises en charge par des recombinaisons ou par des ADN polymérases (POL) et des ligases (LIG). Elles peuvent aussi se transformer en cassures doubles brins (DSB) via une cassure dans la fourche de réplication. Les cassures mènent à des insertions, des délétions, des inversions, des translocations et des 'kataegis'.

2. APOBEC3B

APOBEC3B a une localisation nucléaire et son substrat est l'ADN sous forme simple brin. Ces caractéristiques font de cette protéine une source de mutations somatiques dans l'ADN génomique. A3B change les cytosines en uraciles dans les motifs TCA et TCG (Figure 1). Cette conversion est considérée comme une lésion pré mutagène puisqu'elle est lue comme une thymine par les ADN polymérases qui ajoute par conséquent une adénine en face de l'uracile pendant la réplication de l'ADN. Au cycle suivant, l'uracile se trouvant en face de l'adénine sera remplacé par une thymine. Ce processus conduit à une mutation de C vers T. Des mécanismes de réparation peuvent aussi intervenir pour exciser cet uracile (Figure 2). L'uracile peut directement être excisé par une uracile-ADN glycosylase (UDG) en créant un site abasique. Plusieurs enzymes peuvent agir sur ces sites et créer des mutations différentes. Pour commencer, l'ADN polymérase peut intervenir en ajoutant une adénine en face du site abasique ce qui conduit à une mutation C vers T. Une ADN polymérase translésionnelle comme REV1 est capable d'ajouter une déoxycytidine en face du site abasique induisant une mutation C vers G. Enfin, l'excision de l'uracile peut aussi être suivie par l'intervention d'une endonucléase appelée APEX. Cette dernière génère une rupture simple brin qui évolue dans certains cas vers une cassure double brin via divers mécanismes comme la génération d'une cassure sur le brin opposé. Les cassures peuvent être réparées par recombinaison et mener à des translocations, des délétions, des insertions et des amplifications mais aussi à la formation de 'kataegis'. Le 'kataegis' représente des zones du génome intensément mutées par les A3s au niveau des cytosines des motifs 5'-TC. Ces sites semblent être situés à proximité des sites de réarrangement de l'ADN (Harris, 2015).

Au vu de la capacité d'A3B à induire des mutations dans l'ADN, la cellule a développé des moyens de préservation du génome. Le premier mécanisme de préservation du génome est son accessibilité. A3B ne cible que l'ADN sous forme simple brin. L'ADN génomique se retrouve notamment sous cette forme pendant la réplication, la transcription et la réparation de celui-ci (Salter, Bennett, et Smith, 2016). Lorsque le génome cellulaire est exposé sous forme simple brin, des protéines comme la protéine de réplication A (RPA) protègent le brin d'ADN exposé en liant les enzymes capables de muter l'ADN comme les APOBECs (Roberts et Gordenin, 2014). Un autre mécanisme vient de la capacité de certains APOBECs à lier l'ARN. En effet, les APOBECs dont A3B, possédant deux domaines ZDD ont la capacité de lier l'ARN cellulaire ou viral sur leur domaine non catalytique. Cette capacité permet à la cellule de réguler l'activité des A3s puisque la liaison de l'ARN aux A3s induit l'inhibition du ZDD liant l'ADN simple brin (Salter, Bennett, et Smith, 2016). De plus, en condition physiologique et en l'absence d'infection, A3B n'est transcrit qu'à un niveau basal.

La capacité d'A3B à induire des mutations C vers T et C vers G dans le génome humain suggère qu'A3B pourrait être impliqué dans le développement de mutations somatiques. D'autres membres de la famille APOBEC ont déjà démontré leur implication dans le développement de certains cancers. Par exemple, une surexpression d'AID ou une dérégulation de celui-ci peut mener à un lymphome des lymphocytes B suite à la génération de mutations dans le gène *Myc*. AID peut aussi induire des tumeurs non lymphocytaires comme des carcinomes hépatocellulaires et des cancers gastriques (Gao, Choudhry, et Cao, 2018). Une étude récente sur le génome de plus de 7000 cancers a révélé la présence de 21 signatures mutationnelles. Les signatures regroupent un ensemble de mutations induites par le même processus. Une de ses 21 signatures est caractérisée par des substitutions C vers T et C vers G et a par conséquent été nommée signature APOBEC3. Après celle liée à l'âge, la signature mutationnelle la plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs est celle liée à l'activité des APOBEC3s. Cette

signature est retrouvée dans 16 types de cancers sur les 30 analysés (Alexandrov *et al.*, 2013). Afin d'investiguer quel membre des A3s pourrait être responsable de cette signature, une analyse de la quantité d'ARNm a été effectuée. Les cancers du poumon, de la vessie, de l'utérus, du sein, du cou et de la gorge présentent des niveaux élevés d'ARNm d'A3B. Ce niveau d'expression corrèle avec le nombre de mutations induites par les APOBECs dans ces tumeurs. Cette constatation suggère une implication d'A3B dans le développement de cancers. De plus, A3B est le seul membre des A3s à être localisé de manière constitutive dans le noyau de la cellule (Burns, Temiz, et Harris, 2013).

Le niveau d'expression d'A3B peut être utilisé dans certains cancers pour prédire la survie ou encore pour définir la résistance du cancer à certains traitements. Dans le cas du cancer de l'utérus, une expression importante d'A3B corrèle avec un meilleur pronostic. Dans le cas du cancer du sein positif aux récepteurs œstrogènes, une expression élevée d'A3B induit une résistance aux traitements à base de tamoxifène (Gao *et al.*, 2018). L'expression d'A3B dans les cancers du poumons non à petites cellules est lié à un taux de survie moins élevé (Yan *et al.*, 2016).

3. Le cancer du poumon non à petites cellules

Le cancer du poumon est le cancer le plus mortel à travers le monde. Actuellement, ce cancer est diagnostiqué dans les stades avancés car les symptômes n'apparaissent que tardivement et aucun moyen de dépistage précoce n'existe pour l'instant. Le taux de survie dans les 5 ans n'est par conséquent que de 15,6%. Lorsque le cancer du poumon est diagnostiqué et que le patient est pris en charge à un stade localisé au poumon, le patient a 52% de chances de survie dans les 5 ans. Le cancer du poumon est divisé en deux catégories : le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) représentant 85% des cancers du poumon et le cancer du poumon à petites cellules représentant 15% des cancers du poumon. Le CPNPC est divisé en trois catégories : les adénocarcinomes (38,5%), les carcinomes épidermoïdes (20%) et le cancer du poumon à grandes cellules (2,9%) (Dela Cruz, Tanoue, et Matthay, 2011). La signature mutationnelle d'A3B est présente dans 35% des carcinomes épidermoïdes et 25% des adénocarcinomes (Alexandrov *et al.*, 2013).

Les cancers sont des maladies multifactorielles avec des mutations d'origine génétique et environnementale. Dans le cas du cancer du poumon, la première cause est le tabagisme. Tous les types de cancer du poumon sont associés au tabagisme mais certains le sont plus que d'autres comme le cancer du poumon à petites cellules et le carcinome épidermoïde. Par contre, l'adénocarcinome est plus fréquent chez les non-fumeurs. Les fumeurs ont quand même 9 à 10 fois plus de risques de développer un cancer du poumon. Le tabac possède des substances carcinogènes comme du 4-(méthylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanone (NKK) qui est capable de se lier à l'ADN et de créer des adduits à l'ADN c'est-à-dire des fragments d'ADN liés de manière covalente à un produit chimique. Des processus de réparation sont activés pour éliminer ces adduits. Si les mécanismes de réparations sont incapables de restaurer l'ADN alors la cellule peut rentrer en apoptose ou acquérir des mutations permanentes. Ces mutations peuvent affecter des voies de signalisation activatrices avec la modulation d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs menant à une prolifération cellulaire et à une tumorigenèse incontrôlées (Dela Cruz, Tanoue, et Matthay, 2011). En plus des fumeurs, les personnes soumises au tabagisme passif voient leur risque de développer un cancer du poumon augmenté de 25% (Kim *et al.*, 2018). Cependant, 25% des cancers du poumon concernent des non-fumeurs. Ce nombre est en augmentation ce qui suggère que d'autres facteurs sont impliqués

dans le développement de ce cancer. La seconde cause est le radon. Le radon est un produit de désintégration du radium et est libéré sous forme de gaz radioactif inerte. Ce composé se trouve dans les sous-sols des habitations. Finalement la troisième cause de cancer du poumon est la pollution de l'air. Les microparticules présentes dans l'air sont capables d'atteindre les voies respiratoires basses. Elles peuvent induire une inflammation et la production de ROS (reactive oxygen species) qui peuvent provoquer des dommages à l'ADN et des lésions cellulaires (Dela Cruz, Tanoue, et Matthay, 2011).

Au niveau génétique, ce sont les oncogène comme *K-ras* et les gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* qui sont généralement dérégulés. 24% des adénocarcinomes du poumon présentent une activation de l'oncogène *K-ras* (Dela Cruz, Tanoue, et Matthay, 2011). Certaines infections pourraient être impliquées dans la cancérogenèse du cancer du poumon mais jusqu'à présent aucun lien n'a été clairement établi. Des chercheurs ont suggéré qu'une infection à *Chlamydia pneumonia* pourrait être liée au développement d'un cancer du poumon. *Chlamydia pneumonia* induit une inflammation et la production de ROS provoquant des dommages à l'ADN et des lésions cellulaires (Littman, Jackson, et Vaughan, 2005).

Le cancer est une maladie qui évolue dans l'espace et dans le temps au niveau des mutations présentes. Cette évolution conduit à une hétérogénéité de la tumeur. Les mutations temporelles sont divisées en deux catégories : les mutations précoces qui sont présentes dans toutes les cellules tumorales et les mutations tardives qui sont retrouvées dans quelques cellules tumorales. Dans les mutations précoces, la substitution la plus importante est de C vers A qui peut être due au tabagisme. Ensuite, cette substitution majoritaire laisse place à des substitutions de C vers T et C vers G dans les motifs TpC qui peuvent provenir de l'activité des APOBEC3s. Dans les CPNPC, les A3s causent 11% des mutations non-silencieuses précoces contre 31% pour les mutations non-silencieuses tardives (de Bruin, McGranahan, et Swanton, 2015). Ces mutations permettent à la tumeur d'évoluer suite à une pression de sélection. Elles contribuent aussi à son hétérogénéité spatiale avec une diversité clonale et temporelle. De plus, elles sont capables d'induire des avantages sélectifs comme la résistance à certains traitements et la capacité de métastaser. Au vu de sa capacité à déstabiliser le génome et sa localisation nucléaire, *A3B* pourrait être une nouvelle cible thérapeutique afin d'augmenter l'efficacité des traitements et de diminuer l'hétérogénéité des tumeurs. L'augmentation de l'ARNm d'*A3B* dans certaines tumeurs pourrait servir de nouveau marqueur de pronostic et permettre de classer les tumeurs et prédire leur évolution (Swanton, McGranahan, Starrett, et Harris, 2015).

Les mécanismes par lesquels *A3B* est surexprimé et induit des mutations dans les cancers du poumon non à petites cellules sont encore méconnus. Pour le cancer du cou et de la gorge un lien entre une augmentation d'*A3B* et la présence de virus dans une tumeur a été établi. Dans les cancers du cou et de la gorge positifs aux papillomavirus humains (HPV), *A3B* est surexprimé au niveau de l'ARN messager. Par contre, ces cancers ne présentent pas d'augmentation d'*A3B* quand ils sont négatifs à HPV (Vieira *et al.*, 2014). De plus, 98% des cancers du cou et de la gorge positifs à HPV présentent des signatures mutationnelles APOBEC3 alors que seulement 76% de ces cancers négatifs à HPV ont cette signature (Cannataro *et al.*, 2019). La surexpression d'*A3B* est aussi retrouvée dans les cancers du col de l'utérus positifs à HPV (Vieira *et al.*, 2014). D'autres infections virales persistantes peuvent également être liées à la présence de la signature APOBEC3. Par exemple, le BK polyomavirus humain (BKPyV) est capable d'induire l'expression d'*A3B*. De plus, il a été établi que ces virus sont impliqués dans la genèse des tumeurs réno-urinaires (Verhalen, Starrett, Harris, et Jiang, 2016). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, aucun lien n'a encore été établi entre une infection et le développement de ce cancer. Néanmoins, il a déjà été démontré que les personnes exposées aux fumées de cigarette sont plus susceptibles de développer une infection aux adénovirus (Adv) puisque ces fumées jouent un rôle immunosuppresseur. De plus, ces

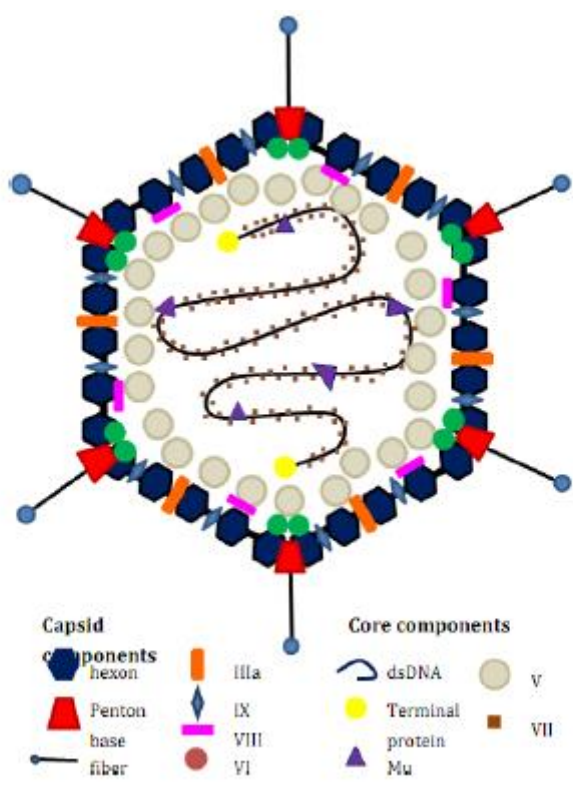


Figure 3 : Structure des adénovirus (Waye et Sing, 2010).

personnes ont plus de risques de développer des infections adénovirales chroniques et des maladies pulmonaires obstructives chroniques (Sharma *et al.*, 2012). Au sein du laboratoire, il a été démontré que les adénovirus sont capables d'induire l'expression d'A3B au niveau de l'ARNm et au niveau protéique des cellules humaines bronchiques (Lejeune *et al.*, In preparation). Ainsi, nous souhaitons investiguer le possible rôle des adénovirus dans la genèse de la signature APOBEC3 observée dans le cancer du poumon.

4. L'adénovirus C2

Les adénovirus appartiennent au genre des *Mastadenovirus* et à la famille des *Adenoviridae* (Lynch, Fishbein, et Echavarría, 2011). Ils sont répartis en 57 sérotypes classés en 7 espèces (A-G). Cette classification est basée sur les propriétés hémagglutiniques, le potentiel oncogénique, le génotype et les analyses phylogénétiques. Ces virus causent des infections respiratoires pour la plupart des espèces des groupes A, B et C, des conjonctives pour les groupes B et D et des infections gastro-intestinales pour les groupes F et G. Les manifestations plus rares sont des cystites et des coliques hémorragiques, des hépatites, des pancréatites, des néphrites ou encore des encéphalites (Chen et Lee, 2014).

Les symptômes liés aux Advs sont des infections respiratoires fébriles, des fièvres ou des diarrhées. Ils passent souvent inaperçus car ils ne sont pas spécifiques à ces virus. Les individus les plus touchés sont les enfants de moins de 4 ans et les personnes immunodéprimées. Les Advs sont résistants dans l'environnement du fait que le virus ne possède aucune enveloppe. Grâce à cette caractéristique, les Advs sont résistants à de nombreux désinfectants. Leur transmission se fait par inhalation, une inoculation conjonctivale directe, la propagation orale ou fécale, l'exposition à des tissus ou du sang infecté et des surfaces contaminées. La période d'incubation est de 2 à 14 jours et dépend du sérotype viral. Aux Etats-Unis, entre 2004 et 2006, 24,3% des infections adénovirales affectant le tractus respiratoire étaient dues à l'Adv C2. L'Adv C2 est une cause importante d'infections respiratoires fébriles à travers le monde mais ce n'est pas le sérotype le plus virulent (Lynch *et al.*, 2011).

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire non-segmenté avec une taille comprise entre 26 et 45 kb. Ces virus sont non-enveloppés icosaédriques et ont une taille de 90 à 100 nm. La capsid possède trois composants principaux : les hexons (240) situés sur les faces et les bords de la capsid, une base de pentons localisée sur les 12 sommets et des fines fibres attachées à la base des pentons (Figure 3). A côté de ces composants majeurs, il y a les composants mineurs qui sont IIIa, VI, VIII et IX. A l'intérieur de la capsid, l'ADN double brin est associé à 5 polypeptides (les protéines terminales (TP), V, VII, Mu et IVa2). Ces polypeptides jouent un rôle dans la stabilisation de la capsid et dans la liaison à la cellule (Waye et Sing, 2010). Le génome des adénovirus encode des unités transcriptionnelles précoces (E1A, E1B, E2, E3 et E4) et tardives (L1-5) qui donnent de multiples ARNm et protéines (Chen et Lee, 2014). Les unités précoces sont nécessaires à la réplication du génome viral et à la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Les unités tardives sont impliquées dans la production de virions matures. Les génomes adénoviraux possèdent des régions de répétition terminale inversée aux extrémités 3' et 5' qui contiennent des motifs de séquence conservés et sont utilisés comme origine de réplication virale. Selon le type d'Adv, les génomes peuvent avoir un ou deux gènes d'ARN associés au virus (VA RNA) non codants impliqués dans la régulation de la traduction. Certains d'entre eux (VA ARNI) peuvent agir comme des microARN (Lion, 2014).

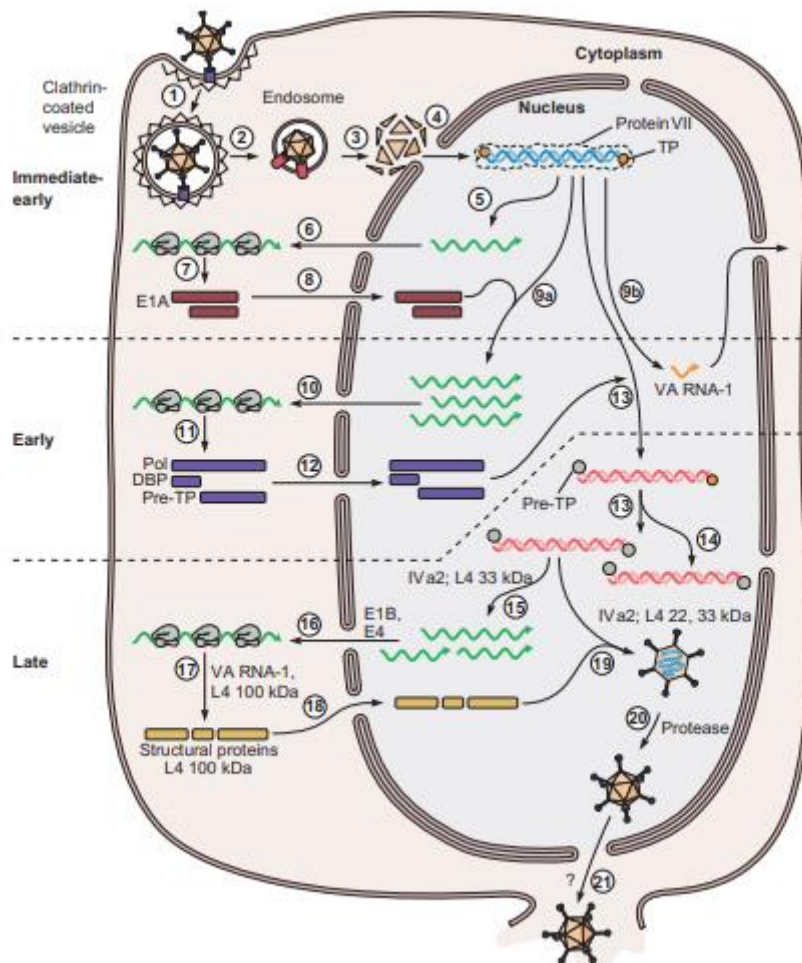


Figure 4 : Cycle de réplication de l'adénovirus C2 (« Virus Replication », 2011). Le virus s'attache sur une cellule humaine permissive par une interaction entre la fibre du virus et le récepteur coxsackie-adénovirus de la cellule. Le virus rentre par endocytose (1 et 2) via l'interaction entre un penton et une intégrine. Le virion se retrouve morcelé ce qui permet son entrée dans le cytoplasme (3). Le génome viral associé à la protéine de base VII migre vers le noyau (4). L'ARN polymérase II de la cellule hôte transcrit le gène de la protéine E1A (5). Après épissage, l'ARN de E1A est exporté vers le cytoplasme (6) afin d'y être traduit (7). Les protéines sont ensuite importées vers le noyau (8) où elles vont réguler la transcription des ARN cellulaires et viraux. E1A stimule la transcription des gènes viraux précoces via l'ARN polymérase II (9a). La transcription des gènes VA par l'ARN polymérase III de la cellule hôte commence durant la phase précoce de l'infection (9b). Les ARNs pré-messagers sont exportés vers le cytoplasme (10) où ils sont traduits (11). Les protéines précoces sont constituées des protéines virales nécessaires à la réplication qui sont importés vers le noyau (12) et qui interagissent avec les protéines cellulaires impliquées dans la réplication du génome (13). Les molécules d'ADN virales répliquées servent de base pour la réplication (14) ou pour la transcription des gènes tardifs (15). Les promoteurs des gènes tardifs sont généralement activés par la réplication de l'ADN. Pour permettre la transcription totale des gènes tardifs, les protéines tardives Iva2 et L4 sont requises. Les ARN messagers tardifs sont exportés dans le cytoplasme par l'action de E4 Orf6 et E1B-55K (16) où ils sont traduits (17) en présence de l'ARN VA et l'ARN-1 VA qui bloquent les défenses cellulaires et de L4 100-kDa. Les protéines tardives servent de chaperonnes afin d'assembler les hexons et les protéines de structure. Elles sont exportées dans le noyau (18). La capside est assemblée dans le noyau et contient l'ADN viral (19). Cette construction est un virion immature non infectieux. L'assemblage a besoin d'un signal d'encapsidement présent sur la fin du génome et des protéines L4 22/33 kDa et IVa2. Le virion mûre est formé quand les protéines précurseurs ont été clivées par la protéase L3 (20). Les virions sont ensuite relâchés dans l'environnement via la destruction de la cellule hôte (21).

Le cycle infectieux des Advs commence avec l'entrée du virus dans la cellule épithéliale (Figure 4). L'Adv rentre dans la cellule hôte grâce à l'interaction entre les fibres du virus et le récepteur coxsackievirus B et adénovirus (CAR). Cette interaction est une liaison à haute affinité qui permet de mettre en contact les bases de penton et les intégrines cellulaires qui sont des protéines de la matrice extracellulaire. Cette interaction avec les intégrines induit l'activation du processus d'endocytose médiée par des clathrines. Dans la cellule, le virus se retrouve dans un endosome possédant un pH faible. Ce dernier influence la structure de la capsid du virion en entraînant la perte de plusieurs protéines du virion et aussi le clivage d'autres protéines par la protéase virale. L'exposition de la protéine VI à l'extérieur de la capsid induit la destruction de la membrane des endosomes. Les virions avec une capsid partiellement dissociée sont libérés dans le cytoplasme. Ensuite, ils s'associent aux microtubules afin d'être transportés vers le noyau. Quand ils arrivent à la membrane nucléaire, les virions s'associent au complexe des pores nucléaires qui induit la séparation des protéines virales liées à l'ADN viral. L'ADN viral est libéré dans le noyau (« Virus Replication », 2011).

L'expression des gènes viraux se divisent en deux phases : une phase précoce et une phase tardive. Pour transcrire son ADN, le virus utilise la machinerie de transcription de la cellule hôte. Les gènes précoces possèdent trois fonctions : la production des protéines nécessaires à la réplication, la mise en place des systèmes d'inhibition des défenses cellulaires et la stimulation du cycle cellulaire afin d'améliorer la réplication virale. La première protéine exprimée est E1A qui induit la transcription d'autres protéines adénovirales. Quand la synthèse de l'ADN commence, la plupart des gènes tardifs sont exprimés dont beaucoup proviennent d'ARNm épissés. Les gènes tardifs codent pour les protéines structurelles des virions. Ces protéines sont synthétisées dans le cytoplasme et transportées vers le noyau afin d'y être assemblées. A cause de la structure complexe des adénovirus, certaines protéines virales ont été identifiées comme des chaperonnes afin de déplacer les protéines structurelles vers des sites de maturation. D'autres protéines ont un rôle d'échafaudage pour assembler les sous-unités virales. Le virus encode une protéase qui utilise de l'ADN comme cofacteur pour dégrader les protéines précoces et les protéines échafaudages. De plus, cette protéase clive des protéines précurseurs. Les cellules infectées par des adénovirus sont reconnaissables grâce aux grands réseaux cristallins de particules virales qui se présentent sous forme de corps d'inclusion intranucléaires (« Virus Replication », 2011).

Au vu de la complexité de son cycle de réplication, l'adénovirus met entre 10 heures et 24 heures pour le réaliser. Vu la longue période de réplication, il doit être capable d'inhiber efficacement les réponses antivirales de la cellule hôte. Pour y arriver, le virus utilise les protéines précoces comme E1A qui est capable d'amener les cellules à entrer dans la phase S afin de répliquer le génome viral. Cet événement conduit la cellule à réagir afin de contrer l'infection. La cellule induit un phénomène d'apoptose pour arrêter la réplication du virus. Pour éviter l'apoptose, le virus produit la protéine E1B-19K qui cible les protéines impliquées dans l'apoptose. Il est aussi capable d'inhiber la production d'interféron (IFN) et les voies de réponses associées à ceux-ci. La voie de la protéine kinase (PKR) fait partie des réponses IFN. Cette voie est inhibée par le virus, via des VA RNA. Ces derniers peuvent aussi interagir avec les ARNs interférents (RNAi) qui jouent un rôle d'inhibiteur dans la traduction des ARNm viraux. Afin de promouvoir la synthèse des protéines virales, les Advs empêchent la synthèse des protéines cellulaires en empêchant l'exportation d'ARNm cellulaires du noyau et en bloquant leur traduction via la modification des facteurs d'initiation de la traduction (« Virus Replication », 2011).

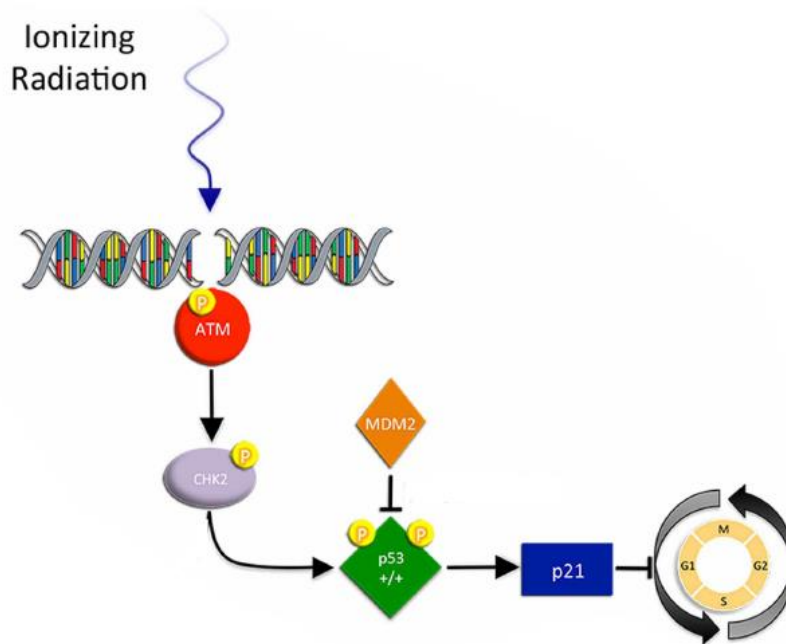


Figure 5 : L'activation de p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire (Golden *et al.*, 2012). Une cassure double brin dans l'ADN provoqué par des radiations ionisantes induit le recrutement d'ATM qui s'autophosphoryle. ATM phosphorylé phosphoryle Chk2 pour l'activer. Chk2 phosphoryle p53 sur la sérine 15 et la sérine 20. L'ajout de groupement phosphate sur p53 empêche MDM2 d'ubiquitiner p53 et donc sa dégradation. L'activation de p53 induit la transcription de p21 qui empêche la formation du complexe cycline/CDK.

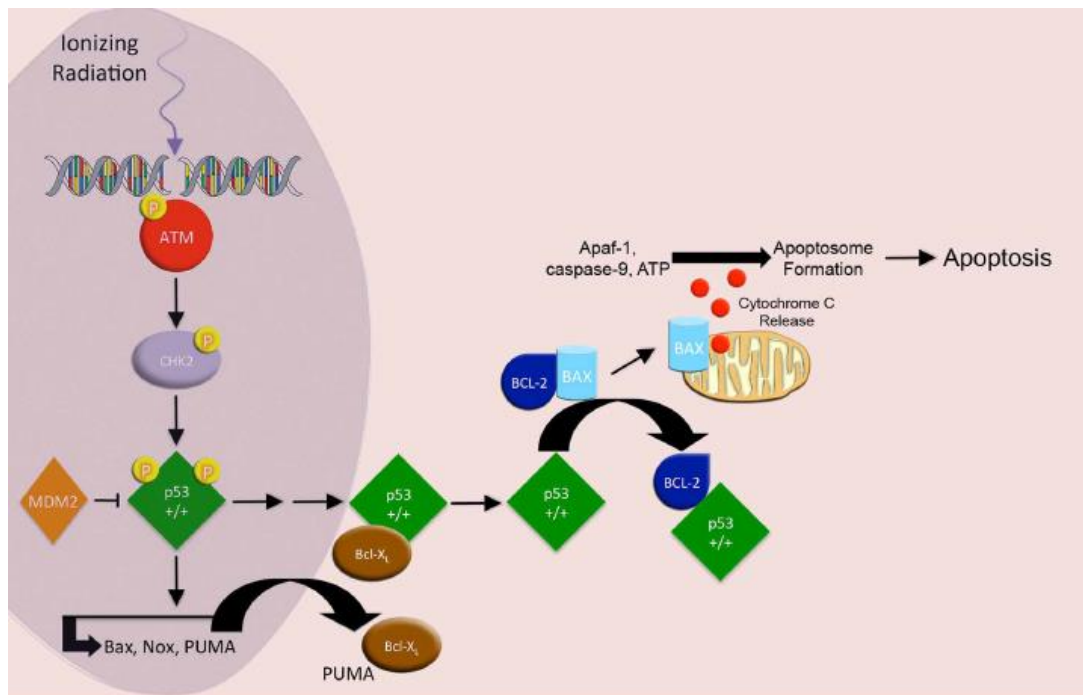


Figure 6 : Voie intrinsèque de l'apoptose (Golden *et al.*, 2012). Une cassure double brin dans l'ADN provoqué par des radiations ionisantes induit le recrutement d'ATM qui s'autophosphoryle. ATM phosphorylé phosphoryle Chk2 pour l'activer. Chk2 phosphoryle p53 sur la sérine 15 et la sérine 20. L'ajout de groupement phosphate sur p53 empêche MDM2 d'ubiquitiner p53 et donc sa dégradation. L'activation de p53 induit la transcription de protéines pro-apoptotiques (Bax, Nox et PUMA). p53 transloque dans le cytoplasme où il se lie à Bcl X₁ une protéine anti-apoptotique. PUMA transloque aussi vers le cytoplasme où il dissocie le complexe p53/Bcl X₁. p53 dissocie le complexe Bcl-2/Bax et se lie à Bcl-2. Bax va perméabiliser la membrane mitochondriale externe ce qui libère le cytochrome c. Ce dernier forme l'apoptosome avec la caspase 9 et de l'ATP. L'apoptosome va activer la voie des caspases et induire la mort cellulaire.

5. La protéine p53

La protéine p53, encodée par le gène *TP53*, a été découverte grâce à son interaction avec une protéine virale oncogène. p53 est un senseur de stress. Il permet de répondre à une infection virale, une privation de nutriments et un stress oxydatif en réduisant la prolifération cellulaire, en altérant le métabolisme et en inhibant la survie cellulaire. Il est surexprimé lorsque l'ADN est endommagé afin d'arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose si les mécanismes de réparation échouent dans la restauration de l'ADN. Suite à ce rôle majeur de préservation du génome, p53 a été surnommée « gardien du génome ». Au-delà de ce rôle, p53 est capable de lier directement des protéines impliquées dans l'angiogenèse, l'autophagie, l'immunomodulation et d'autres processus qui entravent le développement de cancer. En tant que facteur de transcription, il est capable de réguler l'expression de plus de 500 gènes via les 4000 sites de liaisons présents dans le génome humain (Simabuco *et al.*, 2018). Sa régulation dépend des interactions homo- et hétérodimères. La protéine p53 possède un domaine d'oligomérisation C-terminal. Ce dernier permet la formation d'homotétramères qui induisent la liaison spécifique à l'ADN de la séquence ciblée par le facteur de transcription et la transcription du gène ciblé (Stindt *et al.*, 2015). Les séquences génomiques des sites de liaison à p53 sont appelées éléments de réponse à p53 (p53 RE). L'affinité de p53 pour ses sites est variable selon les gènes ciblés. p53 cible les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire avec une haute affinité. Par contre, il a une faible affinité pour les gènes impliqués dans l'apoptose (Joerger et Fersht, 2007). En plus de son affinité pour certains gènes, l'activité de p53 est régulée par certains de ses partenaires capables d'interagir avec lui. Par exemple, p53 peut se lier avec la protéine du récepteur coactivateur 1- α activé par les proliférateurs des peroxysomes (PGC-1 α). L'interaction entre ces deux protéines dirige l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et du métabolisme (Simabuco *et al.*, 2018).

Lorsqu'une cellule subit des dommages à l'ADN comme des cassures doubles brins, la protéine ATM est recrutée afin de réparer l'ADN. Elle s'associe avec un complexe qui induit une autophosphorylation. Ensuite, elle phosphoryle la protéine kinase de point de contrôle 2 (Chk2) qui phosphoryle p53 sur la sérine 15 afin d'arrêter le cycle cellulaire (Figure 5). MDM2, une ubiquitine ligase, est le répresseur de p53. Il induit sa dégradation en l'ubiquitinant. Quand p53 est activé, MDM2 n'est plus capable d'ubiquitinyler p53. Après son activation, p53 induit la transcription de p21 qui inhibe la formation des complexes cycline/CDK et donc le cycle cellulaire. Si les mécanismes de réparation échouent à restaurer l'ADN, la cellule met en place le phénomène d'apoptose (Figure 6). Chk2 est capable de phosphoryler le domaine de transactivation de p53 situé sur la sérine 20 pour stimuler son activité lorsque p53 est déjà phosphorylé sur la sérine 15. Ces phosphorylations mènent à une accumulation nucléaire de p53 actif qui induit la transcription des gènes pro-apoptotiques *PUMA*, *Bax* et *Noxa*. La protéine p53 peut transloquer dans le cytoplasme où elle est associée à Bcl X₁, une protéine anti-apoptotique. Lorsque PUMA est transporté vers le cytoplasme, il dissocie le complexe p53/Bcl X₁ et libère p53. Le p53 cytoplasmique libre dissocie le complexe Bcl-2/Bax et se lie à Bcl-2, une protéine anti-apoptotique. La protéine pro-apoptotique Bax se retrouve libre et induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe qui libère le cytochrome c. Ce dernier forme l'apoptosome en association avec Apaf 1 et de l'ATP. L'apoptosome active la caspase 9 initiant la cascade de caspases en activant les caspases 3 et 7. Cette cascade conduit à la mort programmée de la cellule (Golden, Pellicciotta, Demaria, Barcellos-Hoff, et Formenti, 2012).

Récemment, une étude a montré que p53 est capable de se lier à proximité des sites d'initiation de la transcription des A3s. p53 peut influencer l'expression des A3s en présence des réponses à IFN. Ces derniers sont des cytokines majeures produites par le système immunitaire inné en

réponse à une infection virale. p53 régule positivement l'expression des A3s excepté pour A3B dont l'expression est inhibée par p53. Au vu de son rôle de gardien du génome, il préserve sa stabilité grâce à la répression des rétrotransposons à longue répétition. Pour ce faire, p53 augmente l'expression d'A3C qui inactive les LINEs. Les dommages à l'ADN induisent l'activation de p53. Ce dernier bloque le cycle cellulaire et active les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation à l'ADN. Dans ce contexte, la répression d'A3B par p53 permet d'éviter qu'il soit en contact avec de l'ADN génomique sous forme simple brin (Menendez *et al.*, 2017).

Au vu de son rôle antiprolifératif et de préservation du génome, TP53 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Dans 50% des cancers, TP53 contient des mutations somatiques. Ces mutations deviennent plus fréquentes dans les stades avancés et les cancers qualifiés d'agressifs. Dans les cancers avec des taux de mutations faibles, p53 se retrouve généralement inactivé par d'autres mécanismes que la mutation. La perte de fonction de p53 conduit à un gain de fonction de la cellule c'est-à-dire qu'elle va par exemple pouvoir métastaser (Olivier, Hollstein, et Hainaut, 2010). Une autre conséquence à cette perte est l'évolution de la cellule vers un cycle cellulaire incontrôlé et une accumulation des mutations somatiques dans le génome. De plus, les versions mutées de p53 ne jouent plus leur rôle de répresseur d'A3B. Une augmentation du niveau transcriptionnel d'A3B est notamment retrouvée dans les cancers du sein possédant un p53 muté. La présence d'A3B induit l'apparition de mutation spécifique à celui-ci qui promeut le développement de cancer (Periyasamy *et al.*, 2017).

Les mutations dans le gène TP53 sont nombreuses. Les cancers présentant des p53 mutants sont généralement associés à un mauvais pronostic (Muller *et al.*, 2009). 86% des mutations p53 se situent dans le domaine de liaison à l'ADN. Parmi les mutations recensées, 87% de celles-ci sont des mutations faux sens, c'est-à-dire qu'elles induisent un changement d'acide aminé. Les résidus les plus mutés sont situés dans l'établissement de contacts avec l'ADN et dans le soutien de la structure de la surface de liaison à l'ADN. Les protéines mutantes ont donc été classées en deux catégories : les mutations de contact comme R273H et structurelles comme R175H. La mutation R175H est le mutant le plus fréquent puisque l'introduction de résidus d'histidine est moins déstabilisante du fait de leur petite taille. Cette mutation crée une distorsion suite à une interférence directe dans la liaison au zinc qui stabilise deux grandes boucles impliquées dans le domaine de liaison à l'ADN. De plus, elle induit une rétention partielle de la fonction de la protéine. Le mutant R273H n'affecte pas l'architecture du domaine de liaison à l'ADN mais il induit une perte de contact critique avec l'ADN (Olivier *et al.*, 2010). Les mutations R175H et R273H montrent une augmentation des métastases et une distribution différente du cancer par rapport à l'absence de p53. L'absence de p53 conduit à une perte de fonction alors que les mutations R175H et R273H conduisent à un gain de fonction. Dans les cellules cancéreuses, les formes mutantes et sauvages de p53 peuvent être présentes en même temps. Ce cas de figure induit une augmentation des métastases et une croissance tumorale plus rapide que dans le cas où p53 est présent sous forme mutée et est absent sur l'autre allèle (Pfister et Prives, 2017).

Certains virus comme les papillomavirus 16 et 18 ont été associé au développement de certains cancers comme le cancer du cou et de la gorge, du col de l'utérus, du rectum et du sein. HPV possède des oncoprotéines capables d'immortaliser les cellules infectées suite à son intégration dans le génome cellulaire. Les oncoprotéines des HPV sont E6 et E7 qui induisent respectivement la dégradation de p53 et de pRB. Ces deux protéines sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. En ciblant ces protéines, HPV enlève le frein du cycle cellulaire afin de permettre la réplication du génome viral. La répression de p53 par E6 induit la dérégulation d'A3B. De plus, le promoteur d'A3B possède des éléments sensibles à E6 comme une protéine à doigt de zinc impliquée dans la transactivation d'A3B. HPV E6 est aussi capable d'induire l'expression d'A3B par le renforcement de l'expression du domaine du facteur de transcription

initiateur (TEAD) qui cible le promoteur *A3B*. Toutes ces observations suggèrent une activation de la transcription d'*A3B* par E6. La transcription d'*A3B* et la dégradation de p53 par E6 mènent à une augmentation d'ARNm *A3B*. Dans les cancers du cou et de la gorge positifs à HPV, *A3B* est surexprimé au niveau transcriptionnel et des mutations C vers T et C vers G sont présentes. La présence de mutations APOBEC et l'induction d'*A3B* par HPV suggèrent un lien entre l'infection et le développement de tumeur. D'autres virus sont également capables d'induire l'expression d'*A3B* via des oncogènes comme les BK polyomavirus qui augmentent l'expression d'*A3B* avec leur large antigène T (Warren, Westrich, Van Doorslaer, et Pyeon, 2017). Les adénovirus possèdent eux aussi des oncogènes : E1B-55K et E1A qui dégradent respectivement p53 et pRB (Wong, Lemoine, et Wang, 2010).

Suite à son implication dans l'apoptose, p53 est une cible de traitement dans les cancers. Certaines molécules comme la doxorubicine (Doxo) et la cisplatine (CP) sont utilisés dans des traitements de chimiothérapie. La Doxo est un agent qui endommage l'ADN en s'intercalant dans celui-ci ce qui entraîne une inhibition de la réplication et de la transcription. De plus, elle induit des cassures dans l'ADN suite à son interaction avec la topoisomérase II. Elle cible aussi la chaîne de respiration mitochondriale induisant la biogenèse mitochondriale, l'augmentation des ROS et l'apoptose. A faible dose, la Doxo augmente l'expression de p53. Ce dernier se lie alors aux promoteurs des gènes pro-apoptotiques comme PUMA. La cisplatine induit aussi des dommages à l'ADN en formant des adduits et en inhibant la réplication et la transcription. Suite aux dommages à l'ADN, p53 est activé et est capable d'induire l'apoptose cellulaire. Les cellules cancéreuses expriment des ABC transporteurs capables d'exporter ces molécules de chimiothérapies. Pour éviter cette exportation, ces agents chimiothérapeutiques sont conjugués avec du glutathion qui est capable d'inhiber les ABC transporteurs (Simabuco *et al.*, 2018).

Des résultats préliminaires ont montré que les adénovirus induisent l'expression d'*A3B* au niveau ARNm et protéique dans des cellules bronchiques possédant un p53 sauvage. Connaissant l'implication de p53 dans la régulation d'*A3B*, la question de ce mémoire est d'étudier l'impact du statut de p53 cellulaire sur l'expression d'*A3B* durant une infection adénovirale. Différentes possibilités ont été étudiées :

- La diminution de l'expression de p53 à l'aide d'interférence ARN ;
- L'expression simultanée d'un p53 cellulaire sauvage et de formes mutées de p53 telles que R175H et R273H ;
- L'augmentation de l'expression de p53 suite à l'exposition à des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine et la cisplatine.

Matériels et méthodes

1. Lignées cellulaires

Pour la réalisation de ce mémoire, les cellules utilisées étaient des cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC) 3-KT. Elles ont été immortalisées avec une télomérase humaine (h-TERT) et une CDK4 murine. Ces cellules étaient définies comme les cellules sauvages (WT). Les HBEC3-KT *TP53* knock-down ont été transfectées avec le plasmide pSUPER.retrozeocin (pSRZ) qui contient un gène de résistance à la zéocine et un short hairpin ARN (shRNA) ciblant p53 et un plasmide vecteur pBabe-hyg via un vecteur rétroviral (Sato *et al.*, 2006). Les HBEC3-KT scrambled (Scr) ont été transduites avec des lentivirus contenant un plasmide *pSicoR-MS2* qui a un shRNA non ciblé (Wissing, Montano, Garcia-Perez, Moran, et Greene, 2011).

Les HBEC3-KT ont été transduites à une MOI de 0,01 avec des lentivirus contenant un vecteur pLV exprimant un gène de sélection à la blasticidine et possédant soit le gène *TP53* sauvage (*TP53* WT) soit la forme mutée R175H (*TP53* R175H) ou R273H (*TP53* R273H) de p53. Les HBEC3-KT Luc ont été utilisées comme contrôle des HBEC3-KT *TP53* WT, R175H et R273H. Les HBEC3-KT Luc ont été transduites à une MOI de 10 avec des lentivirus contenant un vecteur pLV exprimant un gène de sélection à la blasticidine et le gène de la luciférase.

Les cellules pulmonaires cancéreuses, A549 ont également été cultivées afin de produire l'Adv C2.

2. Culture cellulaire

Les HBEC3-KT ont été cultivées sur des flasques T75 gélatinées contenant 10 mL de milieu kératinocyte sans sérum avec de la L-glutamine (Gibco) complété avec 25 mg d'extrait de glande pituitaire bovine et 2,5 µg d'hormone de croissance recombinante humaine. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur humidifié.

Les A549 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) complété avec 10% de FCS. Elles ont également été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur humidifié.

3. Production de l'adénovirus humain C2

Les cellules A549 ont été cultivées dans le milieu OPTI-MEM[®]I avec du sérum réduit (ThermoFischer Scientific) sans rouge phénol. Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, elles ont été infectées avec l'adénovirus C2 à une MOI de 20. Lorsque 80% des cellules ont présenté des effets cytopathiques et formé des amas caractéristiques d'une infection adénovirale, les cellules ont été décrochées à l'aide d'un scrappeur et ont subi 3 cycles de congélation/décongélation. Le surnageant contenant les virions a été filtré avec un filtre de 0,22 µm. Le filtre a ensuite été disposé sur un tube de concentration appelé Amicon[®] Ultra-100K (Merck) et centrifugé à 3000g pendant 15 minutes. Les molécules ayant une taille inférieure à 100 kDa ont été enlevées avec le surnageant alors que les virions et les molécules comprises entre 100 kDa et 0,22 µm ont été retenus dans la partie supérieure du tube. Les virions ont été

lavés à deux reprises avec du PBS qui a été éliminé par une centrifugation de 3000g pendant 15 minutes. La dernière étape de centrifugation finissait quand les virions étaient concentrés dans 1 mL de PBS. Après la concentration, les virions ont directement été stockés à -80°C. Les virions ont ensuite été titrés par plage de lyse.

4. Infection des cellules

Quand les cellules étaient à 60% de confluence, elles ont été infectées avec l'adénovirus humain C2 avec une MOI de 1. L'infection a été maintenue durant 2 ou 4 jours.

5. Carcinogènes

5 mg de cisplatine (Cayman chemical) ont été dissouts dans une solution saline de 0,9% afin d'obtenir une solution stock de 0,5 mg/mL. Plusieurs doses (0,5, 1, 5 et 10 μ M) et plusieurs temps d'incubation (24, 48 et 72 heures) ont été testées (Figure S2A) afin de déterminer la dose nécessaire à l'induction de p53 avec le moins d'effets cytotoxiques. La dose 5 μ M a été choisie. Cette dose a été mise sur les cellules 24 heures avant l'infection. Toutes les 48 heures, une dose de 5 μ M de CP a été ajoutée sur les cellules.

La doxorubicine (Cayman chemical) a été dissoute dans du PBS avec 0,1% de diméthyle sulfoxide (DMSO) pour arriver à une concentration de 0,5 mg/mL. Plusieurs doses (0,5, 1, 2 et 4 μ M) et plusieurs temps d'incubation (8, 24 et 48 heures) ont été testées (Figure S2B) afin de déterminer la dose nécessaire à l'induction de p53 avec le moins d'effets cytotoxiques. La dose 1 μ M a été choisie. Cette dose a été mise sur les cellules 8 heures avant l'infection. Toutes les 48 heures, une dose de 1 μ M de Doxo a été ajoutée sur les cellules.

6. Extraction d'ARN et RT-qPCR

Après la récolte des cellules, l'ARN a été extrait à l'aide du kit ReliaPrep™ Miniprep tissu et cellules miRNA (Promega) selon les instructions du fabricant. L'ARN a ensuite été conservé à -80°C. Une rétro transcription a été pratiquée sur l'ARN en utilisant le kit de synthèse d'ADN complémentaire iScript (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. La quantification des ARNs messagers des *APOBECs*, de *TP53* et des gènes de ménages (*TBP*, *HPRT* et *GAPDH*) a été réalisée en utilisant le Fast Start Universal SYBR® Green Master (ROX) (Roche) et avec des amorces spécifiques (voir table 1). Pour chaque échantillon, trois dilutions (10, 30 et 90) ont été analysées par le système illumina® ECO™ Real-Time PCR. Le programme de qPCR utilisé était 1 cycle de 95°C pour la dénaturation initiale et 45 cycles de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 55°C (hybridation) et 30 secondes à 72°C (élongation). Pour quantifier l'expression des *A3s* et de *TP53*, le ratio entre les *A3s*, *TP53* et les gènes de ménages a été calculé. Ensuite, les résultats ont été exprimés en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

7. Extraction protéique et Western Blot

Après la récolte des cellules, les cellules ont été resuspendues dans 100 ou 50 μ L de RIPA (50 mM de Tris HCl à un pH de 8, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,5% de sodium déoxycholate et 0,1% de SDS) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete), du Triton X-100 et du PMSF 1mM. Les cellules resuspendues ont été incubées pendant 30 minutes sur glace et ensuite, elles ont subi 3 cycles de 30 secondes ON/30 secondes OFF de sonication avec un dispositif Bioruptor[®] à 4°C (Diagenode). Les échantillons ont été centrifugés à 14 000 rpm à 4°C et le surnageant a été récupéré et conservé à -80°C.

Les protéines ont été quantifiées à l'aide du kit de dosage protéique Pierce[™] BCA (ThermoFischer Scientific) selon les instructions du fabricant. Les mesures ont été effectuées avec un Multiskan EX (Thermo Electro Corporation) à 550 nm.

Pour chaque échantillon, 25 μ g de protéines ont été chargés dans un gel SDS-PAGE 10% et ont migrés pendant 3 heures à 120V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PolyVinylDene Fluoride (PVDF) activée à l'aide de méthanol. Le transfert actif a été fait à 4°C pendant 1h10 à 200 mA. La membrane a été bloquée avec du TBST-BSA 5% (Tris-Buffered Saline avec 0,1% de Tween-20) pendant 3 heures pour A3B et 1 heure pour p53. Les anticorps primaires ciblant A3B (National Institutes of Health, 1/1000, lapin), hsp90 (Sigma-Aldrich, 1/1000, lapin) et p53 (MiliporSigma, 1/1000, souris) ont été dilués dans du TBST-BSA 5%. Les anticorps primaires ont été appliqués sur la membrane toute la nuit à 4°C. Après, la membrane a été lavée à 3 reprises pendant 10 minutes avec du TBS-T. Les anticorps secondaires anti-lapin (Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP, Dakon) et anti-souris (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, Dakon) dilués 1/2000 dans du TBST-BSA 5% ont été appliqués sur la membrane pendant 1 heure. La membrane a été lavée à 3 reprises pendant 15 minutes avec du TBS-T. La membrane a été incubée avec un substrat de révélation au Pierce[™] (Thermo Scientific) pour hsp90 et p53 et un substrat de révélation plus sensible à base de Femto (SuperSignal[™] Thermo Scientific) pour A3B. Les protéines ont ensuite été détectées par un mini ImageQuant LAS4000 (Ge Healthcare Life Sciences) avec une caméra CCD refroidie.

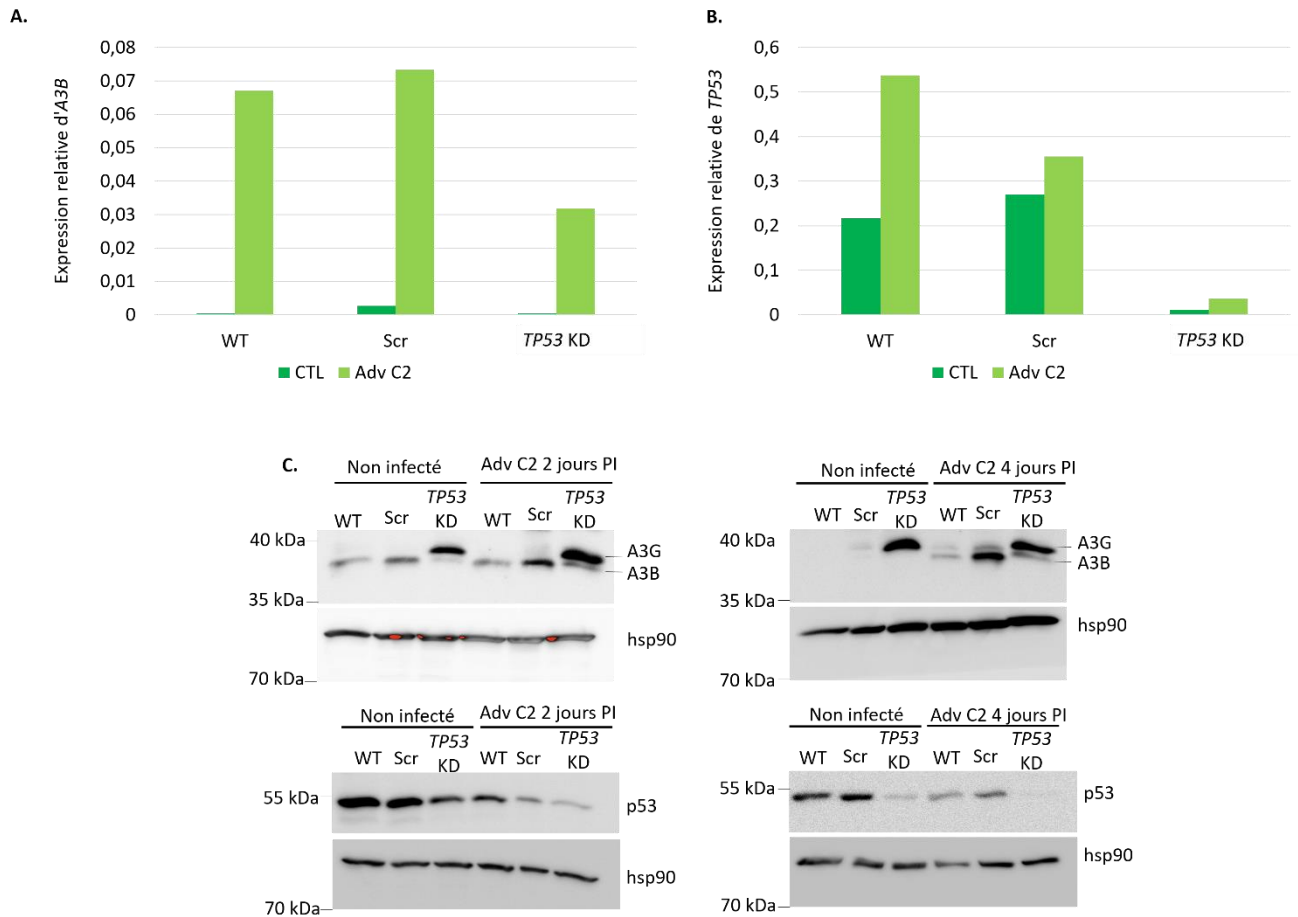


Figure 7 : Expression d'A3B pendant une infection adévirale de cellules bronchiques HBEC3-KT WT et *TP53* KD. A : Expressions relatives des ARN messagers d'A3B normalisées par rapport à *TBP*, *HPRT* et *GAPDH* après 4 jours d'infection par l'adénovirus C2 (MOI = 1) par RT-qPCR. B : Expressions relatives des ARN messagers de *TP53* normalisées par rapport à *TBP*, *HPRT* et *GAPDH* après 4 jours d'infection par l'adénovirus C2 (MOI = 1) par RT-qPCR. C : Niveaux protéiques d'A3B, A3G et p53 par Western Blot après 2 et 4 jours d'infection. La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge.

Résultats

1. L'infection de cellules bronchiques (HBEC3-KT) par l'adénovirus C2 induit l'expression de la protéine APOBEC3B de façon similaire dans les cellules p53 sauvage (WT) que p53 atténué (KD)

Pour étudier l'influence de p53 sur l'expression d'A3B pendant une infection adénovirale, des cellules bronchiques primaires (HBEC3-KT) exprimant un shRNA ciblant *TP53* (*TP53* KD) ont été utilisées. Puisque l'expression de gènes stimulés par les IFN peut être induite par une infection lentivirale ou par l'expression de shRNA (Pebernard et Iggo, 2004), des HBEC3-KT exprimant un shRNA scrambled ont été utilisées comme contrôle en plus des HBEC3-KT sauvage (WT, cellules non transduites).

Quand les cellules étaient à 50% de confluence, ces trois lignées cellulaires ont été infectées avec l'adénovirus C2 à une MOI de 1. Après 2 et 4 jours d'infection, l'ARNm et les protéines ont été extraits. La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge. L'expression des sept *A3s*, de *TP53* et de trois gènes de ménage (*HPRT*, *TBP* et *GAPDH*) au niveau de l'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR (Figure S1). Parmi les sept gènes *A3s*, seul *A3B* montre une augmentation de son expression au niveau de l'ARNm suite à l'infection (Figure 7A). Cette augmentation est plus forte après 4 jours d'infection. Après 2 et 4 jours d'infection contrairement à *A3B*, *A3C* montre une diminution de son expression. L'expression d'*A3F* n'est quant à elle pas influencée par l'infection (Figure S1). L'expression des autres *A3s* (*A3A*, *A3DE* et *A3H*) n'a pas été détectée. Ces observations sont similaires dans les HBEC-3KT WT, Scr et *TP53* KD. Aucune différence n'a été observée entre les trois lignées (Figure 7A). L'expression de *TP53* diminue de l'ordre de 10 fois dans les HBEC3-KT *TP53* KD par rapport aux HBEC3-KT WT et Scr comme attendu mais elle n'est pas influencée par l'infection virale (Figure 7B).

L'expression de *A3B*, *A3G* et p53 au niveau protéique a été étudiée dans ces trois lignées par western blot (Figure 7C). Les résultats montrent que *A3B* est plus exprimé après 2 et 4 jours d'infection. Cet effet semble plus important dans les HBEC3-KT Scr. L'expression d'*A3G* est induite dans les HBEC3-KT *TP53* KD comparée aux deux autres lignées. Après 4 jours d'infection, *A3G* est plus exprimé dans les conditions infectées. Comme attendu, l'expression de p53 est plus faible dans les HBEC3-KT *TP53* KD que dans les deux autres lignées. Néanmoins, l'adénovirus C2 réduit drastiquement le niveau de p53 dans les trois lignées dès 2 jours d'infection et la réduction est d'autant plus importante après 4 jours d'infection.

Pour conclure, l'infection adénovirale induit une rapide dégradation de p53 et une augmentation de l'expression d'*A3B* aux niveaux transcriptionnel et protéique de manière semblable dans les HBEC3-KT WT et *TP53* KD. La diminution de l'expression de p53 à l'aide de shRNA ne semble donc pas avoir un impact sur l'expression d'*A3B* durant une infection adénovirale.

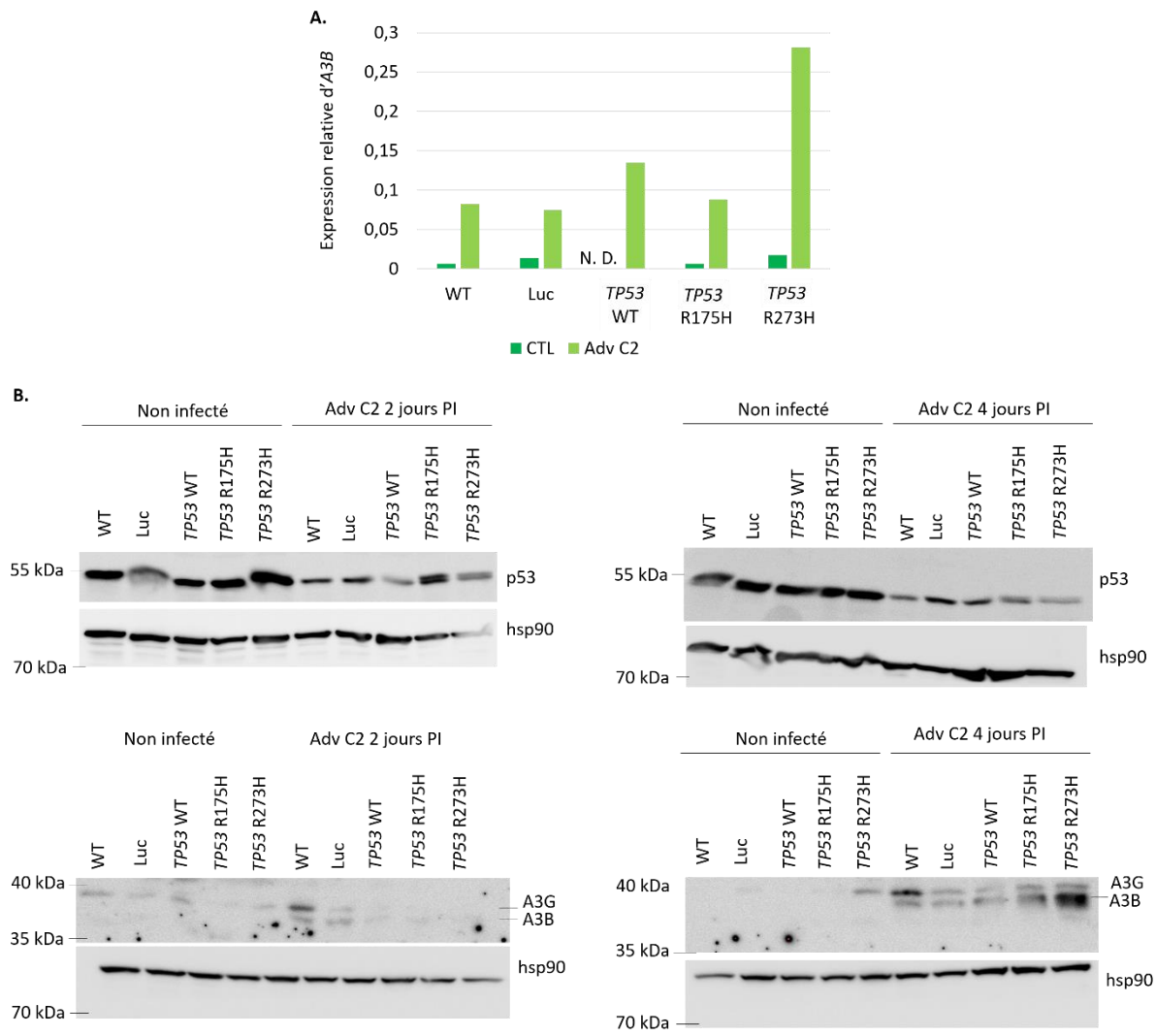


Figure 8 : Expression d'A3B pendant une infection adénovirale dans des cellules bronchiques HBEC3-KT possédant une protéine p53 mutée (*TP53 R175H* ou *R273H*). A : Expressions relatives des ARN messagers d'A3B normalisées par rapport à *TBP* et *GAPDH* après 4 jours d'infection adénovirale par RT-qPCR. B : Niveaux protéiques d'A3B, A3G et de p53 après 2 et 4 jours d'infection à l'adénovirus C2 avec une MOI de 1 par Western Blot. La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge.

2. L'infection de cellules bronchiques (HBEC3-KT) par l'adénovirus C2 semble induire une plus forte expression de la protéine APOBEC3B dans les cellules p53 muté (R273H) que p53 sauvage (WT)

Une autre approche pour étudier l'influence du statut p53 sur l'expression d'A3B est de s'intéresser aux mutants les plus rencontrés dans les cancers. Nous avons choisi un mutant de contact (*TP53* R273H) et un mutant de structure (*TP53* R175H). Pour ce faire, des HBEC3-KT exprimant en plus de la forme WT soit la forme mutée R175H ou R273H de p53 (HBEC3-KT *TP53* R175H ou R273H) ont été utilisées. Comme l'expression d'A3B peut être induite par une infection lentivirale des HBEC3-KT exprimant le gène de la luciférase (HBEC3-KT Luc) ou le gène *TP53* (HBEC3-KT *TP53* WT) ont été utilisées comme contrôle en plus des HBEC3-KT sauvage (WT).

Lorsque les cellules ont atteint 50% de confluence, elles ont été infectées avec l'adénovirus C2 à une MOI de 1. Après 2 et 4 jours d'infection, l'ARNm et les protéines ont été extraits. La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge. L'expression d'A3B, et de deux gènes de ménages (*TBP* et *GAPDH*) au niveau de l'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR après 4 jours d'infection (Figure 8A). A3B est plus exprimé dans les HBEC3-KT *TP53* R273H par rapport aux autres lignées après 4 jours d'infection.

Au niveau protéique, p53 est exprimé de manière homogène dans toutes les lignées en absence d'infection. L'infection par l'adénovirus va mener à une diminution de la quantité de protéine p53 dans toutes les lignées dès 2 jours post infection et se poursuivre à 4 jours post infection (Figure 8B). Une double bande apparaît dans les lignées exprimant un p53 muté. Les deux bandes pourraient correspondre à la forme mutée et WT de p53. Après 4 jours d'infection, p53 diminue dans toutes les conditions infectées. Pour A3B, il est absent dans les conditions non infectées. Après 2 jours d'infection, il est plus exprimé dans les HBEC3-KT WT et Luc. Après 4 jours d'infection, A3B est plus exprimé dans les cellules *TP53* R273H par rapport aux autres lignées. Après 4 jours, la protéine A3G est quant à elle systématiquement détectée dans toutes les lignées infectées.

Ces résultats suggèrent que l'expression de la forme mutée R273H de p53 favorise l'expression d'A3B lors d'une infection adénovirale.

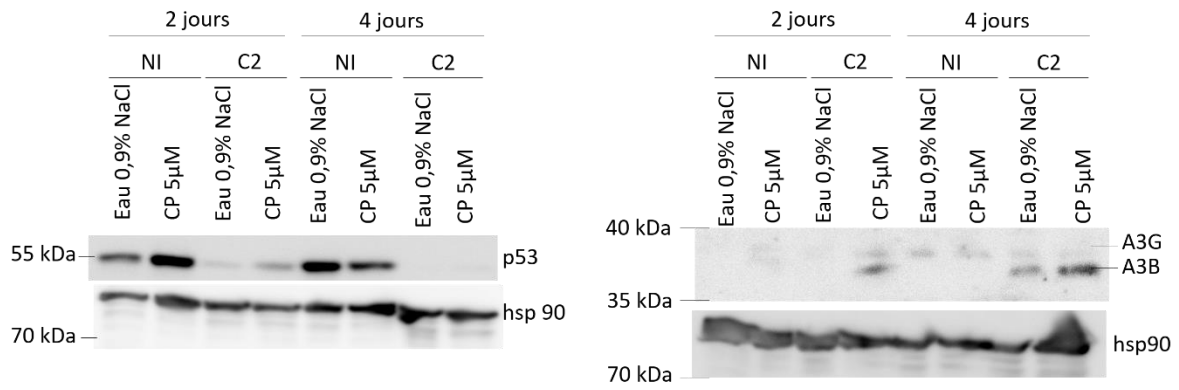


Figure 9 : L'exposition des cellules à la cisplatine potentialise l'induction d'A3B par l'adénovirus C2. Niveaux protéiques d'A3B, A3G et de p53 après 2 et 4 jours d'infection à l'adénovirus C2 avec une MOI de 1 par Western Blot. Le contrôle de charge est assuré par le dosage de hsp90.

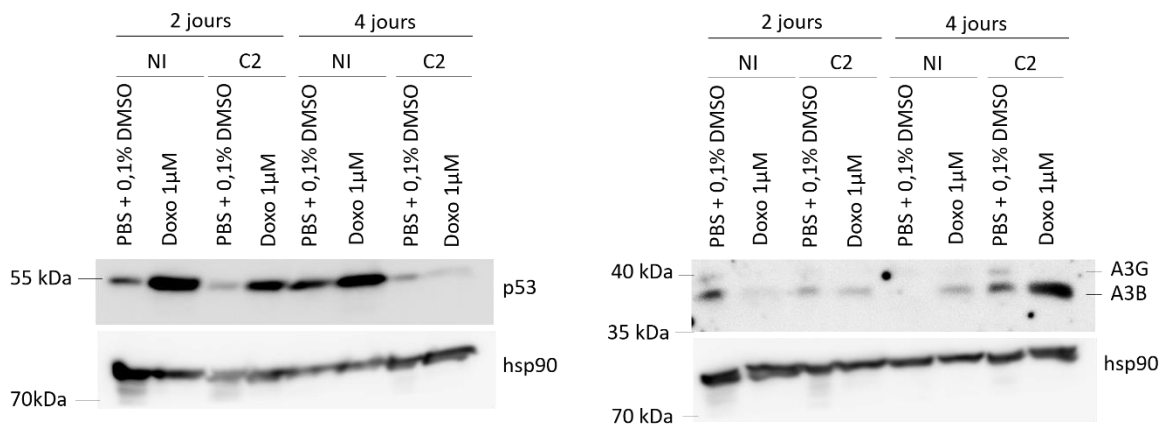


Figure 10 : L'exposition des cellules à la doxorubicine potentialise l'induction d'A3B par l'adénovirus C2. Niveaux protéiques d'A3B, A3G et de p53 après 2 et 4 jours d'infection à l'adénovirus C2 avec une MOI de 1 par Western Blot. Le contrôle de charge est assuré par le dosage de hsp90.

3. L'induction de l'expression de la protéine A3B par l'adénovirus C2 est renforcée par la présence d'agents chimiothérapeutiques cisplatine et doxorubicine

La dernière approche utilisée pour étudier le statut p53 dans les HBEC3-KT WT est de stabiliser celui-ci via la présence d'agents chimiothérapeutiques induisant des dommages à l'ADN avant une infection adénovirale. Cette approche permet une activation indirecte de p53. Ce modèle *in vitro* a pour but d'étudier l'impact des traitements chimiothérapeutiques sur l'expression d'A3B lors d'une infection adénovirale. Pour ce faire, les HBEC3-KT WT ont été traitées avec un agent avant infection.

Le premier agent utilisé est la cisplatine. Afin de déterminer la dose de CP qui permet d'induire l'expression de p53 et qui minimise la mortalité cellulaire, différentes doses de CP allant de 0,5 μ M à 10 μ M ont été testées. Les protéines ont été extraites et l'expression de p53 a été mesurée par western blot après 24, 48 et 72 heures de traitement (figure S2A). Les résultats montrent que l'expression de p53 au niveau protéique augmente après 24h de traitement et l'augmentation est proportionnelle à la dose utilisée. L'expression de p53 décroît à 72h de traitement. Suite à ces résultats, nous avons décidé d'utiliser une dose de 5 μ M et de la renouveler toutes les 48 heures.

Quand les cellules étaient à 50% de confluence, elles ont été exposées à 5 μ M de CP. Après 24 heures, les cellules ont été infectées avec l'adénovirus C2 à une MOI de 1. Une dose de 5 μ M de CP a été ajoutée toutes les 48 heures. Après 2 et 4 jours d'infection, les protéines ont été extraites et l'expression d'A3B et p53 a été détectée par western blot (Figure 9). La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge. Après 2 jours d'infection, dans les conditions non infectées, les cellules exposées à la CP montrent une expression plus élevée de p53. Dans les conditions infectées, p53 est fortement diminué en comparaison des cellules non infectées. La présence de p53 est toujours plus importante dans les cellules ayant reçues de la CP. Après 4 jours d'infection, p53 semble moins présent dans les cellules exposées à la CP dans les conditions non infectées. Pour les conditions infectées, p53 est absent. Au niveau de la protéine A3B, elle n'est pas détectée dans les cellules non infectées. On la détecte par contre après 2 jours dans les cellules infectées et traitées à la CP. Après 4 jours d'infection, A3B est exprimé dans les conditions infectées. De manière intéressante, A3B est plus exprimé dans la condition exposée à la CP.

Le second agent utilisé est la doxorubicine. Afin de déterminer la dose de Doxo qui permet d'induire l'expression de p53 et qui minimise la mortalité cellulaire, différentes doses de Doxo allant de 0,5 μ M à 4 μ M ont été testées. Les protéines ont été extraites et l'expression de p53 a été mesurée par western blot après 6, 24 et 48 heures de traitement (figure S2B). Les résultats montrent que l'expression de p53 au niveau protéique augmente après 6h de traitement et l'augmentation est proportionnelle à la dose utilisée. Suite à ces résultats, nous avons décidé d'utiliser une dose de 1 μ M et de la renouveler toutes les 48 heures.

Quand les cellules étaient à 50% de confluence, elles ont été exposées à 1 μ M de Doxo. Après 8 heures, les cellules ont été infectées avec l'adénovirus C2 à une MOI de 1. Une dose de 1 μ M de Doxo est ajoutée toutes les 48 heures. Après 2 et 4 jours d'infection, les protéines ont été extraites et l'expression d'A3B et p53 a été détectée par western blot (Figure 10). La protéine hsp90 est utilisée comme contrôle de charge. Dans les conditions non infectées, p53 est toujours plus exprimé dans les cellules exposées à la Doxo. Comme observé précédemment, l'infection induit une réduction importante du niveau de p53. Après 4 jours d'infection, p53 est très peu exprimé que ce soit avec ou sans traitement à la Doxo. Ici encore, l'infection promeut

l'expression d'A3B de manière claire après 4 jours. De façon intéressante, le niveau d'A3B semble être plus important quand la cellule a été traitée à la Doxo.

Pour résumer les résultats de ces 2 expériences, les observations semblent montrer que malgré l'activation de p53 par les deux agents chimiothérapeutiques, l'infection adénovirale continue d'induire une dégradation de p53 quasi-totale. De plus, l'expression d'A3B est plus forte dans les cellules traitées à la Doxo et à la CP que dans les cellules non traitées après 4 jours d'infection.

Discussion

Les différents modèles utilisés au cours de ce mémoire ont eu pour but d'étudier l'impact du statut p53 sur l'expression d'A3B. La littérature a montré un lien évident entre ces deux protéines. Le gène *A3B* possède des séquences reconnues par p53 ce qui induit la liaison de p53 et l'inhibition de l'expression d'A3B (Menendez *et al.*, 2017). Dans 50% des cancers, *TP53* contient des mutations somatiques. Ces mutations deviennent plus fréquentes dans les stades avancés et les cancers qualifiés d'agressifs. Dans le cas de cancers du poumon, il y a un enrichissement de mutations induites par les A3s. Il a été démontré que les signatures mutationnelles APOBEC3 sont plus importantes dans les stades avancés de la maladie. Dans les stades précoces, 11% des mutations non-silencieuses viennent des APOBECs contre 33% dans les stades avancés (de Bruin, McGranahan, et Swanton, 2015). Ces mutations corrélient avec une augmentation de l'expression d'A3B au niveau de l'ARNm dans les tumeurs. Connaissant le lien entre p53 et A3B, une question qui vient à l'esprit est de se demander s'il y a un lien entre la perte de fonction de p53 et l'augmentation du niveau d'expression d'A3B dans les cellules cancéreuses et par conséquent avec l'enrichissement de mutations induites par les A3s.

Un des projets de recherche de notre laboratoire est d'étudier si des virus pulmonaires peuvent induire l'expression des A3s dans des cellules bronchiques. Des résultats préliminaires ont montré que les adénovirus induisent l'expression d'A3B dans des cellules bronchiques. Connaissant la capacité de p53 à réprimer l'expression de A3B, une nouvelle question est d'étudier si une perte de fonction de p53 peut affecter l'induction d'A3B en réponse à une infection adénovirale. Cette question pourrait être formulée d'une autre manière : l'induction d'A3B est-elle différente dans une cellule précancéreuse ayant des mutations dans le gène *TP53* par rapport à une cellule non cancéreuse ?

Le premier objectif de ce mémoire a donc été d'étudier si la diminution de l'expression de p53 favorise l'induction d'A3B en réponse à une infection adénovirale. Pour vérifier cette théorie, nous avons commencé par utiliser des cellules bronchiques possédant un shRNA contre *TP53*. Ce cas de figure est retrouvé dans certains cancers où des mutations faux sens sont retrouvées dans le gène *TP53* ce qui conduit à une perte de fonction. Après avoir infecté les cellules, l'expression d'A3B et de *TP53* a été analysée. L'expression d'A3B est augmentée avec l'infection mais il n'est pas plus exprimé dans les HBEC3-KT *TP53* KD que dans les cellules exprimant un p53 sauvage. Cette observation suggère que la diminution de p53 n'influence pas l'expression d'A3B. Cependant, l'utilisation de shRNA ciblant *TP53* ne permet pas de totalement inhiber l'expression de p53. Il serait donc envisageable de recommencer le même type d'expériences sur des cellules knock out pour *TP53* afin de déterminer si une perte totale de p53 affecte l'induction de l'expression d'A3s par les adénovirus.

Les mutations dans le gène *TP53* sont nombreuses. La majorité des mutations p53 se situent dans le domaine de liaison à l'ADN et 87% d'entre elles sont des mutations faux sens, c'est-à-dire qu'elles induisent un changement d'acide aminé. Les résidus les plus fréquemment mutés sont situés dans l'établissement de contacts avec l'ADN et dans le soutien de la structure de la surface de liaison à l'ADN. Les cancers présentant des p53 mutants sont généralement associés à un mauvais pronostic (Muller *et al.*, 2009). Dans les cellules, les formes mutantes et sauvages de p53 peuvent être présentes en même temps, ce qui représente une cellule déjà guidée vers le début de la cancérogenèse. Par conséquent, nous avons utilisé un second modèle pour étudier si le gain de fonction de p53 peut affecter l'induction d'A3B en réponse à une infection adénovirale. Pour ce faire, nous avons utilisé les formes mutées de p53 les plus fréquentes dans les cancers. Ces mutants sont les p53 R175H (mutant de structure) et p53 R273H (mutant

de contact). Ils ont été exprimés dans des cellules contenant un gène *TP53* normal. Les formes mutées utilisées ont déjà démontré leur capacité à induire l'expression d'*A3B* au niveau de l'ARNm dans des lignées cancéreuses. Les cellules avec un p53 muté sans infection ne montre pas d'augmentation de l'expression d'*A3B*. Par contre, avec l'infection, *A3B* est plus exprimé dans les HBEC3-KT *TP53* R273H par rapport aux autres lignées. Cette mutation est liée à un défaut de liaison avec l'ADN.

Nos résultats montrent des observations différentes de celles des articles de la littérature. Dans la littérature, les cellules exprimant les formes R175H et R273H de p53 montrent une augmentation de l'expression d'*A3B* au niveau de l'ARNm au niveau basal et sans infection alors que dans nos cellules, *A3B* n'est pas plus exprimé en présence de ces mutants et en absence d'infection (Menendez *et al.*, 2017). Cette différence pourrait s'expliquer par le modèle cellulaire utilisé. Nos cellules sont issues d'une lignée primaire alors que les cellules utilisées dans l'article sont des cellules issues de lignées cancéreuses de colon et d'ostéosarcome. Les cellules sont à des stades de transformation différents. Pour arriver à ces stades, la cellule doit acquérir plusieurs mutations somatiques dans différents gènes qui sont notamment impliquées dans les voies de prolifération cellulaire. La différence retrouvée entre les types cellulaire suggère que d'autres freins à l'expression d'*A3B* sont présents dans la cellule. D'autres voies de signalisation devraient être étudiées afin de mieux cerner la mécanique d'induction d'*A3B*. Par exemple, l'expression des A3s est influencée par les voies de réponse aux IFN et d'autres voies impliquées dans la réponse immunitaire innée. Durant l'infection adénovirale, le mutant R273H montre une induction forte d'*A3B* par rapport aux autres lignées. Ce constat peut signifier qu'un premier frein à l'expression d'*A3B* est levé et que le virus pourrait être capable d'enlever d'autres freins ou d'induire l'expression ou l'activation de facteurs impliqués dans la régulation de l'expression d'*A3B*. Cette observation soutient l'hypothèse d'une régulation fine et complexe de cette protéine.

Les agents couramment utilisés en chimiothérapies tels que la cisplatine et la doxorubicine provoquent des dommages à l'ADN via des cassures ou des adduits. Ces dommages à l'ADN ont pour conséquence une augmentation de l'expression de *TP53* et la stabilisation de la protéine. Le troisième objectif de ce mémoire a donc été d'étudier si une augmentation du niveau d'expression de p53 dans les cellules peut diminuer l'induction de l'expression d'*A3B* par les adénovirus. Pour ce faire, les HBEC3-KT ont été traitées avec de la cisplatine ou de la doxorubicine avant infection. Dans le cas de la CP, *A3B* n'est pas détecté au niveau protéique dans les conditions non infectées. Cette observation est en accord avec notre hypothèse selon laquelle p53 inhibe l'expression d'*A3B*. Par contre, lorsque les cellules sont infectées, *A3B* semble plus fortement exprimé dans les cellules exposées à la CP. De plus, p53 est fortement diminué dans les conditions infectées. Le même constat est fait pour les cellules exposées à la Doxo bien que *A3B* soit présent dans les conditions non infectées et traitées.

La forte diminution de p53 peut s'expliquer par la présence du virus et sa forte capacité à le dégrader même quand il est surexprimé. Comme le virus dégrade p53, selon notre hypothèse il semble probable qu'*A3B* soit exprimé puisque son répresseur est dégradé. Une autre observation que nous avons faite et qui n'est pas montrée est la diminution du niveau basal d'*A3B* avec la confluence des cellules. Lorsque les cellules sont confluentes, elles arrêtent leur prolifération suite à une inhibition de contact. Ce constat peut expliquer l'augmentation d'*A3B* dans les cellules traitées. Suite au traitement, les cellules subissent des effets cytopathiques qui entraîne une prolifération moindre comparée au groupe non traité. Les voies de prolifération pourraient donc avoir un impact sur l'expression d'*A3B*. Les cellules cancéreuses sont connues pour posséder une capacité de prolifération forte et incontrôlée. Ces cellules pourraient avoir une expression d'*A3B* basale plus importante que les cellules non prolifératives.

Dans toutes les expériences qui ont été réalisées au cours de ce mémoire, un seul constat reste identique : en présence du virus, p53 est fortement diminué voire absent au niveau protéique. En effet, les adénovirus possèdent l'oncoprotéine virale E1B-55K qui cible p53 et induit sa dégradation par le protéasome lorsqu'il forme un complexe avec E4ORF6. La dégradation de p53 par le virus induirait l'augmentation d'A3B selon notre hypothèse de départ. Pour étudier si l'inhibition de p53 par les adénovirus induit l'expression d'A3B, nous avons induit l'expression de l'oncogène E1B-55K des adénovirus dans les cellules bronchiques et étudié son impact sur A3B. Les premiers résultats obtenus confirment cette hypothèse, l'expression d'E1B-55K induit l'expression d'A3B (Lejeune *et al.*, In preparation).

Les adénovirus étant ciblés par les A3s, ils ont développé des stratégies afin d'inhiber l'activité mutagène des A3s. Cette stratégie est différente de celle du VIH qui consiste en la dégradation des A3s. Elle serait plus proche de celle du virus Epstein-Barr (EBV) qui utilisent la protéine BORF2 qui interagit avec A3B et l'inactive (Cheng *et al.*, 2019). L'inhibition de l'activité mutagène des A3s dans le cadre d'une infection adénovirale a récemment été découverte par le laboratoire (Lejeune *et al.*, In preparation). Cette nouvelle information nous indique que notre modèle d'infection lytique est peut-être non pertinent. Ce modèle pourrait nous servir à trouver les partenaires viraux capable de cibler A3B et d'inhiber son activité. Il est peu pertinent dans le cas d'étude de développement de cancer au stade précoce puisque A3B induit dans le cadre d'une infection lytique semble non fonctionnel.

Ainsi, il serait intéressant de tester si l'infection persistante de cellules par les adénovirus induit aussi l'expression d'A3B et si celui-ci est actif. Les HPV16 et 18 sont capable d'induire une infection persistante qui conduit au développement de cancer dans les cas des cancers du cou et de la gorge et du col du l'utérus. Le développement de cancer est médié par la présence d'oncoprotéines capables de cibler et de déréguler le cycle cellulaire. Les oncoprotéines E6 et E7 ciblent et dégradent respectivement p53 et pRB impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, ces cancers présentent des taux élevé d'A3B. Une étude récente montre que E7 chez HPV16 est capable de cibler A3A dans un contexte de latence. Cette interaction induit la stabilisation d'A3A et un maintien de son activité (Westrich *et al.*, 2018). Cette observation laisse penser que A3A pourrait induire des mutations dans le génome cellulaire. Les adénovirus sont aussi capables de latence dans les cellules épithéliales (Zheng, Stamminger, et Hearing, 2016) mais aussi dans les lymphocytes T (Radke et Cook, 2018). Il est donc possible qu'un système similaire aux HPV soit présent chez les adénovirus. En effet, les adénovirus possèdent des oncogènes E1A et E1B-55K qui inhibent respectivement pRB et p53. Durant la latence, seuls les gènes précoces, dont E1A et E1B-55K, sont exprimés ce qui suggère que les adénovirus seraient capables d'induire une dérégulation du cycle cellulaire.

Conclusion et perspectives

Dans ce mémoire, le but était de comprendre comment le statut de p53 peut influencer l'expression des A3s et surtout d'A3B dans un contexte d'infection adénovirale. Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été utilisées : d'abord la diminution d'expression de *TP53* avec un shRNA, ensuite la présence de p53 mutant dans les cellules et enfin l'activation et la surexpression de p53. La diminution de p53 n'influence pas l'induction d'A3B. Ces observations sont divergentes de l'hypothèse de départ qui était que p53 régule négativement l'expression d'A3B. L'expression d'A3B est donc régulée par un processus plus complexe que simplement l'axe p53-A3B. Il a déjà été montré que des voies de réponse aux IFN sont impliqués dans cette régulation. Au vu de l'activité mutagène de cette protéine, il est nécessaire à la cellule de posséder plusieurs freins et mécanismes d'induction de l'expression d'A3B. Il serait intéressant d'investiguer d'autres voies impliquées dans la régulation d'A3B. Cependant, le modèle pourrait présenter un défaut car l'inhibition de p53 n'est pas totale. Il serait donc envisageable de refaire les mêmes expériences avec des cellules knock out pour le gène *TP53*. Nous avons également montré que certaines formes mutées de p53 ainsi que l'induction de p53 par des agents chimiothérapeutiques augmentent l'induction d'A3B lors d'une infection adénovirale. Il serait donc intéressant d'étudier ces mécanismes qui affectent l'induction d'A3B.

Lors de ce mémoire, nous avons également découvert que l'adénovirus C2 est capable de dégrader p53 malgré la présence de mutations dans la protéine ou sa surexpression et son activation. Cette observation montre l'importance pour le virus d'éviter la voie de l'apoptose et d'activer le cycle cellulaire.

Notre modèle est peut-être à remettre en question. Nos cellules sont des cellules bronchiques primaires donc il est possible qu'elles soient à un stade trop précoce du développement du cancer pour étudier l'impact d'A3B sur l'évolution d'une cellule cancéreuse. Cet impact pourrait être étudié dans des cellules présentant déjà des mutations somatiques dans différentes voies de signalisation. De plus, l'infection à l'adénovirus C2 a été étudié dans un contexte de cycle lytique. Cette méthode ne nous permet pas d'étudier l'apparition de mutations qui seraient causées par les APOBEC3s ni d'étudier l'évolution de la cellule. Un modèle de latence pourrait être utilisé afin de mieux cerner le contexte d'apparition des mutations. L'influence des signaux de transmissions cellulaires pourrait être étudié afin de comprendre si une cellule qui se prépare à une infection induit l'expression d'A3B de manière préventive. Ce modèle pourrait être utile dans le but de mieux comprendre comment l'irritation/l'inflammation chronique des poumons chez les fumeurs pourraient induire le développement de cancer.

Bibliographie

- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463): 415-421.
- Burns, M. B., Temiz, N. A., & Harris, R. S. (2013). Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nature genetics*, 45(9): 977-983.
- Cannataro, V. L., Gaffney, S. G., Sasaki, T., Issaeva, N., Grewal, N. K. S., Grandis, J. R., ... Townsend, J. P. (2019). APOBEC-induced mutations and their cancer effect size in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 38(18): 3475-3487.
- Chen, R.-F., & Lee, C.-Y. (2014). Adenoviruses Types, Cell Receptors and Local Innate Cytokines in Adenovirus Infection. *International Reviews of Immunology*, 33(1): 45-53.
- Cheng, A. Z., Yockteng-Melgar, J., Jarvis, M. C., Malik-Soni, N., Borozan, I., Carpenter, M. A., ... Harris, R. S. (2019). Epstein–Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nature Microbiology*, 4(1): 78-88.
- de Bruin, E. C., McGranahan, N., & Swanton, C. (2015). Analysis of intratumor heterogeneity unravels lung cancer evolution. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(3): e985549.
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer : Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4): 605–644.
- Gao, J., Choudhry, H., & Cao, W. (2018). Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like family genes activation and regulation during tumorigenesis. *Cancer Science*, 109(8): 2375-2382.
- Golden, E. B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M. H., & Formenti, S. C. (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, 2: 88.
- Harris, R. S. (2015). Molecular mechanism and clinical impact of APOBEC3B-catalyzed mutagenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 17(1): 8.
- Harris, R. S., & Dudley, J. P. (2015). APOBECs and Virus Restriction. *Virology*, 0, 131-145.
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Structure–function–rescue : The diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15): 2226-2242.
- Lejeune *et al.*, In preparation

- Lion, T. (2014). Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3): 441-462.
- Littman, A. J., Jackson, L. A., & Vaughan, T. L. (2005). Chlamydia pneumoniae and Lung Cancer : Epidemiologic Evidence. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(4): 773-778.
- Lynch, J., Fishbein, M., & Echavarría, M. (2011). Adenovirus. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32(04): 494-511.
- Menendez, D., Nguyen, T.-A., Snipe, J., & Resnick, M. A. (2017). The Cytidine Deaminase APOBEC3 Family is Subject to Transcriptional Regulation by p53. *Molecular cancer research : MCR*, 15(6): 735-743.
- Mulder, L. C. F., Harari, A., & Simon, V. (2008). Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14): 5501-5506.
- Okuyama, S., Marusawa, H., Matsumoto, T., Ueda, Y., Matsumoto, Y., Endo, Y., ... Chiba, T. (2012). Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *International Journal of Cancer*, 130(6): 1294-1301.
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers : Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1): a001008.
- Pebernard, S., & Iggo, R. D. (2004). Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation*, 72(2-3): 103-111.
- Periyasamy, M., Singh, A. K., Gemma, C., Kranjec, C., Farzan, R., Leach, D. A., ... Ali, S. (2017). P53 controls expression of the DNA deaminase APOBEC3B to limit its potential mutagenic activity in cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 45(19): 11056-11069.
- Pfister, N. T., & Prives, C. (2017). Transcriptional Regulation by Wild-Type and Cancer-Related Mutant Forms of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(2): a001008.
- Radke, J. R., & Cook, J. L. (2018). Human adenovirus infections : Update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Current opinion in infectious diseases*, 31(3): 251-256.
- Refsland, E., & Harris, R. (2013). The APOBEC3 family of retroelement restriction factors. *Current topics in microbiology and immunology*, 371: 1-27.

- Roberts, S. A., & Gordenin, D. A. (2014). Clustered and genome-wide transient mutagenesis in human cancers : Hypermutation without permanent mutators or loss of fitness. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 36(4): 382-393.
- Salter, J. D., Bennett, R. P., & Smith, H. C. (2016). The APOBEC Protein Family : United by Structure, Divergent in Function. *Trends in biochemical sciences*, 41(7): 578-594.
- Sato, M., Vaughan, M. B., Girard, L., Peyton, M., Lee, W., Shames, D. S., ... Minna, J. D. (2006). Multiple Oncogenic Changes (*K-RAS*^{V12}, p53 Knockdown, *Mutant EGFRs*, *p16* Bypass, Telomerase) Are Not Sufficient to Confer a Full Malignant Phenotype on Human Bronchial Epithelial Cells. *Cancer Research*, 66(4): 2116-2128.
- Sharma, P., Kolawole, A. O., Core, S. B., Kajon, A. E., & Excoffon, K. J. D. A. (2012). Sidestream Smoke Exposure Increases the Susceptibility of Airway Epithelia to Adenoviral Infection. *PLoS ONE*, 7(11): e49930.
- Simabuco, F. M., Morale, M. G., Pavan, I. C. B., Morelli, A. P., Silva, F. R., & Tamura, R. E. (2018). p53 and metabolism : From mechanism to therapeutics. *Oncotarget*, 9(34): 23780-23823.
- Smith, H. C., Bennett, R. P., Kizilyer, A., McDougall, W. M., & Prohaska, K. M. (2012). Functions and Regulation of the APOBEC Family of Proteins. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(3): 258-268.
- Stindt, M. H., Muller, P. A. J., Ludwig, R. L., Kehrlöesser, S., Dötsch, V., & Vousden, K. H. (2015). Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene*, 34(33): 4300-4310.
- Swanton, C., McGranahan, N., Starrett, G. J., & Harris, R. S. (2015). APOBEC enzymes : Mutagenic fuel for cancer evolution and heterogeneity. *Cancer discovery*, 5(7): 704-712.
- Verhalen, B., Starrett, G. J., Harris, R. S., & Jiang, M. (2016). Functional Upregulation of the DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B by Polyomaviruses. *Journal of Virology*, 90(14): 6379-6386.
- Vieira, V. C., Leonard, B., White, E. A., Starrett, G. J., Temiz, N. A., Lorenz, L. D., ... Harris, R. S. (2014). Human Papillomavirus E6 Triggers Upregulation of the Antiviral and Cancer Genomic DNA Deaminase APOBEC3B. *mBio*, 5(6): e02234-14.
- Virus Replication. (2011). In *Fenner's Veterinary Virology* (p. 21-42).

- Warren, C. J., Westrich, J. A., Van Doorslaer, K., & Pyeon, D. (2017). Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. *Viruses*, 9(8): 233.
- Waye, M. M. Y., & Sing, C. W. (2010). Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals*, 3(10): 3343-3354.
- Westrich, J. A., Warren, C. J., Klausner, M. J., Guo, K., Liu, C.-W., Santiago, M. L., & Pyeon, D. (2018). Human Papillomavirus 16 E7 Stabilizes APOBEC3A Protein by Inhibiting Cullin 2-Dependent Protein Degradation. *Journal of Virology*, 92(7): e01318-17.
- Wissing, S., Montano, M., Garcia-Perez, J. L., Moran, J. V., & Greene, W. C. (2011). Endogenous APOBEC3B Restricts LINE-1 Retrotransposition in Transformed Cells and Human Embryonic Stem Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(42): 36427-36437.
- Wong, H. H., Lemoine, N. R., & Wang, Y. (2010). Oncolytic Viruses for Cancer Therapy : Overcoming the Obstacles. *Viruses*, 2(1): 78-106.
- Yan, S., He, F., Gao, B., Wu, H., Li, M., Huang, L., ... Li, Y. (2016). Increased APOBEC3B Predicts Worse Outcomes in Lung Cancer : A Comprehensive Retrospective Study. *Journal of Cancer*, 7(6): 618-625.
- Zheng, Y., Stamminger, T., & Hearing, P. (2016). E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote Persistent Viral Infection. *PLoS Pathogens*, 12(1): e1005415.

Annexes

1. Résultats RT-qPCR des 7 A3s et de *TP53* dans les HBEC3-KT WT, Scr et *TP53* KD après 2 et 4 jours d'infection adénovirale

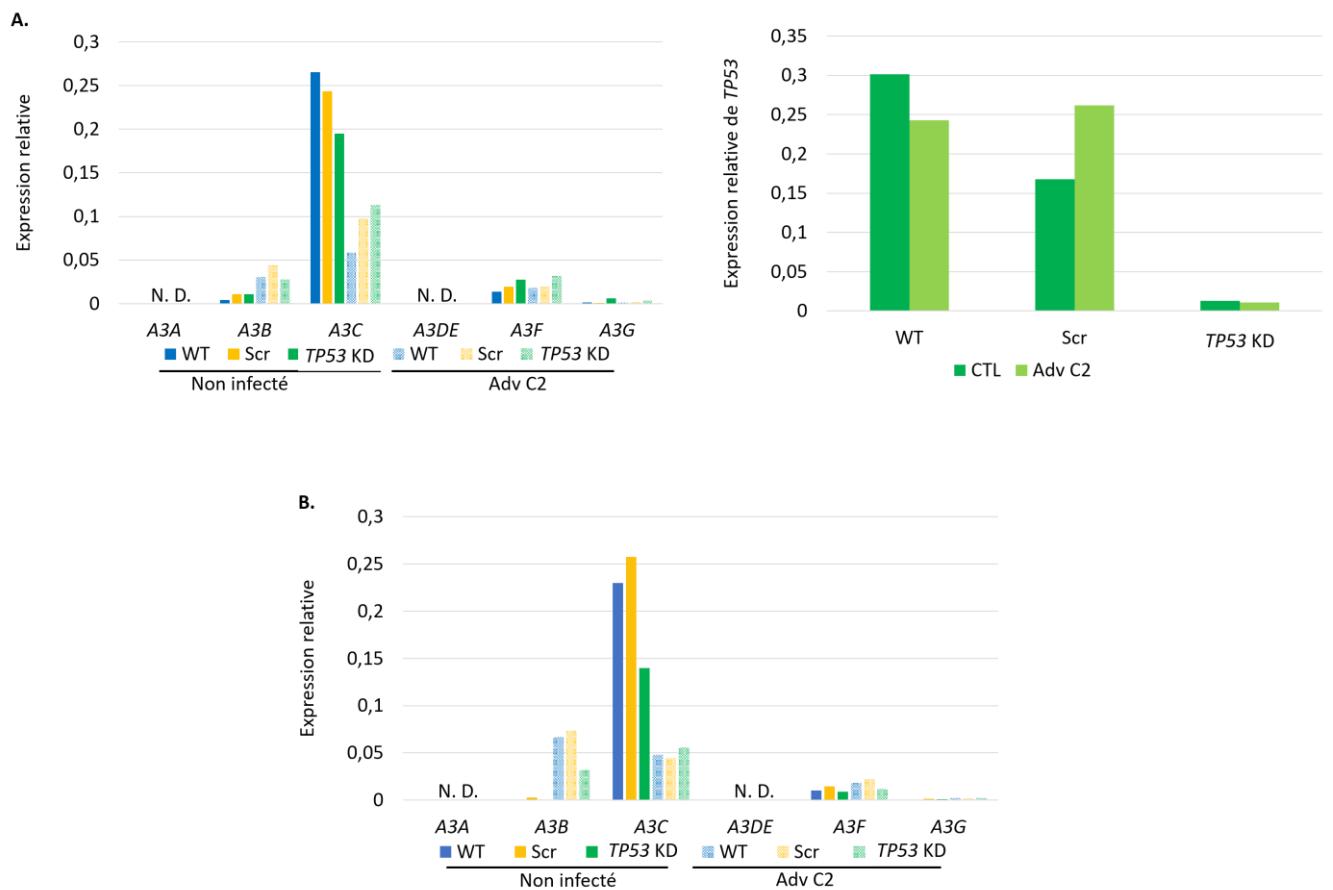


Figure S1 : Niveaux d'expression des transcrits A3s pendant une infection adénovirale dans les HBEC3-KT WT et *TP53* KD. A : Expressions relatives des ARN messagers des sept A3s et de *TP53* normalisées par rapport à *TBP*, *HPRT* et *GAPDH* après 2 jours d'infection par l'adénovirus C2 (MOI = 1) par RT-qPCR. B : Expressions relatives des ARN messagers des sept A3s normalisées par rapport à *TBP*, *HPRT* et *GAPDH* après 4 jours d'infection par RT-qPCR.

2. Détermination des doses et du temps d'exposition des cellules à la cisplatine et à la doxorubicine

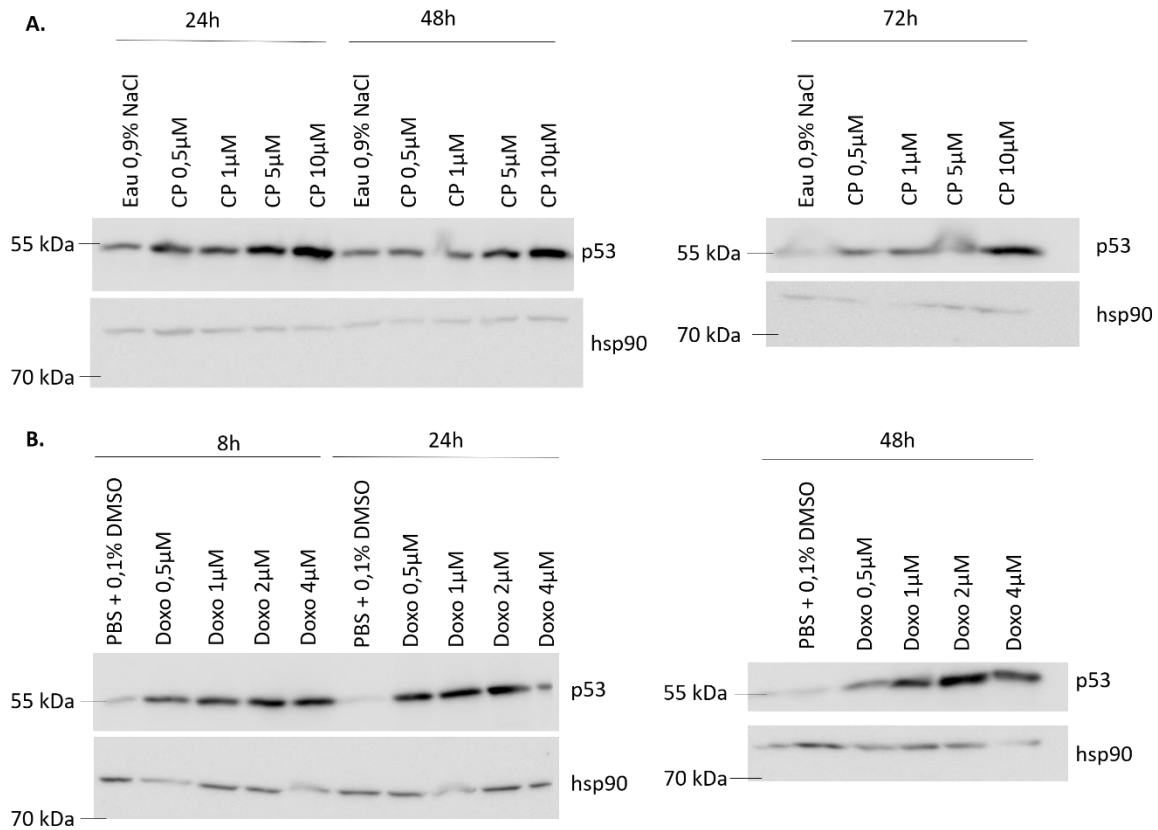


Figure S2 : Niveaux d'expression de la protéine p53 en fonction de différentes doses des agents chimio thérapeutiques doxorubicine et cisplatine. A : Niveaux protéiques de p53 avec différentes doses (0,5, 1, 5 et 10 μM) de cisplatine après 24, 48 et 72 heures d'application par Western Blot avec hsp90 comme contrôle de charge. B : Niveaux protéiques de p53 avec différentes doses (0,5, 1, 2 et 4 μM) de doxorubicine après 8, 24 et 48 heures d'application par Western Blot avec hsp90 comme contrôle de charge.

3. Amorces qPCR

Tableau 1 : séquences d'A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G, A3H, GAPDH, TBP, HPRT et TP53 utilisés pour la qPCR.

Gène	Forward sequence	Reverse sequence
<i>A3A</i>	GAGAAGGGACAAGCACATGG	TGGATCCATCAAGTGTCTGG
<i>A3B</i>	GACCCTTTGGTCCTTCGAC	GCACAGCCCCAGGAGAAG
<i>A3C</i>	AGCGCTTCAGAAAAGAGTGG	AAGTTTCGTTCCGATCGTTG
<i>A3DE</i>	ACCCAAACGTCAGTCGAATC	CACATTTCTGCGTGGTTCTC
<i>A3F</i>	CCGTTTGGACGCAAAGAT	CCAGGTGATCTGGAAACACTT
<i>A3G</i>	CCGAGGACCCGAAGGTTAC	TCCAACAGTGCTGAAATTCG
<i>A3H</i>	AGCTGTGGCCAGAAGCAC	CGGAATGTTTCGGCTGTT
<i>GAPDH</i>	AATCCCATCACCATCTTCCAG	CAGAGATGATGACCCTTTTGG
<i>HPRT</i>	GGTCAGGCAGTATAATCCAAAG	AAGGGCATATCCTACAACAAC
<i>TP53</i>	AAGAAACCACTGGATGGAGAA	CAGCTCTCGGAACATCTCGAA
<i>TBP</i>	ACCTAAAGACCATTGCACTTCG	CATATTTTCTTGCTGCCAGTCTG