

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE – ED 414

THÈSE

Présentée par :

Hanna KRYNSKA

Soutenue le : 20 juin 2023

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Caractérisation des interactions protéine-protéine de l'isoforme oncogénique $\Delta Np73\alpha$

Unité de Recherche : UMR 7242 (Illkirch-Graffenstaden)
Equipe Signalisation Nucléaire et Cancer

THÈSE dirigée par :

Dr. Katia ZANIER

Chargé de recherche, Biotechnologie et Signalisation cellulaire
(UMR 7242)

Dr. Massimo TOMMASINO[†]

Directeur de recherche, CIRC- OMS

RAPPORTEURS :

Pr. Antoine TOUZE

Professeur, Université de Tours (UMR 1282)

Dr. Jacqueline MARVEL

Directeur de Recherche, Centre International de recherche en
Infectiologie (CNRS UMR 5308, INSERM U1111)

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. Fabien ALPY

Directeur de Recherche, IGBMC
(CNRS UMR 7104, INSERM U1258)

MEMBRE INVITE :

Dr. Tarik GHEIT

Scientifique, CIRC - OMS

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de faire part de mon comité, à savoir Dr. Jaqueline Marvel, Dr. Antoine Touzé, ainsi que Dr. Fabien Alpy.

J'aimerais remercier mes co-directeurs de thèse Dr. Katia Zanier et Dr. Massimo Tommasino de m'avoir accordé leur confiance et permis de travailler dans leur équipe.

Je tiens à remercier également Georges qui était là à l'écoute quand j'avais la langue liée.

J'aimerais remercier tous ceux qui m'ont permis, même dans la moindre mesure, d'atteindre la ligne d'arrivée. Je pense à toutes ces rencontres, même très brèves. Que ce soit Eugenie, Grete, Veronica, Stefano, Eleftheria, Jaki, Nico, Alessia, Tanisha, Théo, ... Je ne peux tous les citer.

Je pense à vous aussi, nos héros de l'ombre. Henri, Thomas et surtout Nicole. Sans vous rien ne pourrait fonctionner.

Encore un grand merci à Tarik, pour ses encouragements et sa bienveillance. Même en temps difficiles, tu étais présent. Je resterai impressionnée par ton courage, ta sagesse et ta volonté de continuer d'avancer. Tu resteras pour moi un exemple de force et d'espoir.

En écrivant ces lignes je ne peux retenir mes larmes, quand je repense à vous mes Pigeons. Cecilia et Assunta, Ô combien vous avez illuminé les journées sombres. Je vous en serai éternellement reconnaissante. A trois nous étions tellement plus fortes.

Was wszystkich których chciałabym przede wszystkim przeprosić. Nie byłam obecna, kiedy wy mnie potrzebowaliście. Nie wyszło tak jak chciałam. Przepraszam najmocniej. Mam nadzieję, że mi wybaczycie.

Tylko Tobie zawdzięczam, że jeszcze żyję. Z bólem piszę, kiedy wiem przez ile musiałeś przejść.

Liste des abréviations

A

ART = *ADP-Ribosyl-Transferases Diphteria Toxin-Like*

ARTD = *ADP-Ribosyl-Transferases Diphteria Toxin-Like Domain*

ATAC-SEQ = *Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing*

ATM = *Ataxia-telangiectasia mutated protéine*

ATR = *Ataxia-telangiectasia and Rad3-related protéine*

B

BAL = *B-aggressive lymphoma*

BCC = *basal cell carcinoma*

BRCT = *BRCA1 C-terminus domaine*

brHPV = *bas risque HPV*

C

CBP = *CREB binding protein*

CDK = *cyclin-dependent kinase*

ChIP = *Chromatin Immunoprecipitation*

ChIP-seq = *Chromatin immunoprecipitation sequencing*

CHK = *Checkpoint kinase*

CIP = *ciproflaxin hydrochloride*

CHR = *cell cycle genes homology region*

CTD = *C-terminal domain*

D

DBD = *DNA binding domain*

DBS = *Double break strain*

DDR = *DNA damage response*

DMEM = *Dulbecco's modified essential medium*

DMSO = dimethyl sulfoxide

DTT = -1,4-dithiotheritol

E

EDTA = acide éthylène diamine tétra-acétique

EGFR = *Epidermal Growth Factor Receptor*

F

FAD

FADD = *Fas associated death domain*

FCS = *Foetal Calf Serum*

H

HDAC = *Histone deacetylase*

HFK = *human foreskin keratinocyte*

HK = *human keratinocyte*

HPK = *human primary keratinocyte*

HPV = *human papillomavirus*

hrHPV = haut risque HPV

I

IDD = *intrinseqly disordered domain*

IFN = interférons

IKK = *Inhibitor of κB*

IL = interleukine

IP = immunoprécipitation

L

LZ = *Leucine zipper*

M

MAPK = *mitogen-activated protein kinase*

MB = *marked box*

MEF = *mice embryonic fibroblasts*

MPT = *modification post traductionnelles*

MDM2/4 = *mouse double minute 2/4*

NAD = *nicotinamide adénine dinucléotide*

NES = *nuclear export sequence*

NF- κ B = *Nuclear factor κ B*

NLS = *nuclear localization sequence*

NMSC = *non melanoma skin cancer*

O

OD = *oligomerisation domain*

P

PARP = *poly(ADP-ribosylation) polymérase*

PCAF = *p300/CBP associated factors*

PCR = *Polymerase Chain reaction*

PBM = *PDZ domain binding motif*

PBS = *Phosphate buffer saline*

PRR = *prolin rich region*

P53RE = *responsive element of p53*

R

RB = *retinoblastoma*

RNAseq = *RNA sequencing*

RT-qPCR = *Reverse transcription quantitative PCR*

S

SAM = *sterile alpha motif*

SASP = *senescence-associated secretory phenotype*

SCC = *squamous cell carcinoma*

T

TAD = *transactivation domain*

TERT = *telomerase reverse transcriptase*

TID = *transcription inhibitory domain*

TNF = *Tumor necrosis factor*

Z

ZNF = *Zinc finger domain*

Table des matières

| | |
|--|----|
| PARTIE 1. INTRODUCTION | 1 |
| Chapitre I. Les virus du papillome | 2 |
| 1. Papillomavirus Humain ou virus du papillome humain | 2 |
| a. Structure et classification | 2 |
| b. Le cycle viral | 3 |
| c. HPV et cancer | 4 |
| d. Propriétés transformantes des oncoprotéines E6 et E7 des hrHPV α | 5 |
| e. Propriétés transformantes des oncoprotéines E6 et E7 des HPV β | 7 |
| Chapitre II. La famille de p53..... | 11 |
| 1. Description générale de la famille | 11 |
| 2. p53 : une clé de voute de la cancérologie | 12 |
| a. Structure de p53 et ses isoformes | 12 |
| b. Régulation de l'activité de p53 par des modifications post-traductionnelles ... | 13 |
| c. Activité transcriptionnelle de p53..... | 14 |
| d. p53 et la sénescence | 15 |
| 3. p63 et p73 : les sœurs à ne pas négliger..... | 17 |
| a. Structure et isoformes | 17 |
| b. Fonctions anti- et pro-oncogéniques de p63 et ses isoformes..... | 18 |
| c. Fonctions de p63 et de ses isoformes dans le développement..... | 21 |
| d. Régulation de p73 et de ses isoformes | 22 |
| e. Rôle de p73 et ses isoformes dans l'oncogenèse | 23 |
| f. p73 dans les voies de sénescence..... | 24 |
| g. Fonctions de p73 et de ses isoformes dans le développement..... | 25 |

| | |
|---|----|
| Chapitre III. La famille de E2F | 26 |
| 1. Généralités sur la famille | 26 |
| 2. Structure des membres de la famille..... | 26 |
| 3. La régulation de l'activité des E2F | 27 |
| 4. Les facteurs E2F dans le cycle cellulaire : généralités..... | 27 |
| 5. E2F4 et son homologue E2F5..... | 29 |
| a. Rôle dans le cycle cellulaire et la régulation spatiotemporelle | 29 |
| b. Rôles non-canoniques | 30 |
| c. E2F4 et les RB dans la sénescence | 31 |
| Chapitre IV. Les protéines PARPs..... | 33 |
| 1. Une famille hétérogène | 33 |
| a. PARP14 | 34 |
| PARTIE 2. MATERIEL et METHODES..... | 36 |
| Matériel et méthodes | 37 |
| 1. Culture cellulaire (Annexe 1) | 37 |
| 2. Déplétion de protéines (Annexe 2)..... | 37 |
| 3. Extraction des protéines (Annexe 3)..... | 38 |
| 4. Gradient de sucrose/co-IP (Annexe 4A et 4B) | 39 |
| 5. RT-qPCR (Annexe 5) | 39 |
| 6. Immunofluorescence (Annexe 6)..... | 40 |
| PARTIE 3. OBJECTIFS | 41 |
| Objectifs et Etat de l'art | 42 |
| PARTIE 4. RESULTATS..... | 44 |
| Chapitre V. Identification d'un nouveau complexe Δ Np73 α -E2F4/p130 | 45 |
| Chapitre VI. Caractérisation fonctionnelle du complexe Δ Np73 α -E2F4/p130..... | 48 |
| 1. Analyses transcriptomiques sur Δ Np73 α | 48 |

| | | |
|--|--|----|
| 2. | Identification de cibles potentiels du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130..... | 49 |
| 3. | E2F4-5 contribuent à la prolifération des 38HK | 51 |
| 4. | E2F4-5 contribuent à la prolifération des cellules cancéreuses exprimant $\Delta Np73\alpha$ 53 | |
| 5. | Conclusion..... | 53 |
| Chapitre VII. PARP14, le nouveau partenaire de $\Delta Np73\alpha$ | | 55 |
| 1. | Régulation de PARP14 et $\Delta Np73\alpha$ dans les 38HK..... | 55 |
| 2. | Analyses d'interaction protéine-protéine..... | 55 |
| 3. | Analyse d'activité enzymatique | 57 |
| 4. | Analyses transcriptomiques..... | 57 |
| 5. | Analyses phénotypiques | 62 |
| 6. | Conclusions | 63 |
| PARTIE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS..... | | 64 |
| Le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130..... | | 65 |
| Interaction $\Delta Np73\alpha$ -PARP14..... | | 69 |
| PARTIE 6. REFERENCES | | 73 |
| PARTIE 7. ANNEXES..... | | 90 |

PARTIE 1. INTRODUCTION

Chapitre I. Les virus du papillome

Ce chapitre est consacré aux virus du papillome humain (HPV). Les différents groupes d'HPV y sont décrits, ceci afin de mettre le point sur les caractéristiques du modèle cellulaire utilisé durant cette thèse doctorale. En effet, les techniques actuelles de culture cellulaire ne peuvent pas reproduire les conditions nécessaires à la réplication des HPV, ce qui les rend difficiles à étudier en dehors de l'hôte. Pour cette raison ce travail est basé sur des lignées cellulaires de kératinocytes du prépuce humain immortalisé par les oncoprotéines E6 et E7 de l'HPV38 du genre β , nommées collectivement 38HK.

La famille des Papillomaviridae est composée de virus à ADN non enveloppés qui infectent les kératinocytes basaux des épithéliums muqueux ou cutanées. Ils sont présents chez tous les amniotes tel que les mammifères, oiseaux, reptiles et poissons (1). Les infections par les papillomavirus sont considérées comme largement hôte- et tissus-tropiques. L'infection par les papillomavirus peut être asymptomatique, présenter des tumeurs bénignes, ou mener à un cancer, comme c'est le cas pour certains types de papillomavirus humain. Les études phylogénétiques suggèrent que les virus ont co-évolué avec les oiseaux et les humains, mais de nombreux événements tels que les recombinaisons et les zoonoses ont donné lieu à une diversification des différents types originaux (2). C'est le cas du virus BPCV1 (*Bandicoot Papillomatosis and Carcinomatosis Virus 1*) qui infecte les Bandicoot de Bougainville, de petits marsupiaux d'Australie, et qui se caractérise par un phénotype hybride aux propriétés communes aux polyomavirus et papillomavirus (1, 3).

1. Papillomavirus Humain ou virus du papillome humain

Les HPV sont responsables de nombreuses lésions cutanées et muqueuses, tel que les verrues génitales, plantaires ou vulgaires. Au regard de leur impact important sur la santé publique, ces virus sont sous la loupe de nombreux chercheurs depuis des décennies.

a. **Structure et classification**

Les papillomavirus sont dits non enveloppés car limités par une capsid. Cette capsid est composée des protéines L1 principalement et dans une moindre mesure des protéines L2. Les protéines L1 s'assemblent en pentamères ; l'assemblage de la capsid se fait à travers l'interaction de pentamères voisins (4). Ces deux protéines sont le centre d'intérêt dans la stratégie de prévention, à savoir le développement de vaccin contre les HPV. Les vaccins

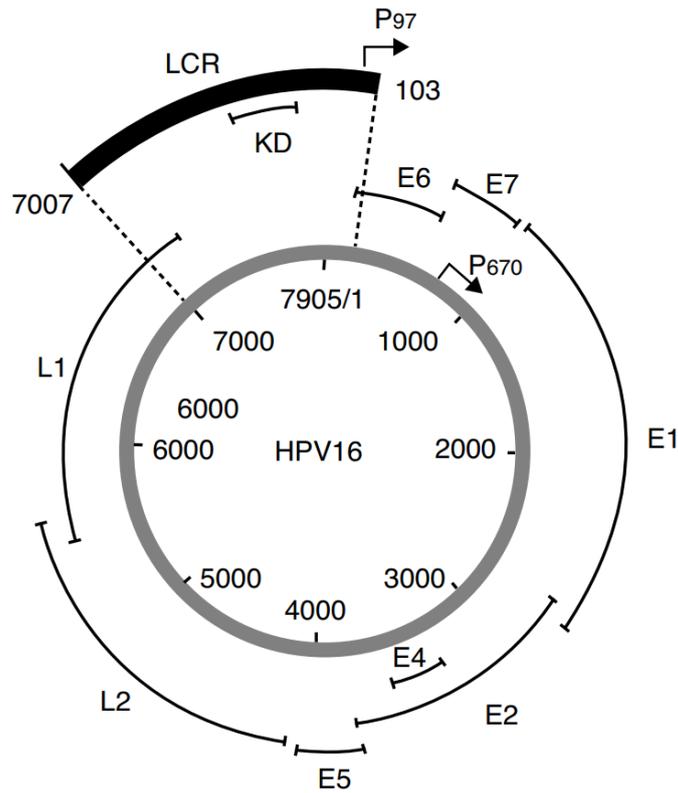


Figure 1. Organisation du génome de l'HPV16. L'ADN double brin (représenté en gris) est d'environ 8000 nucléotides et code pour 7 protéines E dites Early et 2 protéines L dites Late. Les promoteurs sont indiqués par les flèches. (Adapté de Viariso et al. 2017) (7)

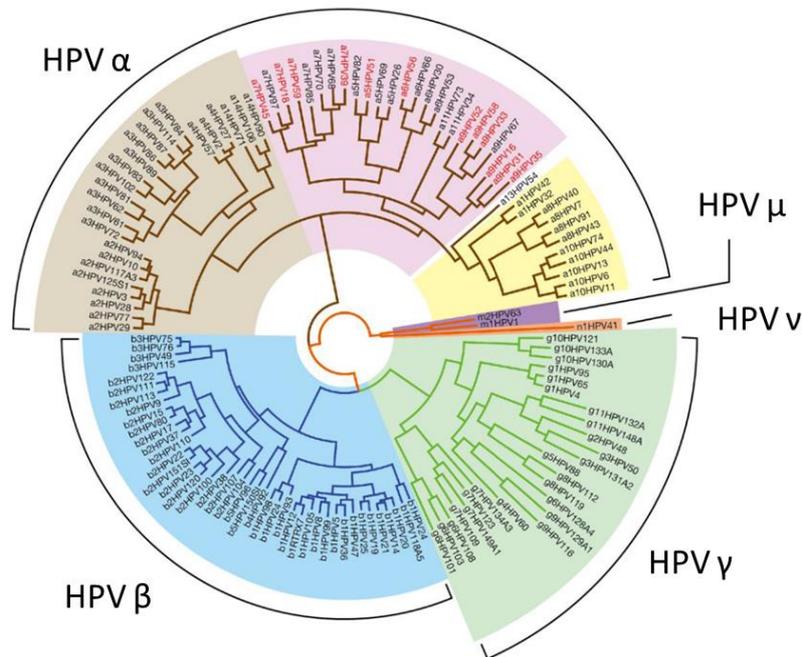


Figure 2. Classification des HPV. Les HPV sont regroupés en cinq genres : alpha (HPV α), bêta (HPV β), gamma (HPV γ), nu (HPV ν) et mu (HPV μ). Les groupes α, β (bleu) et γ (vert) sont les groupes les plus représentés. Parmi les HPV α sont reconnus les cutanés à bas-risque (brun), les muqueux à bas-risque (jaune) et ceux à haut-risque (rose). (d'après Egawa et al. 2015) (9)

disponibles ciblent la protéine L1. L'inconvénient de cette stratégie est la spécificité du L1 au type de HPV. Actuellement de nouvelles recherches sont en cours afin de développer les vaccins ciblant la protéine L2 qui est hautement conservé parmi les HPV, ce qui conduirait à une protection vers un plus large spectre de HPV (5).

Le génome des papillomavirus est une molécule d'ADN double-brin circulaire d'environ 8000 paires de bases. Il est organisé en trois régions, dont deux codantes pour des protéines et une non codante qui régule la transcription virale. Les deux régions codantes contiennent de sept à neuf cadres de lecture ouverts, de sorte à avoir une transcription en deux temps : une phase précoce, qui donne lieu aux protéines E (*Early*), et une phase tardive, qui génère les protéines L (*Late*). Tous les gènes sont transcrits à partir du même brin d'ADN sous forme de plusieurs ARNm polycistroniques (6) (Figure 1).

Plus de 200 types de HPV ont été identifiés et classés en cinq genres sur la base de la séquence de la protéine de capsid L1 (8) : les genres alpha (HPV α), bêta (HPV β), gamma (HPV γ), nu (HPV ν) et mu (HPV μ). Les genres les plus représentés sont les α , β et γ . Les HPV α présentent à la fois un tropisme muqueux et cutané, tandis que les HPV du groupe β et γ sont principalement cutanés (Figure 2).

Les HPV sont également regroupés selon leur potentiel oncogénique : les HPV à bas risque (brHPV), sont responsables de lésions bénignes, tandis que les HPV à haut-risque (hrHPV), dont les HPV α à tropisme muqueux (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) et les HPV β à tropisme cutané (5 et 38) responsables de lésions malignes (Figure 3).

b. Le cycle viral

Le cycle commence par l'infection de la strate basale des épithéliums stratifiés squameux avec une étape dite d'adsorption, où la capsid se fixe à la membrane cellulaire. Cependant, les récepteurs cellulaires qui permettent l'entrée du virus n'ont pas encore été clairement définis. Il semblerait que ce sont les intégrines $\alpha 6$ - $\beta 1$ et $\alpha 6$ - $\beta 4$ ainsi que les glycosaminoglycanes qui seraient responsables de la reconnaissance virale (10). L'étape de reconnaissance serait suivie d'une étape d'endocytose dans des vésicules à clathrines ; néanmoins, il est probable que l'entrée diffère selon les types de papillomavirus.

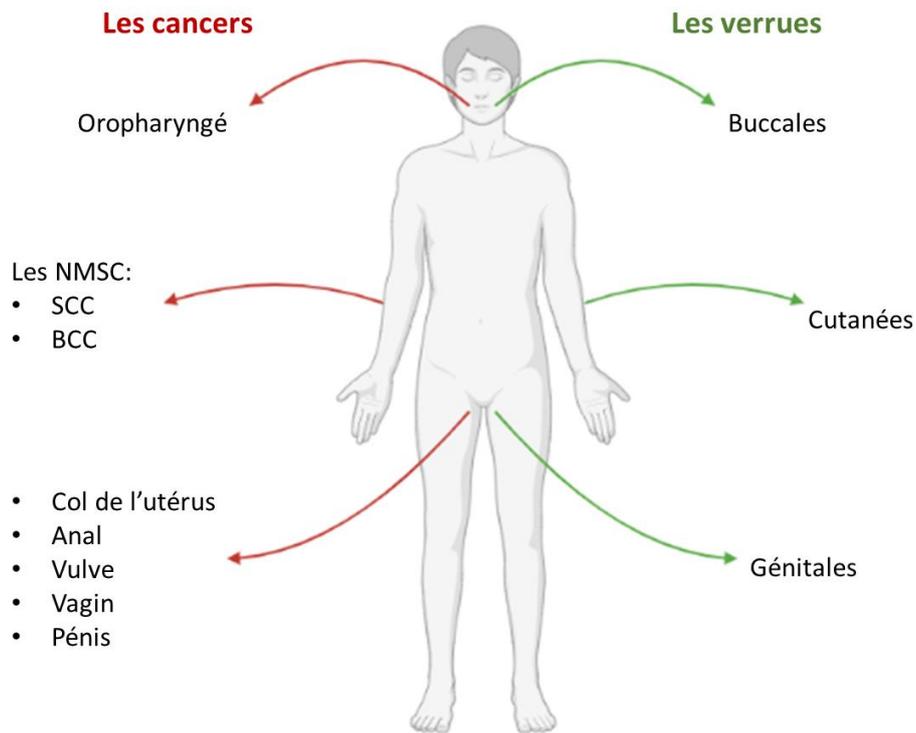


Figure 3. Les lésions provoquées par les HPV. Les HPV sont responsables de différents types de lésions. Les brHPV mènent aux lésions dites bénignes telles que les verrues (buccales, cutanées, génitales). Les hrHPV regroupent principalement les HPV de type α qui sont responsables des cancers des organes génitaux. Certains HPV β sont également des hrHPV, tel que le HPV38, responsable du développement du cancer cutané non-mélanome (NMSC). (Schéma créé sur BioRender.com)

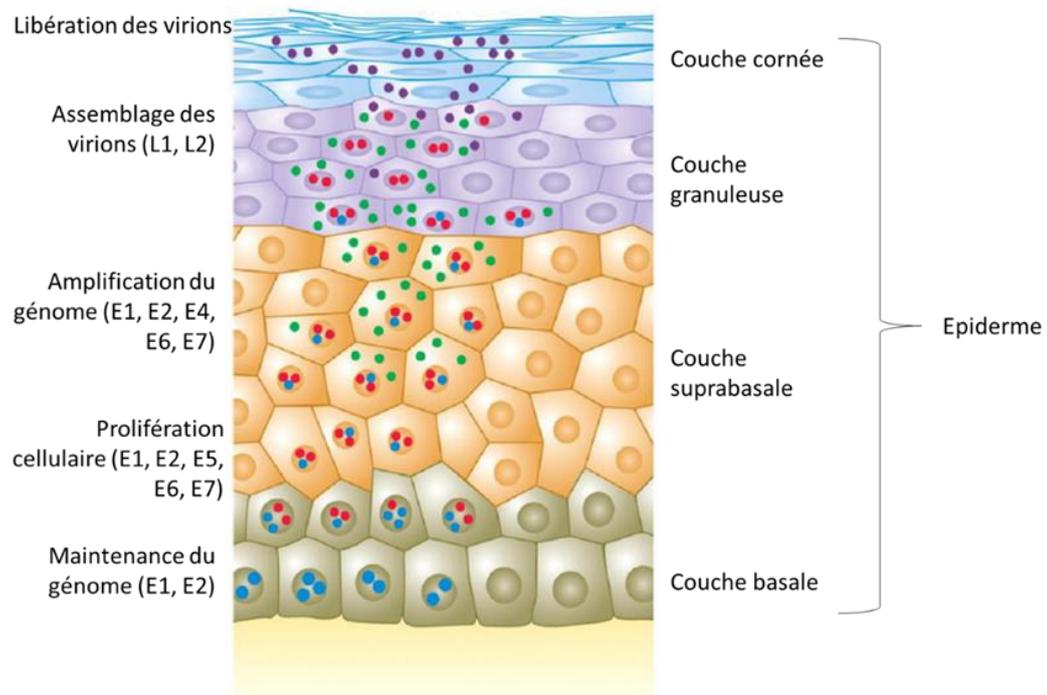


Figure 4. Le cycle viral. Le virus infecte la strate basale des épithéliums stratifiés. La réplication virale se poursuit avec la différenciation cellulaire. Les protéines E sont produites en premier lieu. En fin de cycle, ce sont les protéines L qui sont synthétisées afin de permettre l'assemblage du virus. Les virions sont libérés avec la desquamation en surface de l'épiderme depuis la couche cornée. (adapté de Hampson 2021) (11)

La réplication virale se poursuit avec la différenciation cellulaire, à savoir la kératinisation des cellules épithéliales. La phase précoce a lieu dans les couches basales, où les protéines *early* sont produites. Ensuite, la réplication de l'ADN viral a lieu dans les couches épineuses et granuleuses. En fin de cycle, les protéines *late* de la capsidite sont produites afin de permettre l'assemblage de nouvelles particules virales. Les virions sont libérés avec la desquamation en surface de l'épiderme (Figure 4).

c. HPV et cancer

Les HPV ne possèdent pas leur propre ADN polymérase, ils sont ainsi exclusivement dépendants des protéines de réplication des cellules de l'hôte et de leur différenciation. De ce fait, ces virus incitent la cellule à augmenter son métabolisme afin de la pousser vers une division active, nommée néoplasie, qui peut être bénigne ou maligne. Ainsi, les cellules infectées tendent *in fine* vers un phénotype de cellules transformées. Généralement le virus est éliminé par le système immunitaire. Cependant, dans certains cas comme lors d'une infection chronique, la lésion peut persister et conduire au développement d'un cancer et ce même après plusieurs décennies.

Les HPV ont développé différentes stratégies afin de faciliter la réplication du génome viral. Les facteurs les plus importants lors de cette carcinogenèse sont les protéines E6 et E7 qui sont essentielles dans l'établissement d'un environnement favorable pour la réplication virale. Plus précisément, ces protéines protègent le génome viral du système inné et adaptatif. Elles n'ont aucune activité enzymatique ; néanmoins, il a été montré qu'elles s'associent avec de nombreux partenaires cellulaires. Dans ce chapitre, les mécanismes d'oncogénicité des hrHPV α et particulièrement des β sont détaillés, selon les propriétés des E6 et E7 de ces deux genres.

Les oncoprotéines E6 et E7 : caractéristiques générales

Les oncoprotéines des HPV α et HPV β ont globalement des structures très similaires. Cependant, les variations de séquence à la surface de ces protéines sont à la base de propriétés fonctionnelles distinctes. Les protéines E6 sont formées d'environ 150 acides aminés présentes principalement dans le noyau en périphérie de la chromatine condensée. Elles sont constituées de deux domaines de liaison au zinc (E6N et E6C), chacun contenant deux répétitions du motif CxxC (12). Ces deux domaines forment une poche hydrophobe capables de capturer les cibles cellulaires contenant le motif LXXLL (13) (Figure 5).

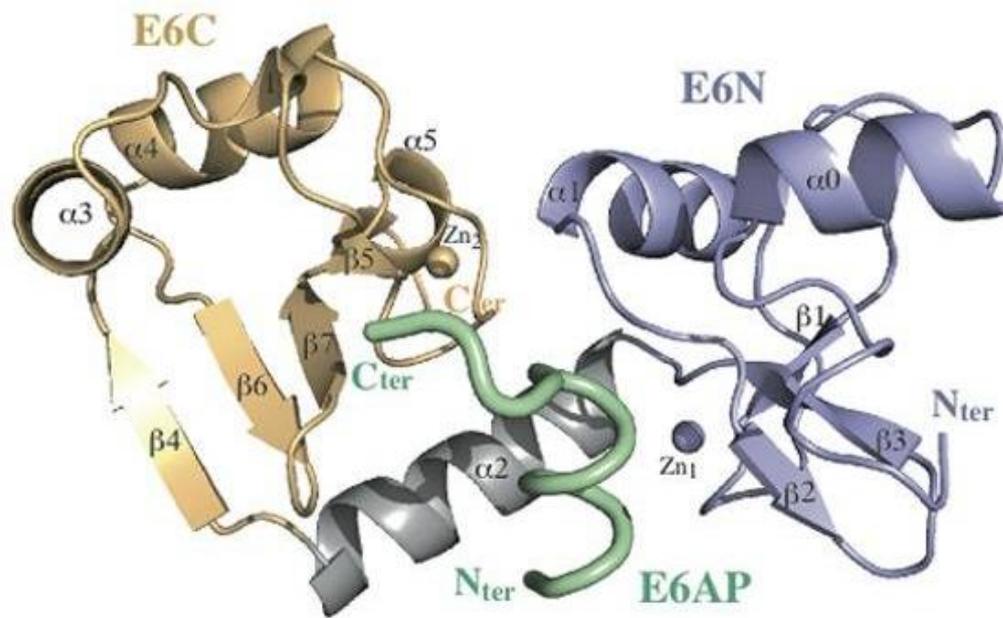


Figure 5. Structure de E6 de l'HPV16 lié au motif LXXLL de E6AP. Le domaine de liaison au zinc E6N (gris) et E6C (or) sont nécessaires pour la liaison du motif LXXLL de E6AP (vert). (adapté de Zanier et al. 2013) (13)

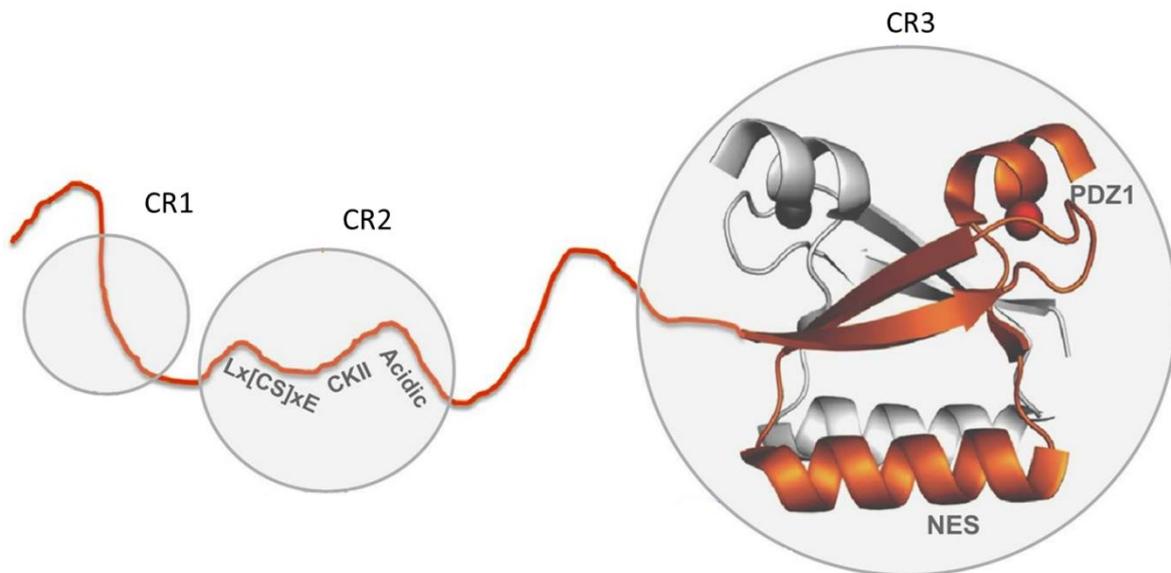


Figure 6. Représentation schématique de la structure de E7 de HPV45. La protéine E7 est composée de trois régions nommées CR1, CR2 et CR3. La région CR2 contient le motif LXCXE, tandis que la région CR3 est essentielle à la dimérisation (les dimères étant représentés par les structures oranges et argentées). (Adapté de Chemes et al. 2013) (16)

La protéine E7, composée d'environ 100 acides aminés, est localisée dans le noyau et le cytoplasme. Elle est divisée en 3 régions, nommées CR1, CR2 et CR3. La CR2 localisée en N-terminus contient le motif LXCXE requis pour la transformation cellulaire, en reconnaissant les protéines de la famille du rétinoblastome (RB), i.e. pRb, p107/RBL1 et p130/RBL2 (voir Chapitre 3) avec une très haute affinité (14). En C-terminus, la CR3 contient un domaine de liaison au zinc incluant deux motifs CXXC. Ce domaine est essentiel à la dimérisation et la stabilisation de l'E7 (15) (Figure 6).

Les oncoprotéines E6 et E7 des hrHPV exercent à elles-seules une activité transformante des cellules infectées. Bien que ciblant indépendamment les différentes voies de la régulation cellulaire, la dérégulation du système cellulaire se fait en synergie par les protéines E6 et E7. Exprimées dans les cellules basales et suprabasales, elles ciblent de nombreuses protéines de l'hôte en détournant principalement les réseaux cellulaires d'interaction domaine-motif (17). L'expression de E6 et E7 immortalise efficacement la plupart des types de cellules primaires (18-20).

Il est intéressant de noter que dans les modèles de souris transgéniques, E7 des hrHPV α est suffisante pour induire des carcinomes invasifs du col de l'utérus qui sont, néanmoins, plus petits que ceux qui se développent lorsque E6 et E7 sont coexprimées (21-28). Ces observations soulignent l'activité coopérative des protéines E6 et E7 dans la promotion de la carcinogenèse.

d. Propriétés transformantes des oncoprotéines E6 et E7 des hrHPV α

L'implication des hrHPV α dans la carcinogenèse est très bien documentée. L'infection par ces types d'HPV est fréquente chez les jeunes femmes et hommes sexuellement actifs. Les hrHPV sont les agents étiologiques d'un certain nombre de cancers du tractus ano-génital, y compris les carcinomes du col de l'utérus, de la vulve, du vagin, du pénis et de l'anus, et pour environ 20 % des cancers de la tête et du cou (en particulier les cancers de l'oropharynx). La majorité des cancers HPV-positifs diagnostiqués chaque année dans le monde sont des cancers du col de l'utérus (> 600 000) (29) constituant la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde. Parmi les hrHPV α , le HPV16 est le type oncogène le plus fréquent, associé à 50% des carcinomes du col de l'utérus, de l'anus et la plupart des cancers de l'oropharynx HPV positifs (30).

Dans le cas des hrHPV α , les oncoprotéines E6 et E7 sont essentielles au maintien du phénotype cancéreux des cellules. En effet, les études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles expérimentaux ont montré que la déplétion de ces deux oncoprotéines mène à une mort rapide des cellules cancéreuses.

L'oncoprotéine E7 est un perturbateur majeur du cycle cellulaire. Son motif LXCXE cible pRb dans l'état hypophosphorylé, ce qui est une étape essentielle à la transformation induite par les HPV α . De plus, le domaine de liaison au zinc dans la région CR3 augmente l'affinité de E7 à pRB (27). Ainsi, E7 bloque la formation des complexes répressifs RB/E2F (voir Chapitre 3), conduisant à l'expression des gènes impliqués dans la transition G1/S et à l'entrée prématurée en phase S (voir Chapitre 3) (31, 32). En plus d'empêcher la formation des complexes RB/E2F, E7 cible également pRb à la dégradation par le système ubiquitine-protéasome (33).

E7 est aussi capable de se lier aux protéines p21^{CIP1/WAF1} et p27^{KIP1} (codées par les gènes *CDKN1A* et *CDKN1B* respectivement) ainsi qu'aux cyclines A et E, facteurs essentiels à la régulation du cycle cellulaire (34-37). Ceci a pour effet le maintien de l'activité de la kinase cycline-dépendante CDK2 qui phosphoryle les protéines RB et favorise la dissociation du complexe E2F/RB. Un autre mécanisme de dérégulation du cycle cellulaire repose sur la liaison de E7 aux histones désacétylases de classe I (HDAC) (38, 39). Celles-ci contrôlent la transcription en remodelant la chromatine grâce à leur activité d'acétylation.

En revanche, l'oncoprotéine E6 joue un rôle central dans l'inhibition du suppresseur de tumeur p53. En effet, la prolifération incontrôlée des cellules induite par E7 active les réponses apoptotiques médiées par p53. De ce fait, les HPV ont dû développer des stratégies afin de contrer ce mécanisme.

La protéine E6 est capable de se lier au motif LxxLL de l'ubiquitine ligase E3 E6AP. La résolution de la structure du complexe E6 – motif LXXLL d'E6AP – DBD de p53 a permis de mettre en évidence que le recrutement d'E6AP restructure la conformation d'E6 (40). Ceci permet la liaison d'E6 à p53, ce qui mène à sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S. Dans le cas des E6 des brHPV, ces protéines se lient également à E6AP sans aboutir à la dégradation de p53 (41). Enfin, E6 peut également perturber l'acétylation de p53 en inactivant p300/CBP (42, 43) et l'ADA3 acétyltransférase (44). Cependant, il est intéressant

de noter que E6 des hrHPV ne cible pas les homologues de la famille p53, à savoir les protéines p63 et p73 (voir Chapitre 2).

Bien que l'association E6/p53 soit cruciale dans la carcinogenèse, d'autres voies indépendantes de p53 sont également ciblées par les virus hrHPV. Cela concerne notamment la voie apoptotique extrinsèque qui est contrôlée par la cytokine inflammatoire TNF α . Dans ce processus, E6 inhibe la transduction du signal en se liant au récepteur 1 de TNF (TNFR1) et dégrade les protéines FADD (*Fas-associated protein with death domain*) et la caspase 8 (45, 46). Les E6 des hrHPV inhibent également d'autres facteurs pro-apoptotiques (45, 46) tel que BAK (47) ou c-Myc (48). Une autre cible d'E6 est le réseau Myc/Max, favorisant ainsi l'expression de la transcriptase reverse de la télomérase (hTERT) (49).

Une particularité spécifique aux oncoprotéines E6 des hrHPV est la présence d'un motif de liaison au domaine PDZ (PBM) au niveau du C-terminus. Les études sur des modèles de tissus en culture ainsi que sur des souris ont démontré l'importance de ce motif dans l'activité transformante (50). Les cibles identifiées sont notamment les protéines DLG1, Scribble ou encore MAGI-1, facteurs jouant un rôle de premier rang dans l'adhésion et polarité cellulaire (51).

Enfin, les protéines E6 et E7 interviennent également dans la perturbation de la réponse immunitaire innée (NF- κ B, JAK/STAT) (52-54).

e. Propriétés transformantes des oncoprotéines E6 et E7 des HPV β

Les HPV β sont divisés en cinq groupes, β -1, β -2, β -3, β -4 et β -5, qui comportent plus d'une cinquantaine d'espèces. Les HPV β -1 et β -2 sont en prévalence détectés au niveau de la peau, alors que les β -3 sont présents au niveau des épithélium muqueux (7). Les HPV5 et HPV8 (β -1) ont été les premiers types β à être découverts, isolés à partir des lésions cutanées de personnes atteintes d'une maladie génétique appelée épidermodysplasie verruciforme (EV). Cette maladie comporte un risque élevé de développer le cancer de la peau non-mélanome (*non melanoma skin cancer* - NMSC) au niveau des zones cutanées photoexposées. Les NMSC sont classifiées en deux types de carcinomes : les carcinomes épidermoïdes (*squamous cell carcinoma* – SCC) et les carcinomes basocellulaires (*basal cell carcinoma* – BCC). Par la suite, un risque plus élevé de développer des cancers NMSC a été observé chez des patients immunodéprimés. De plus, de nombreux marqueurs des HPV β (comme l'ADN viral et des

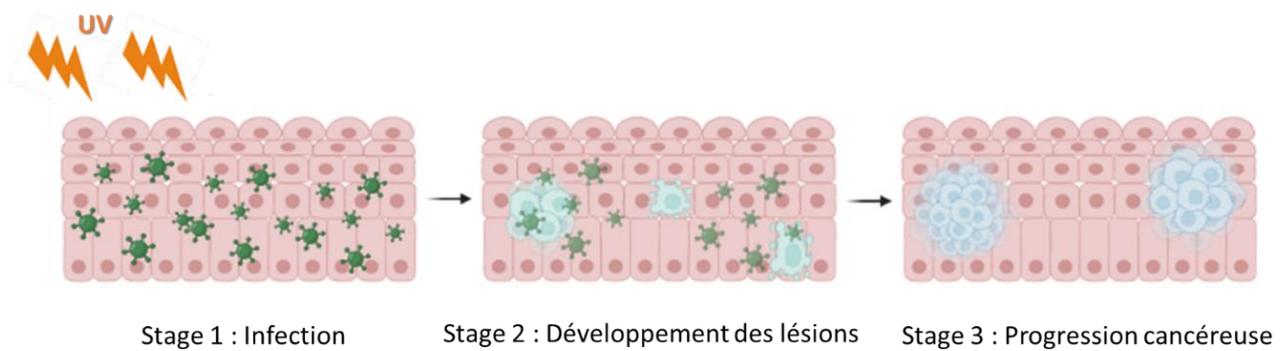


Figure 7. Schéma du modèle d'action "hit and run" des HPV β . Le rayonnement UV induit l'accumulation des lésions au niveau de l'ADN qui, dans les cellules saines, provoquent l'arrêt du cycle cellulaire. En cas d'infection par les HPV β , l'expression des E6 et E7 inhibe la réponse induite par les UV, ce qui mène à une accumulation de mutations dans le génome de l'hôte. L'expression des oncogènes disparaît avec la progression du cancer. Les particules virales représentées en vert. (Schéma créé à partir de BioRender.com).

anticorps contre la protéine L1) ont été détectés chez des patients ayant des antécédents de carcinome spinocellulaire (CSC). Ceci a conduit à l'hypothèse des HPV β comme facteurs liés à la carcinogenèse cutanée (7). En outre, les données épidémiologiques indiquent que les facteurs de risque liés à la persistance des infections par le HPV β sont l'âge avancé et les érythèmes solaires aigus (7). Il ne semble pas qu'il y ait un type de HPV β prévalant dans le développement des NMSC : les résultats varient selon les analyses sérologiques à partir d'échantillons prélevés sur les différentes parties du corps. En somme, ces études convergent principalement vers une majorité de HPV5, 8, 15, 20, 23, 36 et 38 impliqués dans les lésions des différents types de NMSC (55).

Des données expérimentales indiquent que les mécanismes de virulence des HPV β sont différents de ceux des groupes α . En effet, dans les cellules cancéreuses rares sont les cas où il y a plus d'une copie du génome viral, ce qui indique que toutes les cellules ne contiennent pas de l'ADN des HPV β . Parmi les dérégulations cellulaires engendrées par les HPV β , la perturbation de la réponse aux dommages par l'ADN (*DNA damage response* – DDR) semble être prépondérante et responsable de la mutagenèse observée chez les individus immunocompétents (56). Ainsi, la DDR est liée à la capacité des cellules à réparer les agressions génotoxiques, en particulier après exposition aux UV. Des expériences menées sur des souris transgéniques ont montré que la délétion des oncogènes viraux E6 et E7 de l'HPV38, après le développement de lésions au niveau de la peau exposée aux UV, n'affecte pas la croissance de la tumeur (57). Ceci suggère que HPV38 joue un rôle crucial dans les premières étapes de la carcinogenèse. Par la suite, l'expression des oncogènes viraux disparaît au fil de la progression du cancer, n'étant plus indispensable au maintien du phénotype malin. Dans ce modèle de transformation cellulaire, qu'on appelle "*hit and run*", les HPV β peuvent donc faciliter l'accumulation des mutations induites par les UV dans le génome de l'hôte et, par la suite, devenir inutiles une fois que le NMSC est bien établi (7) (Figure 7).

Les protéines E6 et E7 des types HPV β sont capables de cibler les voies p53 et RB, comme c'est le cas des protéines E6 et E7 des hrHPV α . Néanmoins, il y a des différences fondamentales dans les mécanismes de ces interactions (58). Ainsi, ces mécanismes varient selon les espèces des HPV β , ce qui conduit à différents phénotypes (58). Comme dans le cas des HPV α , E7 des HPV β contiennent le motif LXCXE permettant les interactions avec les

protéines de la famille RB. Cependant, il existe des variations d'affinité entre les protéines RB et les E7 des différentes espèces.

Ceci est le cas des E7 des HPV14, 24 et 36 (β -1), des HPV23 et 38 (β -2) et d'HPV49 (β -3), qui interagissent bien avec pRb, mais, contrairement aux hrHPV α , favorisent l'hyperphosphorylation de pRb, ainsi que sa stabilisation dans les kératinocytes humains (59, 60). D'autre part, il a été montré que la protéine E7 de HPV115 (β -3) n'est pas capable de cibler les RB (61).

Concernant l'interaction E6/p53, il a été démontré que les protéines E6 de certains HPV β , comme l'HPV38 (β -2) et l'HPV92 (β -4), se lient efficacement à p53 (62) par un mécanisme indépendant d'E6AP, favorisant ainsi la stabilisation des niveaux de p53 (63). En revanche, la protéine E6 de l'HPV49 (β -3) favorise la dégradation de p53 par l'intermédiaire d'E6AP (60).

Des mécanismes de dérégulation indirecte de p53 spécifiques aux HPV β ont aussi été démontrés. Ceci est le cas d'E6 du HPV23 (β -2), qui interagit avec la kinase HIP2, inhibant ainsi la phosphorylation de p53 au niveau de la sérine 46 et, par conséquent, l'activation de p53 après irradiation aux UV (64). Cependant, comme souligné par White *et al* (63), l'hétérogénéité des interactions E6-p53 observée parmi les différentes espèces des HPV β pourrait être potentiellement due aux différentes conditions expérimentales.

Une propriété spécifique des E6 des HPV8 (β -1), HPV17 (β -1) et HPV38 (β -2) est l'interaction avec le motif LXXLL de la protéine Mastermind-like1 (MAML1), membre de la voie de signalisation canonique Notch, (41, 65). L'interaction E6/MAML1 entraîne la répression de la transcription médiée par Notch, favorisant ainsi la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes.

Des mécanismes communs entre les E6 des HPV α et β ont la capacité d'activer hTERT (60, 66) et d'interagir avec p300/CBP (58). De même, il existe des variations de réponse parmi les espèces. Dans le cas des HPV5 et HPV8 (β -1), l'interaction d'E6 avec p300 mène à sa déstabilisation par l'inhibition de la phosphorylation de la sérine 1834. Cet événement conduit à une diminution de l'activation de p53 et des voies en aval de la réparation des lésions à l'ADN (67, 68).

L'équipe de Massimo Tommasino a effectué des nombreuses études fonctionnelles portant sur la souche HPV38, qui s'appuient sur un modèle cellulaire constitué de kératinocytes du prépuce humain (HFK) exprimant les oncoprotéines E6 et E7 de ce virus (38HK). Il a été montré que dans les 38HK, la protéine p53 pleine longueur et de type sauvage (wt) est stabilisée et acquiert des propriétés pro-prolifératives. Dans les faits, p53 est indispensable à la survie de ces cellules : l'inhibition de l'expression de la protéine ou de son activité diminue significativement la prolifération cellulaire (69). Dans les 38HK p53, est phosphorylée uniquement sur deux résidus sérine (S15 et S392). La phosphorylation au niveau de la sérine 392 est médiée par la kinase PKR, fortement active dans les HPV38. La phosphorylation de p53 favorise l'assemblage du complexe p53/DNMT1, ce qui inhibe l'expression du gène codant pour l'intégrine $\alpha 1$ (ITGA1), un répresseur de la voie de signalisation d'EGFR (69). Ceci suggère qu'il existe des formes de p53 wt qui exercent des fonctions pro-prolifératives dans les HPV38. L'équipe de Tommasino a également montré que dans les 38HK la protéine p53 est recrutée au niveau du promoteur P2 du gène TP73 codant pour son propre homologue p73, permettant ainsi la transcription de l'isoforme oncogénique $\Delta Np73\alpha$ (70). Comme décrit dans le chapitre 2 de cette thèse, $\Delta Np73\alpha$ agit en tant qu'inhibiteur dominant négatif de la transcription médiée par p53 et p73. De plus, E7 du HPV38 favorise l'accumulation nucléaire de $\Delta Np73\alpha$ par le biais d'une phosphorylation médiée par IKK β (71), ce qui entraîne l'assemblage des complexes répressifs transcriptionnels capable d'inhiber l'expression d'un sous-ensemble de gènes régulés par p53 impliqués dans l'apoptose et la réparation de l'ADN (72).

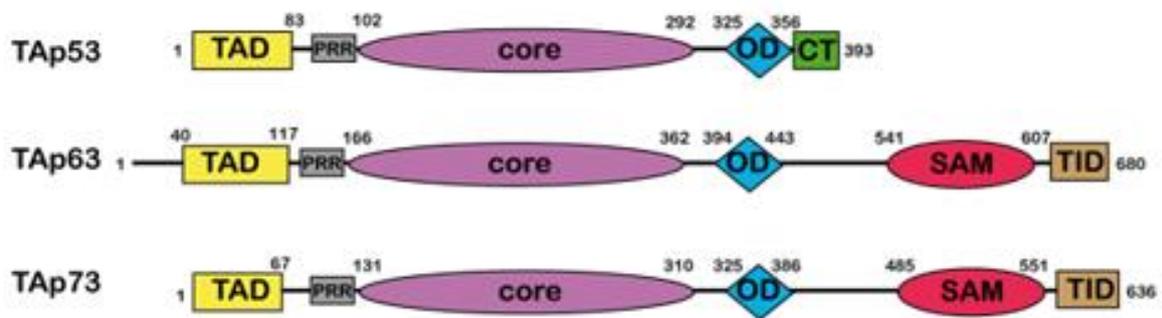


Figure 8. Architecture des protéines de la famille p53. Les trois membres (p53, p63 et p73) possèdent en commun le domaine transactivateur (TAD – en jaune), un domaine riche en proline (PRR – en gris), un domaine de liaison à l'ADN (DBD – en violet), un domaine d'oligomérisation (OD – en bleu) ainsi qu'une région C-terminale (CTD). La partie C-terminale de p53 n'est définie que par une région régulatrice CT (en vert), tandis que p63 et p73 possèdent un domaine SAM (en rouge) et TID (en brun).

Chapitre II. La famille de p53

Dans ce chapitre, je décris les membres de la famille de p53, à savoir p53, p63, p73 et leurs isoformes. La protéine p53 est connue comme étant cible des HPV. p73 et tout particulièrement son isoforme $\Delta Np73\alpha$ est surexprimée dans notre modèle cellulaire 38HK. $\Delta Np73\alpha$ constitue le sujet central de ma thèse doctorale. Je mets également l'accent sur leur implication dans les voies de sénescence, étant un point développé lors de mes recherches en laboratoire

1. Description générale de la famille

La protéine p53 est bien connue depuis un peu plus de 40 ans dans le monde scientifique. Découverte premièrement en 1979, elle a suscité un grand intérêt pour son implication dans les mécanismes d'oncogénèse. Depuis, deux autres protéines ont été identifiées et ont rejoint la famille de p53 : p63 et p73. Du point de vue phylogénétique, le gène *TP53* a évolué depuis un gène *TP63/TP73* ancestral présent chez la plupart des invertébrés ([73](#), [74](#)). Les produits de ces gènes (p53, p63, p73) sont trois facteurs de transcription homologues qui reconnaissent les mêmes séquences régulatrices (p53RE) dans les promoteurs des gènes. Le p53RE est une séquence en tandem du motif RRRCWWGYYY ([75](#)). De ce fait, p53, p63 et p73 partagent la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, la sénescence et le contrôle du cycle cellulaire. Toutefois, les protéines p63 et p73 présentent également des fonctions distinctes de celles de p53. En effet, p63 joue un rôle unique dans le maintien et la différenciation des cellules souches épithéliales et le contrôle de la qualité des ovocytes, tandis que p73 est impliquée dans la différenciation des cellules multiciliés ou neuronales. De plus, l'enjeu de ces protéines au sein de la cellule reste complexe, par la présence de nombreux isoformes de p53, p63 et p73.

Les trois protéines possèdent différents domaines fonctionnels, à savoir un domaine de transactivation (TAD) en N-terminus, suivi d'un domaine riche en proline (PRR), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de tétramérisation (OD) et un domaine régulateur C-terminal (CTD) ([76](#)). Le DBD est hautement conservé au cours de l'évolution, alors que les domaines N-terminal et C-terminal présentent plus de variations. Plus particulièrement, p53 possède uniquement un CTD, tandis que le C-terminus de p63 et p73 est composé d'un domaine SAM et TID, décrits ci-dessous (Figure 8).

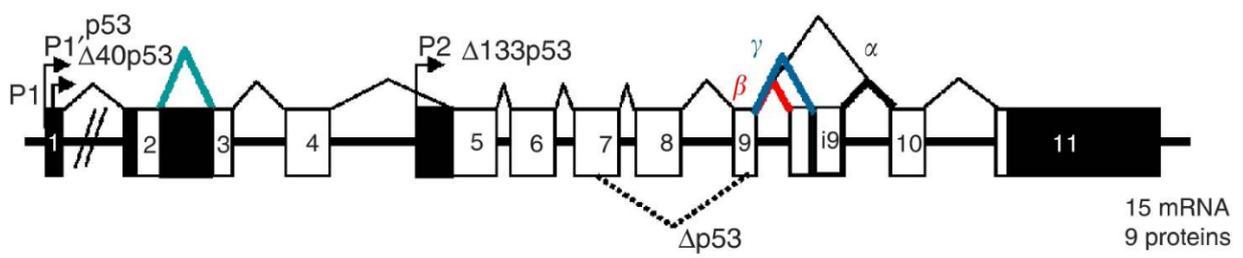


Figure 9. Schéma de la structure du gène TP53. L'isoforme $\Delta 133p53$ est généré à partir du promoteur alternatif P2. L'isoforme $\Delta 40p53$ est généré à partir de P1 ou P1' suivi d'un épissage alternatif. (adapté de Bourdon 2007) (76)

Dans 50% des cas des cancers humains le gène *TP53* présente des altérations génétiques, qui consistent dans la plupart des cas en mutations faux-sens au niveau du DBD (77). En revanche les gènes *TP63* et *TP73* sont rarement mutés. Cependant ces gènes sont souvent exprimés sous forme d'isoformes oncogéniques $\Delta Np63$ et $\Delta Np73$.

2. p53 : une clé de voute de la cancérologie

a. Structure de p53 et ses isoformes

p53 est une protéine de 393 résidus de long, contenant les régions TAD, PRR, DBD, OD et le CTD. Bien que des nombreuses données structurales des domaines DBD et OD, ainsi que des peptides dérivés des régions TAD et CTD en complexe avec des protéines partenaires, ont été générés, la structure à haute résolution de la protéine p53 complète reste inconnue. Ceci est principalement dû à la grande proportion de domaines intrinsèquement désordonnés (IDD) (40% du monomère p53 entier) principalement dans les régions TAD, linker (entre les domaines de noyau et de tétramérisation) et CTD (78). Les IDD existent dans différents états conformationnels, qui sont hautement dynamiques et interchangeables au cours du temps. Cette flexibilité permet la modulation des propriétés d'interaction de ces domaines par des mécanismes de régulation de p53. Pour cette raison, les IDD sont abondantes dans les réseaux d'interaction protéine-protéine (78, 79). Cependant, des études très récentes ont permis de déterminer un modèle structural de p53 à partir d'échantillons de patients, issues de cellules de tumeurs cérébrales. Des micropuces à base de silicium maintenant les protéines ont permis de réaliser les analyses par cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Ces analyses ont permis la mise en évidence d'un mélange de monomères, dimères et tétramères (80, 81).

La protéine p53 présente également différents isoformes. Le gène *TP53* contient deux promoteurs : le premier étant situé en amont de l'exon 1, le deuxième localisé au sein de l'intron 4 (Figure 9). La transcription à partir de ce second promoteur conduit à des protéines tronquées commençant avec le codon 133 ($\Delta 133p53$). Le transcrit $\Delta 133p53$ peut également donner lieu à plusieurs isoformes par épissage alternatif de la région 3'. Il en est de même pour les transcrits générés depuis le promoteur de l'exon 1. Au total 8 isoformes de p53 peuvent être exprimés dans différents tissus humains comme dans le foie, la rate ou le thymus. Le promoteur alternatif ainsi que l'épissage sont régulés de manière tissue-dépendante (76).

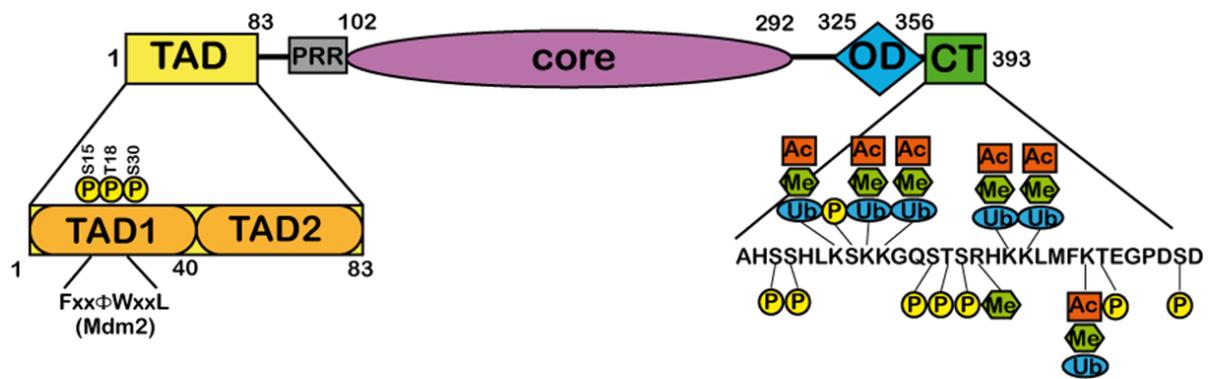


Figure 10. Représentation schématique des domaines de p53 ainsi que les principaux PTM dans le TAD et CT régulant la fonction de p53. Parmi les PTM sont représentées les phosphorylations (« P » en jaune), les acétylations (« Ac » en orange), les méthylation (« Me » en vert) et les ubiquitinations (« Ub » en bleu).

b. Régulation de l'activité de p53 par des modifications post-traductionnelles

p53 est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT), principalement situées dans les régions TAD et CTD (Figure 10). Les MPT réversibles sont l'un des moyens les plus efficaces pour moduler dynamiquement les fonctions de la protéine. L'analyse par spectrométrie de masse de p53 isolée à partir de fibroblastes humains infectés par l'adénovirus montre 222 modifications réparties sur 99 résidus (82). Ces MPTs incluent la phosphorylation des sérines et thréonines, l'acétylation des lysines, la méthylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, la NEDDylation et l'arginisation (NEDDylation et méthylation de l'arginine). Ceci permet un contrôle fin des différentes fonctions de p53. (83)

En absence de stress, p53 est inhibée et dégradée par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase E3 MDM2 (84-86). MDM4, homologue de MDM2, contribue également à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 sans toutefois promouvoir la dégradation de p53 (87). En cas de stress cellulaire, tel que les dommages à l'ADN, l'hypoxie ou la présence d'oncogènes, les kinases ATM/ATR ou CHK2 phosphorylent p53 au niveau du TAD, le protégeant ainsi de l'interaction avec MDM2/4 (83, 88). Cela conduit à la stabilisation des niveaux de p53, qui cible les éléments de régulation p53RE, favorisant ainsi l'expression de centaines de miRNA et de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence, l'apoptose, l'autophagie et le métabolisme. Il est intéressant de noter que p53 active la transcription de MDM2 et de MDM4, ce qui donne lieu à une boucle de rétroaction négative permettant de maintenir les niveaux de p53 bas en absence de stimuli. D'autre part, la phosphorylation de p53 peut être aussi associée à l'inhibition de son activité transcriptionnelle. Ceci est le cas de la phosphorylation au niveau de la Thr55 par TAF1, ce qui en conditions physiologiques induit la dissociation de p53 du promoteur du gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21^{CIP1/WAF1} (89). En réponse aux agressions génotoxiques, la Thr55 est déphosphorylée par la protéine phosphatase 2A (PP2A), stabilisant p53 et induisant l'arrêt du cycle cellulaire (90).

Au niveau du CTD, les lysines 370, 372, 373, 381, 382 et 386 sont acétylées par l'intermédiaire du co-activateur CBP/p300. Ceci est contrebalancé par les désacétylases comme l'histone désacétylase 1 (HDAC1) et la Sirtuin 1 (SIRT1). Ces MPTs modulent la spécificité de liaison aux séquences promotrices. Le facteur associé à la CBP/p300 (PCAF) acétyle également la lysine

30, ce qui inhibe l'activité pro-apoptotique de p53 en réprimant la transcription des gènes de la voie de l'apoptose.

Des études sur les mutations ponctuelles, notamment chez la souris, ont permis de caractériser les rôles biologiques des différents MPT de p53 (91). Par exemple, en cas de mutation au niveau de la Ser23 de p53, les souris irradiées aux rayons γ développent des tumeurs plus rapidement que les souris contrôle (92). En revanche, le remplacement de toutes les lysines du CTD par des arginines, empêchant ainsi l'acétylation et/ou la méthylation de ces résidus, n'a produit aucun phénotype tumoral. Dans l'ensemble, les travaux sur les souris transgéniques ont conduit au concept qu'il existe un haut degré de redondance dans les voies en amont et en aval de p53. La suppression individuelle de MPT spécifiques n'affecte pas significativement les fonctions de suppression des tumeurs de p53.

c. Activité transcriptionnelle de p53

p53 constitue un élément charnière dans la régulation de l'expression des gènes, étant à l'initiation de la cascade de signalisation. Il a été clairement démontré que p53 active l'expression de gènes de manière directe, tandis qu'il réprime l'expression de gènes principalement de manière indirecte *via* ses effecteurs en aval. L'un de ces effecteurs les mieux caractérisés est p21^{CIP1/WAF1}. Transcriptionnellement activée par p53, p21^{CIP1/WAF1} est un inhibiteur des kinases cyclines dépendantes CDK2, et, par conséquent, promoteur de l'état hyper-phosphorylé des protéines RB (pRb, RBL1/p107, RBL2/p130) (voir Chapitre 3). L'activité de p21^{CIP1/WAF1} conduit donc au maintien des complexes répresseurs RB/E2F au niveau des gènes codant pour les facteurs de la machinerie de la synthèse d'ADN ainsi que les régulateurs de la progression du cycle cellulaire (voir Chapitre 3) (93). Il est important de noter qu'un grand nombre de ces gènes sont également ciblés par le complexe DREAM. Ce dernier est composé de p107 ou p130 et de E2F4 ou E2F5, ainsi que du complexe central MuvB (voir Chapitre 3). Les gènes ciblés à la fois par les complexes RB/E2F et DREAM, comme pour exemple le gène codant pour la kinase cycline dépendante 1 (CDK1) possèdent le motif CHR (*cell cycle genes homology region*) au niveau de leur promoteur (94).

Un autre effecteur de p53 est E2F7, un membre répressif de la famille E2F, qui favorise la répression des gènes-cibles des activateurs de la transcription E2F1-3 (95). De plus, p53 est

également capable d'activer des miRNA répresseurs tel que le miR-34a, qui cible les ARNm de diverses cyclines, affectant les complexes RB/E2F. (96).

Bien que le mécanisme-même de liaison de p53 à l'ADN reste invariable, le transcriptome de p53 est variable selon le contexte cellulaire (97, 98). En effet, p53 cible les régions régulatrices des gènes par la reconnaissance des séquences p53RE avec une haute affinité sans avoir besoin de facteurs auxiliaires. Cependant, toutes les interactions p53-ADN n'activent pas la transcription du gène le plus proche. Dans les faits, la transactivation dépend d'autres facteurs, tels que les facteurs épigénétiques, la méthylation de l'ADN environnant et la topologie de la chromatine (99).

d. p53 et la sénescence

Les facteurs de stress peuvent être intrinsèques, comme l'activation d'oncogène(s) et l'érosion des télomères, ou extrinsèques comme l'irradiation UV et la chimiothérapie. Indépendamment de la source, ce stress engendre les réponses aux DDR qui sont variables selon le type cellulaire et le degré de lésions. Ainsi, ces dommages induisent un arrêt du cycle cellulaire, avant d'entrer dans l'un des programmes de la mort cellulaire, notamment la sénescence.

Historiquement, la sénescence était définie par un arrêt de croissance de cellules. Elle a été décrite pour la première fois dans les années soixante par Leonard Hayflick (100, 101) qui observa une perte des fonctions répliquatives des cellules primaires en culture liée à l'érosion des télomères. Actuellement, la définition de la sénescence s'est élargie : elle est considérée comme un arrêt irréversible de la croissance, suite au vieillissement cellulaire, ainsi qu'à différents stimuli comme l'activation des oncogènes ou des cytokines, le stress oxydatif (ROS) et les dommages à l'ADN (102). Cet arrêt a lieu entre les phases G1-S du cycle cellulaire et il est accompagné de nouveaux phénotypes induits par un changement morphologique, le remodelage de la chromatine, la reprogrammation métabolique, ainsi que la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (SASP) (103).

Le vieillissement cellulaire et la carcinogenèse sont deux processus intimement liés à la notion du temps. Les marqueurs de sénescence peuvent être détectés dans les premières phase de l'oncogenèse, alors qu'ils disparaissent complètement avec le développement de la tumeur.

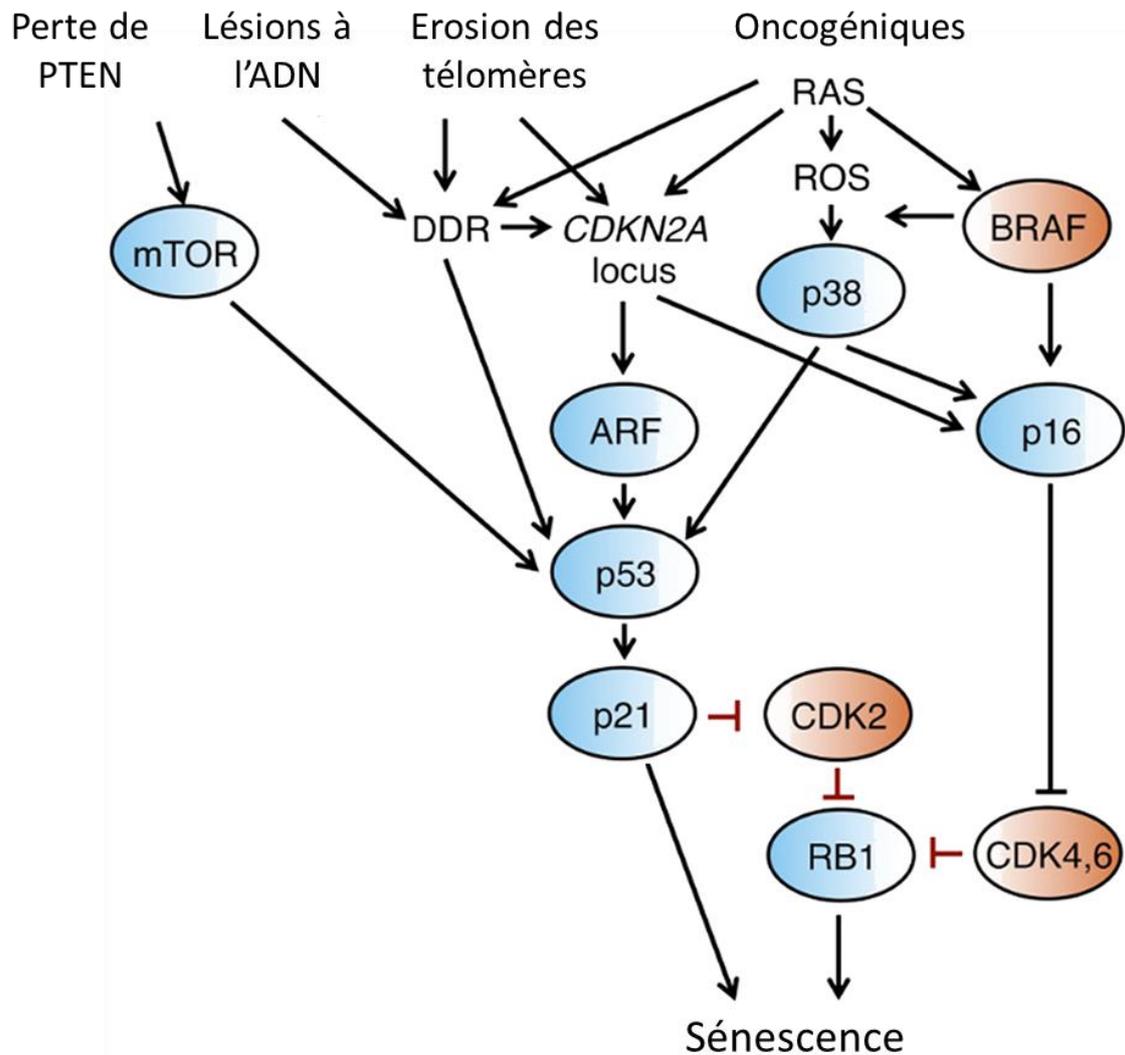


Figure 11. Schéma simplifié de la voie d'activation de la sénescence. Différents facteurs peuvent enclencher la sénescence, tel que les dommages à l'ADN ou des facteurs oncogéniques. Celles-ci peuvent mener à l'activation de la voie p21 ou de p16, deux inhibiteurs de CDK. L'inhibition des CDK mène à l'activation de pRB, ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire. (adapté de Lujambio A. & Villanueva A. 2015) (105)

Cette observation a mené vers l'hypothèse où la sénescence est la première barrière contre l'initiation du développement du cancer ([102-104](#)). Ainsi, en cas de perte d'intégrité génomique, p53 promeut l'entrée de la cellule en sénescence prématurée ou en apoptose. En cas de sénescence, les cellules restent viables et inhibent activement les voies apoptotiques (Figure 11).

Le choix du programme d'arrêt ou mort cellulaire dépend principalement des niveaux de p53. Les études menées par Chu et Liu ont montré que l'exposition à des faibles doses de H₂O₂ induit la sénescence dans les fibroblastes en culture, alors que des doses plus élevées conduisent à l'apoptose ([106](#)). En comparaison au phénotype de sénescence, le niveau protéique de p53 était deux fois plus élevé en cas de phénotype apoptotique. Il existerait donc un seuil de stress déterminant la suite du programme cellulaire. Ce seuil est variable non seulement en fonction du niveau de p53, mais également du type cellulaire/tissulaire, des MPT de p53, ainsi que du statut des isoformes de p53. En effet, il a été montré que les isoformes $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53\alpha$, et $p53\beta$ sont principalement impliqués dans la sénescence. Dans les cellules en sénescence, l'isoforme $p53\beta$ est surexprimée par le biais de l'épissage médié par SRSF3 ([107](#)), tandis que $\Delta 133p53\alpha$ est dégradé via STUB1 ([108](#)). $\Delta 40p53$ est capable de former un hétérocomplexe avec la protéine p53 pleine longueur (TAp53), ce qui module l'activité de ce dernier ([109](#)).

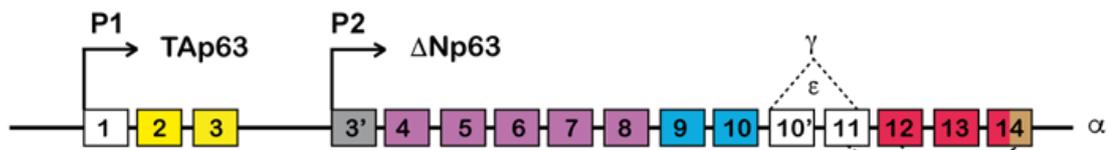
La voie p53/p21^{CIP1/WAF1}

Le rôle le plus important de $CDKN1A/p21^{CIP1/WAF1}$ est la capacité de promouvoir la sénescence en inhibant l'apoptose. En réponse aux DDR, p53 active la transcription de $p21^{CIP1/WAF1}$, qui, à son tour, est capable de moduler l'expression de gènes cibles de p53, comme $CDC25C$, $CDC25B$ et $BIRC5$, principalement *via* le recrutement des complexes répressifs E2F4/RB même en absence de p53 ([110](#)). Le knockout de $p21^{CIP1/WAF1}$ dans les cellules en sénescence active l'apoptose en induisant la cascade des caspases. $p21^{CIP1/WAF1}$ est également capable d'induire la sénescence par des mécanismes indépendamment de p53 *via* CHK2 ([111](#)).

La voie p16^{INK4a}/RB

Bien que la voie $p53/p21^{CIP1/WAF1}$ semble être importante pour l'enclenchement de la sénescence, le gène $CDKN2A/p16^{INK4a}$ est important dans le maintien de la sénescence. $p16^{INK4a}$ est un inhibiteur des kinases cyclines dépendantes CDK4/6. Son implication dans le

A



B

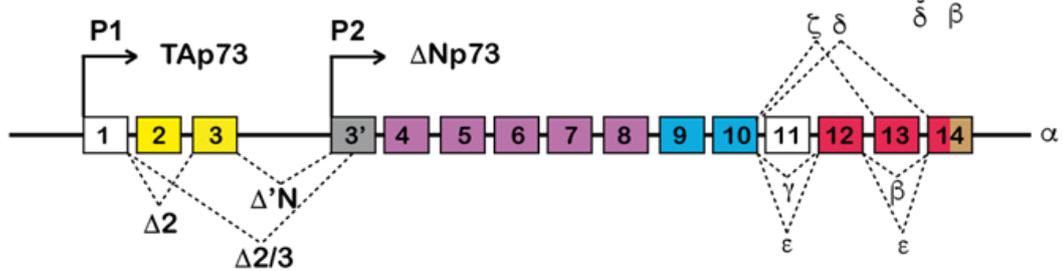


Figure 12. Schéma des structures des gènes TP63 (A) et TP73 (B). Les isoformes $\Delta N - p63$ (A) et $-p73$ (B) sont générés à partir de promoteurs alternatif P2. Les isoformes α , β , γ , δ , ϵ de $p63$ et 73 , ainsi que les isoformes ζ et η de $p73$ sont générés à partir d'un épissage alternatif en 3'. Les couleurs correspondent aux domaines décrits précédemment, à savoir en jaune – TAD, gris – PRR, violet – DBD, bleu – OD, rouge – SAM, brun – TID

maintien du phénotype a été suggéré après observation de la diminution du niveau de p53 dans les cellules sénescentes, alors que le niveau de p16^{INK4a} restait stable. L'activation de la voie de p16^{INK4a} serait donc un seuil déterminant entre deux phases de senescence : une précoce, réversible, dominée par l'activité de p53 et une tardive induite par la voie p16^{INK4a}/pRb qui serait irréversible ([112-115](#)). L'induction de la senescence peut être empêchée en inactivant p53 avant l'augmentation des niveaux de p16^{INK4a}. Cependant, une fois que p16^{INK4a} est hautement exprimé, la déplétion de p53 ne peut plus inverser l'arrêt du cycle cellulaire ([114](#)). L'activation de p16^{INK4a} empêche la phosphorylation de pRb le rendant capable de recruter des facteurs de remodelage de la chromatine tel que les HDAC. Ainsi, p16^{INK4a} conduit à l'inhibition de gènes régulés par les activateurs E2F1-3 ([116](#)). En bloquant la voie E2F, p16^{INK4a} /pRb active la voie de signalisation ROS-PKCδ, ce qui empêche de manière irréversible la cytokinèse ([117](#)).

Les deux voies de p21^{CIP1/WAF1} et p16^{INK4a} convergent vers l'accumulation de p130 qui réprime l'expression de la cycline A. L'activation de la voie p53 induit la diminution du niveau de pRb et p107, tandis que le niveau de p130 augmente dans sa forme hyperphosphorylée ([118](#)). Néanmoins p130 est potentiellement déjà impliquée dans les voies précoces de sénescence, en jouant un rôle dans l'érosion des télomères.

3. p63 et p73 : les sœurs à ne pas négliger

a. Structure et isoformes

Comme p53, p63 et p73 possèdent les domaines TAD, DBD et OD. Les DBDs de p63 et p73 partagent 60% et 63% d'identité de séquence avec p53, respectivement. Les régions TAD sont moins conservées, avec 22% d'identité de séquence entre p63 et p53 et 30% entre p73 et p53 ([119](#)). La différence majeure entre p63/p73 et p53 se trouve au niveau du C-terminus. Au lieu du domaine désordonné CTD, p63 et p73 possèdent un domaine SAM, qui est un petit module capable de former des homo- ou hétéro-oligomères avec d'autres protéines ([120](#)), et une séquence inhibitrice TID qui semble réguler les fonctions du TAD ([121](#)) (Figure 8).

Les gènes *TP63* et *TP73* partagent la même structure (Figure 12). La protéine p63 complète (TAp63), est transcrite depuis le promoteur P1. Cinq isoformes (α , β , γ , δ , ϵ) peuvent être générés par épissage alternatif dans la région 3' du même transcrit. Il existe également un

promoteur alternatif P2 localisé au niveau de l'intron 3 qui donne lieu à l'isoforme Δ Np63, ou les premiers 69 résidus de TAp63 sont remplacés par 14 résidus propres à l'isoforme Δ Np63. Comme dans le cas de TAp63, le transcrit de Δ Np63 peut générer les isoformes, α , β et γ au niveau de la région en 3'. Bien que l'isoforme Δ Np63 n'ait pas le domaine TAD, il porte toujours une activité transactivatrice *via* un autre domaine présent au niveau de son N-terminus (122). Ceci est liée à un motif présent dans les 14 résidus propres à Δ Np63 ainsi que à deux motifs particuliers, le motif PXXP en N-terminus (exon 3) et le motif PPXY au niveau du C-terminus (122) (Figure 12).

Concernant le gène *TP73*, sept variants de la protéine TAp73 ont été identifiés à partir du promoteur P1 qui sont générés grâce à l'épissage alternatif dans la région en 3' du transcrit (α , β , γ , δ , ϵ , ζ et η) (Figure 12). Comme dans le cas du gène TP63, le promoteur P2 dans l'intron 3 génère des isoformes Δ Np73 qui présentent les mêmes variations ou niveau de la région en 3' que les isoformes TAp73. Au total, c'est une trentaine d'isoformes théoriques qui peuvent être générés à partir du gène TP73 grâce aux promoteurs P1 et P2 et à l'épissage alternatif. Les isoformes Δ Np73 se caractérisent par l'absence du domaine conservé Fxx ψ W en N-terminus du TAD mais possède toujours une partie du domaine transactivateur localisé dans l'exon 3 (76). Cependant, les isoformes Δ Np73 agissent en tant qu'inhibiteurs dominants négatifs de la transcription médiée par TAp53 et TAp73. Malgré la très haute similitude entre les DBD de p73 et p53, la conformation tétramérique lors de la liaison à l'ADN est significativement différente due à une différence de séquence dans la boucle L2 (123, 124).

L'interprétation des études fonctionnelles des p63 et p73 est souvent compliquée par le grand nombre d'isoformes qui peuvent être générées à partir des transcrits de leurs gènes. Ci-dessous, je décris certaines de ces études fonctionnelles.

b. Fonctions anti- et pro-oncogéniques de p63 et ses isoformes

L'ensemble des études sur TAp63 semblent suggérer que, dans certaines conditions, la protéine p63 complète joue un double rôle dans la carcinogénèse. Comme mentionné ci-dessus, p63 et p53 partagent des cibles communes impliquées dans la réponse de suppresseur de tumeur classique, comme p21^{CIP1/WAF1}, PUMA et BAX. Cependant, malgré la similarité des domaines DBD, il existe des voies de régulation propres à p63 et p73 qui se justifient par les différences dans la thermostabilité de ce domaine (125, 126), ainsi que la présence d'autres

domaines au niveau de la région C-terminale. Ces différences affectent la spécificité de liaison à l'ADN ([127](#), [128](#)).

Les études menées sur des souris knockout spécifiques de TAp63 ont montré que cette protéine est essentielle à l'activation de la voie de sénescence induite par le facteur Ras ([129](#)). Cette activation est indépendante de p53, p16^{INK4a} et de CDKN2D/p19^{INK4d} (ce dernier codant pour un autre inhibiteur des kinases cycline dépendantes CDK4/6) mais nécessite p21^{CIP1/WAF1} et pRb. L'expression exogène de TAp63 inhibe la formation de tumeurs lors de l'implantation de xénogreffes chez des souris *nude*.

D'autre part des études menées à l'aide des cultures 3D-organotypiques de kératinocytes primaires du prépuce humain (HFK) exprimant les protéines E6 et E7 de l'HPV16 ont montré que l'expression de TAp63 facilite la migration cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que l'invasion par l'activation et expression du complexe Src/FAK ([130](#)). Cependant d'autres études menées sur les HFK ont montré que la déplétion de TAp63 réduit la différenciation ainsi que la prolifération des cellules. Le phénotype a été restauré lors d'une co-déplétion avec p53, et partiellement restauré lors d'une co-déplétion avec p21^{CIP1/WAF1} ([131](#)). TAp63 γ est donc démontré comme un facteur pro-prolifératif, en promouvant l'expression de Skp2, une protéine partenaire du complexe SCF^{Skp2} E3 ubiquitine-ligase, qui induit la dégradation de p130 et p21.

Le locus du gène *TP63* est amplifié dans les carcinomes épidermoïdes des poumons ainsi que de la tête et du cou. Cette amplification est accompagnée par la surexpression des isoformes Δ Np63 α et Δ Np63 γ ([132](#)). De plus, la protéine TAp63 α est détectée dans un pourcentage élevé de carcinomes thyroïdiens, mais pas dans les cellules thyroïdiennes normales ou les adénomes thyroïdiens bénins ([133](#)). Dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes, les activités de suppresseur de tumeurs de TAp63 α sont absentes. Au contraire, TAp63 α semble agir en tant qu'antagoniste de p53 au niveau de l'expression des gènes cibles, ainsi que la viabilité cellulaire. Il a été proposé que les effets oncogènes de TAp63 α dépendent de la région C-terminale contenant les domaines SAM et TID, puisque les isoformes TAp63 β et TAp63 γ sont capables d'induire l'expression des gènes cibles de p53 (Figure 12).

D'autres études sur des souris *TP63* +/- ont mis en évidence que la perte allélique augmente les prédispositions tumorales. Les tumeurs des souris *TP63* +/- présentaient une perte

d'hétérozygotie (LOH), qui est l'une des caractéristiques de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur ([134](#)). D'autres groupes indépendants ont rapporté que la perte d'expression de TAp63 est associée à la progression tumorale et à un mauvais pronostic dans les carcinomes de la vessie humaine ([135](#), [136](#)). Dans d'autres cas, la perte de TAp63 chez des souris transgéniques montre une sénescence cellulaire accrue. Cette sénescence induite par la déficience de TAp63 se produit non seulement dans les cellules précurseurs dermiques ([137](#)), mais aussi dans les ostéosarcomes et les rhabdomyosarcomes chez les souris TAp63^{-/-} ; p53^{+/-} ([138](#)).

Des études à l'aide d'un modèle de souris knock-out conditionnel ont montré que les différents isoformes de TAp63 suppriment les métastases cancéreuses en régulant à la hausse la transcription de miR-130b et Dicer ([138](#)). La biogenèse de divers microARN liés aux métastases, y compris miR-10b, miR-200b, miR-200c, miR34a et miR-130b, est déficiente chez les souris TAp63^{-/-}. Plus important encore, la restauration de Dicer ou de miR-130b résout partiellement le phénotype invasif des fibroblastes embryonnaires murins TAp63^{-/-}, tandis que la restauration simultanée des deux molécules inverse parfaitement l'invasion induite par la déficience de TAp63. TAp63 peut aussi considérablement activer la transcription de Perp pour inhiber les métastases ([139](#)).

Concernant les isoformes Δ Np63, Δ Np63 α est la forme prédominante dans différents types de cancers, notamment les carcinomes épidermoïdes. Premièrement, il a été proposé comme inhibiteur dominant négatif de TAp63 par le fait de sa capacité de bloquer l'expression de p21^{CIP1/WAF1} ce qui conduit à l'inhibition de la sénescence médiée par le complexe cycline E-CDK2 ([114](#)). Les analyses ChIP-seq et transcriptomiques ont montré que les fonctions inhibitrices de Δ Np63 sont favorisées par le recrutement des HDAC ([140-143](#)). En accord avec ces résultats, l'expression ectopique des isoformes Δ Np63 mène à une augmentation de la taille des tumeurs chez les souris ([144](#)) et confère une résistance à la cisplatine ([145](#)). Δ Np63 α est également capable de cibler Lsh, facteur de remodelage de la chromatine, permettant de contourner la sénescence induite par les oncogènes ([146](#)).

En revanche, Δ Np63 α semble agir comme inhibiteur des métastases. L'expression ectopique de Δ Np63 α par injection intraveineuse inhibe les métastases des cellules fusiformes malignes vers les poumons des souris ([147](#)). Il a également été documenté que Δ Np63 α inhibe l'invasion

cellulaire *via* la régulation de l'inhibiteur de la différenciation-3 (Id-3), qui, à son tour, diminue l'expression de la métallopeptidase matricielle 2 (MMP2) afin d'empêcher le clivage des composants de la matrice extracellulaire (148). L'activation de la signalisation oncogène PI3K/Ras/Her2 supprime l'expression de Δ Np63 α , ce qui favorise une amélioration de la motilité cellulaire et des métastases tumorales (149). De plus, le suppresseur de métastases CD82 et la protéine kinase phosphatase 3 activée par des agents mitogènes (MKP3) sont des cibles transcriptionnelles directes de Δ Np63 α (REF). Enfin, il paraît que Δ Np63 α est impliquée dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), étape requise pour l'établissement et la stabilisation des métastases distantes, pendant la colonisation et la formation d'un nodule métastatique (150).

En somme, l'ensemble des données suggèrent que TAp63 est associé à des fonctions de suppresseur de tumeur, en induisant l'apoptose et la sénescence, tandis que les isoformes Δ Np63 favorisent la prolifération cellulaire, en bloquant la sénescence répllicative (151). En revanche, Δ Np63 α semble avoir un effet protecteur au niveau de la formation des métastases.

c. Fonctions de p63 et de ses isoformes dans le développement

Les études sur des souris transgéniques ont montré l'implication de la protéine p63 et de ses isoformes dans le développement. Les souris p63 $-/-$ souffrent d'anomalies du développement des membres et des structures épithéliales. p63 est fortement exprimée dans les couches basales des tissus épithéliaux stratifiés, indispensables à la formation de structures multicouches (152). D'autres études ont indiqué un rôle de p63 dans le développement des tissus musculaires ainsi que dans le contrôle de la qualité génétique des ovocytes, qui consiste en des points de contrôle spécifique qui surveillent l'intégrité de l'ADN ainsi que l'alignement correct des chromosomes homologues au cours de la méiose (153). Cette diversification des rôles pourrait s'expliquer par l'expression des isoformes différents selon les tissus.

Le principal rôle de la protéine complète TAp63 α est associé au développement et à la différenciation embryonnaire, en particulier de l'ectoderme. Les mutations hétérozygotes au niveau du DBD provoquent l'ectrodactylie, la dysplasie ectodermique, une fente labiale/palatine et une dysplasie ectodermique. Les mutations au niveau du CTD provoquent le syndrome Hay-Wells (syndrome d'ankyloblépharon-anomalies ectodermiques-fente labiopalatine ou AEC), un trouble potentiellement mortel caractérisé par une fragilité de la

peau, des érosions cutanées graves et durables ainsi qu'une fente labiale/palatine. TAp63 est presque indétectable dans les cellules somatiques, tandis qu'elle est essentielle lors du développement des oocytes (154) et au cours de l'embryogenèse chez la souris (155).

L'isoforme $\Delta Np63\alpha$ a été largement étudié également dans le contexte du développement, à cause de son rôle essentiel dans le développement des tissus épithéliaux (156-158).

d. Régulation de p73 et de ses isoformes

Comme dans le cas de p53, la stabilité et l'activité de TAp73 et de ses isoformes sont régulées par des MPT. TAp73, mais pas $\Delta Np73$, interagit avec MDM2 (159). Cette interaction conduit à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de TAp73 mais pas à sa dégradation (160).

En revanche, dans les cellules saines, les niveaux des isoformes TAp73 et $\Delta Np73$ sont maintenus bas par la dégradation *via* les calpaïnes (161) ou *via* des voies ubiquitine dépendantes ou indépendantes. Il a été démontré que les protéines TAp73/ $\Delta Np73$ interagissent avec l'ubiquitine ligase E3 Itch, ce qui conduit à leur dégradation par le protéasome 26S (162). TAp73 est également dégradée par le protéasome 20S (163), dans un processus qui est régulé par la NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 (NQO1).

En cas de stress génotoxique, TAp73 est phosphorylée par c-AB1, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de TAp73 (164). Une dégradation sélective de $\Delta Np73$ est également présente *via* l'ubiquitine ligase E3 p73-induced ring finger protein 2 (PIR2) (165), ce qui mène à une augmentation du ratio TAp73/ $\Delta Np73$ entraînant vers l'apoptose. TAp73 peut aussi être activée en réponse aux DDR par les mêmes voies de signalisation que p53, comme la voie ATM/ATR/CHK1. En effet, l'expression de TAp73 est régulée par E2F1 (166) qui est stabilisé par les kinases CHK1 et CHK2 (167) en réponse aux dommages à l'ADN. Ceci active la voie d'apoptose de manière indépendante de p53, bien qu'il ait été suggéré que l'activation de l'apoptose p53-dépendante requière p73 et p63 (168).

Concernant les isoformes $\Delta Np73$, jusqu'à présent seulement quelques MPT ont été caractérisées, notamment la phosphorylation par la c-Abl kinase au niveau de la tyrosine 50 (169) et la phosphorylation par IKK β au niveau de la sérine 422 qui mènent à une accumulation nucléaire de $\Delta Np73\alpha$ dans les 38HK (71). Dans l'étude menée par Zaika *et al.*, les kinases p38

MAPK et IKK ont également été détectées comme des interacteurs de Δ Np73, sans montrer de liaison à une activité kinase ([169](#)).

e. Rôle de p73 et ses isoformes dans l'oncogenèse

Les expériences menées sur des souris knockout isoforme-spécifiques ont montré que la déplétion de TAp73 est un facteur de prédisposition au développement du cancer, tandis que la déplétion de Δ Np73 diminue la croissance tumorale ([170](#), [171](#)). Par le manque de TAD, il est admis donc que les isoformes Δ Np73 sont des inhibiteurs dominant négatifs de p73. Ceci serait principalement attribué à la liaison aux mêmes promoteurs de gènes-cibles des membres de la famille de p53, sans activer la transcription des gènes. De plus, TAp73 et TAp53 sont capables d'activer la transcription de Δ Np73 ce qui permet de créer une boucle de rétroaction négative ([172](#), [173](#)).

Vu la haute similitude de séquence entre les DBD de TAp73 et TAp53, les deux protéines partagent des nombreux gènes-cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme p21, BAX et PUMA, que ce soit au niveau de G1, G2-M ou de la mitose (revue dans ([174](#), [175](#))). Il était donc proposé que TAp73 serait capable de compenser le rôle pro-apoptotique en cas d'absence de TAp53 fonctionnelle ([176](#)). La région C-terminale de TAp73 serait nécessaire au fonctionnement de nombreux facteurs de transcription. Il a été démontré qu'en cas de surexpression du proto-oncogène c-Jun, TAp73 favorise la liaison de c-Jun aux promoteurs des gènes contenant les séquences d'ADN AP-1, permettant ainsi l'expression de la cycline D1 ([177](#)).

Suite aux dommages à l'ADN, le ratio TAp73/ Δ Np73 est donc crucial afin de contrôler la voie apoptotique ([178](#)) ainsi que le destin cellulaire et l'oncogenèse. En effet, il a été montré que l'expression des différents isoformes de Δ Np73 est liée à de nombreux cancers humains ([179](#)), comme les adénocarcinomes de l'estomac et de l'œsophage ([180](#)), le cancer du sein ([181](#)) ou des ovaires. Dans ce dernier, l'inactivation ou la mutation du gène *BRCA1* est associée à une sensibilité accrue au traitement au cisplatine. Dans les cellules où *BRCA1* est inactivé, l'inhibition de TAp73 conduit à une plus grande chimiorésistance. L'expression de TAp73 y est régulée au niveau épigénétique, par des hyperméthylations dans l'intron 1 de p73. Ceci empêche la liaison de l'inhibiteur ZEB1, ce qui permet une augmentation de l'expression de TAp73 et donc l'induction de gènes pro-apoptotiques en réponse à la chimiothérapie ([182](#)).

D'autre part, il semblerait que le promoteur de $\Delta Np73$ soit hypométhylé dans les épithéliums normaux du sein, tandis qu'il est méthylé dans les autres types de tissus. Dans ce cas-ci, l'hypométhylation mène à une expression de $\Delta Np73$ plus élevée. A son tour, l'expression accrue des isoformes $\Delta Np73$ produit une diminution des niveaux BRCA1 et BRCA2, ce qui serait lié à une meilleure survie de cellules épithéliales mammaires suite aux lésions de l'ADN ([183](#)). En accord avec ces résultats, les cellules de souris $\Delta Np73$ $-/-$ présentent une plus grande sensibilité aux agents endommageants l'ADN, ainsi qu'une entrée en apoptose p53-dépendante ([171](#)). $\Delta Np73$ serait donc directement liée aux voies DDR.

TAp73 est également capable de former des hétérocomplexe avec l'isoforme $\Delta 133p53$ après irradiation aux rayons γ . Ainsi, cet isoforme favorise l'activation des mécanismes de réparation des cassures double brin, en permettant l'expression de facteur de réparation comme RAD51, RAD52 et Lig4 ([184](#)). D'une manière similaire, les isoformes $\Delta Np73$ peuvent s'associer à d'autres facteurs de transcription, activant l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, dans le cas de $\Delta Np73\alpha$ ([185](#)), ou dans la croissance cellulaire, dans le cas de l'isoforme $\Delta Np73\beta$ ([186](#)). Les 13 résidus uniques dans la région N-terminale des $\Delta Np73$ ainsi qu'un motif PXXP seraient indispensables pour la synergie avec ces facteurs de transcription.

f. p73 dans les voies de sénescence

La télomérase (TERT) est une ribonucléoprotéine qui synthétise les répétitions de télomères au niveau des terminaisons de l'ADN. Ce processus a lieu dans les tissus embryonnaires et germinaux, ainsi que dans les lignées immortalisées. Dans les tissus somatiques normaux, TERT est inactif. Par conséquent, les répétitions de télomères diminuent avec la division cellulaire, ce qui mène à une sénescence répllicative. Il a été montré que la voie d'apoptose p73-dépendante est activée dans les souris p63 $-/-$ où Pot1b a également été déplété. En effet, Pot1b est un composant de la shelterin, un complexe protéique protégeant les télomères des dommages à l'ADN ([187](#)). Il a aussi été montré que la surexpression de TAp73 α et TAp73 β dans les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) inhibe la transcription et donc l'activité de TERT. Le même phénotype a été observé après surexpression de TAp63 γ et p53. L'ensemble de ces observations a mené à l'hypothèse que TAp73 serait un facteur prédisposant à la sénescence dans les cellules HEK *via* l'inactivation de TERT, bien que des marqueurs de la sénescence n'y aient pas été évalués. ([188](#)).

Les études menées par Rufini *et al.* montrent que la déplétion de TAp73 induit une augmentation des marqueurs de sénescence (activité de β -galactosidase, expression de p19^{ARF} et p16^{INK4a}) dans les fibroblastes primaires embryonnaires issus de souris (MEF) ([189](#)). Ce phénotype a été attribué à l'inhibition de l'activité de l'oxydase du complexe IV du cytochrome C mitochondriale. En effet, une des sous-unités du complexe, la Cox4i1, dont le gène est régulé par TAp73. L'absence de TAp73 mène donc à une augmentation des lésions oxydatives liées à un dysfonctionnement de l'élimination des ROS.

L'isoforme Δ Np73 serait également impliquée dans la voie de sénescence. Lors de l'étude susmentionnée menée par Wilhelm *et al.*, les auteurs ont observé une diminution de la taille et de la vitesse de croissance des tumeurs dans les souris Δ Np73 $-/-$. Cet effet n'était pas lié à une augmentation de l'apoptose mais, plutôt, à une induction des processus de sénescence. Les chercheurs ont donc conclu que Δ Np73 est essentiel à la formation de tumeurs par son activité d'inhibition de la sénescence ([171](#)).

g. Fonctions de p73 et de ses isoformes dans le développement

Dans le cerveau les isoformes TAp73 et Δ Np73 sont présents dans les mêmes types neuronaux. De manière générale, le TAp73 semble promouvoir la différenciation terminale des neurones en régulant la transcription du récepteur p75 neurotrophine ([190](#)) et du microRNA miR34a ([191](#)). Il a été démontré que TAp73 est impliqué dans la régulation du programme de différenciation des cellules multiciliées, cellules épithéliales du système respiratoire ([192](#)). Il est intéressant de noter que cette fonction ne semble pas dépendre des domaines présents dans la région C-terminale. En effet, l'expression spécifique des isoformes β TAp73 et Δ Np73 chez la souris conduit à une réduction des fonctions synaptiques, ainsi que l'altération des capacités d'apprentissage et de mémorisation, sans affecter les cellules multiciliées ([193](#)). Les isoformes Δ Np73 sont plutôt associés à la survie des types de neurones discrets tels que les neurones de la zone préoptique, ainsi que les neurones voméronasaux, GnRH-positifs et Cajal-Retzius (CR) ([194](#)).

Au niveau des gonades, TAp73 est essentiel dans la régulation du programme transcriptionnel et dans l'adhésion cellulaire, que ce soit dans les spermatozoïdes ([193](#), [195](#)), que les ovocytes ([196](#)). L'isoforme Δ Np73 β peut être également exprimé à un niveau significatif dans certains tissus, notamment jusqu'à 20% dans la peau ([124](#), [197](#)).

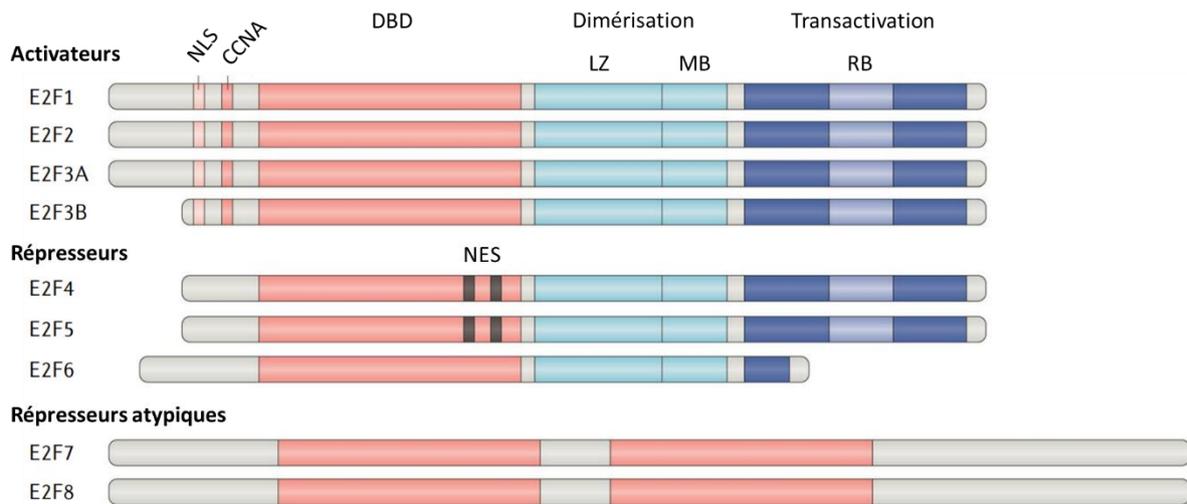


Figure 13. Famille des E2Fs. Représentation schématique des E2Fs activateurs (E2F1-3B), répresseurs (E2F4-6), ainsi que des répresseurs atypiques (E2F7-8). Les activateurs et répresseurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN (DBD), les domaines de dimérisation LZ et MB, ainsi qu'un domaine de transactivation, tandis que les répresseurs atypiques possèdent uniquement deux DBD en tandem. Les activateurs possèdent en plus une séquence de localisation nucléaire (NLS) et un domaine régulateur de cycline A (CCNA). Les E2F1-5 possèdent un motif de liaisons au RB. Enfin, E2F4-5 possèdent une séquence d'export nucléaire (NES). (adapté de Kent et Leone 2019) (204)

Chapitre III. La famille de E2F

Ce chapitre reprend les généralités sur la famille des E2F ainsi que leurs principaux partenaires, les protéines RB. Ces protéines sont d'importants régulateurs de la progression du cycle cellulaire. De ce fait, elles sont cruciales dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Notre étude a été focalisée sur le rôle de E2F4 qui a été identifié comme un partenaire de $\Delta Np73\alpha$.

1. Généralités sur la famille

La famille E2F est composée de huit facteurs de transcription, nommées E2F1-8. De plus, il existe deux isoformes pour E2F3, E2F3a et E2F3b, où le second est produit à partir d'un promoteur alternatif (198). Récemment, de nouvelles isoformes ont vu le jour, comme E2F3c et E2F3d qui résultent d'un épissage alternatif du transcrit d'E2F3a (199). Ces facteurs sont principalement connus pour la régulation des gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire. Dans la vision classique, les E2F1-3a sont considérés comme activateurs, E2F3b et E2F4-6 des répresseurs, et E2F7-8 des répresseurs atypiques.

Tous les E2F partagent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui reconnaît la séquence E2FRE de liaison à l'ADN avec le consensus TTTSSCGC, où S est soit un C ou un G. Des variations de ce consensus sont reconnues par certains E2F, comme l'E2F7 qui se lie au motif TTCCCGCC (200). Comme pour la famille de p53, il semblerait donc que les membres de la famille E2F soient capables de cibler des nombreux gènes en commun, mais aussi avoir des cibles spécifiques. Cette spécificité est liée aux variations de motifs au niveau de l'ADN mais également de partenaires et d'autres facteurs de transcription qui interagissent avec les E2F (201-203).

Comme pour d'autres facteurs de transcription, différents niveaux de régulation existent pour les E2F : transcriptionnel, traductionnel, par les MPT, mais également *via* des interactions avec des protéines partenaires. Seul ce dernier point sera développé dans ce chapitre.

2. Structure des membres de la famille

Pour tous les E2F, le DBD est localisé dans la région N-terminale (Figure 13). Les E2F activateurs (E2F1, E2F2, E2F3a et b) et les répresseurs (E2F4, E2F5, E2F6) canoniques possèdent également une région de dimérisation composée d'un domaine leucine zipper (LZ) et d'un domaine *marked box* (MB), qui sont essentiels à l'interaction avec les protéines partenaires

de dimérisation DP1-3. La région C-terminale des E2F1-3 et E2F4-5 héberge le domaine de transactivation (TAD) et la séquence d'interaction avec les protéines RB. Les E2F activateurs possèdent dans la région N-terminale qui précède le DBD une séquence de localisation nucléaire (NLS), suivi d'un domaine régulateur de cycline A (CCNA). En revanche, les E2F4-5 ont une séquence d'export nucléaire (NES) située au niveau du DBD. Enfin, les E2F atypiques (E2F7 et E2F8) possèdent deux DBD en tandem.

3. La régulation de l'activité des E2F

Les activateurs et les répresseurs E2F canoniques forment des hétérodimères avec les protéines DP1-3. Tandis que l'interaction avec DP1 et 2 augmente l'affinité de liaison à l'ADN des hétérodimères ([205](#), [206](#)), l'interaction avec DP3 empêche la reconnaissance au motif E2FRE consensus ([207](#)). Les fonctions des E2F sont principalement modulées par les protéines *pocket* de la famille RB : pRB, p107 et p130. Plus précisément, E2F1 à 3 forment des complexes fonctionnels avec pRb, alors que E2F4 et E2F5 peuvent s'associer avec chacun des trois membres ([208](#)). Les protéines RB sont capables de bloquer la fonction activatrice de la transcription des hétérodimères E2F-DP en se liant au domaine de transactivation localisé au niveau du C-terminus des E2F1-5. L'activité des E2F est donc intimement liée à la présence des RB. Les RBs affectent aussi les interactions avec d'autres partenaires des complexes E2F-DP. Ces partenaires sont principalement HDAC ([209-211](#)), ou des méthyltransférases, notamment la DNMT1 ([212](#)).

L'interaction RB-E2F est dépendante de l'état de phosphorylation des RB. En effet, l'interaction a lieu lorsque les RB sont hypophosphorylés, alors que les RB hyperphosphorylés se détachent des E2F, les libérant ainsi de l'action inhibitrice. L'état de phosphorylation des RB est modulé par les complexes cycline-CDK ; la dérégulation de l'axe cycline-CDK-RB-E2F est un élément récurrent dans l'oncogenèse. Ceci peut être à différents niveaux, que ce soit par la dérégulation de la phosphorylation des RB *via* l'inhibition ou l'activation des CDK, ou par l'atteinte même des gènes codant pour les RB *via* une mutation ou l'extinction épigénétique ([213](#)).

4. Les facteurs E2F dans le cycle cellulaire : généralités

Le cycle cellulaire est une succession d'évènements durant laquelle la cellule-mère duplique son génome afin d'obtenir deux cellules-filles. Ce cycle est divisé en quatre phases : G1, S, G2

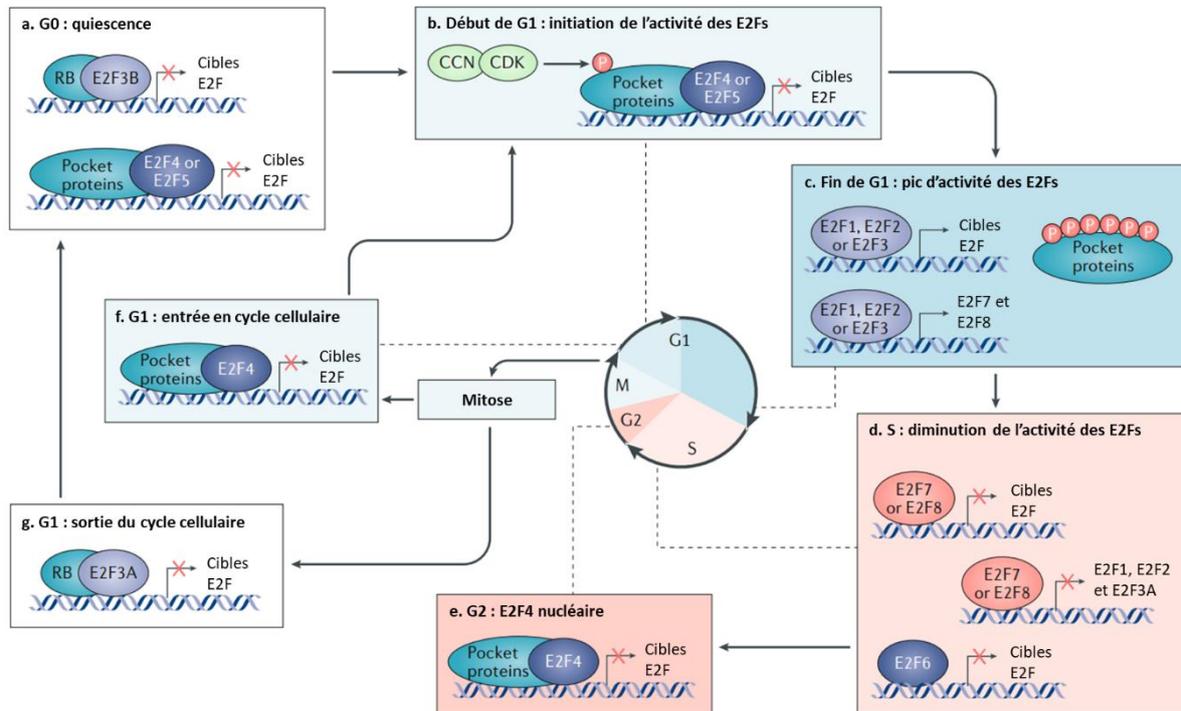


Figure 14. Les E2Fs dans le cycle cellulaire. Les cellules en quiescence (a) n'expriment pas les gènes régulés par les E2Fs activateurs dû à l'inhibition par les complexe E2F4-5/RBs hypophosphorylés et le complexe DREAM. En cas du déclenchement de la voie de signalisation de la croissance cellulaire, les cyclines s'associent avec les kinases CDK afin de phosphoryler les pocket proteins (b). Les RBs hyperphosphorylés se détachent des E2Fs répresseurs, permettant ainsi l'expression de gènes régulés par les E2Fs activateurs (c). Les E2F répresseurs interviennent principalement lors de la duplication de l'ADN en phase S (d). Le E2F répresseur E2F4 intervient également en phase G2 afin d'arrêter le cycle cellulaire de manière transitoire en cas de lésion à l'ADN (e). Après la mitose, la cellule peut entrer dans un nouveau cycle cellulaire (f) ou entrer à nouveau en quiescence (g). (adapté de Kent et Leone 2019) (204)

et M. Les cellules qui ne sont pas en cours de division sont à l'arrêt en phase G₀, c'est-à-dire en quiescence. La phase G₁ se définit par la synthèse d'ARN, protéines et membrane cellulaire, ce qui prépare la réplication de l'ADN. La phase S consiste en la synthèse de l'ADN. La phase G₂ est une phase transitoire de croissance avant l'entrée en phase M, qui est la division cellulaire à proprement parler. Ce mécanisme est hautement conservé chez les eucaryotes, avec comme principal régulateur les complexes kinases cyclines-CDK. Globalement, le cycle cellulaire peut se résumer en une séquence d'activation et désactivation des CDK. Avant chaque passage d'une phase à l'autre, un arrêt temporaire du cycle a lieu afin de réaliser un contrôle-qualité qui vérifie le bon déroulement de tous les points de la phase en cours. Ces arrêts temporaires portent le nom de *checkpoints* G₁, G₂ et M ([214](#), [215](#)). Les E2F activateurs, les répresseurs, et les répresseurs atypiques sont exprimés différemment au cours du cycle cellulaire (Figure 14).

Les activateurs sont exprimés au maximum durant la transition G₁-S, tandis que pour les répresseurs atypiques le maximum d'expression concorde avec la phase S. Enfin, les répresseurs canoniques sont exprimés constitutivement tout le long du cycle cellulaire ([204](#)). En G₁, la cellule reçoit un nombre de signaux extérieurs comme des facteurs mitogènes ou des inhibiteurs de croissance qui déterminent la poursuite ou non du cycle cellulaire ([216](#)). En fin de G₁, au G₁ checkpoint (aussi nommé point de restriction) la cellule décide du chemin à emprunter : si le nombre de facteurs mitogènes est insuffisant, le cycle est dirigé vers la phase G₀. Avec un nombre suffisant de facteurs mitogènes la machinerie du cycle cellulaire est enclenchée. A partir de là, la régulation se fait de manière intrinsèque ([214](#), [215](#)).

Les facteurs mitogènes de croissance induisent la synthèse des cyclines D (D₁, D₂ et D₃) qui sont capables de se lier et activer les kinases CDK 4/6 (Figure 15). Ces complexes cycline D-CDK4/6 phosphorylent pRb, ainsi que p107 et p130, ce qui favorise la dissociation des interactions RB-E2F ([217](#)). Les complexes E2F-DP peuvent alors se lier aux promoteurs et transcrire les gènes-cibles comme les cyclines A et E. La demi-vie des cyclines D est très courte (environ 30min), ce qui fait d'elles des initiateurs de la phosphorylation ; ensuite, l'état de phosphorylation est maintenu par les complexes cycline E-CDK2 et cycline A-CDK2, créant ainsi une boucle positive de phosphorylation des RB. Contrairement aux cyclines D, les cyclines A et E ne sont pas dépendantes des facteurs extracellulaires.

Le seuil du point de restriction est modulé par les inhibiteurs et régulateurs des complexes cycline-CDK (Figure 15). Les membres de la famille INK4, c'est-à-dire p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}

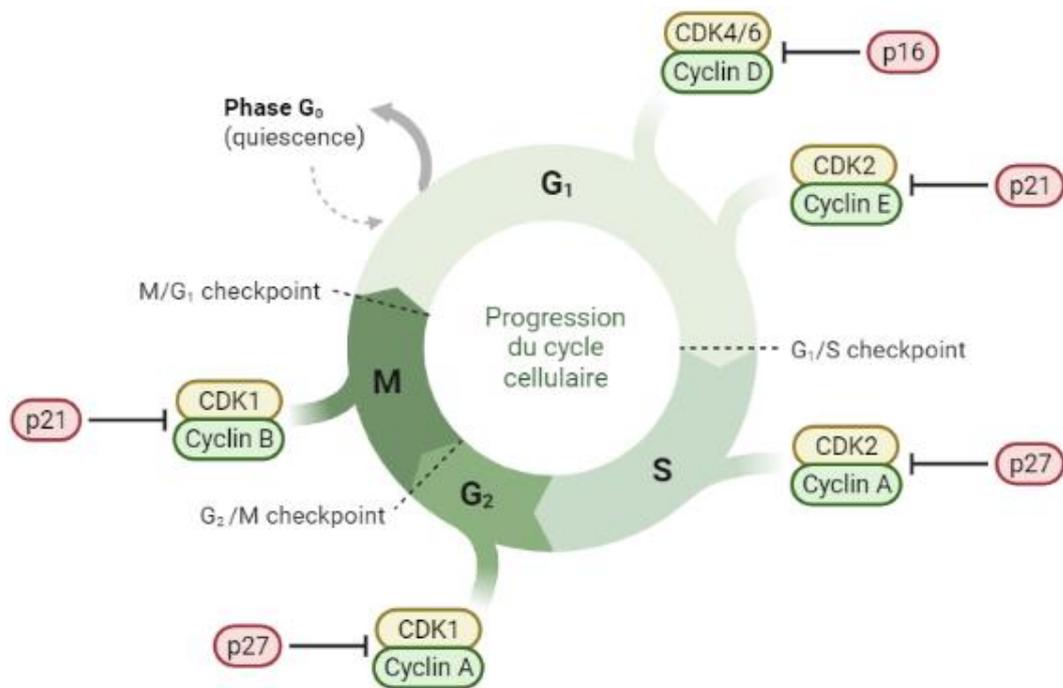


Figure 15. Schéma simplifié des oscillations des CDK-cyclines ainsi que des CDKI lors de la progression du cycle cellulaire. Les cyclines forment des complexes avec les CDK qui sont capables de phosphoryler les protéines RB. En G₁, Les inhibiteurs des CDK sont les protéines de la famille INK4 tel que p16 qui inhibe le complexe cycline D - CDK4/6. Le complexe cycline E - CDK2 est inhibé par p21, tandis que l'inhibiteur p27 agit sur le complexe cycline A - CDK2. Les complexes cyclines-CDK interviennent également en phase G₂ et M, étant régulés par les CDKI p21 et p27. (Schéma adapté et repris à partir de BioRender.com)

et p19^{INK4d}, inhibent la formation du complexe cycline D-CDK4/6 (218, 219). Ceci a pour effet de maintenir les niveaux de phosphorylation des RB bas et de bloquer la poursuite du cycle cellulaire. En revanche, p21^{CIP1/WAF1} et p27^{KIP1} sont des inhibiteurs des complexes cycline A/E-CDK2 d'une part et des régulateurs positifs des complexes cycline D-CDK4/6. En effet, en stimulant la formation du complexe cycline D-CDK4/6, p21^{CIP1/WAF1} et p27^{KIP1} empêchent leur propre interaction au complexe cycline E-CDK2, créant ainsi une boucle de rétroaction négative (220). De plus, une fois activé, le complexe cycline E-CDK2 phosphoryle p27^{KIP1} et stimule sa dégradation (220, 221). Cela permet au complexe cycline E-CDK2 d'être activé d'avantage, ce qui maintient les RB hyperphosphorylés et favorise la transition de la phase G1 vers la phase S (222).

L'arrêt du cycle cellulaire au G1-checkpoint permet la réparation des lésions de l'ADN. Les lésions activent les kinases ATR et ATM, qui eux-mêmes activent les kinases CHK1 et CHK2. Ces kinases phosphorylent p53 en la protégeant de la dégradation par MDM2. A son tour, p53 active la transcription de p21^{CIP1/WAF1}, conduisant ainsi à l'inhibition des cyclines A/E-CDK2 et à l'arrêt du cycle cellulaire. En cas de stress oncogénique, c'est p16^{INK4A} qui est transcrit afin de diminuer l'activité du complexe cycline D-CDK4/6.

Enfin, les E2F répresseurs atypiques interviennent au cours de la phase S afin d'atténuer la transcription de gènes régulés par les E2F (204).

5. E2F4 et son homologue E2F5

a. Rôle dans le cycle cellulaire et la régulation spatiotemporelle

E2F4 et E2F5 forment des complexes répressifs avec les protéines RB et jouent un rôle important au sein du cycle cellulaire. Sans aucun signal extérieur, la cellule reste en quiescence en G0. Durant cette phase, les gènes régulés par les E2F ne sont pas exprimés. Ceci est dû aux complexes RB/E2F4-5, qui sont liés aux promoteurs de ces gènes et inhibent leur expression. Avec p130 ou p107, E2F4 et E2F5 font partie du complexe répressif DREAM (Drosophila, RB, E2F and Myb) présent en G0. Ce complexe est hautement conservé au cours de l'évolution (223-225), comme il est essentiel au maintien de la quiescence. MuvB est le cœur du complexe. MuvB est formé des protéines LIN9, Lin37, LIN52, LIN54 et RBBP4. En phase S/G2, MuvB s'associe à B-Myb pour former un complexe activateur BMYM-MuvB (226, 227).

Une particularité des E2F répressifs est leur séquence d'export nucléaire (NES) (228) qui est masquée lors de l'interaction avec les RB. La dissociation des complexes RB-E2F favorise donc

l'export, d'E2F4 et 5 vers le cytoplasme ([229](#)), assurant un niveau supplémentaire de régulation qui est la régulation spatiotemporelle couplée au cycle cellulaire. Une étude récente a montré que E2F4, essentiellement présent en G0, s'accumule dans le noyau à deux reprises au cours du cycle cellulaire, une première fois en début de G1 puis de nouveau en S-G2 ([230](#)). Durant la première accumulation, E2F4 coopère avec E2F3a à l'inhibition de l'expression des gènes régulant le cycle cellulaire, afin de permettre la sortie du cycle pour démarrer la différenciation. La seconde accumulation en S-G2 n'est que temporaire et aidée par E2F8, afin d'empêcher l'entrée en mitose en cas de lésions présentes au niveau de l'ADN ([231](#)).

Cette fluctuation spatiotemporelle de E2F4 et E2F5 serait essentielle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Des variations considérables dans leur localisation ont été détectées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. En cas d'infection par un virus oncogène comme l'Epstein-Barr, E2F4 et E2F5 sont exportés dans le cytoplasme afin d'empêcher la quiescence ([232](#)). Les analyses sur des tissus du cancer du sein ont montré la présence d'E2F4 à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. E2F5, qui paraît être moins exprimée, est présent dans le noyau uniquement en phase G0 ([233](#)). Une corrélation a été établie entre les niveaux élevés d'E2F4 dans le noyau et le stade avancé de la carcinogenèse du sein. Ainsi, E2F4 pourrait avoir une fonction nucléaire pro-oncogène dans certaines situations ([234](#)).

b. Rôles non-canoniques

Des études récentes ont mis en évidence des rôles non-canoniques pour E2F4. Cette protéine est directement liée à la différenciation cellulaire ([228](#), [235](#), [236](#)) et porterait des fonctions pro-prolifératives. Ceci a été observée dans les cellules sanguines ([237](#)), dans l'épiderme en développement ([238](#)), ainsi que dans les cancers de la prostate ou du sein ([234](#), [239](#)). Dans le cas des tumeurs, E2F4 agit d'une part comme un activateur de la transcription ([240](#)) et d'autre part comme répresseur des gènes pro-apoptotiques. Dans les cellules cancéreuses qui échappent au checkpoint G1, le complexe E2F4-p130 est surexprimé pour inhiber la répression des gènes G2/M. Ce complexe peut également inhiber dans certaines tumeurs l'expression des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN ([228](#)).

Les études sur des souris ont montré qu'E2F4 peut être présent dans des cellules en cours de progression du cycle cellulaire, notamment dans le développement cardiaque ([241](#)) ou

intestinal (242). Hsu *et al.* ont montré que, dans les cellules souches murines, E2F4 est également un régulateur positif de la transition G1/S malgré l'état hyperphosphorylé des RB (243). Les données d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de séquençage de l'ARN (RNAseq) dans différentes conditions de knockdown des différentes protéines RB ainsi que d'E2F4 suggèrent qu'E2F4 est capable non seulement de réprimer, mais également d'activer la transcription et ce de manière RB-indépendante. Le modèle proposé soutient qu'E2F4 recrute des composants de complexes des acétyltransférases d'histones (243).

E2F4 paraît aussi jouer un rôle dans le cytoplasme afin de promouvoir la multiciliogenèse. Dans ce processus, E2F4 servirait en tant que centre organisationnel essentiel au recrutement des régulateurs précoces de la biogenèse des centrioles. Ceci suggère que l'exportation d'E2F4 vers le cytoplasme n'est pas uniquement liée à un mécanisme de contrôle de la transcription, mais également à des rôles non canoniques dans des types cellulaires particuliers, comme les cellules multiciliées (244, 245). Plus récemment, E2F4 a été associé avec le développement des microvili de l'épithélium des intestins chez les poissons-zèbres (246).

c. E2F4 et les RB dans la sénescence

Bien qu'initialement la sénescence a été reliée exclusivement au vieillissement avec l'âge, il est clair maintenant que le processus peut être induit par de multiples facteurs, comme les oncogènes, l'expositions aux radiations ou aux composés chimiques (247, 248). Ceci peut dès lors activer différentes voies réactionnelles en fonction de l'agent inducteur. Récemment E2F4 a été identifié comme un des facteurs phénotypiques exprimés en cas de sénescence répllicative. Dans les fibroblastes murins, l'expression de E2F4 diminuerait après chaque passage des cellules. Les études intégratives d'RNAseq et ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing*) ont montré qu'E2F4 est capable de réguler la progression du cycle cellulaire durant le processus de sénescence. L'expression d'E2F4 augmente la capacité proliférative de la cellule et atténue l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence répllicative. Cependant, cet effet serait dose-dépendant car la prolifération est inhibée en cas de forte surexpression. En revanche, le knockdown d'E2F4 dans les cellules en prolifération induirait la sénescence (249).

Il semblerait aussi que les protéines RB possèdent des fonctions autres que celles de séquestration des E2F. Au départ, les études se sont focalisées sur pRb qui est capable d'empêcher la transition de la phase G1 vers la phase S en réprimant les promoteurs des

cyclines E et cyclines A ([250](#)). Néanmoins, Narita *et al.* ont montré que le knockdown de pRb n'est pas suffisant pour empêcher la sénescence ([116](#)). D'autres études ont montré que p130 s'accumule dans différentes lignées cellulaires en sénescence, alors que les niveaux de pRb et p107 sont bas. De plus, la transcription de p21^{CIP1/WAF1} dépendante de p53 est un facteur essentiel à l'accumulation de p130 hypophosphorylé. Sur la base de ces résultats Helmbold *et al.* ont conclu que l'accumulation de p130 hypophosphorylé constitue une réponse aux lésions à l'ADN activant la voie p53- p21^{CIP1/WAF1} ([118](#), [251](#)). De plus, les études de Alessio *et al.* ont montré que le knockdown de pRb dans ces cellules déclenche la voie p53 et facilite la stabilisation de p130 hypophosphorylé, qui est l'évènement décisif et irréversible de la sortie du cycle cellulaire et du déclenchement du programme de sénescence ([252](#)).

D'autre part, il semblerait que le complexe DREAM peut également jouer un rôle dans la sénescence. Le mécanisme exact de l'implication du complexe DREAM n'est pas encore établi. Cependant, il a été montré que la kinase DYRK1A participe dans ce processus. Celle-ci phosphoryle LIN52 au niveau de la sérine28, étape indispensable à l'association de p130 au complexe. Cette phosphorylation est également essentielle à l'interaction p130/E2F4 et de l'ensemble des sous-unités du complexe DREAM. L'inhibition de DYRK1A empêche l'arrêt en G0 et empêche l'entrée en sénescence induit par le facteur oncogénique RAS dans les fibroblastes BJ diploïdes humain immortalisés par la surexpression de TERT ([253](#), [254](#)). Cependant, le knockdown de pRb seul ne contourne que partiellement la sénescence induite par RAS dans les fibroblastes IMR90 humains ([255](#)). Sadasivam et DeCaprio proposent un modèle où les voies des RBs et du complexe DREAM apportent des fonctions différentes dans le processus de sénescence, potentiellement divergeant selon la lignée cellulaire ([226](#)).

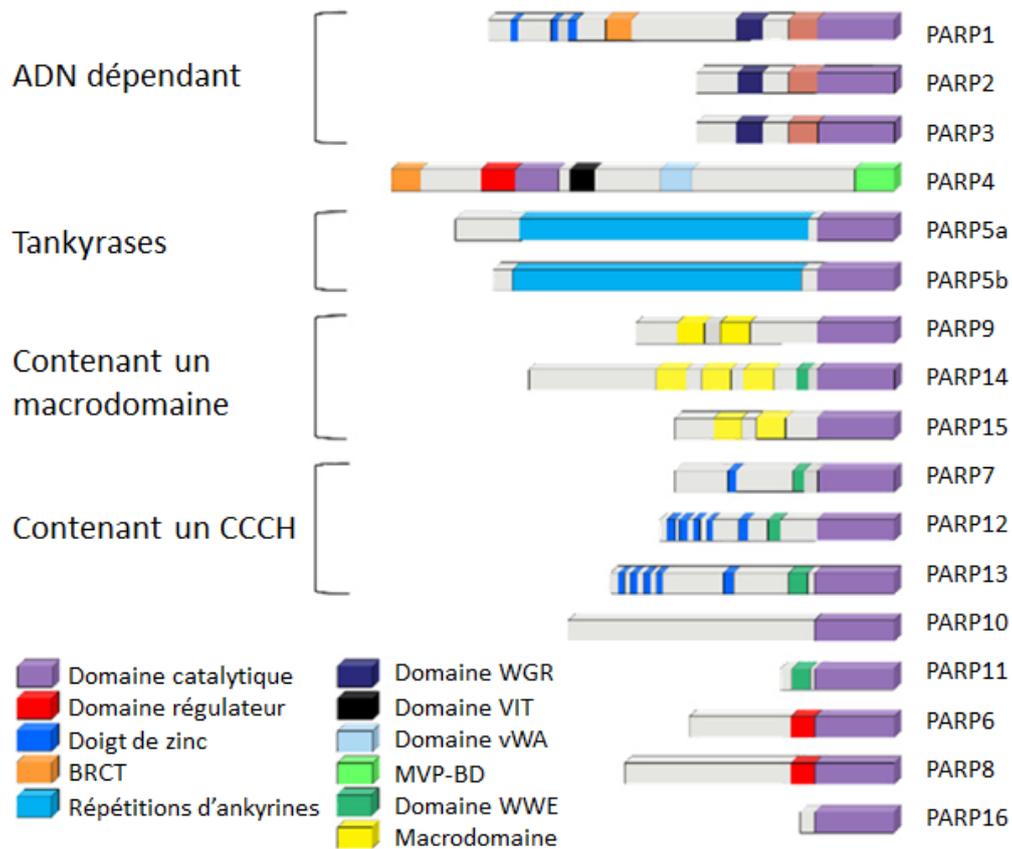


Figure 16. La Famille des protéines PARP. La famille PARP comporte 17 membres qui possèdent tous en commun un domaine catalytique capable de catalyser une réaction d'ADPriboseylation. Les différentes PARP peuvent être regroupées selon les autres domaines présents. Les couleurs sur le schéma indiquent les domaines correspondants. (adapté de Ummarino 2021) (258)

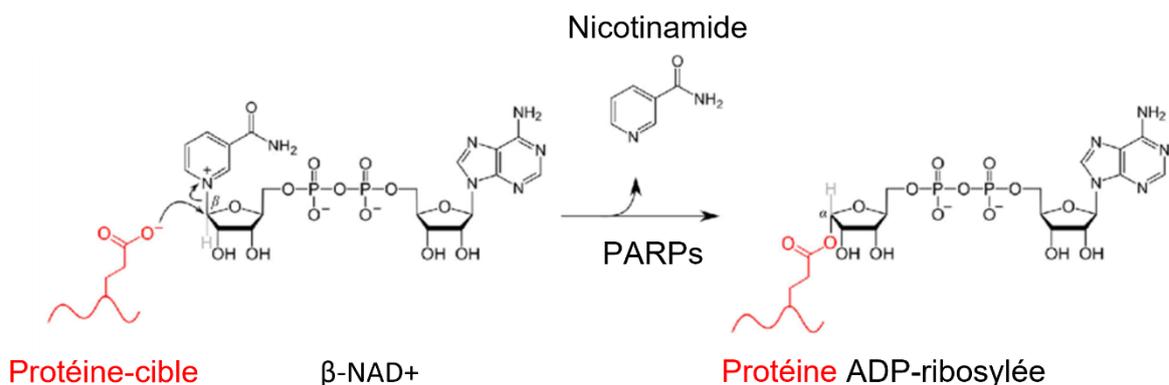


Figure 17. Schéma simplifié de la ADPriboseylation. L'ADP-ribosylation est une PTM où le NAD⁺ est utilisé comme substrat. En tant qu'exemple, le glutamate d'une protéine est représenté sur ce schéma comme résidu accepteur. (adapté de Suskiewicz et al. 2020) (259)

Chapitre IV. Les protéines PARPs

La famille des PARP est le dernier chapitre de l'introduction de ce manuscrit. Comme E2F4 PARP14 a été identifiée comme partenaire de $\Delta Np73\alpha$. Ici nous présentons un court résumé de l'état de l'art sur cette protéine.

1. Une famille hétérogène

Les membres de la famille poly(ADP-ribose) polymérase PARP, connus également sous le nom de ARTD ou pour certains membres protéines BAL, ont été décrits initialement comme des facteurs importants dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Le membre fondateur PARP1 a été décrit la première fois dans le contexte du cancer du sein présentant une mutation au niveau du gène *BRCA* (256). PARP1 est un important facteur de la réparation des cassures double-brin (DBS) de l'ADN. Les autres membres de la famille ont été identifiés par la suite par des analyses bio-informatiques basées sur la recherche du domaine catalytique ART (257). Dès lors, 17 membres de cette superfamille ont été identifiés (Figure 16).

Tous sont capables de catalyser le transfert d'un mono-ADP-ribose vers les protéines-cibles en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) comme substrat (Figure 17). L'ADPriboseylation est, comme la phosphorylation, une MPT capable de moduler l'activité ou la capacité d'interaction de la protéine modifiée.

Tous les membres de la famille PARP possèdent le domaine catalytique ART qui est très conservé au niveau du site actif. Le résidu catalytique E988 de PARP1 semble être le plus crucial, étant le résidu le plus conservé parmi les PARP1 de différentes espèces. Ce résidu est également présent chez les PARP2 ,3, 4, 5a, 5b, 5c, 11, 12 et 14. Dans d'autres PARP ce résidu catalytique semble être présent à une position différente, alors que dans PARP14 ce glutamate est remplacé par une aspartate. En revanche, PARP7, 9, 10, 13 et 16 ne présentent ni glutamate ni aspartate conservé au niveau du site actif, ce qui pourrait avoir un impact sur l'activité catalytique (257).

La famille des protéines PARP reste très hétérogène. D'une part, les PARP peuvent être divisées selon leurs propriétés enzymatiques, c'est-à-dire la capacité de catalyser la Mono-ADP-riboseylation (aussi appelée MARYlation) ou la Poly-ADP-riboseylation (aussi appelée PARylation). D'autre part, elles peuvent être regroupées par la présence de domaines



Figure 18. Représentation schématique des domaines de PARP14. PARP14 possède deux domaines RRM (en vert) qui reconnaissent l'ARN, trois macrodomaines capables d'interagir avec les MAR de protéines-cibles (en bleu) et un domaine WWE (en jaune) d'interaction protéine-protéine. Le domaine catalytique, ART (en orange), se trouve en C-terminus.

supplémentaires, tels que les domaines de liaison au zinc, SAP, Ankyrin, BRCT, WWE, macro et SAM, qui leur donne chacun des propriétés distinctes ([257](#)) (Figure 16).

a. PARP14

La poly(ADP-ribose) polymérase 14 PARP14 (connue également sous le nom de BAL2, ARTD8 et CoaST6) catalyse le transfert de MARYlation. PARP14 possède trois macrodomaines, un domaine WWE et un domaine catalytique en C-terminus ([260](#)) (Figure 18). Alors que le domaine catalytique catalyse la MARYlation, le macrodomaine 2 de PARP14 est capable de reconnaître les modifications MAR. Les macrodomaines se retrouvent principalement chez les variants d'histones macroH2A. Le domaine WWE présent dans la région C-terminale de PARP14 est un domaine d'interaction protéine-protéine stabilisant l'interaction avec la protéine modifiée. Il a été aussi démontré que PARP14 est capable de modifier d'autres membres de la famille PARP ([261](#), [262](#)).

Initialement PARP14 a été décrite comme membre de la famille BAL (*B-aggressive lymphoma*). Puisque les membres de cette famille possèdent un macrodomaine similaire à ceux des histones macroH2A, il a été suggéré qu'ils seraient capables de réprimer l'expression de gènes par interaction avec des facteurs de transcription ou directement avec l'ADN ([263](#)). Par la suite, PARP14 a été identifiée comme co-facteur de Stat6, favorisant l'expression de l'interleukine 4 (IL-4) induite par Stat6 ([264](#), [265](#)). Depuis, il a été montré que PARP14 peut agir à la fois positivement et négativement sur l'expression génique régulée par Stat6 dans les cellules B et T ([266](#), [267](#)). En absence de stimulus, PARP14 recrute les enzymes HDAC 2 et 3 aux promoteurs régulés par IL-4, conduisant ainsi à la répression de la transcription. En revanche, en présence de l'IL-4, PARP14 facilite l'interaction de Stat6 au promoteur, en favorisant la dissociation des HDACs et la décondensation de la chromatine.

Dans le carcinome hépatocellulaire, PARP14 favorise la glycolyse anaérobie (effet Warburg), qui est essentielle à la croissance et à la survie des tumeurs, diminuant ainsi la sensibilité à la chimiothérapie ([268](#)). PARP14 est décrit aussi comme régulateur du métabolisme des cellules B en présence de l'oncogène Myc ([269](#)). PARP14 est surexprimée dans les cellules cancéreuses pancréatiques résistantes à la gemcitabine en activant la voie NF- κ B. Dans ces cellules, le knockout de PARP14 inhibe la prolifération cellulaire et augmente la sensibilité à la chimiothérapie ([270](#)). Dans plusieurs métaanalyses, PARP14 apparaît comme facteur pivot impliqué dans les cancers du poumon ([271](#)) ou dans des cancers pédiatriques ([272](#)). PARP14

est activement impliquée dans la réparation des DSB par recombinaison homologue et empêche la mort cellulaire induite par le cisplatine, en réparant les DSB résultant de la chimiothérapie génotoxique (273). Dans les cellules du myélome, PARP14 constitue un signal de pro-survie en se liant et inhibant JNK1 (274). Enfin, il a été démontré que PARP14 est impliquée dans la composition des adhésions focales (275).

PARP14 est également étudiée dans les réseaux d'inflammation. Par sa fonction de coactivateur de Stat6, elle promeut le développement de la sous-population de cellules Th9 (276), ainsi que la différenciation des Th2 en permettant l'expression des cytokines IL-4 mais aussi IL-5 et IL-13 (266). Dans cette dernière étude, des souris déficientes en PARP14 présentent une réponse atténuée face aux allergènes dans le cas de maladies des voies respiratoires. Ainsi, PARP14 est proposée comme nouvelle cible thérapeutique de traitement contre l'asthme (277).

En revanche, lors de l'activation des macrophages, PARP14 constitue une réponse anti-inflammatoire dans la voie IFN- γ (278, 279). Dans les macrophages murins, PARP14 contrôle la réponse à l'interféron en régulant l'expression de gènes antiviraux IRF3-dépendants et en permettant l'accumulation de protéines spécifiques ISG dans le noyau. Durant cette même étude, Caprara et al. ont montré qu'en absence de PARP14 dans les macrophages, l'expression de gènes IRF3-dépendants est diminuée même en cas d'infection par *Salmonella typhimurium*, soulignant son implication dans le contrôle de la réplication des pathogènes (280). Il est intéressant de noter que certains virus à ARN simple brin (Chikungunya ou le virus de l'hépatite E) sont capable d'hydrolyser les substrats MARYlés par PARP10, 14 et 15 *via* leurs macrodomaines viraux (281). Sur la base de ces résultats, Eckeï *et al.* ont suggéré que la MARYlation serait une MPT directement impliquée dans la défense virale (281). Plus récemment, PARP14 a attiré l'intérêt des chercheurs dans le contexte de la pandémie de COVID-19. En effet, les coronavirus possèdent également des macrodomaines viraux. Le macrodomaine de SARS-CoV-2 présente 32% d'homologie structurale avec les macrodomaines de PARP14 (282). Ainsi, les premières publications sur SARS-CoV-2 ont supposé que PARP14 pourrait potentiellement avoir un rôle lors de la « tempête » des cytokines qui correspond à une sécrétion massive de différentes cytokines (283). L'intensité de cette « tempête » est directement corrélée à la mortalité. Cependant, il manque toujours suffisamment de données expérimentales pour soutenir cette hypothèse (284).

PARTIE 2. MATERIEL et METHODES

Matériel et méthodes

Dans cette section sont présentés les généralités sur les méthodes et sur le matériel utilisé. Les protocoles détaillés de chacune des techniques sont décrits dans la partie Annexe.

1. Culture cellulaire (Annexe 1)

Toutes les cellules utilisées durant cette thèse sont des cellules adhérentes qui poussaient dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Notre système modèle sont les kératinocytes du prépuce humain immortalisés après rétrotransduction de plasmides codant pour les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV38 (38HK). Cette lignée a été décrite dans Caldeira 2003 (59). Les kératinocytes sont cultivés dans un milieu nommé FAD en co-culture avec des fibroblastes murins NIH 3T3. Les fibroblastes seuls sont mis en culture en parallèle afin de garantir un stock de nouveau fibroblastes qui sont ajoutés aux kératinocytes à chaque passage. Les fibroblastes sont cultivés dans un milieu DMEM contenant du FBS à 10% et des antibiotiques à 1%. Concernant les kératinocytes primaires (HPK), ces cellules sont cultivées dans un milieu complet commercial ne nécessitant pas de fibroblastes. Les lignées cancéreuses HNC-136 et CAL-51 sont cultivées dans le même milieu que les fibroblastes.

2. Déplétion de protéines (Annexe 2)

Plusieurs approches ont été utilisées afin de diminuer le taux des protéines ciblées. Toutes sont basées sur des transfections transitoires utilisant des agents formant des liposomes tel que la Lipofectamine (Invitrogen) ou TransIT-Keratinocytes (Mirus) suivant des protocoles optimisés et décrits dans Annexe.

La première approche expérimentale est la transfection des siRNA qui sont de petits ARN interférants double brin. Une fois introduit dans la cellule, le complexe RISC clive l'ARN double brin libérant ainsi une séquence nucléotidique capable de s'hybrider par complémentarité avec l'ARNm de notre cible. Cette approche a été utilisée pour la déplétion des protéines E2F4, E2F5 et PARP14. Nous avons utilisé des siRNA commerciaux ON-TARGETplus (Dharmacon) sous forme de SMARTpool qui est un mélange de quatre siRNA différents, garantissant un minimum d'effet *OFF-target*.

La deuxième approche expérimentale est l'utilisation de plasmides codant pour des shRNA. Dans ce cas nous effectués des transfections transitoires de plasmides. Ceux-ci contiennent une séquence nucléotidique qui, après expression du vecteur, est capable de cibler l'ARNm correspondant, menant à la dégradation de ce dernier. Les plasmides shRNA ont été construits à partir d'un clonage d'oligonucléotides dans un vecteur pLKO.1 dans le laboratoire de Massimo Tommasino.

Enfin, nous avons utilisé des oligonucléotides simple brin afin de dépléter la protéine $\Delta Np73\alpha$ selon la méthode publiée dans Zaika 2002 ([179](#)). Ces oligonucléotides ciblent l'exon 5' spécifique de $\Delta Np73\alpha$. Cette stratégie a été mise au point afin de cibler uniquement notre isoforme $\Delta Np73\alpha$ et non la protéine TAp73.

3. Extraction des protéines (Annexe 3)

Dans ce travail de thèse j'ai utilisé plusieurs protocoles permettant l'extraction de protéines

La première méthode consiste en une utilisation d'un tampon de lyse hypertonique qui permet une extraction totale de l'ensemble de protéines cellulaires. Dans le cas où il était nécessaire de récupérer les protéines ainsi que l'ARN depuis les mêmes cellules, nous avons utilisé le kit d'extraction *protein/RNA* commercial qui permet d'obtenir l'extrait total des protéines ainsi que l'ARN correspondant des mêmes cellules.

Une deuxième méthode permet d'obtenir des extraits solubles de protéines des différents compartiments cellulaires dans des conditions compatibles avec les expériences de co-immunoprécipitation. Dans un premier temps, Valerio Taverniti a optimisé un protocole qui permet l'extraction des protéines du cytoplasme et de la fraction soluble du noyau. La première étape de ce protocole consiste à incuber les cellules avec un tampon hypotonique et ensuite à effectuer une lyse mécanique par passage répétitive dans des aiguilles de seringue. Après centrifugation, le surnageant contient les protéines cytoplasmiques, tandis que les membranes et les organelles intactes, comme les noyaux et les mitochondries, se retrouvent dans le culot. Dans la deuxième étape du protocole, ce culot est resuspendu dans un tampon contenant du sel et du détergent et passé dans des aiguilles de seringue afin d'effectuer une lyse mécanique. Ces extraits nucléaires sont ensuite clarifiés par centrifugation.

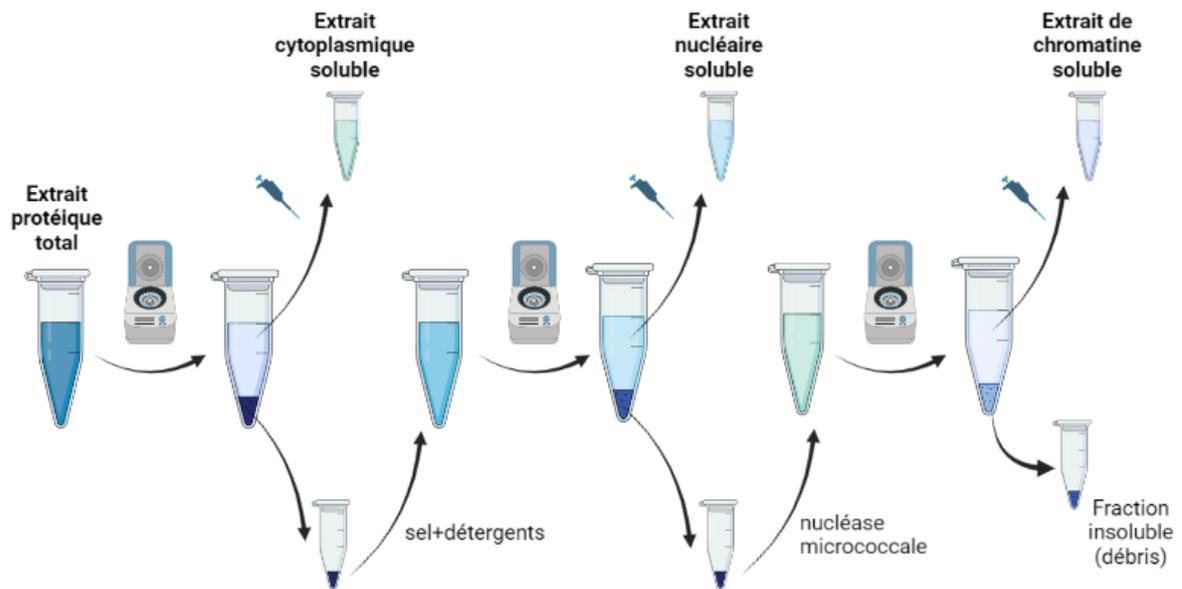


Figure 19. Subextractions des protéines solubles. Les extraits solubles cytoplasmiques, nucléaires et de chromatine sont récupérés suivant des étapes successives de collecte de surnageant après centrifugation. Les cellules sont lysées avec un tampon de lyse donnant lieu à l'extrait protéique total. La centrifugation de celui-ci permet de récupérer les protéines cytoplasmiques solubles dans le surnageant. Le culot est resuspendu dans un deuxième tampon de lyse qui contient une concentration plus élevée en sel et détergents. La seconde centrifugation permet de récupérer un 2^e surnageant qui correspond à l'extrait nucléaire soluble. Enfin, le culot est resuspendu dans un tampon contenant une nucléase micrococcale. La dernière centrifugation permet de récupérer les protéines solubilisées après traitement de la chromatine. (Schéma réalisé sur BioRender.com)

Dans un deuxième temps, j'ai modifié ce protocole afin de pouvoir récupérer les protéines associées à la chromatine. En effet, le défi ici a été de solubiliser ces protéines tout en préservant des conditions non dénaturantes pour permettre d'effectuer des co-immunoprecipitations. Dans ce protocole (Figure 19), la première étape de lyse cellulaire est identique à celle du protocole mis au point par Valerio Taverniti et décrit ci-dessus. En revanche, j'ai modifié les conditions de la deuxième étape, afin de rendre la lyse des noyaux plus douce. Plus précisément, les noyaux sont incubés dans un tampon contenant du sel et du détergent uniquement, sans effectuer la lyse mécanique par passage dans l'aiguille. Ensuite, par une étape de centrifugation, la fraction soluble des noyaux (ou extraits nucléaires soluble – surnageant) est séparée de la chromatine (culot). Une troisième étape a été rajoutée qui consiste à resuspendre le culot contenant la chromatine dans un tampon en présence de la nucléase micrococcale afin de fragmenter l'ADN, libérant ainsi les protéines liées.

4. Gradient de sucrose/co-IP (Annexe 4A et 4B)

Le gradient de sucrose est une technique de séparation de complexes dans des conditions natives en fonction de leur poids moléculaire. Les extraits protéiques natifs sont soumis à une ultracentrifugation dans un gradient de saccharose dont la densité varie de 10% à 50%, dans des conditions où les complexes natifs ne seront pas compromis. Après celle-ci les fractions sont collectées pour procéder aux l'expériences de co-IP. Chaque fraction a été incubée avec les anticorps dirigés contre l'antigène qu'on veut cibler. Nous avons utilisé soit des anticorps déjà conjugués aux billes d'agarose, soit nous avons procédé avec une étape de couplage d'anticorps sur des billes de sepharose liées aux protéines A ou G. Après Co-IP, les protéines ont été récupérées par dénaturation à 95°C dans le tampon Laemmli.

5. RT-qPCR (Annexe 5)

Pour l'extraction de l'ARN cellulaire, nous avons utilisé un kit d'extraction qui permettait d'obtenir à la fois les protéines et l'ARN correspondant des mêmes cellules. L'ARN a été ensuite utilisé pour synthétiser l'ADNc qui est nécessaire aux expériences de RT-qPCR. La RT-qPCR a permis de mesurer le taux d'ARNm initial de chaque protéine, en utilisant des primers spécifiques pour chaque transcrit correspondant aux protéines étudiées. Le SYBRGreen a été utilisé comme fluorophore. Le calcul du taux d'ARNm relatif entre les conditions expérimentales et le contrôle a été effectué selon la méthode $\Delta\Delta C_t$ qui utilise un gène

« housekeeping », à savoir un gène qui doit être exprimé de façon stable entre les différentes conditions expérimentales. Dans notre cas, nous avons utilisé la GAPDH.

6. Immunofluorescence (Annexe 6)

L'immunofluorescence (IF) a été utilisée comme une des méthodes de détection de sénescence. Nous avons adapté le protocole d'IF afin de garder les mêmes conditions de déplétion décrites ci-dessus. En effet, l'ensemble de nos IF a été réalisé à partir de cellules collectées qui ont été transfectées avec des siRNA/shRNA/oligonucléotides décrits ci-dessus. Une partie des cellules collectées a été déposée sur lame de microscope traitée à la poly-lysine, tandis que le reste de cellules a été traité avec le kit d'extraction de protéines/RNA cité précédemment. Les cellules ont été ensuite incubées avec l'anticorps dirigé contre la lysine 9 méthylée de l'histone 3 (H3K9me3), puis nous avons utilisé une solution de montage contenant du DAPI.

PARTIE 3. OBJECTIFS

Objectifs et Etat de l'art

Mon projet de thèse est une continuation du travail entamé durant la collaboration entre les deux laboratoires de recherches dirigés par mes co-directeurs de thèse, Massimo Tommasino et Katia Zanier. Plus précisément, l'objectif de cette thèse doctorale est la caractérisation des réseaux d'interaction protéine-protéine formés par $\Delta Np73\alpha$, afin d'établir un lien avec ses propriétés oncogéniques. En effet, une forte expression de l'isoforme $\Delta Np73\alpha$ est notoirement associée à diverses tumeurs malignes humaines caractérisées par un mauvais pronostic, notamment le cancer du sein, de la prostate ou du foie. Cette isoforme est également accumulée lors de l'infection par des virus oncogènes tels que le virus d'Epstein-Barr (EBV), ainsi que par les HPV du groupe β qui semblent être impliqués dans la carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes.

Souhaitant approfondir le rôle de $\Delta Np73\alpha$ dans l'oncogénèse l'équipe de Massimo Tommasino (CIRC-OMS, Lyon) a développé dans un premier temps un modèle cellulaire dans des kératinocytes primaires. Ces cellules ont été transduites par les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV38, ce qui a induit leur immortalisation et permis d'obtenir une lignée de kératinocytes transformés nommés 38HK. Des études réalisées par la suite au sein de l'équipe de Tommasino ont montré que ces cellules présentent une accumulation de l'isoforme $\Delta Np73\alpha$. Dès lors ces cellules ont été utilisées comme modèle d'étude pour caractériser les propriétés fonctionnelles de $\Delta Np73\alpha$. Par ailleurs, Accardi et al. ont montré que $\Delta Np73\alpha$ est stabilisé par la kinase IKK β et se lie aux régions promotrices de gènes régulés par p53, conférant des fonction anti-apoptotiques ([71](#)).

Toutefois, peu d'études existent sur les partenaires protéiques de $\Delta Np73\alpha$.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail a été l'étude de potentiels partenaires protéiques de $\Delta Np73\alpha$ pour la formation de complexes répressifs agissant en tant que modulateurs dominant négatifs des gènes cibles de p53.

En effet, des analyses protéomiques à partir d'extraits des 38HK ont été réalisées en amont de mon travail de thèse afin d'identifier ces nouveaux partenaires de liaison à $\Delta Np73\alpha$. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé PARP14, E2F4 et p130 comme partenaires

potentiels de $\Delta Np73\alpha$. Dès lors, j'ai entrepris une étude systématique d'analyse et de caractérisation de ces nouveaux partenaires potentiels.

Dans un premier temps nous avons commencé par la validation des interactions de $\Delta Np73\alpha$ avec les nouveaux partenaires identifiés par des méthodes de co-immunoprécipitation de protéines endogènes. Ces données ont été approfondies par des approches biochimiques qui ont permis de caractériser l'interaction de E2F4 avec $\Delta Np73\alpha$.

La deuxième partie de l'étude est consacrée aux études fonctionnelles de ce nouveau complexe. Des études par RNAseq, CHIP et des analyses fonctionnelles de sénescence, ont permis la caractérisation du rôle de ce nouveau complexe dans les cellules 38HK. Afin de consolider nos observations sur les 38HK nous avons élargi notre étude aux cellules cancéreuses CAL-51 (cancer du sein) et HNC-136 (cancer de la tête et du cou) qui présentent également une surexpression de l'isoforme $\Delta Np73\alpha$.

Dans une dernière partie de mon travail j'ai entrepris une série de travaux préliminaires pour la caractérisation de l'interaction de $\Delta Np73\alpha$ et PARP14. Nous décrivons dans ce manuscrit les premiers résultats obtenus lors de ces études et émettons de nouvelles hypothèses qui seront décrites dans les perspectives de ce projet.

PARTIE 4. RESULTATS

Chapitre V. Identification d'un nouveau complexe Δ Np73 α -E2F4/p130

Dans ce chapitre, je présente les résultats portant sur l'identification et la caractérisation d'un nouveau complexe répresseur de la transcription formés par Δ Np73 α et E2F4/p130. Ce complexe, décrit dans Taverniti/Krynska et al. *mSphere* 2023 ([285](#)) et fourni en annexe 8, agit sur la régulation de l'expression des gènes dans les kératinocytes transformés par les oncoprotéines E6 et E7 des HPV38 (38HK). La présence de ce complexe a également été validée dans les cellules cancéreuses HPV-négatives qui surexpriment Δ Np73 α .

Ce projet a débuté par des études biochimiques réalisées par Valerio Taverniti au sein de l'équipe dirigée par Massimo Tommasino. La première étape a consisté à identifier les partenaires protéiques de Δ Np73 α par des analyses de protéomique. Les cellules 38HK ont été transduites avec un plasmide Δ Np73 α fusionné à une double étiquette ProtA-CBP en C-terminus. Les complexes natifs formés par Δ Np73 α ont été purifiés par la méthode TAP (*tandem affinity purification*) à partir des extraits nucléaires. Les analyses bio-informatiques ont montré un enrichissement en facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Parmi ces facteurs, nous avons retrouvé E2F4 et son co-répresseur p130. Par la suite, cette interaction a été validée par différentes approches, telles que des expériences de gradient de saccharose suivies de co-immunoprécipitation. En outre, les études de déplétion suivies par la co-immunoprécipitation ont montré qu'en absence de E2F4, E2F5 peut se substituer à son homologue permettant le maintien du complexe Δ Np73 α -E2F4-5/p130 complet. Afin de supprimer la formation de ce complexe, il est nécessaire de co-dépléter E2F4 et E2F5.

Dans la deuxième étape, l'équipe de Katia Zanier a réalisé des études biochimiques afin d'évaluer les régions minimales d'interactions directe entre E2F4 et Δ Np73 α . En somme, nous avons cartographié les régions/domaines des deux protéines impliquées dans cette interaction à l'aide de constructions de délétion des deux protéines. Pour cela, nous avons employé la méthode GPCA (*Gaussia princeps protein complementation assay*) où les constructions sont fusionnées à l'un des deux fragments de la luciférase de la *Gaussia princeps*, soit Gluc1 soit Gluc2 ([286](#)) L'interaction des deux constructions permet de reformer une luciférase fonctionnelle. Les résultats indiquent qu'E2F4 est capable de distinguer entre TAp73 et Δ Np73 α . De plus, la région N-terminale de Δ Np73 α (résidus 1-73) semble être

impliquée dans l'interaction. Concernant E2F4, l'interaction semble nécessiter la présence du domaine DP-dimérisation et la région C-terminale désordonnée.

Il a déjà été montré précédemment que dans le modèle cellulaire 38HK l'isoforme $\Delta Np73\alpha$ est surexprimée, tandis que la protéine TAp73 est indétectable (70). De ce fait, j'ai évalué l'expression des différents composants du complexe identifié dans deux lignées cellulaires de kératinocytes primaires (HPK) et deux lignées de cellules transformées 38HK à des passages précoces et tardifs après transformations. Conformément aux résultats antérieurs, l'expression de $\Delta Np73\alpha$ est plus élevée dans les lignées 38HK transformées par rapport aux HPK. Bien que le niveau d'E2F4 semble être similaire entre les différentes lignées cellulaires, les niveaux de p130 sont plus élevés dans les 38HK. Ceci est dû principalement à une augmentation de la transcription du gène codant pour p130, car la protéine E7 de l'HPV38 semble cibler p130 à la dégradation tout comme E7 des HPV α à haut risque (i.e. HPV16). D'autre part, nous avons constaté que E7 des HPV β montre une affinité plus faible pour les protéines RB par rapport aux protéines E7 des HPV α .

Nous avons poursuivi cette étude par des analyses fonctionnelles. E2F4 est connue pour former un complexe inhibiteur des gènes E2F en s'associant avec les protéines RB. De même, $\Delta Np73\alpha$ est un inhibiteur dominant négatif par sa structure dépourvue d'un domaine transactivateur. De ce fait, nous avons procédé à l'identification des gènes régulés par le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 dans les 38HK par une approche en trois étapes. Premièrement, nous avons réalisé des analyses d'RNAseq en conditions de déplétion de E2F4-5 *versus* contrôle, ce qui nous a permis d'identifier 2802 gènes réprimés par les deux facteurs de transcription homologues. Deuxièmement, nous avons validé un ensemble de 15 gènes par RT-qPCR. Dans la troisième étape, enfin, nous avons vérifié l'expression de ces gènes dans les 38HK en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ *versus* contrôle. Parmi ceux-ci, 8 gènes (STC1, MAFB, PRR15L, RIC3, GAD1, CDKN1B/p27^{Kip1}, CDKN2B/p15^{INK4b} et CDKN2D/p19^{INK4d}) présentent des niveaux d'ARNm significativement plus élevés en condition de déplétion d'E2F4-5 ou de $\Delta Np73\alpha$ (Figure 5 de Taverniti/Krynska *et al.* 2023). D'autre part, l'expression de ces 8 gènes n'est pas affectée par la déplétion des facteurs E2F4-5 dans les HPK. Ces résultats indiquent que $\Delta Np73\alpha$ et E2F4/p130 coopèrent afin d'inhiber l'expression de gènes spécifiques et ce mécanisme est spécifique aux cellules transformées.

Par la suite nous avons procédé à des analyses de ChIP qui nous ont permis de démontrer le recrutement du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 au niveau des promoteurs de deux gènes co-régulés par $\Delta Np73\alpha$ et E2F4-5 (STC1 et MAFB). En outre, le knockdown d'E2F4-5 diminue le recrutement de $\Delta Np73\alpha$ à ces promoteurs, ce qui suggère que l'interaction protéine-protéine avec E2F4 redirige $\Delta Np73\alpha$ vers des gènes spécifiques.

Parmi les gènes co-réprimés par $\Delta Np73\alpha$ et E2F4-5, nous avons retrouvé trois membres de la famille des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (CDKN1B/p27^{Kip1}, CDKN2B/p15^{INK4b} et CDKN2D/p19^{INK4d}). Les produits de ces gènes sont des régulateurs négatifs de la progression du cycle cellulaire, en inhibant les kinases CDK1/2 (p27^{Kip1}) et CDK4/6 (p27^{Kip1}, p15^{INK4b}, p19^{INK4d}). CDKN2D code pour la protéine p19^{INK4d} qui a également été décrite comme facteur impliqué dans la sénescence. Dans le cadre de cette étude, j'ai pu montrer que la réactivation de l'expression de p19^{INK4d} par rétrotransduction de son ADNc conduit les 38HK en sénescence précoce.

La dernière partie de cette étude a été consacrée à la précision du rôle du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 dans des lignées de cellules cancéreuses HPV-négatives telles que HNC-136 (cancer de la tête et du cou) et CAL-51 (cancer du sein).

Précédemment, l'équipe de Massimo Tommasino a montré que ces cellules possèdent également un haut niveau d'expression de $\Delta Np73\alpha$ ainsi que de TAp53 (71). L'expérience de gradient de saccharose suivie d'une co-immunoprécipitation, a permis de montrer que $\Delta Np73\alpha$ interagit avec E2F4 et p130 dans ces deux lignées cellulaires. De plus, 3 gènes parmi les 8 validés précédemment (STC1, MAFB et CDKN2D/p19^{INK4d}) ont des niveaux d'ARNm significativement plus élevés en condition de déplétion d'E2F4-5 ou de $\Delta Np73\alpha$ par rapport à la condition contrôle.

En conclusion, nos résultats montrent que le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 agit dans les cellules cancéreuses afin d'inhiber l'expression de gènes spécifiques tels que des régulateurs négatifs de la prolifération.

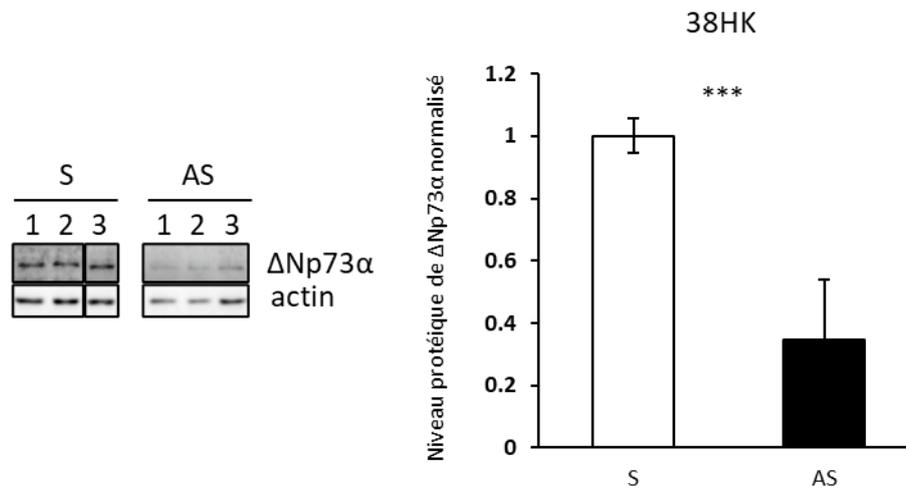


Figure 20. Analyse par Western blot de la déplétion de Δ Np73 α dans les 38HK. (Gauche) Les six échantillons choisis pour les analyses RNA-seq, trois transfectées avec des oligonucleotides antisens (AS), trois transfectées avec des oligonucleotides sens (S, contrôle). Les six échantillons ont été migrés sur le même gel. (Droite) Le niveaux protéique de Δ Np73 α ont été quantifiés et normalisés par rapport à la β -actine (panel de droite). (***) : $P < 0.001$)

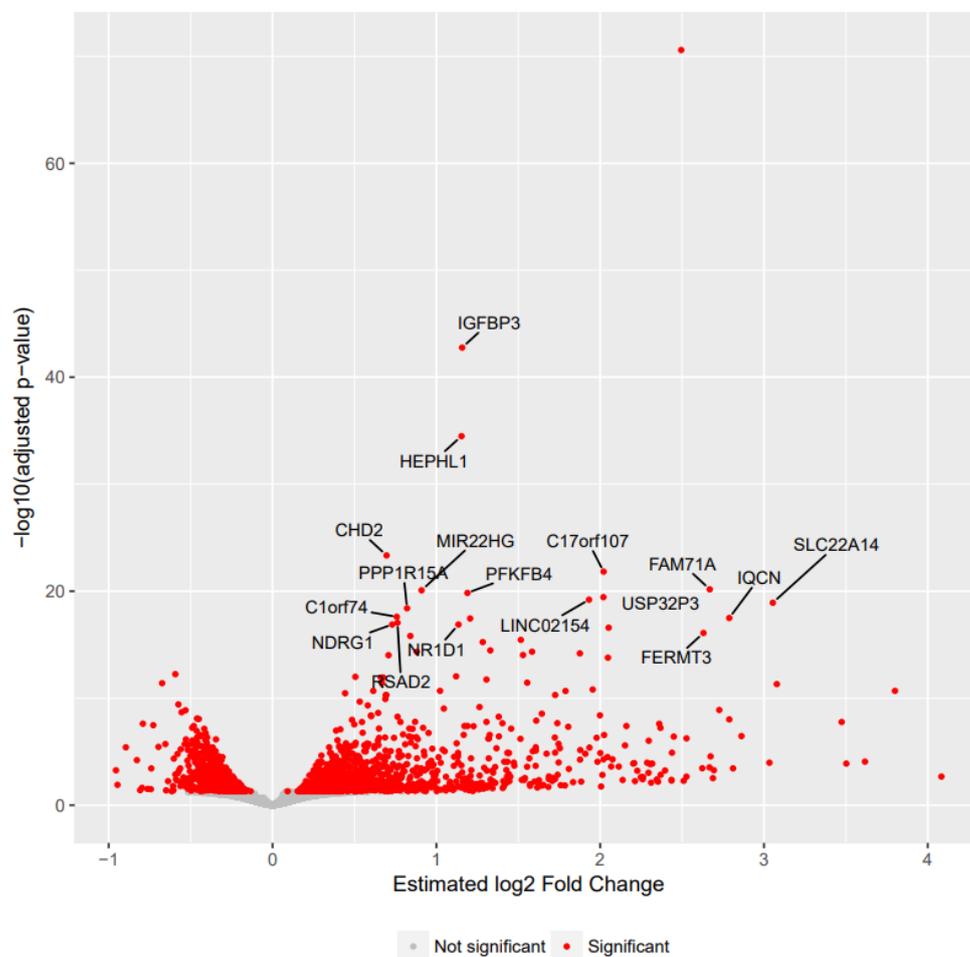


Figure 21. Diagramme en volcan des gènes dérégulés après déplétion de Δ Np73 α . Les gènes significatifs ont été sélectionnés en utilisant le seuil de valeur p ajustée inférieure à 0,05 (rouge).

Chapitre VI. Caractérisation fonctionnelle du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130

Ce chapitre décrit les résultats issus des analyses transcriptomiques et phénotypiques et constitue une première caractérisation fonctionnelle du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130. Afin d'identifier des gènes cibles potentiels du complexe, nous avons effectué des analyses transcriptomiques dans des conditions de knockdown de $\Delta Np73\alpha$ et nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus à partir d'analyses similaires dans des conditions de déplétion d'E2F4-5 (décrit dans Taverniti/Krynska et al. 2023-voir Chapitre 5). Un certain nombre d'observations intéressantes ont été réalisées, indiquant des directions pour de futures études fonctionnelles. En particulier, les analyses phénotypiques sur 38HK présentées dans ce chapitre indiquent que le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 contribue à la prolifération cellulaire en favorisant la phosphorylation de pRb.

1. Analyses transcriptomiques sur $\Delta Np73\alpha$

Afin de caractériser les contributions transcriptionnelles de $\Delta Np73\alpha$, nous avons procédé avec la déplétion de $\Delta Np73\alpha$ dans les 38HK(D3). Cette lignée cellulaire de passage tardif, qui a subi plus de 30 passages depuis la transformation des kératinocytes primaires par les protéines E6 et E7 de l'HPV38, a été utilisée pour les analyses transcriptomiques d'E2F4-5. Pour la déplétion de $\Delta Np73\alpha$, nous avons suivi le protocole décrit dans Taverniti/Krynska et al. 2023, qui emploie des oligonucléotides antisens (AS) ([179](#)) ciblant une séquence en 3' du gène spécifique aux isoformes $\Delta Np73$ et absente dans le gène codant pour la protéine TAp73. La transfection des 38HK avec les oligonucléotides S/AS a été réalisée en utilisant l'agent de transfection lipofectamine et les cellules collectées 24h après transfection. Au-delà de ce temps, nous observons de très nombreuses cellules flottantes, indiquant une mort cellulaire accrue imputable à l'absence de $\Delta Np73\alpha$, qui semble essentielle à la survie cellulaire. Ainsi, j'ai généré six échantillons S (sens) et six échantillons AS. En s'appuyant sur les résultats de Western Blot, nous avons choisi trois échantillons de chaque groupe présentant les meilleures conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ (Figure 20). L'ARN correspondant a été sélectionné afin de réaliser des analyses d'RNAseq. Les résultats, visualisés sur le diagramme en volcan (Figure 21), montrent qu'en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ la majorité des gènes dérégulés (associés à une valeur p ajustée ≤ 0.05) présentent une expression à la hausse.

Ensuite, nous avons sélectionné les gènes codant pour des protéines dont la différence d'expression entre les conditions knockdown et contrôle correspond à une valeur « Log2 fold-

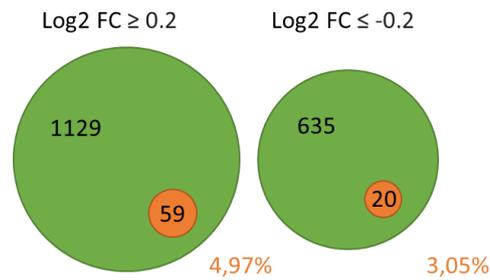


Figure 22. Diagrammes de Venn des gènes dérégulés après déplétion de $\Delta Np73\alpha$. A gauche les gènes régulés à la hausse ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 0.2$), à droite les gènes régulés à la baisse ($\text{Log}_2 \text{FC} \leq -0.2$). Orange : gènes cibles de p53 ; vert : autres gènes. Le nombre des gènes dans chaque ensemble est indiqué. La pourcentage des gènes cibles de p53 dans chaque ensemble est indiquée en orange.

Tableau 1 : Gènes cibles de p53 régulés à la hausse en condition de knockdown de $\Delta Np73\alpha$

| Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée | Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée | Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée |
|-----------|---------|------------------|---------|---------|------------------|----------|---------|------------------|
| VWCE | 1.74 | 0.0014 | RGS16 | 0.40 | 0.0100 | FLRT2 | 0.32 | 0.0035 |
| CEL | 1.31 | 0.0006 | SLC4A11 | 0.40 | 0.0449 | EFNB1 | 0.31 | 0.0283 |
| RNASE7 | 0.81 | 2.06E-06 | KITLG | 0.40 | 0.0015 | RETSAT | 0.29 | 0.0017 |
| GRHL3 | 0.71 | 0.0036 | SESN2 | 0.39 | 0.0025 | KRT15 | 0.29 | 0.0401 |
| RND3 | 0.67 | 3.96E-12 | ITGA3 | 0.39 | 0.0055 | ADGRG1 | 0.29 | 0.0494 |
| SFN | 0.65 | 0.0193 | ZNF385A | 0.39 | 0.0106 | DUSP7 | 0.28 | 0.0228 |
| NOTCH1 | 0.53 | 0.0096 | TRAF4 | 0.37 | 0.0106 | JAG1 | 0.27 | 0.0003 |
| EPHA2 | 0.53 | 0.0006 | PML | 0.37 | 0.0177 | ZNF79 | 0.27 | 0.0343 |
| ATF3 | 0.51 | 2.40E-05 | EPS8L2 | 0.36 | 0.0409 | IER5 | 0.25 | 0.0122 |
| HRAS | 0.50 | 0.0058 | BTG1 | 0.36 | 9.38E-05 | CCDC51 | 0.24 | 0.0343 |
| GADD45A | 0.49 | 2.72E-06 | TRIP6 | 0.35 | 0.0451 | RAP2B | 0.23 | 0.0114 |
| PLCXD2 | 0.49 | 6.67E-05 | MKKNK2 | 0.34 | 0.0340 | CSF1 | 0.23 | 0.0371 |
| SERTAD1 | 0.48 | 0.0098 | PRDM11 | 0.34 | 0.0240 | SERPINE1 | 0.23 | 0.0255 |
| GDF15 | 0.46 | 0.0122 | CDKN1A | 0.34 | 0.0005 | DUSP5 | 0.22 | 0.0093 |
| DNAJB2 | 0.45 | 0.0030 | BCL6 | 0.34 | 0.0012 | TEP1 | 0.22 | 0.0160 |
| KRT8 | 0.43 | 0.0012 | FOSL1 | 0.34 | 0.0074 | ENC1 | 0.22 | 0.0148 |
| SAC3D1 | 0.43 | 0.0463 | SLC9A1 | 0.33 | 0.0127 | FBXO32 | 0.21 | 0.0267 |
| CES2 | 0.41 | 0.0002 | PLXNB2 | 0.33 | 0.0476 | FHL2 | 0.21 | 0.0186 |
| TNFRSF10D | 0.41 | 3.94E-06 | CPEB2 | 0.32 | 0.0123 | PLK2 | 0.21 | 0.0177 |
| FAM98C | 0.41 | 0.0354 | PMAIP1 | 0.32 | 0.0060 | | | |

change » égal ou supérieur à 0.2 (pour les gènes régulés à la hausse) et égal ou inférieur à -0.2 (pour les gènes régulés à la baisse). Ainsi nous avons sélectionné 1188 et 655 gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée, respectivement. Considérant que $\Delta Np73\alpha$ agit comme répresseur de la transcription, nous nous sommes focalisés sur les gènes régulés à la hausse après déplétion de $\Delta Np73\alpha$. L'analyse du « Processus Biologique » par *Gene Ontology* (GO) (utilisant l'outil STRING) montre un enrichissement de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'assemblage d'hémidesmosomes ainsi que dans la régulation des HDAC (Annexe 7.1). D'autres part, les analyses des voies de signalisation montre un enrichissement de protéines impliquées dans les voies de l'immunité et de la voie de signalisation des cytokines (Annexe 7.2). Parmi ces mêmes gènes, nous avons recherché les gènes cibles de p53. Pour cela nous avons comparé la liste de gènes issus des analyses de RNAseq sur $\Delta Np73\alpha$ (avec Log_2 fold-change égal ou supérieur à 0.2) avec la liste des 343 gènes établis comme régulés par p53 recensés dans Fischer et al. (98). A notre étonnement, les gènes cibles de p53 ne constituent que 5% (59) du nombre total de gènes dont la transcription a augmenté après déplétion de $\Delta Np73\alpha$ (Figure 22). Parmi ceux-ci, nous retrouvons certains composants des voies oncogéniques comme *HRAS* codant pour une GTPase impliquée dans l'activation de la transduction du signal Ras. Nous retrouvons également le gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21^{CIP1/WAF1} (Tableau 1). Nous pensons que le nombre des gènes cibles de p53 dans ces analyses transcriptionnelles est largement sous-estimé. Ceci pourrait être dû au fait que la réactivation de l'expression de ces gènes en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ est compromise. En effet, comme décrit dans le Chapitre 7, nous avons observé que PARP14, dont les niveaux augmentent avec la transformation par l'E6 et E7 de l'HPV38, agit sur la voie de p53 (voir Chapitre 7).

2. Identification de cibles potentiels du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130.

Nous avons comparé les gènes régulés à la hausse en condition de déplétion de E2F4-5 avec les gènes régulés à la hausse en condition de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ (pour Log_2 fold-change égal ou supérieur à 0.2). Ainsi, nous obtenons une liste de 124 gènes qui sont co-régulés par E2F4-5 et $\Delta Np73\alpha$. L'analyse d'enrichissement des voies biologiques GO nous indique des gènes codant pour des protéines impliquées dans la méthylation des histones (GO:0016571) (Annexe 7.3). De manière intéressante, nous retrouvons aussi CREBBP qui est une acétyltransférase capable d'activer l'expression du gène *CDKN1A*. Parmi les facteurs

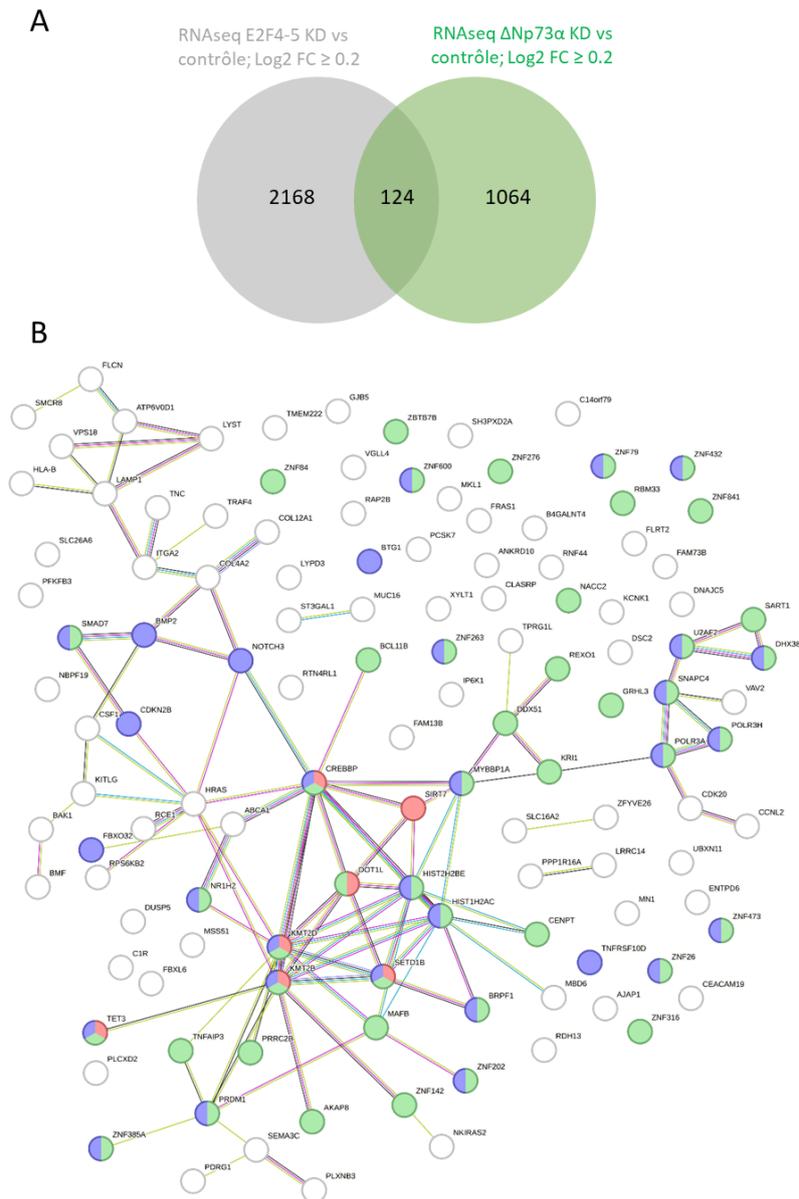


Figure 23. Gènes régulés à la hausse commun après déplétion de E2F4-5 et Δ Np73 α . (A) Diagrammes de Venn représentant les gènes régulés à la hausse après déplétion de E2F4-5 (en gris) ou de Δ Np73 α (en vert). (B) Représentation schématique du réseau de connections entre les protéines codées par les 124 gènes régulés à la hausse après déplétion de Δ Np73 α ou d' E2F4-5. L'Analyse a été réalisée par l'outil STRING. En rouge sont indiquées les protéines associées à la méthylation des histones (GO:0016571), en vert les protéines impliquées dans la liaison aux acides nucléiques (GO:0003676), en bleu les protéines associées à la transcription (réactome HSA-74160).

épigénétiques, nous observons les composants du nucléosome (HIST2H2BE et HIST1H2AC) et les méthyltransférases (KMT2D, KMT2B, DOT1L, SIRT7 et SETD1B), des facteurs de déméthylation (TET3) et des composants des complexes d'acétylation d'histones (BRPF1). D'autre part, nous remarquons la présence de plusieurs protéines en doigt de zinc régulatrices de la transcription (ZNF276, ZNF432, ZNF841, ZBTB7B, ZNF600, ZNF84, ZNF263, ZFYVE26, ZNF473, ZNF26, ZNF316, ZNF202, ZNF142, ZNF385A) (Figure 23).

Parmi les gènes co-régulés à la hausse par E2F4-5 et Δ Np73 α , nous retrouvons également des gènes qui sont connus pour être impliqués dans l'oncogenèse, comme les gènes *BTG1*, *AJAP1*, *ETS2* et *NOTCH3*. Nous avons donc validé les résultats sur ces gènes par des expériences indépendantes de RT-qPCR sur la lignée 38HK(D3) traitée avec des oligonucléotides siRNA spécifiques pour E2F4-5 ou avec des oligonucléotides AS ciblant Δ Np73 α (Figure 24A). J'ai ensuite évalué l'expression de ces mêmes gènes dans les kératinocytes humains primaires (HPK) qui n'expriment pas Δ Np73 α (Taverniti/Krynska et al 2023 -voir Chapitre 5). Les résultats montrent que l'expression de ces gènes n'est pas affectée par la déplétion d'E2F4-5 dans les HPK (Figure 24B), indiquant ainsi que l'interaction avec Δ Np73 α module la spécificité d'E2F4 dans les 38HK. J'ai ensuite analysé l'effet de la transformation par les protéines E6 et E7 du HPV38 sur l'expression de ces gènes. Pour cela, les niveaux des ARNm de ces quatre gènes ont été mesurés dans les lignées 38HK(D2) et HPK(D2) issues du même donneur. Par rapport au 38HK(D3), les kératinocytes 38HK(D2) sont de passage précoce après transformation. Bien que les analyses de RNAseq ont été réalisées sur les 38HK(D3), nous avons pris en considération la comparaison 38HK(D2)-HPK(D2) car nous ne sommes plus en possession de cellules primaires pour les donneur des 38HK(D3). Les résultats montrent que trois de ces gènes, *BTG1*, *AJAP1* et *ETS2*, présentent des niveaux d'ARNm plus bas dans les 38HK transformés par rapport aux HPK primaires (Figure 25A). Concernant *NOTCH3*, nous avons observé une augmentation du niveau de son ARNm dans les 38HK(D2) par rapport aux HPK(D2). Nous avons donc décidé de faire une nouvelle analyse en utilisant les ARNm extrait des 38HK(D3). Le niveau d'expression de *NOTCH3* diminue drastiquement dans les 38HK(D3), suggérant que la régulation de ce gène évolue au cours de la transformation des kératinocytes (Figure 25B).

Ainsi, comme dans Taverniti/Krynska et al. 2023, nous avons poursuivi avec des analyses ChIP afin d'évaluer le recrutement du complexe Δ Np73 α -E2F4/p130 au niveau des promoteurs de ces gènes. Nous avons sélectionné le gène *BTG1* qui possède dans son promoteur des

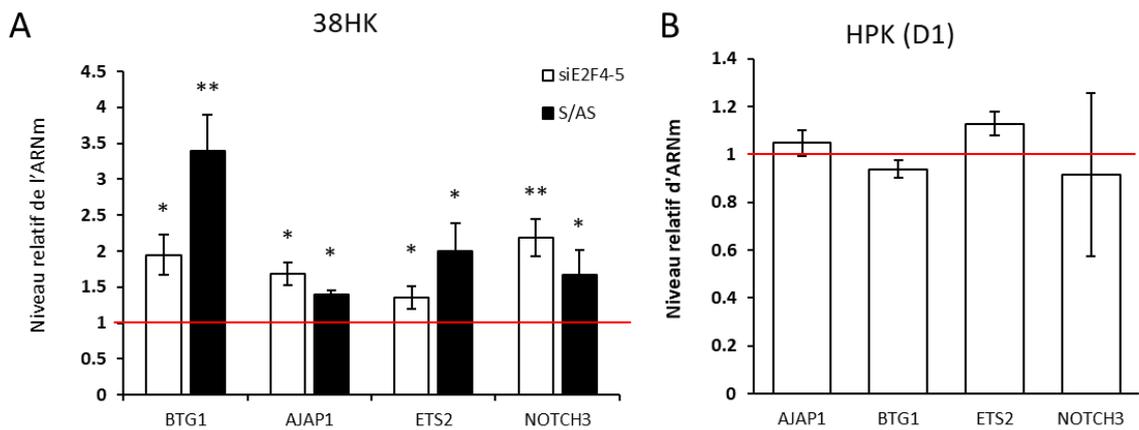


Figure 24. Profil d'expression de gènes avec fonctions dans l'oncogenèse identifiés par les analyses RNAseq. (A) Analyse RT-qPCR à partir d'extraits des 38HK en conditions de déplétion de E2F4-5 versus contrôle (blanc) ou de $\Delta Np73\alpha$ versus contrôle (noir). (B) Analyse RT-qPCR à partir d'extraits des HPK (D1) primaires en conditions de déplétion d'E2F4-5 versus contrôle. (A-B- La ligne rouge indique les niveaux d'ARNm en condition contrôle (SC ou S). L'analyse a été réalisée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ utilisant GAPDH comme gène de référence. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$).

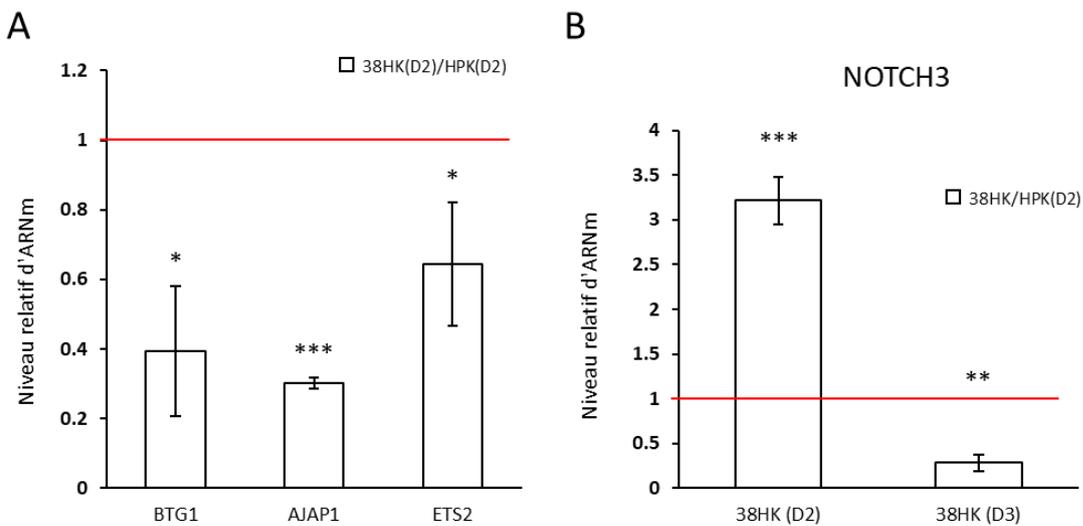


Figure 25. Variation de l'expression des gènes impliqués dans l'oncogenèse en fonction de la transformation induite par l'HPV38. (A) Niveaux des ARNm dans les 38HK(D2) versus HPK(D2) issus du même donateur (B) Analyse RT-qPCR du gène NOTCH3 dans les 38HK(D3) versus HPK(D2). La ligne rouge se réfère aux niveaux d'ARNm dans les HPK (D2). L'analyse a été réalisée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ utilisant GAPDH comme gène de référence. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$).

éléments de réponse (RE) spécifiques pour E2F et p53. J'ai donc transfecté la lignée 38HK(D3) avec des siRNA scramble ou spécifiques pour E2F4-5 puis j'ai procédé avec des expériences de CHIP en utilisant des anticorps anti-E2F4 et anti-p73. L'ADN élué a été analysé par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour les régions 1, 2 et 3 du promoteur de BTG1 (Figure 26A). Comme contrôle négatif, nous avons utilisé la même région indiquée dans Taverniti/Krynska et al. 2023. Nos résultats montrent que $\Delta Np73\alpha$ et E2F4 sont recrutés au niveau de la région 3 du gène BTG1. La déplétion d'E2F4 réduit significativement le recrutement d'E2F4 ainsi que de $\Delta Np73\alpha$ sur cette région (Figure 26B).

3. E2F4-5 contribue à la prolifération des 38HK

Suivant les résultats obtenus dans le Chapitre 5, nous avons émis l'hypothèse que le complexe E2F4/p130 pourrait acquérir des fonctions oncogéniques en s'associant avec $\Delta Np73\alpha$, qui, à son tour, est essentiel pour la prolifération des 38HK. En effet, nous observons que la déplétion de E2F4-5 par transfection d'oligonucléotides siRNA rend les cellules 38HK larges et aplaties, un phénotype qui est caractéristique de la sénescence prématurée. L'analyse de l'activité de la β -galactosidase montre que la déplétion d'E2F4-5 augmente le nombre des cellules 38HK en sénescence par un facteur deux à 48h après transfection (Figure 27A). Afin de corroborer cette observation, j'ai réalisé des tests de clonogénicité. Pour ça, les 38HK ont été co-transfectés avec deux plasmides pLKO.1 exprimant des shRNA qui ciblent les 3'-UTR des gènes E2F4 et E2F5, respectivement. Un plasmide pLKO.1 exprimant un shRNA scramble (SC) a été utilisé comme contrôle. Puisque le vecteur pLKO.1 contient une cassette de résistance à la puromycine, l'utilisation de ces plasmides permet une mise en sélection des cellules transfectées, ce qui est nécessaire pour les tests de clonogénicité. Les résultats obtenus 14 jours après transfection montrent que la déplétion d'E2F4-5 réduit le nombre de colonies d'un facteur trois par rapport à la condition contrôle (Figure 27B). Ceci suggère que E2F4-5 possèdent des fonctions pro-prolifératives dans les cellules transformées 38HK.

Afin de comprendre si des changements au niveau de l'axe RB/E2F sont également impliqués dans le phénotype de sénescence, j'ai évalué la formation de foyers nucléaires d'hétérochromatine associée à la sénescence (*senescence-associated heterochromatin foci* – SAHF). Les SAHF ont été décrits comme des foyers de condensation de la chromatine au niveau des gènes promouvant la prolifération, qui sont régulés par les complexes répressifs pRb/E2F

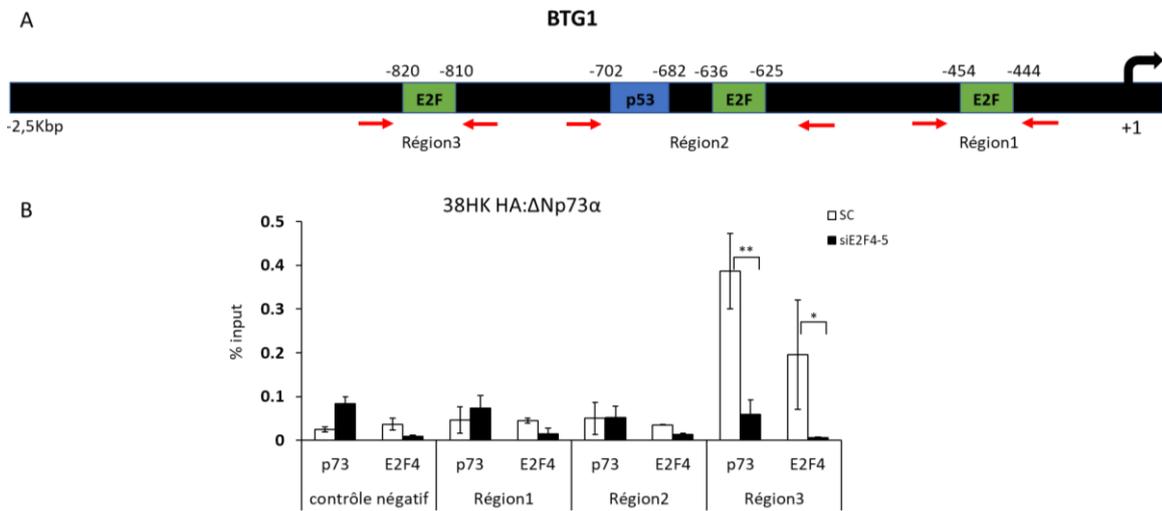


Figure 26. Analyse ChIP du gène BTG1 après déplétion EF4-5 dans les 38HK. (A) Illustration schématique du promoteur de BTG1. Les nombres correspondent aux positions des éléments de réponse E2FRE et p53RE. Les flèches rouges indiquent les positions des amorces utilisés dans les expériences décrites en B. (B) Analyse ChIP utilisant les anticorps anti-p73 et anti-E2F4. L'ADN élué a été analysé par RT-qPCR en utilisant les amorces reconnaissant les régions 1, 2 et 3 du promoteur de BTG1 ou la région contrôle négatif. La quantité d'ADN lié à chaque protéine est exprimé en pourcentage d'ADN par rapport à l'input. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$).

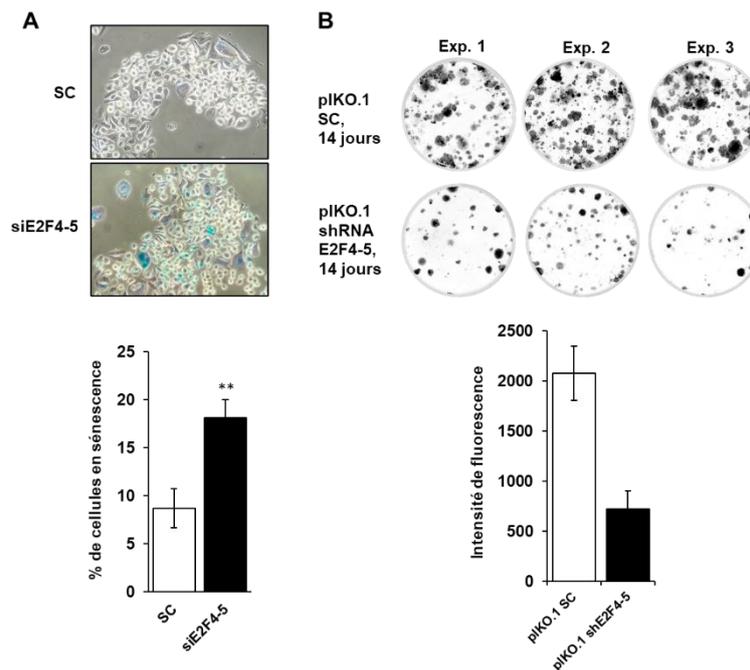


Figure 27. La déplétion de E2F4-5 induit la sénescence précoce dans les 38HK. (A) En haut : coloration *in situ* relevant l'activité de la β -galactosidase dans les 38HK. Les 38HK ont été transfectés avec des siRNA SC ou dirigés contre E2F4-5 (siE2F4-5). En bas : pourcentages des cellules 38HK en sénescence dans les deux conditions estimées sur la base des tests de β -galactosidase. (B) Tests de clonogénicité sur les 38HK après transfections avec des plasmides pLKO.1 codant pour des shRNAs SC (contrôle) ou dirigés contre E2F4-5. En haut : les images ont été prises avec le scanner Typhoon FLA 9500. En bas : quantification des colonies sur base de la fluorescence émise par le crystal violet. La quantification a été réalisée sur ImageJ. (A-B) Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes (** : $P < 0.01$).

(116). Ainsi, nous avons réalisé une analyse par immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre la lysine 9 tri-méthylée de l'histone 3 (H3K9Me3), ce qui est un marqueur typique des SAHF. Nous observons que la déplétion d'E2F4-5 augmente de 3 à 4 fois le nombre de cellules 38HK positives au marqueur H3K9me3 (Figure 28A). En revanche, la déplétion d'E2F4-5 dans les HPK primaires et les kératinocytes exprimant les oncoprotéines E6 et E7 de l'HPV16 (16HK) n'affecte pas la formation des SAHF (Figure 28B et C), suggérant ainsi que E2F4-5 ne possède pas de fonctions pro-prolifératives dans ces cellules.

Afin de vérifier que le phénotype observé pour les 38HK est bien lié aux protéines E2F4-5, j'ai réalisé une expérience de type « rescue », où des plasmides codant pour les protéines E2F4 et E2F5 ont été co-transfectés avec les plasmides PLKO.1 shRNA E2F4/E2F5 dans les 38HK. Les résultats montrent que l'expression ectopique d'E2F4-5 rétablit le phénotype prolifératif des 38HK (Figure 29). Ce dernier résultat exclut la possibilité que le phénotype de sénescence observé pourrait être un effet OFF-target induit par l'approche de déplétion des protéines.

Les analyses par Western blot des extraits cellulaires montrent que les niveaux de pRb sont plus élevés dans les 38HK comparé aux HPK primaires et 16HK (Figure 30). Ceci est en accord avec les résultats publiés précédemment par l'équipe de M. Tommasino, qui mettent en évidence le rôle des oncoprotéines E6 et E7 de l'HPV38 dans la stabilisation de pRb hyperphosphorylé (60) (voir Chapitre 1). Cependant, pRb doit être dans un état hypophosphorylé pour pouvoir former les complexes RB/E2F qui agissent au niveau des foyers SAHF. Comme suggéré par Taverniti/Krynska et al. 2023, le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 réprime l'expression des gènes de la famille *Cdkn* CDKN1B/p27^{Kip1}, CDKN2B/p15^{INK4b} et CDKN2D/p19^{INK4d}, dont les produits inhibent l'activité des kinases cycline-dépendantes CDK1/2 (p27Kip1) et CDK4/6 (p27Kip1, p15INK4b et p19INK4d). Par conséquent, l'augmentation de la formation de foyer SAHF lors de la déplétion en E2F4-5 serait le résultat de la réactivation de l'expression de ces gènes *Cdkn*, favorisant ainsi la formation de complexes RB/E2F.

En conclusion, les résultats présentés dans cette section suggèrent qu'E2F4-5 joue un rôle pro-prolifératif dans les 38HK, mais pas dans les HPK primaire ou dans les 16HK, probablement en promouvant l'état hyperphosphorylé de pRb.

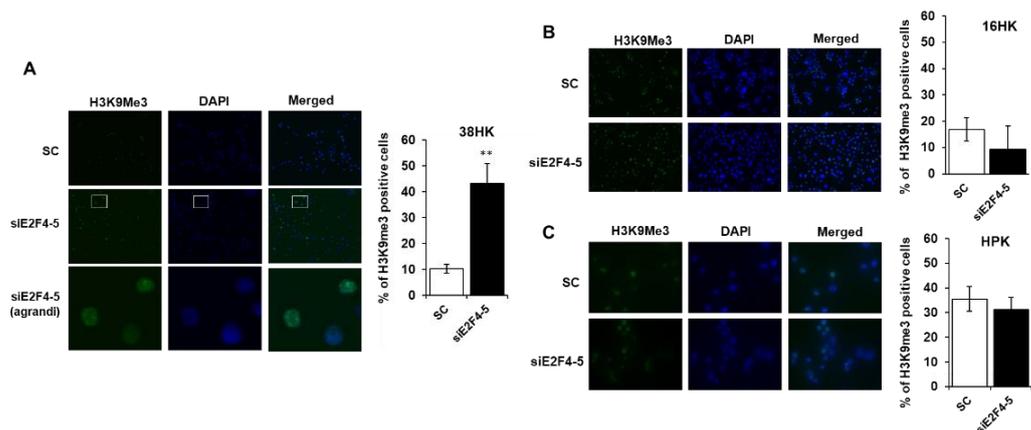


Figure 28. Analyse d'immunofluorescence en conditions de déplétion d' E2F4-5 versus contrôle sur les 38HK (A), 16HK (B) et HPK (C). (A, B, C) Gauche : les cellules ont été collectées 48h après transfection, déposées sur lame de microscope puis incubées avec l'anticorps anti-H3K9me3 et ensuite avec un anticorps secondaire couplé au Alexa Fluor 488 (vert). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Les images ont été analysées utilisant ImageJ. Droite: les cellules positives au H3K9me3 ont été quantifiées par ImageJ. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes. Au moins 100 cellules ont été comptées pour chacun des réplicas. (** : $P < 0.01$).

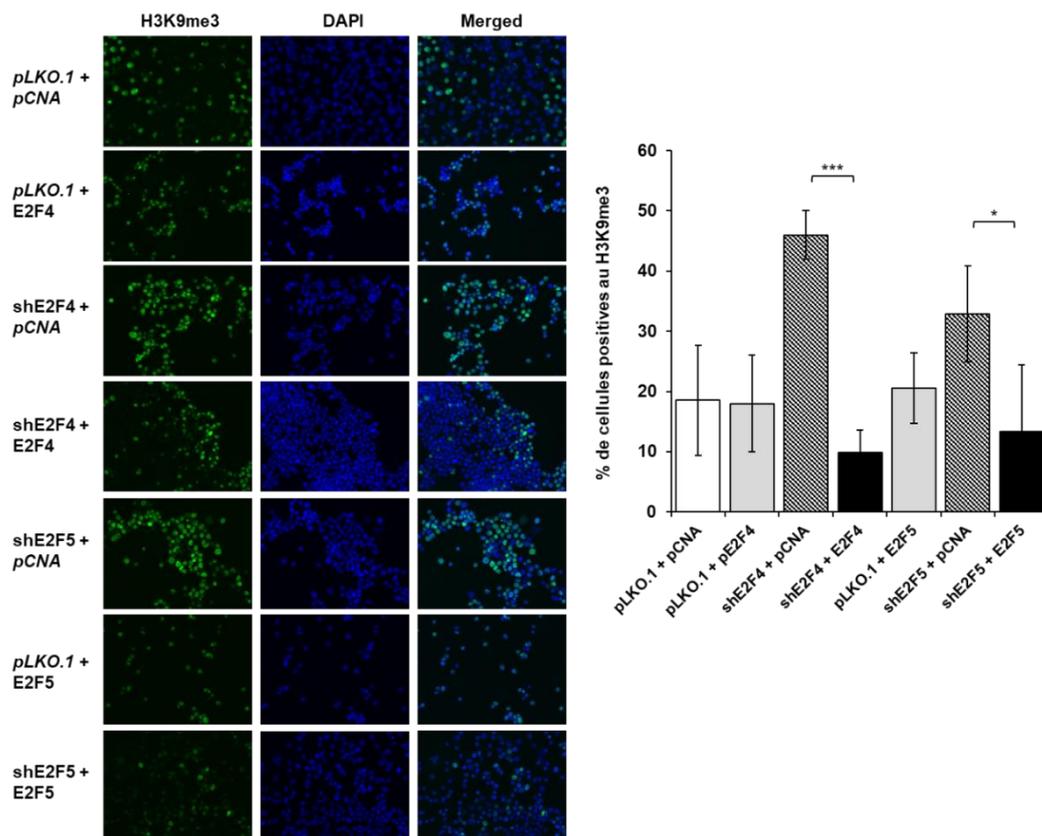


Figure 29. Expression ectopique de E2F4 ou E2F5 dans les 38HK en conditions de knockdown d'E2F4 ou E2F5. Gauche : les cellules ont été transfectées avec différentes combinaisons de plasmides pLKO.1 et pCNA, à savoir pLKO.1 vide, pLKO.1 codant pour un shRNA contre E2F4 (shE2F4) ou E2F5 (shE2F5), pCNA vide, pCNA codant pour E2F4 ou E2F5. Les cellules ont été collectées 48h après transfection, déposées sur une lame de microscope puis incubées avec l'anticorps anti-H3K9me3 suivi par l'anticorps secondaire couplé au Alexa Fluor 488 (vert). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Les images ont été analysées utilisant ImageJ. Droite : les cellules positives au H3K9me3 ont été quantifiées par ImageJ. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes. Au moins 100 cellules ont été comptées pour chacun des réplicas (* : $P < 0.05$; *** : $P < 0.001$).

4. E2F4-5 contribuent à la prolifération des cellules cancéreuses exprimant Δ Np73 α

Comme nous l'avons décrit dans Taverniti/Krynska et al. 2023, le complexe Δ Np73 α -E2F4/p130 est également présent dans les cellules cancéreuses CAL-51 et HNC-136, qui surexpriment l'isoforme Δ Np73 α . Pour rappel, les CAL-51 sont des cellules issues d'un cancer du sein, tandis que les HNC-136 sont des cellules de cancer tête et cou. Dans Taverniti/Krynska et al. 2023, nous avons montré que certains des gènes identifiés comme potentiels cibles du complexe Δ Np73 α -E2F4/p130 dans les 38HK le sont également dans ces cellules (*STC1*, *MAFB*, *CDKN2D/p19^{INK4d}* - voir Chapitre 5). Nous avons donc procédé dans ces deux lignées cellulaires à une expérience d'activité de β -galactosidase comme marqueur des cellules en sénescence. Nous observons que, comme dans le cas de 38HK, la déplétion de E2F4-5 mène à une sénescence prématurée (Figure 31A). L'évaluation des niveaux de pRB ainsi que de son état de phosphorylation (P-pRB) dans les cellules CAL-51 analysés par Western blot indique une baisse du rapport P-pRb/pRb après la double déplétion de E2F4-5, ce qui suggère une diminution de la phosphorylation de pRb (Figure 31B). L'ensemble de ces résultats indiquent l'implication de E2F4-5 au niveau du maintien de l'état de phosphorylation de pRB, ce qui est en cohérence avec la répression de l'expression du gène *CDKN2D/p19^{INK4d}* (inhibiteur des kinases CDK4/6) par le complexe Δ Np73 α -E2F4/p130.

5. Conclusion

A partir des résultats décrits dans ce chapitre, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- (i) Δ Np73 α agit principalement comme répresseur de l'expression de gènes, en particulier de l'expression de facteurs de transcription et épigénétiques.
- (ii) De nouveaux gènes cibles du complexe Δ Np73 α -E2F4/p130 impliqués dans l'oncogenèse ont été validés.
- (iii) La déplétion d'E2F4-5 mène à une sénescence prématurée dans les cellules surexprimant Δ Np73 α , à savoir les 38HK et les cellules cancéreuses HPV-négatives CAL-51 et HNC-136 qui sur-expriment Δ Np73 α .
- (iv) E2F4-5 pourrait favoriser l'état hyperphosphorylé de pRB

Toutefois nous devons souligner la nécessité de compléter les analyses décrites ici par d'autres expériences. En effet, les gènes cibles de Δ Np73 α qui ont émergé des analyses RNAseq semblent être largement sous-estimés, en particulier les gènes liés aux voies de

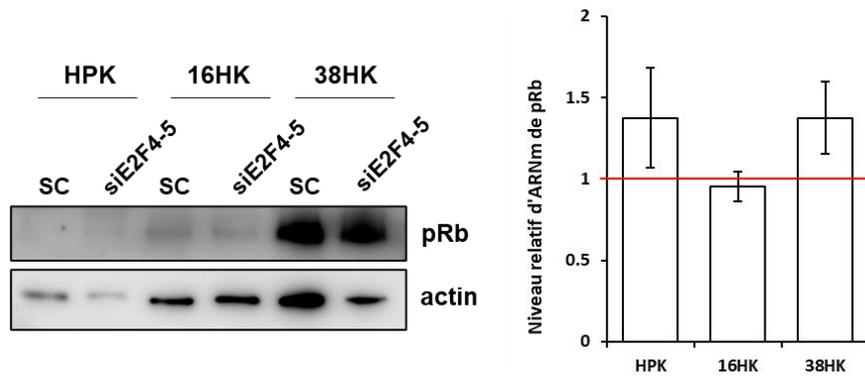


Figure 30. Expression de pRB en conditions de déplétion d'E2F4-5 versus contrôle dans les HPK, 16HK et 38HK. Gauche : analyses par Western blot sur les extraits protéiques totaux utilisant un anticorps anti-pRB. Droite : analyse par RT-qPCR à des niveaux d'ARNm de pRb. La ligne rouge se réfère aux niveaux d'ARNm dans les conditions contrôle (SC). L'Analyse a été réalisée par la méthode $\Delta\Delta Ct$ utilisant GAPDH comme gène de référence. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes

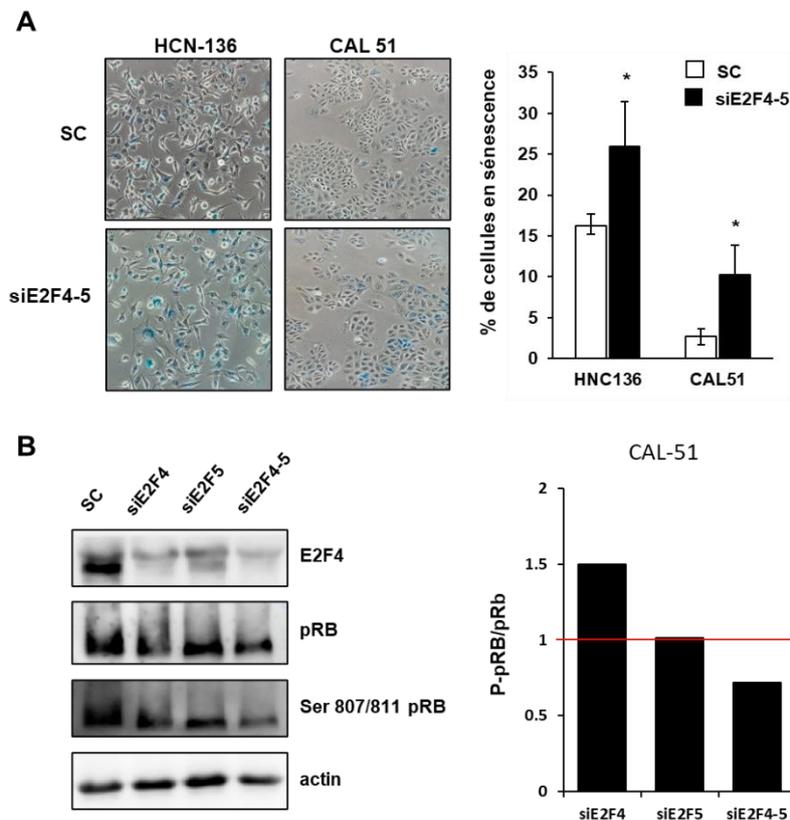


Figure 31. La déplétion de E2F4-5 induit la sénescence précoce dans les cellules cancéreuses HPV-négatives. (A) Gauche : coloration in situ relevant l'activité de la β -galactosidase dans les lignées HNC-136 et CAL-51. Les cellules ont été transfectées avec des siRNA SC ou dirigés contre E2F4-5 (siE2F4-5). Droite : pourcentages des cellules HNC-156 et CAL-51 en sénescence dans les deux conditions estimées sur la base des tests de β -galactosidase. (B) Gauche : Analyse par Western blot des extraits protéiques totaux des CAL-51 après déplétion d'E2F4, E2F5 ou E2F4-5 versus contrôle. Les analyses ont été effectuées à l'aide des anticorps anti-E2F4, anti-pRb, anti-P-pRB (phosfo-Ser 807/811). Droite : fraction de pRB phosphorylé (P-pRb) par rapport au total, exprimé en tant que ratio P-pRb/pRb. Chaque ratio a été normalisée à la condition contrôle (SC) qui est indiqué par la ligne rouge.

signalisation p53. Il sera donc important d'effectuer des analyses de CHIP-seq afin de cartographier de manière exhaustive ceux réprimés par $\Delta Np73\alpha$. De plus, des expériences complémentaires seront nécessaires pour évaluer correctement les contributions de E2F4-5 pour la phosphorylation de pRb.

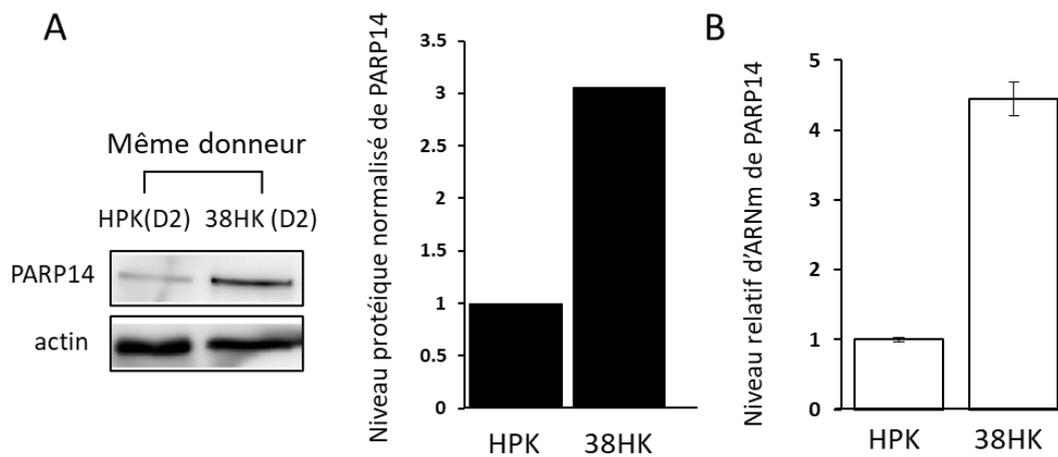


Figure 32. Expression de PARP14 dans les cellules primaires (HPK) et les kératinocytes transformés (38HK). (A) Gauche : analyse par Western blot des niveaux protéiques de PARP14 à l'aide d'un anticorps anti PARP14. Droite : quantification des niveaux de PARP14 normalisés par rapport à l'actine. (B) Niveaux d'ARNm de PARP14 évalués par RT-qPCR par la méthode $\Delta\Delta C_t$ utilisant GAPDH comme gène de référence. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes.

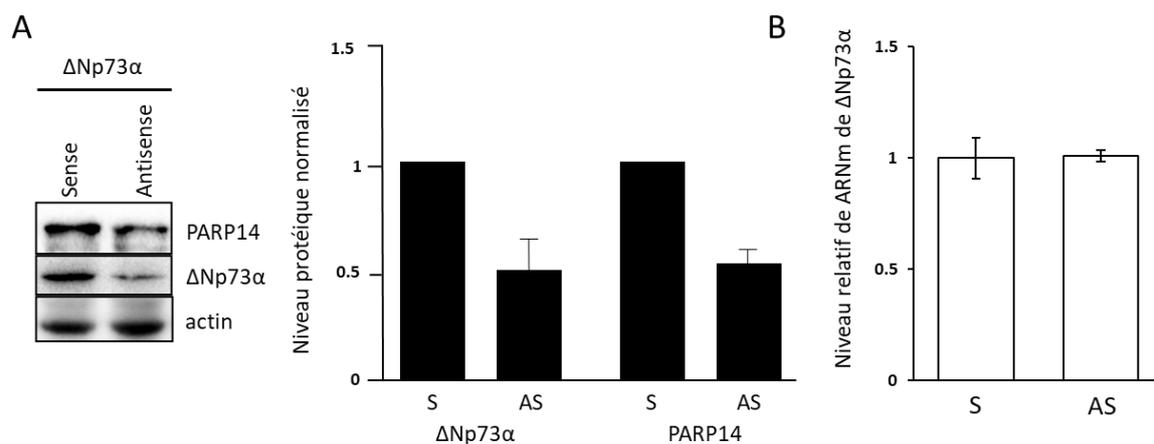


Figure 33. Expression de PARP14 dans les 38HK après déplétion de $\Delta Np73\alpha$. (A) En haut : analyse par Western blot des niveaux protéiques de $\Delta Np73\alpha$ et PARP14 à l'aide des anticorps anti PARP14 et anti-p73. En bas : les niveaux protéiques de $\Delta Np73\alpha$ et PARP14 ont été quantifiés et normalisés par rapport à l'actine (B) Le taux d'ARNm de PARP14 en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ versus contrôle ont été évalués par RT-qPCR par la méthode $\Delta\Delta C_t$ utilisant GAPDH comme gène de référence. (A-B) Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes.

Chapitre VII. PARP14, le nouveau partenaire de $\Delta Np73\alpha$

PARP14 est l'une des protéines qui ont émergé des analyses protéomique réalisées sur $\Delta Np73\alpha$ et décrites dans Taverniti/Krynska et al. 2023 (voir Chapitre 5), ce qui suggère que PARP14 interagissait de manière directe ou indirecte avec $\Delta Np73\alpha$. Dans ce chapitre, je décris les résultats des analyses biochimiques de l'interaction PARP14- $\Delta Np73\alpha$ ainsi que des données préliminaires sur la contribution de PARP14 au niveau de l'expression de gènes régulés par p53.

1. Régulation de PARP14 et $\Delta Np73\alpha$ dans les 38HK

En premier lieu, j'ai examiné l'expression de PARP14 dans les kératinocytes primaires (HPK) et dans les kératinocytes 38HK. Les deux lignées cellulaires sont issues du même donneur (D2) et ont déjà été décrites dans Taverniti/Krynska et al. 2023. Pour rappel, le 38HK(D2) est une lignée en début de phase de transformation et présente une surexpression de $\Delta Np73\alpha$. L'analyse par Western blot des extraits protéiques totaux montre que les niveaux de PARP14 sont plus élevés dans les 38HK en comparaison avec les HPK (Figure 32A). L'analyse par RT-qPCR montre que les niveaux d'ARNm de PARP14 sont entre 4 à 5 fois plus élevés dans les 38HK en comparaison avec les HPK (Figure 32B). Ceci montre que la transformation médiée par les protéines E6/E7 d'HPV38 conduit à une augmentation de l'expression du gène codant pour PARP14.

Comme les niveaux de $\Delta Np73\alpha$ et PARP14 sembleraient en corrélation dans les deux lignées cellulaires, j'ai examiné les niveaux de la protéine PARP14 en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$ par transfection d'oligonucléotides antisens (AS) par rapport à la condition contrôle (transfection d'oligonucléotides sens – S). En effet, la déplétion de $\Delta Np73\alpha$ conduit à une diminution de la protéine PARP14 (Figure 33A). Puisque l'analyse RT-qPCR ne montre pas de variation au niveau de l'ARNm de PARP14 entre la condition contrôle et knockdown (Figure 33B), nous concluons que $\Delta Np73\alpha$ n'affecte pas la transcription de PARP14 mais serait nécessaire à la stabilisation de la protéine.

2. Analyses d'interaction protéine-protéine

Nous avons effectué des analyses de co-IP en utilisant des extraits nucléaires d'une lignée cellulaire de 38HK exprimant de façon stable $\Delta Np73\alpha$ fusionné à une étiquette HA (38HK HA- $\Delta Np73\alpha$) qui est décrite dans Taverniti/Krynska et al. 2023. Les extraits ont été préparés

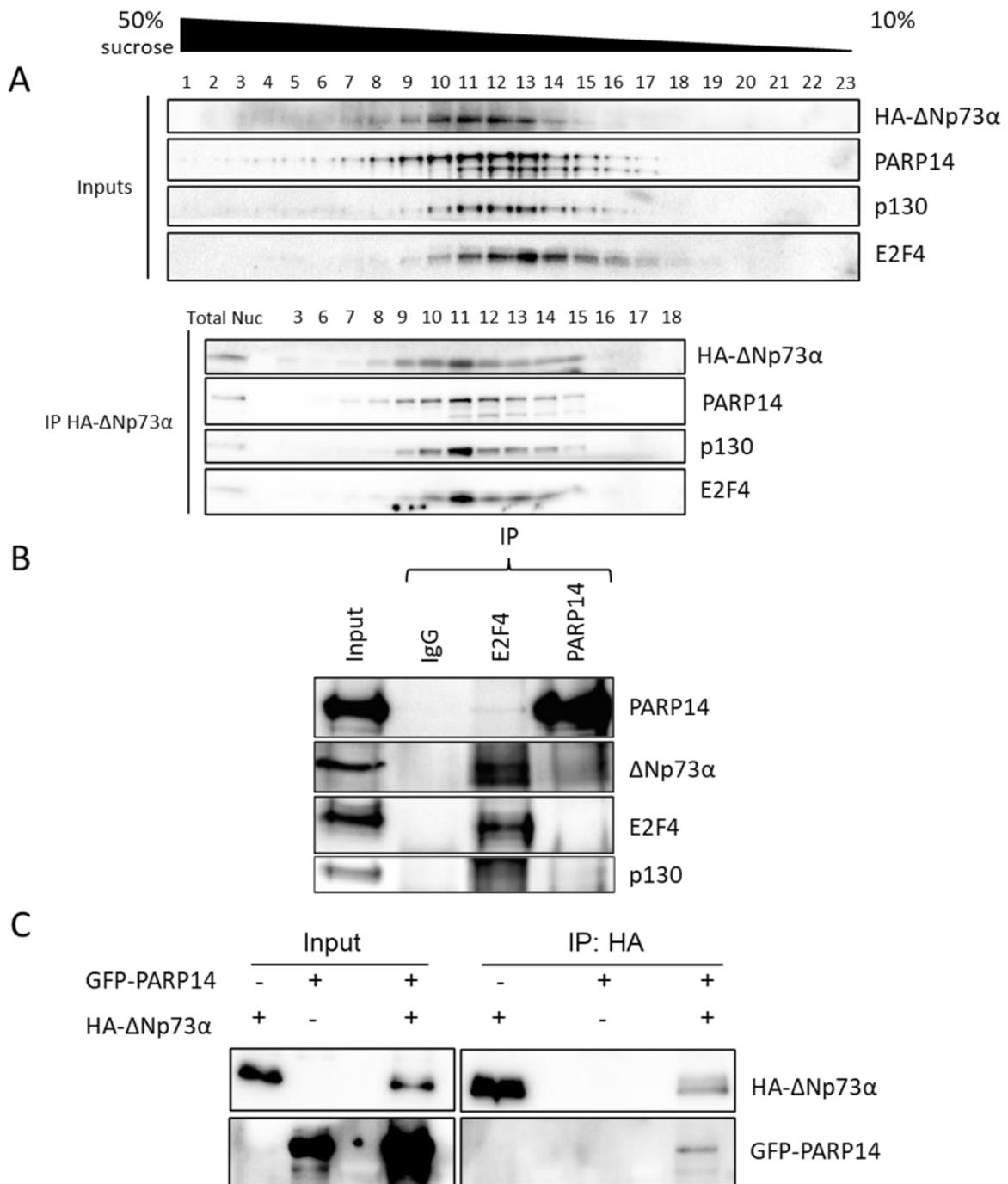


Figure 34. Co-immunoprécipitations de ΔNp73α, E2F4, p130 et PARP14 (A) En haut : fractionnement de l'extrait nucléaire des 38HK HA-ΔNp73α par gradient de saccharose. En bas : immunoprécipitations des fractions utilisant des billes d'agarose conjuguées à un anticorps anti-HA. L'extrait total nucléaire est utilisé comme référence (Total nuc). (B) Immunoprécipitations des extraits nucléaires des 38HK utilisant des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-E2F4 ou anti-PARP14 (C) Co-immunoprécipitation de GFP-PARP14 et HA-ΔNp73α surexprimés dans les HEK293T utilisant les billes d'agaroses couplées à l'anticorps anti-HA. (A-C) Les analyses ont été effectuées sur gel SDS PAGE 8% puis analysés par Western blot à l'aide des anticorps dirigés contre l'étiquette HA, p73, PARP14, E2F4, p130.

suivant le protocole mis au point par mon collègue Valerio Taverniti (décrit dans Taverniti/Krynska et al. 2023 – Annexe 8).

L'extrait nucléaire des 38HK HA- Δ Np73 α a été ensuite fractionné sur un gradient de 10% à 50% de saccharose. La migration sur gradient de saccharose permet de séparer les complexes natifs en fonction de leur poids moléculaire. Chaque fraction du gradient a été incubée avec des billes conjuguées à un anticorps anti-HA. Par cette méthode, V. Taverniti a montré que l'anticorps HA co-précipite Δ Np73 α avec PARP14, E2F4 et p130 dans les mêmes fractions (Figure 34A, fractions 9-15). Afin de vérifier si Δ Np73 α , PARP14, E2F4 et p130 forment un complexe unique, nous avons effectué des expériences réciproques en utilisant des anticorps dirigés soit contre la PARP14 endogène soit contre l'E2F4 endogène. Cependant, la dilution engendrée par le fractionnement par saccharose n'a pas permis d'obtenir des résultats clairs. Ainsi, nous avons procédé avec des expériences de co-IP sur les extraits nucléaires non fractionnés. Les résultats montrent que l'anticorps dirigé contre E2F4 co-immunoprécipite Δ Np73 α et p130 mais pas PARP14. De manière cohérente, l'anticorps dirigé contre PARP14 co-immunoprécipite Δ Np73 α mais pas E2F4 et p130 (Figure 34B). Par la suite, nous avons surexprimé de manière transitoire PARP14 fusionné à la GFP (GFP-PARP14) et HA- Δ Np73 α dans les cellules HEK293T. Les extraits cellulaires ont été incubés avec des billes d'agaroses couplés à l'anticorps HA. Les résultats montrent que Δ Np73 α est capable de co-immunoprécipiter PARP14, validant ainsi l'interaction entre Δ Np73 α et PARP14 (Figure 34C). L'ensemble de ces résultats suggère qu'il y aurait deux complexes indépendants, c'est à dire Δ Np73 α -E2F4/p130 d'une part et Δ Np73 α -PARP14 d'autre part.

Il a été démontré que PARP14 fonctionne comme cofacteur dans la régulation de la transcription. De ce fait, nous avons voulu analyser par la suite l'interaction Δ Np73 α -PARP14 au niveau de la chromatine. Pour cela, j'ai optimisé le protocole de Valerio Taverniti afin d'obtenir uniquement un extrait correspondant aux protéines présentes au niveau de la chromatine. L'optimisation de ce protocole est décrite dans la section « Matériel et Méthode », tandis que le protocole détaillé se trouve dans l'annexe 4A.

Les extraits nucléaires solubles et les extraits de la chromatine des 38HK HA- Δ Np73 α ont été fractionnés par gradient de saccharose. L'analyse par Western blot de ces fractions montre que Δ Np73 α et PARP14 sont plus abondantes dans l'extrait chromatique en comparaison à

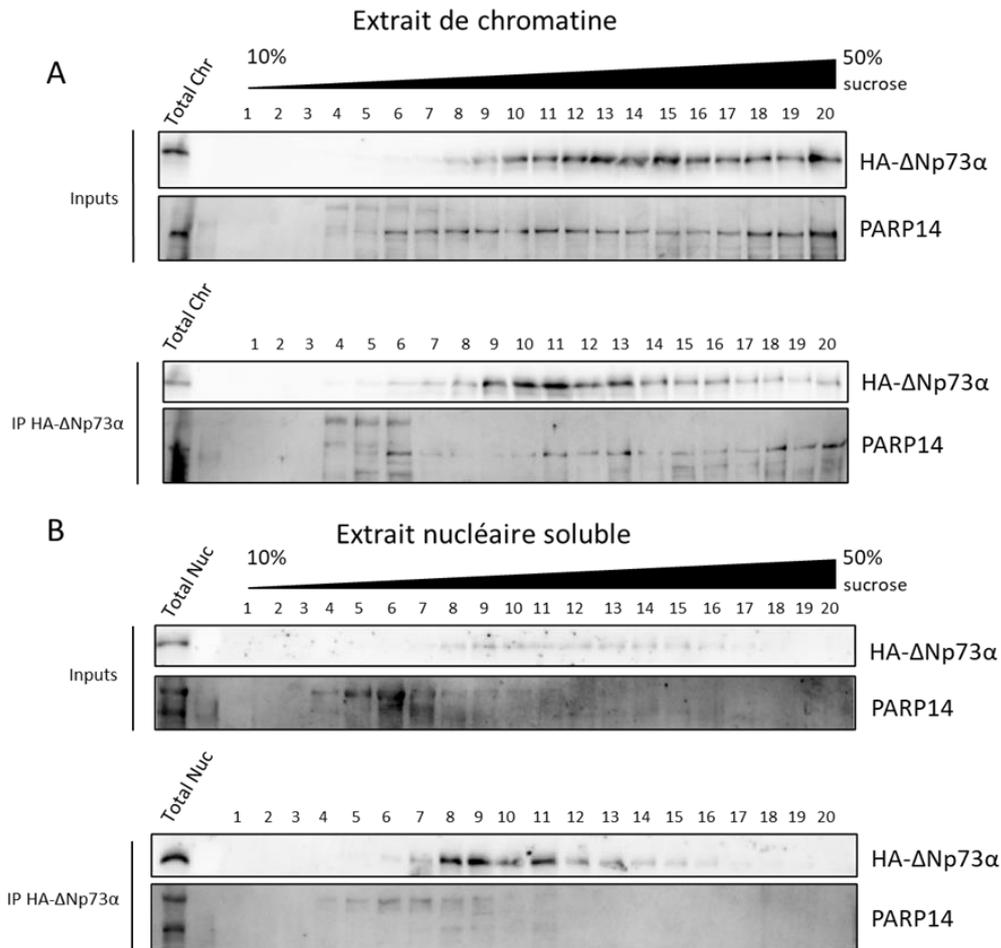


Figure 35. Immunoprécipitations sur des extraits de protéines associées à la chromatine (A) ou présentes dans la fraction soluble du noyau (B) des 38HK HA-ΔNp73α. (A-B) En haut : fractionnement par gradient de saccharose. En bas : immunoprécipitations des fractions du gradient utilisant des billes d'agaroses couplées à un anticorps anti-HA. Les extraits totaux de chromatine (A – Total Chr) ou du noyau (B – Total Nuc) ont été chargés sur le même gel SDS-PAGE 8% comme référence de la migration des protéines. L'analyse par Western blot a été réalisée en incubant les membranes avec les anticorps anti-PARP14 et anti-HA.

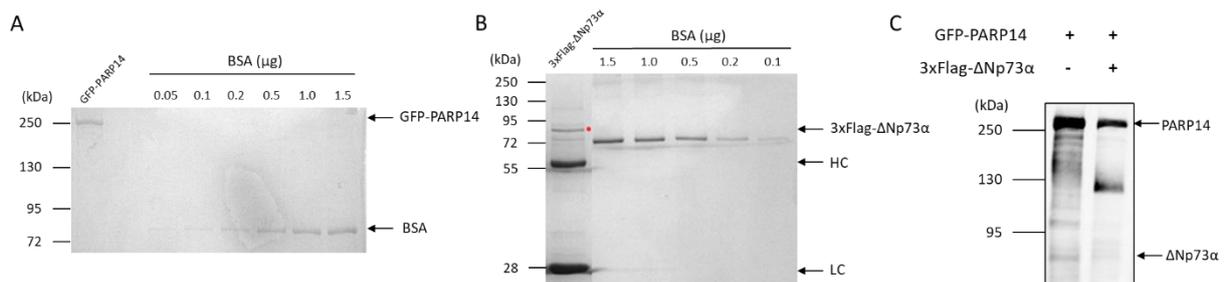


Figure 36. Réaction de MARYlation in vitro. (A) GFP-PARP14 a été exprimée dans les HEK293T puis purifiée en utilisant des billes GFP-Trap® (Chromoteck). Des concentrations connues de BSA ont été utilisés comme standard. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. (B) 3xFlag-ΔNp73α a été exprimé dans les HEK293T puis purifié en utilisant des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-3xFlag. L'astérisque rouge indique la protéine 3xFlag-ΔNp73α. Les chaînes lourdes (HC) et les chaînes légères (LC) de l'anticorps anti-Flag sont aussi indiquées. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie (C) Les protéines GFP-PARP14 et 3xFlag-ΔNp73α partiellement purifiées par immunoprécipitation ont été ensuite incubées en présence de substrat NAD⁺ biotinylé et analysées sur gel SDS-PAGE 8%. L'analyse par Western blot a été réalisé en utilisant la streptavidine conjuguée à Alexa-Fluor 488. La migration de ΔNp73α est indiquée par une flèche.

l'extrait nucléaire soluble (Figure 35A et B en haut). Ensuite, les fractions du gradient ont été incubées avec les billes conjuguées à l'anticorps anti-HA. L'analyse par Western blot montre que $\Delta Np73\alpha$ co-immunoprécipite PARP14 dans les mêmes fractions de l'extrait chromatique, indiquant que ces deux partenaires interagissent au niveau de la chromatine, potentiellement afin de réguler la transcription (Figure 35A et B en bas).

3. Analyse d'activité enzymatique

PARP14 est une enzyme capable de conjuguer le mono(ADP-ribose) (MAR) à une protéine cible. De plus, PARP14 interagit avec la protéine via son macrodomaine 2 qui reconnaît la modification MAR. Nous avons donc examiné la capacité de PARP14 à modifier $\Delta Np73\alpha$ *in vitro*. Pour cela, PARP14 fusionnée à l'étiquette GFP (GFP-PARP14) et $\Delta Np73\alpha$ fusionnée à l'étiquette 3xFlag (3xFlag- $\Delta Np73\alpha$) ont été exprimées dans les HEK293T. GFP-PARP14 et 3xFlag- $\Delta Np73\alpha$ ont été partiellement purifiées suivant un protocole d'immunoprécipitation à l'aide de billes magnétiques conjuguées à un nanobody dirigé contre la GFP et à un anticorps dirigé contre l'étiquette 3xFlag, respectivement. En s'aidant d'une courbe d'étalonnage avec de la BSA, nous avons estimé que nous obtenons approximativement 1 μ g et 0.4 μ g de PARP14 et $\Delta Np73\alpha$, respectivement à partir d'environ 1,3.10⁶ cellules (Figure 36A et 36B). Les deux protéines purifiées et attachées aux billes ont été co-incubées en présence du substrat NAD⁺ biotinylé. La MARylation a été ensuite révélée par Western Blot à l'aide de la streptavidine couplée à un fluorophore. Les résultats montrent la présence de la modification MAR au niveau de la PARP14, ce qui indique que la construction GFP-PARP14 est catalytiquement active et capable d'auto-MARylation (Figure 36C). Cependant, aucun signal n'est observé pour $\Delta Np73\alpha$, ce qui suggère que PARP14 interagit avec cette protéine mais n'est pas capable de la modifier.

4. Analyses transcriptomiques

PARP14 a été initialement décrite comme modulateur de la transcription ([266](#), [267](#)). J'ai donc commencé par étudier les contributions de PARP14 au niveau de l'expression génique dans la lignée cellulaire 38HK(D3). La déplétion de PARP14 a été effectuée par transfection des 38HK avec des oligonucléotides siRNA. Les cellules ont été récoltées 48 heures après transfection et l'ARN a été extrait. D'abord, les niveaux d'ARNm des gènes identifiés comme cibles du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 (Taverniti/Krynska et al. 2023) ont été comparés en conditions

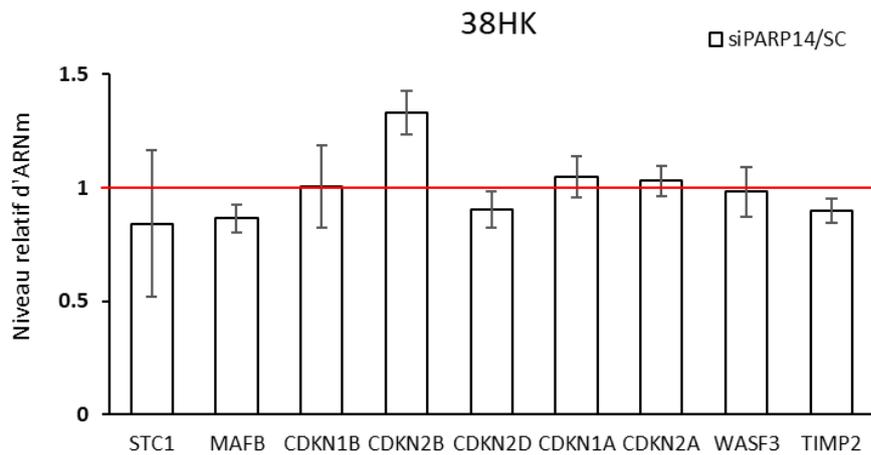


Figure 37. Profil d'expression de gènes co-régulés par $\Delta Np73\alpha$ et E2F4-5 dans les 38HK en conditions de déplétion de PARP14 versus contrôle. Les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT-qPCR par la méthode $\Delta\Delta Ct$ utilisant GAPDH comme gène de référence. La ligne rouge indique les niveaux d'ARNm en condition contrôle (SC). Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes.

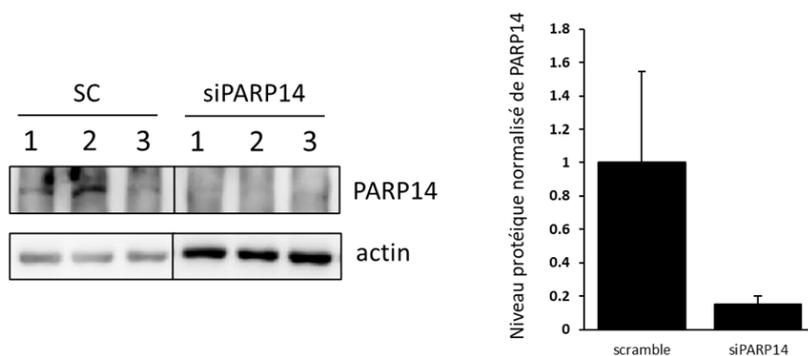


Figure 38. Déplétion de PARP14 dans les 38HK. Niveaux protéiques de PARP14, normalisés à l'actine en condition contrôle (SC) ou de knockdown (siPARP14). Les extraits cellulaires ont été analysés par Western blot après migration sur gel SDS PAGE 8%. Les extraits d'ARN correspondants ont été analysés par RNAseq.

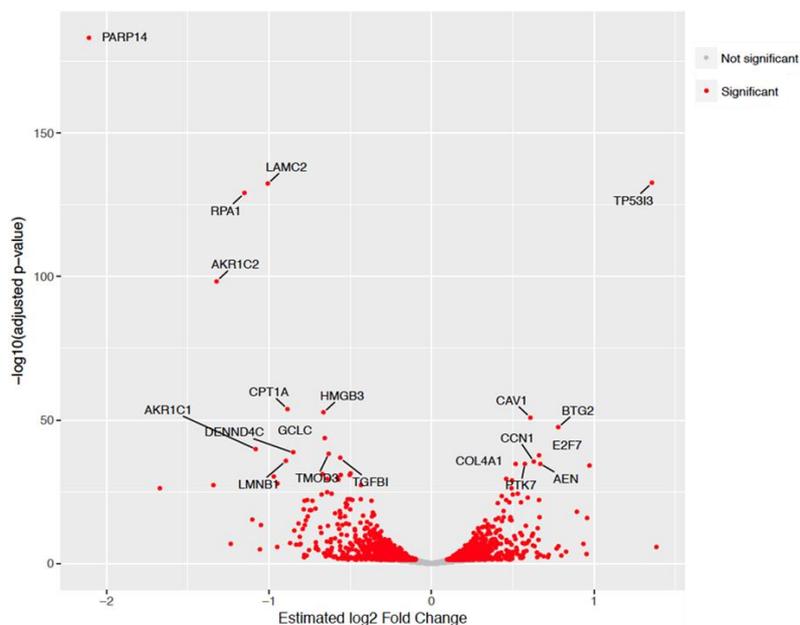


Figure 39. Diagramme en volcan des gènes dérégulés après déplétion de PARP14. Les gènes significatifs ont été sélectionnés en utilisant le seuil de valeur p-ajustée inférieure à 0,05 (rouge).

de déplétion de PARP14 (siPARP14) par rapport à la condition contrôle (SC). Aucun des gènes testés ne semble être affecté par la déplétion de PARP14 (Figure 37). Ceci suggère que PARP14 jouerait un rôle indépendant du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 et est en accord avec les résultats obtenus dans les analyses d'interaction protéine-protéine.

Nous avons donc décidé d'analyser le transcriptome des 38HK en conditions de knockdown PARP14 par rapport au contrôle. Nous avons généré six échantillons SC et six échantillons knockdown. Les trois échantillons contrôles présentant les taux les plus hauts de PARP14 et les trois échantillons knockdown présentant les taux les plus bas de PARP14 ont été sélectionnés pour des analyses d'RNAseq (Figure 38). Les résultats de ces analyses montrent que la déplétion de PARP14 induit une augmentation de l'expression pour 1733 gènes (gènes régulés à la hausse) et a une diminution de l'expression de 1623 gènes (gènes régulés à la baisse) considérant une valeur p-ajustée inférieure ou égale à 0.05 (Figure 39).

Ensuite, nous avons sélectionné les gènes codant pour des protéines dont la différence d'expression entre les conditions knockdown et contrôle correspond à une valeur « Log_2 fold-change » égale ou supérieure à 0.2 (pour les gènes régulés à la hausse) et égale ou inférieure à -0.2 (pour les gènes régulés à la baisse). De cette façon nous avons sélectionné 450 et 556 gènes régulés à la hausse et à la baisse, respectivement. Parmi les gènes régulés à la hausse, nous avons remarqué plusieurs cibles classiques de p53 comme *PIG3* et *CDKN1A* codant pour p21^{CIP1/WAF1}. Comme dans le cas des analyses RNAseq sur $\Delta Np73\alpha$ décrites dans le chapitre 6, nous avons recherché les gènes cibles de p53 recensés dans Fischer et al. (98) parmi les 450 gènes régulés à la hausse. De façon remarquable, 18% de ces gènes (82 gènes) sont des gènes cibles confirmés de p53 (Figure 40A et Tableau 2). En revanche, seulement 2,7% des gènes régulés à la baisse en conditions de déplétion de PARP14 sont des cibles de p53. Dès lors nous avons décidé de vérifier le niveau de p53 dans les extraits protéiques totaux correspondant aux réplicas dont l'ARN a été utilisé pour les analyses RNA-seq PARP14 KD (Figure 40B). Nous remarquons qu'il y a une nette augmentation de l'expression de p53 en condition de déplétion de PARP14 (Figure 40C) Ceci indique que PARP14 agit en tant que répresseur des gènes de la voie de p53 dans les 38HK et régulant les niveaux protéiques de p53.

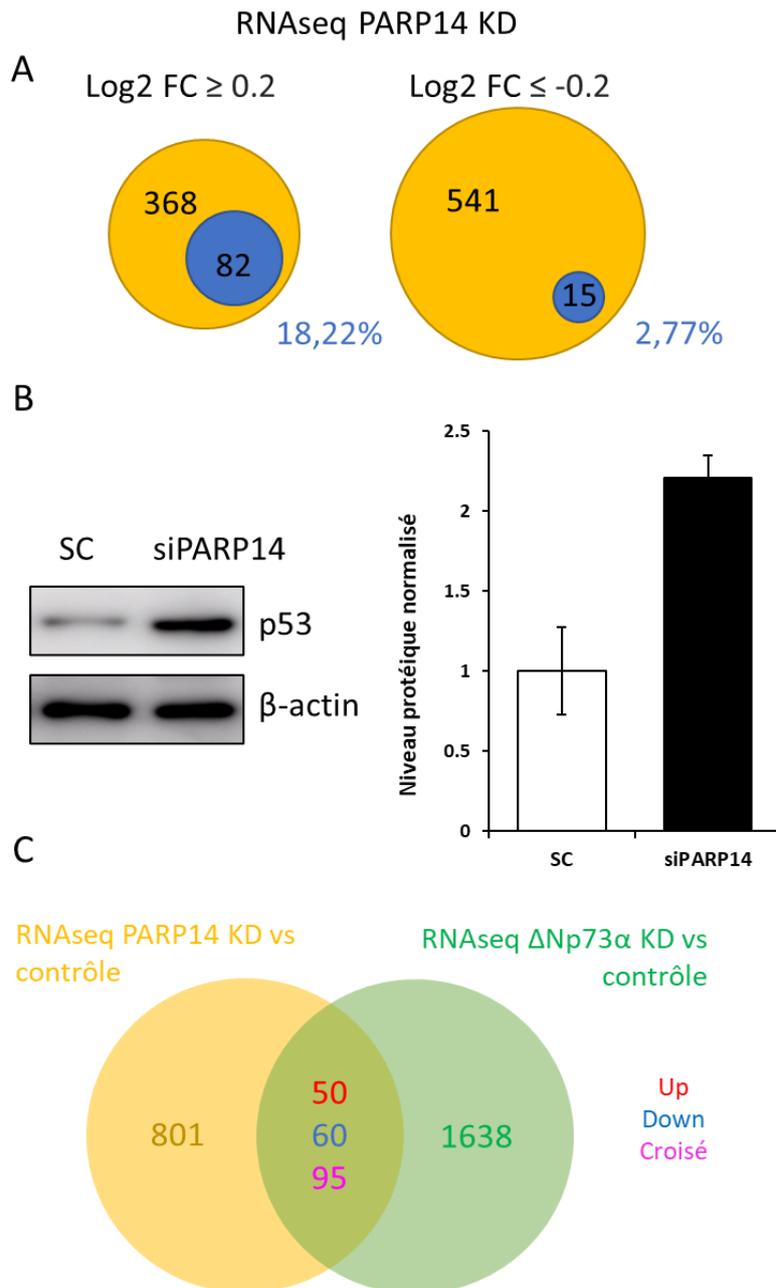


Figure 40. Analyse des gènes dont l'expression est régulé par PARP14. (A) Diagramme de Venn de gènes régulés à la hausse ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 0.2$, gauche) et à la baisse ($\text{Log}_2 \text{FC} \leq -0.2$, droite) après déplétion de PARP14. Bleu : gènes cibles de p53 ; jaune : autres gènes. Le nombre des gènes dans chaque ensemble est indiqué. La pourcentage des gènes cibles de p53 dans chaque ensemble est indiquée en bleu. (B) Gauche : analyse par Western blot de l'expression de p53 en conditions de déplétion de PARP14 versus contrôle. Droite : quantification des niveaux protéiques de p53. Les données correspondent aux valeurs moyennes et à l'écart type dérivées de trois expériences indépendantes. (C) Diagrammes de Venn représentant l'ensemble de gènes dérégulés après déplétion de PARP14 (en jaune) ou de $\Delta\text{Np73}\alpha$ (en vert). Le nombre de gènes régulés à la hausse ou à la baisse est indiqué en rouge et bleu, respectivement. Le nombre de gènes qui sont communs aux deux dataset mais ne suivent pas la même tendance de sousrégulation ou surrégulation est indiqué en violet.

Tableau 2 Gènes cibles de p53 régulés à la hausse en condition de knockdown de PARP14

| Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée | Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée | Gène | Log2 FC | Valeur P ajustée |
|-----------------|---------|------------------|-----------------|---------|------------------|-----------------|---------|------------------|
| <i>TP53I3</i> | 1.36 | 2.43E-133 | <i>TP53INP1</i> | 0.40 | 1.43E-07 | <i>DUSP5</i> | 0.28 | 0.0001 |
| <i>CYFIP2</i> | 0.89 | 8.84E-19 | <i>HHAT</i> | 0.40 | 0.0063 | <i>SERPINB5</i> | 0.28 | 1.86E-10 |
| <i>SCN2A</i> | 0.80 | 0.0017 | <i>EI24</i> | 0.39 | 6.91E-16 | <i>SDC4</i> | 0.27 | 1.83E-10 |
| <i>BTG2</i> | 0.78 | 3.97E-48 | <i>SESN1</i> | 0.39 | 4.01E-07 | <i>POLH</i> | 0.27 | 3.24E-06 |
| <i>AEN</i> | 0.67 | 1.68E-35 | <i>DRAM1</i> | 0.39 | 2.99E-09 | <i>MCC</i> | 0.27 | 1.86E-08 |
| <i>FDXR</i> | 0.67 | 1.09E-16 | <i>SPATA18</i> | 0.38 | 4.66E-07 | <i>PARD6G</i> | 0.27 | 0.0027 |
| <i>E2F7</i> | 0.66 | 2.42E-38 | <i>RPS27L</i> | 0.38 | 2.74E-09 | <i>PCBP4</i> | 0.27 | 0.0007 |
| <i>PLCL2</i> | 0.65 | 0.0001 | <i>PPM1D</i> | 0.38 | 1.40E-07 | <i>LIMK2</i> | 0.27 | 8.01E-07 |
| <i>PIDD1</i> | 0.62 | 5.63E-11 | <i>DDB2</i> | 0.38 | 1.52E-13 | <i>EDA2R</i> | 0.26 | 0.0177 |
| <i>CAV1</i> | 0.61 | 1.31E-51 | <i>PHPT1</i> | 0.37 | 7.36E-09 | <i>BCL2L1</i> | 0.26 | 4.24E-07 |
| <i>GLS2</i> | 0.59 | 9.98E-24 | <i>FBXW7</i> | 0.36 | 3.09E-08 | <i>LIF</i> | 0.26 | 0.0024 |
| <i>PRDM1</i> | 0.59 | 8.57E-08 | <i>PLK3</i> | 0.36 | 1.26E-07 | <i>BAX</i> | 0.26 | 1.34E-06 |
| <i>ACER2</i> | 0.57 | 9.94E-05 | <i>ANKRA2</i> | 0.36 | 1.00E-05 | <i>EFNB1</i> | 0.25 | 0.0003 |
| <i>ABCA12</i> | 0.56 | 8.98E-08 | <i>ZNF337</i> | 0.35 | 5.04E-06 | <i>PPM1J</i> | 0.25 | 0.0161 |
| <i>MYLK</i> | 0.56 | 1.54E-10 | <i>PTPRU</i> | 0.35 | 2.30E-11 | <i>DUSP14</i> | 0.25 | 0.0009 |
| <i>GPC1</i> | 0.50 | 0.0008 | <i>EBI3</i> | 0.34 | 0.0303 | <i>TEP1</i> | 0.23 | 8.93E-07 |
| <i>PLTP</i> | 0.50 | 1.62E-29 | <i>ZNF385A</i> | 0.33 | 1.31E-08 | <i>HES2</i> | 0.23 | 0.0233 |
| <i>LACC1</i> | 0.49 | 2.83E-07 | <i>PTAFR</i> | 0.33 | 9.93E-05 | <i>DGKA</i> | 0.23 | 2.75E-07 |
| <i>PLCXD2</i> | 0.48 | 7.38E-05 | <i>CLP1</i> | 0.33 | 0.0023 | <i>NLRP1</i> | 0.22 | 8.45E-05 |
| <i>TRIML2</i> | 0.46 | 2.33E-05 | <i>CES2</i> | 0.33 | 1.86E-08 | <i>CMBL</i> | 0.22 | 3.19E-06 |
| <i>SERPINE1</i> | 0.46 | 9.00E-23 | <i>CSF1</i> | 0.32 | 3.66E-06 | <i>NADSYN1</i> | 0.21 | 0.0010 |
| <i>XPC</i> | 0.43 | 1.52E-15 | <i>APOBEC3C</i> | 0.32 | 1.19E-13 | <i>BTBD10</i> | 0.21 | 0.0013 |
| <i>ZNF79</i> | 0.42 | 0.0003 | <i>VCAN</i> | 0.32 | 2.27E-10 | <i>CDIP1</i> | 0.21 | 0.0169 |
| <i>P3H2</i> | 0.42 | 2.31E-10 | <i>MAST4</i> | 0.31 | 4.08E-11 | <i>TMEM63B</i> | 0.21 | 0.0008 |
| <i>TRIAP1</i> | 0.42 | 2.38E-12 | <i>RGS16</i> | 0.30 | 0.0353 | <i>ZNF561</i> | 0.21 | 0.0053 |
| <i>ETV7</i> | 0.41 | 0.0305 | <i>ACTA2</i> | 0.30 | 0.0018 | <i>RRM2B</i> | 0.21 | 0.0118 |
| <i>CD82</i> | 0.41 | 1.87E-16 | <i>COL7A1</i> | 0.29 | 1.22E-07 | | | |
| <i>FAS</i> | 0.40 | 3.87E-12 | <i>TRIM22</i> | 0.28 | 0.0002 | | | |

Dans un deuxième temps, j'ai comparé la liste des gènes dérégulés par la déplétion de PARP14 avec celle des gènes dérégulés par la déplétion de Δ Np73 α (voir Chapitre 6). L'intersection de ces deux listes dénombre 50 en commun qui sont régulés à la hausse et 60 gènes en commun régulés à la baisse (Tables 3 et 4 et Figure 40C). Parmi les gènes communs régulés à la hausse, nous retrouvons seulement 10 gènes cibles de p53 (*DUSP5* ; *ZNF79* ; *CSF1* ; *ZNF385A* ; *RGS16* ; *TEP1* ; *PLCXD2* ; *CES2* ; *EFNB1* ; *SERPINE1*). Ceci est très probablement lié à la sous-estimation des gènes cibles de p53 dans les analyses RNAseq de Δ Np73 α . En effet, p53 ne serait pas capable d'activer la transcription de ces gènes même en conditions de déplétion de Δ Np73 α . Ceci est lié probablement à une potentielle activité inhibitrice de PARP14. De plus, lors d'une analyse par Western blot d'extraits des 38HK, nous avons constaté que la déplétion de PARP14

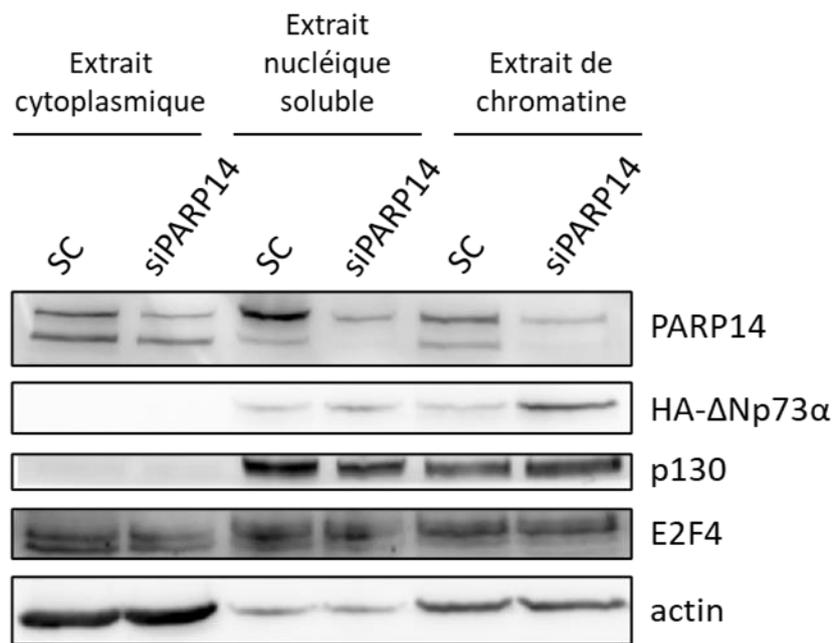


Figure 41. Distribution de PARP14, ΔNp73α, p130 et E2F4 dans les fractions solubles du cytoplasme, du noyau et de la chromatine des cellules 38HK. Les protéines ont été migrées sur gel SDS-PAGE 10% et analysées par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre PARP14, l'étiquette anti-HA, p130 et E2F4.

augmente significativement le niveau de $\Delta Np73\alpha$ associé à la chromatine (Figure 41). Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation des niveaux de p53 en conditions de déplétion de PARP14, ce qui augmenterait la transcription l'isoforme $\Delta Np73\alpha$. En revanche, la déplétion de PARP14 ne semble pas affecter les autres partenaires de $\Delta Np73\alpha$, à savoir E2F4 et p130. Une augmentation de $\Delta Np73\alpha$ pourrait donc compenser les effets de la déplétion de PARP14 au niveau des gènes régulés par $\Delta Np73\alpha$.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus indiquent que PARP14 maintient un niveau bas de p53. Cependant, il est nécessaire de vérifier si PARP14 agit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Enfin, il est probable que ces analyses ne permettent d'identifier qu'une partie de gènes co-régulés par $\Delta Np73\alpha$ et PARP14 et qui seraient des cibles potentielles du complexe protéine-protéine $\Delta Np73\alpha$ -PARP14.

Tableau 3 Gènes régulés à la hausse en conditions de déplétion de PARP14 versus contrôle ou de Δ Np73 α versus contrôle.

| Gène | Log2 FC PARP14 KD | Valeur p ajustée | Log2 FC Δ Np73 α KD | Valeur p ajustée | Gène | Log2 FC PARP14 KD | Valeur p ajustée | Log2 FC Δ Np73 α KD | Valeur p ajustée |
|-----------------|----------------------|---------------------|---|---------------------|-----------------|----------------------|---------------------|---|---------------------|
| <i>CYP2S1</i> | 0.33 | 6.82E-08 | 0.26 | 0.0438 | <i>COL27A1</i> | 0.26 | 3.93E-05 | 0.56 | 0.0002 |
| <i>TMEM40</i> | 0.35 | 8.46E-05 | 0.31 | 0.0051 | <i>DUSP5</i> | 0.28 | 0.0001 | 0.22 | 0.0093 |
| <i>EFNB1</i> | 0.25 | 0.0003 | 0.31 | 0.0283 | <i>ITGA5</i> | 0.35 | 4.80E-12 | 0.37 | 0.0002 |
| <i>ABCA1</i> | 0.26 | 0.0009 | 0.55 | 1.71E-07 | <i>CELSR3</i> | 0.24 | 0.0033 | 0.57 | 0.0013 |
| <i>PRDM1</i> | 0.59 | 8.57E-08 | 0.34 | 0.0240 | <i>SERPINE1</i> | 0.46 | 9.00E-23 | 0.23 | 0.0255 |
| <i>TNC</i> | 0.21 | 0.0022 | 0.49 | 1.06E-08 | <i>ZNF79</i> | 0.42 | 0.0003 | 0.27 | 0.0343 |
| <i>CES2</i> | 0.33 | 1.86E-08 | 0.41 | 0.0002 | <i>ITPKC</i> | 0.23 | 0.0002 | 0.47 | 0.0011 |
| <i>SLC39A13</i> | 0.26 | 2.93E-05 | 0.46 | 0.0206 | <i>ADGRE2</i> | 0.32 | 0.0003 | 0.27 | 0.0065 |
| <i>CES3</i> | 0.50 | 0.0026 | 0.71 | 0.0004 | <i>NLRC5</i> | 0.48 | 0.0016 | 0.63 | 5.19E-05 |
| <i>ZNF512B</i> | 0.28 | 0.0013 | 0.51 | 0.0064 | <i>NEURL2</i> | 1.38 | 2.36E-06 | 1.21 | 0.0019 |
| <i>TEP1</i> | 0.23 | 8.93E-07 | 0.22 | 0.0160 | <i>ADPRHL1</i> | 0.50 | 0.0202 | 0.51 | 0.0460 |
| <i>COL4A2</i> | 0.21 | 1.01E-05 | 0.32 | 0.0343 | <i>ZNF1</i> | 0.26 | 1.50E-09 | 0.24 | 0.0014 |
| <i>KRT17</i> | 0.41 | 1.26E-21 | 1.33 | 3.40E-15 | <i>INHBA</i> | 0.25 | 3.61E-05 | 0.41 | 2.92E-06 |
| <i>RSAD2</i> | 0.24 | 0.0024 | 0.76 | 8.94E-18 | <i>MAMDC4</i> | 0.30 | 0.0191 | 1.01 | 0.0006 |
| <i>ETS1</i> | 0.23 | 1.95E-06 | 0.27 | 0.0036 | <i>CSF1</i> | 0.32 | 3.66E-06 | 0.23 | 0.0371 |
| <i>STX1A</i> | 0.22 | 0.0102 | 0.60 | 0.0042 | <i>CEACAM19</i> | 0.25 | 0.0071 | 0.59 | 0.0006 |
| <i>SLC15A3</i> | 0.41 | 0.0425 | 0.47 | 0.0214 | <i>DHX37</i> | 0.26 | 0.0021 | 0.48 | 0.0108 |
| <i>PLCXD2</i> | 0.48 | 7.38E-05 | 0.49 | 6.67E-05 | <i>ZNF385A</i> | 0.33 | 1.31E-08 | 0.39 | 0.0106 |
| <i>HSH2D</i> | 0.58 | 5.90E-05 | 0.31 | 0.0232 | <i>CACNB1</i> | 0.28 | 0.0162 | 0.42 | 0.0084 |
| <i>GJB4</i> | 0.26 | 0.0136 | 0.35 | 0.0096 | <i>SLC35C1</i> | 0.29 | 0.0014 | 0.37 | 0.0126 |
| <i>IFIT2</i> | 0.29 | 2.45E-06 | 0.53 | 2.10E-10 | <i>EDN1</i> | 0.56 | 0.0086 | 1.05 | 9.51E-10 |
| <i>C1R</i> | 0.31 | 0.0009 | 0.31 | 0.0231 | <i>DDX60L</i> | 0.29 | 0.0001 | 0.24 | 0.0136 |
| <i>OAS1</i> | 0.31 | 4.73E-08 | 0.26 | 0.0007 | <i>SHFL</i> | 0.26 | 0.0122 | 0.34 | 0.0132 |
| <i>ZNF600</i> | 0.34 | 0.0025 | 0.28 | 0.0241 | <i>RGS16</i> | 0.30 | 0.0353 | 0.40 | 0.0100 |
| <i>WWC1</i> | 0.21 | 0.0032 | 0.25 | 0.0152 | <i>PTGS2</i> | 0.33 | 0.0001 | 0.69 | 5.07E-11 |

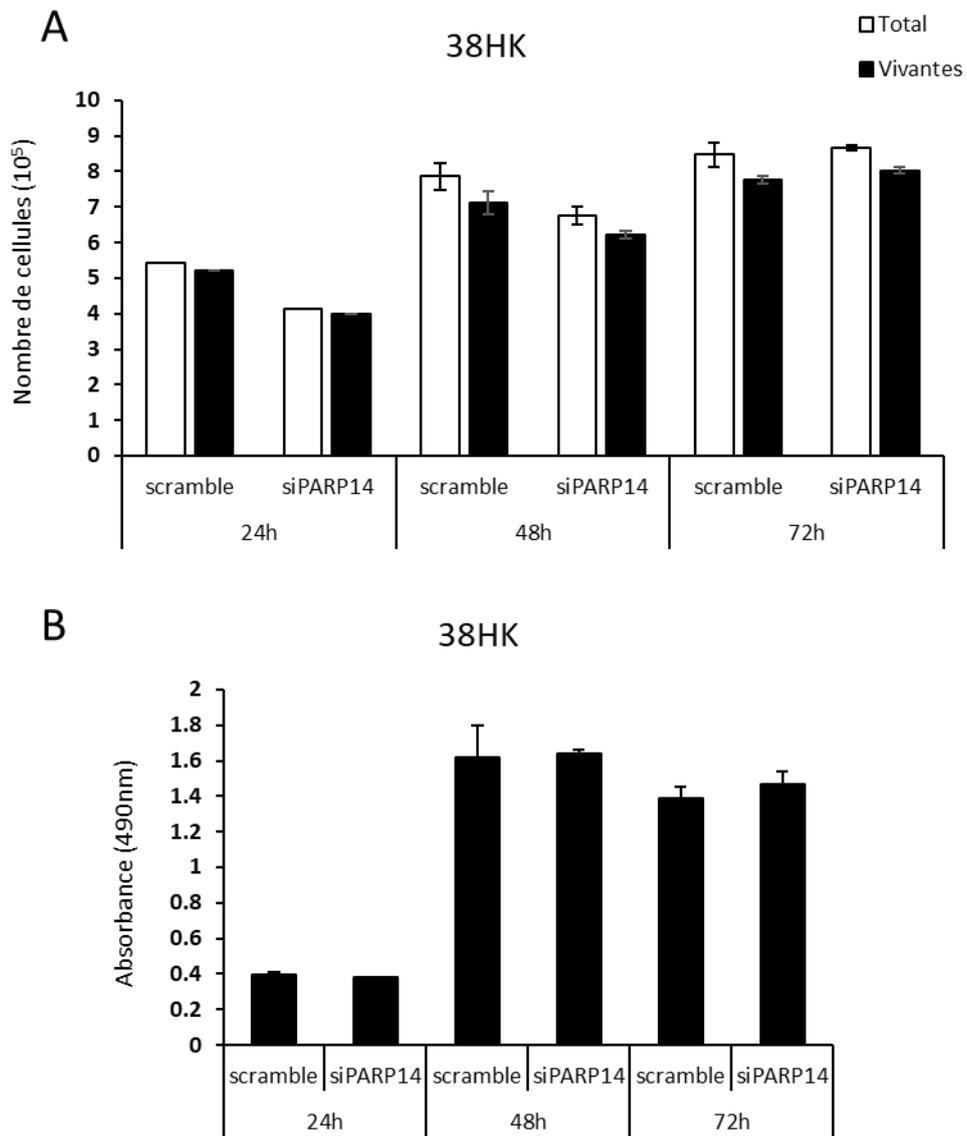


Figure 42. Etudes de viabilité et prolifération cellulaire sur des 38HK en conditions de déplétion de PARP14 versus contrôle. (A) Le taux de viabilité cellulaire après déplétion de PARP14 dans les 38HK a été établie par traitement au bleu de trypan et comptage du nombre de cellules totales par rapport au nombre de cellules colorées. (B) Mesure de la prolifération cellulaire par colorimétrie utilisant le MTS (absorbance à 490 nm).

Tableau 4 Gènes régulés à la baisse en conditions de déplétion de PARP14 versus contrôle ou de Δ Np73 α versus contrôle.

| Gène | Log2 FC PARP14 KD | Valeur p ajustée | Log2FC Δ Np73 α KD | Valeur p ajustée | Gène | Log2 FC PARP14 KD | Valeur p ajustée | Log2 FC Δ Np73 α KD | Valeur p ajustée |
|----------------|-------------------|------------------|----------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| <i>MCM6</i> | -0.41 | 3.81E-10 | -0.27 | 0.0019 | <i>GGH</i> | -0.33 | 2.48E-06 | -0.23 | 0.0437 |
| <i>NEIL3</i> | -0.38 | 9.45E-05 | -0.41 | 0.0002 | <i>MKI67</i> | -0.34 | 8.42E-11 | -0.31 | 0.0009 |
| <i>BHLHE41</i> | -0.31 | 0.0195 | -0.24 | 0.0450 | <i>VAV3</i> | -0.38 | 6.86E-08 | -0.38 | 0.0003 |
| <i>NQO1</i> | -0.32 | 2.63E-11 | -0.25 | 0.0024 | <i>LMNB1</i> | -0.90 | 1.69E-36 | -0.25 | 0.0075 |
| <i>AURKA</i> | -0.24 | 1.45E-05 | -0.38 | 8.96E-06 | <i>DIXDC1</i> | -0.28 | 0.0230 | -0.27 | 0.0284 |
| <i>SLFN11</i> | -0.41 | 0.0001 | -0.60 | 4.48E-05 | <i>CDCA2</i> | -0.30 | 0.0002 | -0.26 | 0.0112 |
| <i>CNTN1</i> | -0.34 | 9.85E-05 | -0.46 | 0.0001 | <i>CIT</i> | -0.35 | 2.15E-09 | -0.21 | 0.0176 |
| <i>TSPAN7</i> | -0.50 | 0.0129 | -0.65 | 0.0417 | <i>CENPE</i> | -0.38 | 1.26E-07 | -0.32 | 0.0013 |
| <i>ACSS2</i> | -0.50 | 5.40E-32 | -0.28 | 0.0020 | <i>ZMYND8</i> | -0.27 | 1.50E-08 | -0.24 | 0.0020 |
| <i>USP28</i> | -0.21 | 0.0007 | -0.28 | 0.0058 | <i>INSIG1</i> | -0.22 | 0.0004 | -0.36 | 0.0007 |
| <i>NDC1</i> | -0.35 | 8.60E-10 | -0.20 | 0.0388 | <i>CENPF</i> | -0.34 | 1.39E-10 | -0.41 | 7.24E-07 |
| <i>PIR</i> | -0.34 | 5.09E-10 | -0.54 | 1.95E-06 | <i>ASB9</i> | -0.50 | 0.0051 | -0.41 | 0.0143 |
| <i>SPAG5</i> | -0.27 | 3.03E-05 | -0.25 | 0.0031 | <i>PTGR1</i> | -0.29 | 4.18E-06 | -0.27 | 0.0049 |
| <i>AGR2</i> | -1.05 | 5.88E-14 | -0.49 | 0.0045 | <i>NDC80</i> | -0.22 | 0.0201 | -0.37 | 0.0005 |
| <i>JADE1</i> | -0.22 | 0.0136 | -0.21 | 0.0431 | <i>DLGAP5</i> | -0.23 | 0.0001 | -0.46 | 4.56E-07 |
| <i>PAQR3</i> | -0.21 | 0.0058 | -0.26 | 0.0453 | <i>TPGS2</i> | -0.38 | 7.67E-12 | -0.27 | 0.0010 |
| <i>RPL39L</i> | -0.27 | 0.0092 | -0.28 | 0.0243 | <i>FAM114A1</i> | -0.23 | 0.0004 | -0.27 | 0.0372 |
| <i>ALDH3A2</i> | -0.34 | 1.02E-13 | -0.42 | 8.02E-06 | <i>PPARG</i> | -0.31 | 5.89E-06 | -0.23 | 0.0200 |
| <i>IDH1</i> | -0.24 | 5.29E-06 | -0.25 | 0.0055 | <i>CBR3</i> | -0.41 | 0.0036 | -0.30 | 0.0262 |
| <i>SCFD1</i> | -0.28 | 4.51E-06 | -0.26 | 0.0049 | <i>KIF14</i> | -0.24 | 0.0004 | -0.35 | 0.0002 |
| <i>PADI3</i> | -0.62 | 0.0014 | -0.83 | 6.19E-05 | <i>RAD54L</i> | -0.24 | 0.0289 | -0.32 | 0.0007 |
| <i>AR</i> | -0.31 | 0.0036 | -0.45 | 0.0022 | <i>HMGB3</i> | -0.66 | 2.65E-53 | -0.32 | 0.0006 |
| <i>RAD21</i> | -0.50 | 1.60E-31 | -0.24 | 0.0114 | <i>CBX5</i> | -0.25 | 4.67E-07 | -0.23 | 0.0182 |
| <i>GMCL1</i> | -0.33 | 2.05E-05 | -0.25 | 0.0291 | <i>AKR1C3</i> | -0.74 | 3.68E-19 | -0.24 | 0.0426 |
| <i>APPL2</i> | -0.47 | 2.50E-08 | -0.20 | 0.0478 | <i>PDHX</i> | -0.21 | 0.0021 | -0.21 | 0.0351 |
| <i>RFC4</i> | -0.29 | 0.0003 | -0.33 | 0.0010 | <i>HMGCS1</i> | -0.23 | 4.67E-07 | -0.42 | 1.50E-05 |
| <i>CYB5A</i> | -0.38 | 4.63E-08 | -0.24 | 0.0116 | <i>FBXO27</i> | -0.30 | 1.94E-06 | -0.31 | 0.0031 |
| <i>GSR</i> | -0.35 | 1.73E-11 | -0.25 | 0.0079 | <i>RGCC</i> | -0.26 | 0.0002 | -0.47 | 2.22E-06 |
| <i>PRPS1</i> | -0.23 | 0.0001 | -0.24 | 0.0099 | <i>CLCA2</i> | -0.35 | 0.0007 | -0.79 | 2.44E-08 |
| <i>ASPH</i> | -0.36 | 1.85E-18 | -0.22 | 0.0249 | <i>DSCC1</i> | -0.26 | 0.0013 | -0.29 | 0.0094 |

5. Analyses phénotypiques

Afin d'évaluer l'effet de PARP14 sur la prolifération et la viabilité cellulaire, des analyses basées sur deux approches colorimétriques complémentaires ont été effectuées, la première étant le MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (Figure 42B) et la deuxième le Bleu de Trypan (Figure 42A). Le MTS est un indicateur du métabolisme cellulaire, corrélé à son état prolifératif. Le Bleu de Trypan est une

solution qui colore les cellules dont la membrane est rompue, indiquant ainsi celles qui sont mortes. Nous remarquons que la déplétion de PARP14 n'affecte pas de façon notable le niveau de l'absorbance après traitement au MTS (Figure 42B), ni le nombre de cellules colorées au Bleu de Trypan (Figure 42A). Ainsi, la déplétion de PARP14 seule ne produit aucun effet sur la viabilité cellulaire.

6. Conclusions

A partir des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- (i) La transformation par l'E6/E7 du HPV38 augmente l'expression de PARP14
- (ii) L'isoforme $\Delta Np73\alpha$ contribue à stabiliser les niveaux de PARP14
- (iii) $\Delta Np73\alpha$ -PARP14 forment un complexe au niveau de la chromatine
- (iv) PARP14 n'est pas capable de modifier $\Delta Np73\alpha$
- (v) PARP14 maintient les niveaux bas de p53.

Cependant les analyses transcriptionnelles décrites ici ne permettent pas de cartographier l'ensemble des gènes co-régulés par $\Delta Np73\alpha$ et PARP14. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires de ChIP-seq.

PARTIE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130

Il a été largement montré qu'à travers des interactions protéine-protéine, certains facteurs de transcription sont capables de rediriger d'autres facteurs sur des sites spécifiques ([287-289](#)). $\Delta Np73\alpha$ est connue comme inhibiteur dominant négatif de la voie de signalisation du suppresseur de tumeur p53. Cependant, les partenaires protéiques associés à l'activité inhibitrice de la transcription de $\Delta Np73\alpha$ n'ont pas été étudiés jusqu'à présent. Les résultats décrits dans les chapitres 5 et 6 de cette thèse montrent que $\Delta Np73\alpha$ interagit avec E2F4/p130 afin de former un complexe répressif de la transcription en se liant sur des promoteurs de gènes spécifiques.

La caractérisation du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 repose en grande partie sur le modèle cellulaire viral constitué de kératinocytes de prépuce humain transformés par les protéines E6 et E7 du virus β HPV38 (38HK). Ce complexe a été identifié dans les 38HK par des analyses protéomiques validées par des expériences de gradient de saccharose couplées à la co-immunoprécipitation. Suivant la même approche, nous avons également montré que ce complexe est présent dans deux lignées cellulaires cancéreuses HPV-négatives qui surexpriment $\Delta Np73\alpha$.

E2F4 est connu pour faire partie avec p130 du complexe répressif DREAM nécessaire au maintien de la quiescence des cellules. Fait intéressant, aucun composant de ce dernier complexe ne co-précipite avec $\Delta Np73\alpha$. Ceci indique que $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130 et DREAM sont des complexes indépendants. Néanmoins, nous n'excluons pas que d'autres partenaires protéiques peuvent également s'associer au complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130.

Les analyses d'interaction protéine-protéine indiquent une interaction directe entre $\Delta Np73\alpha$ et la sous-unité E2F4. Cette interaction d'E2F4 est spécifique à l'isoforme $\Delta Np73\alpha$. En effet, l'interaction d'E2F4 avec $\Delta Np73\alpha$ est plus forte en comparaison à celle avec la protéine TAp73 α . Ceci serait dû à la reconnaissance d'un site de liaison dans la région désordonnée N-terminale de $\Delta Np73\alpha$ qui ne serait pas accessible dans TAp73 α . Nous avons observé que $\Delta Np73\alpha$ est également capable d'interagir avec l'homologue E2F5 en cas de déplétion d'E2F4. Cependant, dans les 38HK le partenaire préférentiel de $\Delta Np73\alpha$ semble être E2F4. Ceci pourrait être dû à des différences d'expression (les niveaux d'E2F4 sont plus élevés par rapport

à ceux d'E2F5) ou à des modifications post-traductionnelles propres à E2F4, qui n'ont pas été examinées dans ce projet.

Dans ce travail nous constatons que les 38HK présentent des niveaux d'expression plus élevés de p130 et pRb par rapport aux kératinocytes transformés par les oncoprotéines E6 et E7 du virus α -HPV16 (16HK). E7 de HPV38 semble avoir une affinité plus faible pour les protéines RB, en comparaison avec E7 de HPV16. Néanmoins, nous observons que la cinétique de dégradation de p130 dans les 38HK est similaire à celle dans les 16HK. D'autre part, la transcription du gène *RBL2* codant pour p130 augmente dans les 38HK par rapport aux HPK primaires, ce qui permet de compenser la dégradation et donc permet le maintien du complexe E2F4/p130. Contrairement au cas des hrHPV α , pRB n'est pas dégradé dans les 38HK, où il est maintenu dans l'état hyperphosphorylé (7).

Nous avons montré que la déplétion d'E2F4-5 mène à une activation de la sénescence prématurée dans les 38HK et dans les cellules cancéreuses exprimant Δ Np73 α . De plus, la surexpression ectopique d'E2F4 ou d'E2F5 dans les cellules 38HK en conditions de déplétion d'E2F4 ou d'E2F5, restore le phénotype initial, excluant ainsi un potentiel effet *OFF-target* lié à l'approche knockdown. En revanche, la déplétion d'E2F4-5 n'augmente pas le nombre de cellules en sénescence dans les cas des HPK primaires ou des 16HK. Dans l'ensemble, ces résultats indiquent qu'E2F4-5 possèdent des propriétés pro-prolifératives dans les cellules sur-exprimant Δ Np73 α , ce qui pourrait être lié à l'interaction protéine-protéine Δ Np73 α -E2F4. En effet, nous avons constaté que l'expression de plusieurs gènes codant pour les inhibiteurs des CDK (*Cdkn*) est réprimé par Δ Np73 α et E2F4-5 dans les 38HK. Notamment, l'expression de *CDKN2B/p15^{INK4b}*, *CDKN1B/p27^{Kip1}* et de *CDKN2D/p19^{INK4d}* est régulée à la hausse en conditions de déplétion de Δ Np73 α ou d'E2F4-5, ce qui suggère que ces gènes seraient des cibles du complexe Δ Np73 α -E2F4/p130. Pour rappel, les produits des gènes *Cdkn* agissent en tant que régulateurs négatifs de la progression du cycle cellulaire en se liant et inhibant les kinases cycline-dépendantes (290-292). De nombreuses études ont montré leurs rôles redondants et compensateurs. p27^{Kip1} est impliquée dans la sénescence *via* la voie de PTEN/p27^{Kip1} (293). Les protéines p15^{INK4b} et p19^{INK4d} font partie de la famille INK4. Plusieurs études ont montré que p15^{INK4b} joue un rôle dans le maintien de la sénescence (294-297). La p19^{INK4d} a été décrite comme associée à la formation des SAHF dans d'autres lignées cellulaires (298). Dans l'ensemble, la répression des inhibiteurs des CDK par le complexe Δ Np73 α -

E2F4/p130 pourrait expliquer l'état hyperphosphorylé de pRb dans les 38HK. Il serait intéressant dès lors d'analyser l'impact de la déplétion d'E2F4-5 sur l'état de phosphorylation de pRb dans les 38HK, en utilisant des anticorps anti-pRb phospho-spécifiques. Enfin, nous pourrions compléter ces résultats par des expériences de type FACS afin de déterminer si la déplétion d'E2F4-5 mène à un arrêt du cycle cellulaire en une phase particulière.

Afin d'identifier des gènes cibles du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130, dans un premier temps nous avons effectué des analyses de RNA-seq en conditions de déplétion d'E2F4-5 *versus* contrôle, qui ont été ensuite complétées par des analyses similaires sur $\Delta Np73\alpha$. Ainsi, nous obtenons une liste de plus d'une centaine de gènes qui sont réprimés par E2F4-5 et $\Delta Np73\alpha$. Un grand nombre de ces gènes sont associés à la régulation de la transcription et codent pour des facteurs de transcription ainsi que pour des facteurs épigénétiques. D'autre part, les analyses RNAseq sur $\Delta Np73\alpha$ ont pointé un autre fait remarquable qui est le faible nombre de gènes-cibles de p53 identifiés. Ceci pourrait être dû à un déficit au niveau de la réactivation de la transcription par p53 en conditions de déplétion de $\Delta Np73\alpha$. Pour cette raison, il serait nécessaire d'effectuer des analyses de CHIP-seq afin de cartographier de façon exhaustive les gènes réprimés par $\Delta Np73\alpha$.

Nous nous sommes aussi focalisés sur un nombre restreint de gènes co-régulés qui ont été validés par RT-qPCR. Nous avons également montré que certains de ces gènes sont aussi co-régulés par $\Delta Np73\alpha$ et E2F4-5 dans les lignées cellulaires cancéreuses qui surexpriment $\Delta Np73\alpha$. En revanche, la déplétion de E2F4-5 dans les HPK primaires n'a montré aucune variation significative des gènes testés, montrant ainsi qu'en absence de $\Delta Np73\alpha$, le complexe E2F4/p130 n'est pas capable de cibler ou inhiber l'expression de ces gènes. En complément de ces analyses nous avons ensuite effectué des analyses CHIP sur trois de ces gènes, à savoir MAFB, STC1 et BTG1. Les résultats montrent qu'E2F4 redirige $\Delta Np73\alpha$ sur les sites E2F RE de ces gènes.

Parmi ces trois gènes étudiés par CHIP, *MAFB* est un gène codant pour une protéine de la famille AP1, qui agit comme activateur ou répresseur de la transcription ([299](#)). Bien qu'il ait été décrit comme un oncogène, MAFB a également été reporté comme un suppresseur de tumeur dans certains contextes cellulaires, en empêchant les fonctions oncogènes de HRAS et BRAF ([300](#)). Le gène *STC1* code pour la Stanniocalcine 1 qui est un facteur SASP sécrété par

les cellules en sénescence ([301](#)). Le produit du gène *BTG1* fait partie de la famille des protéines BTG/TOB (*B cell translocation/transducer of ERBB2*). Premièrement décrit dans les leucémies des cellules B et divers types de lymphomes ([302](#)), ce gène y est communément muté comme dans le cas d'autres suppresseurs de tumeur. Il a été montré que la surexpression de *BTG1* dans les cellules cancéreuses du sein mène à une réduction du niveau des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire inhibant ainsi la prolifération cellulaire et induisant un arrêt en phase G0/G1 ([303](#)).

En plus de ces trois gènes, nous avons aussi validé d'autres gènes impliqués dans l'oncogenèse, à savoir *AJAP1*, *NOTCH3* et *ETS2*. *AJAP1* a été décrit comme régulé à la baisse dans de nombreux types de cancers comme dans les carcinomes de l'endomètre ([304](#)) ou les gliomes ([305](#)). Dans ces derniers, la surexpression promeut l'adhésion cellulaire et diminue l'invasion cellulaire dans la matrice extracellulaire. Le produit du gène *NOTCH3* est exprimé dans les cellules souches en quiescence où il joue le rôle d'inhibiteur de prolifération cellulaire ([306](#)). De plus, la surexpression de ce gène est associée dans presque tous les cas de leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T ([307](#), [308](#)). Enfin, la protéine *ETS2* est une oncoprotéine qui s'associe à la forme mutée de p53 ([309](#), [310](#)). De plus, la déplétion de *ETS2* inhibe l'oncogenèse des carcinomes de l'œsophage. Cependant, l'expression de *ETS2* est réduite dans les adénocarcinomes pulmonaires en comparaison avec les cellules saines, indiquant un rôle potentiel de suppresseur de tumeur qui peut être dépendant du contexte cellulaire ([311](#)).

En conclusion, nous avons identifié un nouveau complexe transcriptionnel qui semble promouvoir l'oncogenèse en favorisant l'inhibition de plusieurs facteurs anti-tumoraux. Cependant, pour une caractérisation exhaustive des fonctions de ce complexe il serait nécessaire d'effectuer des analyses de ChIP-seq.

Interaction $\Delta Np73\alpha$ -PARP14

PARP14 a été identifié comme partenaire de $\Delta Np73\alpha$ par les analyses de protéomique dans les 38HK. Les résultats décrits dans le chapitre 7 constituent un ensemble de données préliminaires sur le rôle de PARP14 dans la dérégulation de la voie de signalisation p53.

Dans la littérature, PARP14 est décrite comme un cofacteur de la transcription régulée par Stat6 dans les macrophages. Néanmoins, les mécanismes d'action de PARP14 au niveau de la transcription des gènes sont encore méconnus. Nos résultats indiquent que la transformation par les protéines E6 et E7 du HPV38 augmente l'expression du gène *PARP14*. De plus, la déplétion de $\Delta Np73\alpha$ engendre une baisse du niveau de PARP14 dans les 38HK. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires afin d'étudier le mécanisme qui est à la base de la stabilisation de PARP14 par $\Delta Np73\alpha$. Il est possible que l'interaction protéine-protéine avec $\Delta Np73\alpha$ protège PARP14 de la dégradation. En effet, grâce à l'optimisation d'un protocole d'extraction de protéines, nous avons pu démontrer que PARP14 interagit avec $\Delta Np73\alpha$ au niveau de la chromatine, suggérant ainsi que PARP14 jouerait un rôle dans la régulation de la transcription.

Les analyses par gradient de saccharose/co-IP montrent que $\Delta Np73\alpha$ est capable de co-immunoprécipiter E2F4 et PARP14 dans les mêmes fractions, ce qui soulève la question de la participation de PARP14 au sein du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130. Pour répondre à cette question nous avons effectué plusieurs tests d'immunoprécipitation utilisant des anticorps anti-E2F4 et anti-PARP14. Ces expériences se sont avérées techniquement difficiles à cause de la faible concentration des protéines endogènes dans les gradients de saccharose et/ou de la faible spécificité de certains anticorps anti-PARP14. Toutefois, les résultats issus des expériences avec des extraits nucléaires non fractionnés suggèrent que $\Delta Np73\alpha$ forme deux complexes distincts, l'un avec E2F4/p130, et l'autre avec la PARP14. Ceci est en accord avec les résultats issus des analyses d'expression génique, qui montrent que la déplétion de PARP14 ne semble pas affecter l'expression des gènes cibles du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130.

PARP14 catalyse le transfert du Mono-ADP-ribose (MAR) sur une protéine cible et, en même temps, elle est capable d'interagir avec cette protéine cible par l'intermédiaire de son macrodomaine 2 qui reconnaît les modifications MAR. Dans ce travail, nous n'avons pas pu

observer de modification MAR au niveau de $\Delta Np73\alpha$ par PARP14. Ceci pourrait être expliqué par (i) l'absence d'une protéine adaptatrice, qui pourrait être la cible de la modification; (ii) le fait que la modification MAR serait catalysée par un autre membre de la famille PARP, ce qui permettrait l'interaction de la PARP14 avec $\Delta Np73\alpha$; (iii) la présence des contaminants dans les échantillons de 3xFlag- $\Delta Np73\alpha$ utilisés pour les tests, qui pourraient s'associer à $\Delta Np73\alpha$ inhibant ainsi la modification MAR catalysée par la PARP14. De manière générale nous n'avons pas pu montrer que $\Delta Np73\alpha$ est modifié par PARP14 dans un système *in vitro*. Cependant, nous n'excluons pas que ceci peut avoir lieu *in vivo*.

Un résultat majeur de ce travail est la découverte que la déplétion de PARP14 augmente les niveaux de p53 dans les 38HK. Ceci indiquerait que PARP14 réprime p53 probablement en diminuant son niveau protéique, puisque les analyses RNA-seq dans les conditions de knockdown de PARP14 *versus* contrôle ne montrent aucune variation des niveaux d'ARNm du gène *TP53*. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires afin d'examiner si PARP14 induit la dégradation de p53 dans le modèle cellulaire des 38HK.

En accord avec ces résultats, les analyses transcriptomiques montrent que la déplétion de PARP14 induit l'augmentation de l'expression d'un grand nombre de gènes cibles de p53. D'autre part, cette déplétion semble affecter aussi l'accumulation de $\Delta Np73\alpha$ au niveau de la chromatine. Ceci est vraisemblablement lié à l'augmentation des niveaux de p53, qui à son tour, active la transcription de $\Delta Np73\alpha$ dans les 38HK. Nous supposons donc que la déplétion de PARP14 affecte en moindre degré les gènes régulés par $\Delta Np73\alpha$ car cet effet serait compensé par l'augmentation des niveaux de $\Delta Np73\alpha$.

La déplétion de PARP14 dans les 38HK induit l'augmentation de l'expression de certains gènes et la diminution de l'expression d'autres gènes, ce qui est en accord avec les données publiées sur les macrophages ([266](#), [267](#)). Supposant que par son interaction avec $\Delta Np73\alpha$, la PARP14 acquiert des propriétés répressives de la transcription, nous nous sommes focalisés sur les gènes régulés à la hausse en conditions de knockdown de PARP14. La comparaison avec les analyses de RNA-seq sur $\Delta Np73\alpha$ décrites plus haut indiquent une cinquantaine de gènes réprimés par PARP14 et $\Delta Np73\alpha$. En particulier les gènes *ZNF385A* et *TEP1*, sont associés à l'oncogenèse. Le produit du gène *ZNF385A*, connue également sous le nom HZF, est une protéine en doigt de zinc qui cible le 3'UTR de p53 afin de contrôler son export nucléaire ([312](#)). La protéine TEP1 est une composante du complexe ribonucléique de la télomérase ([313](#)). Par

les études réalisées dans le laboratoire de Massimo Tommasino, nous savons que le système de la télomérase est perturbé dans les 38HK où les télomères sont extrêmement courts et instables (314). Dans les 38HK, le gène hTERT est surexprimé par l'intermédiaire de $\Delta Np73\alpha$, ce qui mène à l'immortalisation cellulaire. Malgré cette surexpression, les 38HK présentent une érosion des télomères. Avec les voies de p53 et RB déficientes, ces cellules accumulent dès lors des aberrations génomiques à chaque division cellulaire. En effet, la présence de télomères courts et instables peut mener à un phénomène de fusion de terminaisons de chromatines, ainsi qu'à une mitose multipolaire (314). L'inhibition de l'expression de TEP1 par le complexe PARP14- $\Delta Np73\alpha$ pourrait donc favoriser l'érosion des télomères dans les 38HK. Bien que nous nous sommes uniquement focalisés sur le rôle de PARP14 dans la transcription de gènes, il est important de mentionner que PARP14 est capable de se lier et stabiliser les ARNm, notamment dans le cas de l'ARNm de la cycline D1 (315), ce qui est lié à la présence d'un domaine RRM dans la PARP14. D'autre part, nos données de RNAseq n'ont pas montré d'effet de PARP14 sur le taux d'ARNm de la cycline D1. Ceci pourrait être dû au fait que, comme indiqué par O'Connor et al. (315), la stabilisation du ARNm de la cycline D1 par PARP14 a lieu dans les cellules avec la voie de p53/p21 fonctionnelle et intacte, ce qui n'est pas le cas des 38HK.

Enfin, Mehrotra et al. proposent un modèle où PARP14 agit comme commutateur transcriptionnel en fonction du stimulus (267). En absence de stimuli, PARP14 agit comme répresseur en recrutant les HDAC2 et 3. En présence du signal d'IL-4 et de Stat6 actif, PARP14 devient activateur et est fonctionnelle du point de vue enzymatique. Une PARP14 fonctionnelle semble donc être nécessaire pour que Stat6 se lie de manière efficace à l'ADN. Il est possible qu'une activation complète de la PARP14 dans les 38HK nécessite un stimulus, que dans ce cas pourrait être le rayonnement UV. Il serait donc intéressant de répéter les expériences de transcriptomique en présence des UV et voir si dans ces conditions l'absence de PARP14 affecte les fonctions répressives de $\Delta Np73\alpha$ au niveau des gènes cibles de p53. D'ailleurs, la déplétion de PARP14 ne semble avoir aucun impact sur la prolifération ainsi que la viabilité cellulaire des 38HK. Nous supposons que ceci est lié à l'augmentation des niveaux de p53 en conditions de knockdown de PARP14, ce qui se traduit en une augmentation de la transcription de l'isoforme $\Delta Np73\alpha$. De manière cohérente, il a été montré par Romero-Medina et al. 2020 que p53 est un facteur essentiel à la survie des 38HK (69). Ainsi, nous

proposons de réaliser des expériences additionnelles de prolifération et de viabilité cellulaire en rajoutant le rayonnement UV à la déplétion de PARP14.

Pour conclure, l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse indiquent que PARP14 agit en tant que répresseur de la voie du suppresseur de tumeur p53 dans les 38HK, tout en renforçant l'activité inhibitrice de $\Delta Np73\alpha$. Comme dans le cas du complexe $\Delta Np73\alpha$ -E2F4/p130, l'identification des gènes régulés par le complexe $\Delta Np73\alpha$ -PARP14 nécessite des analyses de CHIP-seq. En outre, des expériences classiques de CHIP en conditions de déplétion de PARP14 *versus* contrôle seront nécessaires afin d'évaluer les contributions de l'interaction protéine-protéine entre $\Delta Np73\alpha$ et PARP14 sur l'expression de ces gènes.

PARTIE 6. REFERENCES

1. Rector A, Van Ranst M. 2013. Animal papillomaviruses. *Virology*. 445(1-2):213-23. **PMID: 23711385**
2. Truchado DA, *et al.* 2018. Genomic characterization of the first oral avian papillomavirus in a colony of breeding canaries (*Serinus canaria*). *Vet Res Commun*. 42(2):111-20. **PMID: 29446002**
3. Woolford L, *et al.* 2007. A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (*Perameles bougainville*) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae. *J Virol*. 81(24):13280-90. **PMID: 17898069**
4. Trus BL, *et al.* 1997. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 4(5):413-20. **PMID: 9145113**
5. Ahmels M, *et al.* 2022. Next generation L2-based HPV vaccines cross-protect against cutaneous papillomavirus infection and tumor development. *Front Immunol*. 13:1010790. **PMID: 36263027**
6. Della Fera AN, *et al.* 2021. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 13(2). **PMID: 33672465**
7. Viarisio D, *et al.* 2017. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Curr Opin Virol*. 26:56-62. **PMID: 28778034**
8. Van Doorslaer K. 2013. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*. 445(1-2):11-20. **PMID: 23769415**
9. Egawa N, *et al.* 2015. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 7(7):3863-90. **PMID: 26193301**
10. Aksoy P, *et al.* 2014. HPV16 infection of HaCaTs is dependent on beta4 integrin, and alpha6 integrin processing. *Virology*. 449:45-52. **PMID: 24418536**
11. Hampson IN, *et al.* 2020. Potential Effects of Human Papillomavirus Type Substitution, Superinfection Exclusion and Latency on the Efficacy of the Current L1 Prophylactic Vaccines. *Viruses*. 13(1):22. **PMID: 33374445**
12. Zanier K, *et al.* 2012. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. *Structure*. 20(4):604-17. **PMID: 22483108**
13. Zanier K, *et al.* 2013. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science*. 339(6120):694-8. **PMID: 23393263**
14. Liu X, *et al.* 2006. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*. 281(1):578-86. **PMID: 16249186**
15. Bello-Rios C, *et al.* 2021. Modeling and Molecular Dynamics of the 3D Structure of the HPV16 E7 Protein and Its Variants. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(3):1400. **PMID: 33573298**
16. Chemes LB, *et al.* 2012. Sequence evolution of the intrinsically disordered and globular domains of a model viral oncoprotein. *PLoS One*. 7(10):e47661. **PMID: 23118886**
17. Davey NE, *et al.* 2011. How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem Sci*. 36(3):159-69. **PMID: 21146412**
18. Kaur P, *et al.* 1989. immortalization of primary human epithelial cells by cloned cervical carcinoma DNA containing human papillomavirus type 16 E6/E7 open reading frames. *J Gen Virol*. 70 (Pt 5):1261-6. **PMID: 2543780**

19. Choo CK, *et al.* 1999. Immortalization of human prostate epithelial cells by HPV 16 E6/E7 open reading frames. *Prostate*. 40(3):150-8. **PMID: 10398276**
20. Choi M, *et al.* 2014. Roles of the PDZ domain-binding motif of the human papillomavirus type 16 E6 on the immortalization and differentiation of primary human foreskin keratinocytes. *Virus Genes*. 48(2):224-32. **PMID: 24293186**
21. Kanda T, *et al.* 1988. Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology*. 165(1):321-5. **PMID: 2838969**
22. Phelps WC, *et al.* 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. 53(4):539-47. **PMID: 2836062**
23. Vousden KH, *et al.* 1988. The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res*. 3(2):167-75. **PMID: 2852339**
24. Watanabe S, Yoshiike K. 1988. Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int J Cancer*. 41(6):896-900. **PMID: 2836322**
25. Bedell MA, *et al.* 1989. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol*. 63(3):1247-55. **PMID: 2536832**
26. Tanaka A, *et al.* 1989. Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 63(3):1465-9. **PMID: 2536847**
27. Munger K, *et al.* 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 63(10):4417-21. **PMID: 2476573**
28. Hawley-Nelson P, *et al.* 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 8(12):3905-10. **PMID: 2555178**
29. Singh D, *et al.* 2023. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Glob Health*. 11(2):e197-e206. **PMID: 36528031**
30. Bosch FX, *et al.* 2013. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 31 Suppl 8(0 8):I1-31. **PMID: 24229716**
31. Chellappan S, *et al.* 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(10):4549-53. **PMID: 1316611**
32. Huang PS, *et al.* 1993. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol*. 13(2):953-60. **PMID: 7678696**
33. Boyer SN, *et al.* 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 56(20):4620-4. **PMID: 8840974**
34. Funk JO, *et al.* 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 11(16):2090-100. **PMID: 9284048**
35. Zerfass-Thome K, *et al.* 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 13(11):2323-30. **PMID: 8957073**
36. Arroyo M, *et al.* 1993. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol*. 13(10):6537-46. **PMID: 8413252**

37. Tommasino M, *et al.* 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 8(1):195-202. **PMID: 8380917**
38. Brehm A, *et al.* 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*. 18(9):2449-58. **PMID: 10228159**
39. Longworth MS, Laimins LA. 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 78(7):3533-41. **PMID: 15016876**
40. Martinez-Zapien D, *et al.* 2016. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*. 529(7587):541-5. **PMID: 26789255**
41. Brimer N, *et al.* 2012. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene*. 31(43):4639-46. **PMID: 22249263**
42. Patel D, *et al.* 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. 18(18):5061-72. **PMID: 10487758**
43. Zimmermann H, *et al.* 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*. 73(8):6209-19. **PMID: 10400710**
44. Kumar A, *et al.* 2002. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*. 22(16):5801-12. **PMID: 12138191**
45. Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ. 2006. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*. 151(12):2321-35. **PMID: 16862386**
46. Garnett TO, *et al.* 2006. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. 13(11):1915-26. **PMID: 16528386**
47. Thomas M, Banks L. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 17(23):2943-54. **PMID: 9881696**
48. Gross-Mesilaty S, *et al.* 1998. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(14):8058-63. **PMID: 9653139**
49. Zhang Y, *et al.* 2017. Direct HPV E6/Myc interactions induce histone modifications, Pol II phosphorylation, and hTERT promoter activation. *Oncotarget*. 8(56):96323-39. **PMID: 29221209**
50. Pim D, *et al.* 2012. Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J*. 279(19):3530-7. **PMID: 22805590**
51. Roberts S, *et al.* 2012. The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity proteins. *FEBS J*. 279(19):3549-58. **PMID: 22846345**
52. Huang SM, McCance DJ. 2002. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol*. 76(17):8710-21. **PMID: 12163591**
53. Spitkovsky D, *et al.* 2002. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem*. 277(28):25576-82. **PMID: 11986318**
54. Westrich JA, *et al.* 2017. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res*. 231:21-33. **PMID: 27890631**
55. Karagas MR, *et al.* 2006. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst*. 98(6):389-95. **PMID: 16537831**

56. Viarisio D, *et al.* 2011. E6 and E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002125. **PMID: 21779166**
57. Viarisio D, *et al.* 2018. Beta HPV38 oncoproteins act with a hit-and-run mechanism in ultraviolet radiation-induced skin carcinogenesis in mice. *PLOS Pathogens.* 14(1):e1006783. **PMID: 29324843**
58. Tommasino M. 2017. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res.* 231:128-38. **PMID: 27856220**
59. Caldeira S, *et al.* 2003. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol.* 77(3):2195-206. **PMID: 12525654**
60. Cornet I, *et al.* 2012. Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J Virol.* 86(4):2366-70. **PMID: 22171257**
61. Minoni L, *et al.* 2020. Transforming Properties of Beta-3 Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins. *mSphere.* 5(4). **PMID: 32669468**
62. White EA, *et al.* 2012. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol.* 86(24):13174-86. **PMID: 23015706**
63. White EA, *et al.* 2014. Genus beta human papillomavirus E6 proteins vary in their effects on the transactivation of p53 target genes. *J Virol.* 88(15):8201-12. **PMID: 24850740**
64. Muschik D, *et al.* 2011. Cutaneous HPV23 E6 prevents p53 phosphorylation through interaction with HIPK2. *PLoS One.* 6(11):e27655. **PMID: 22110707**
65. Tan MJ, *et al.* 2012. Cutaneous beta-human papillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(23):E1473-80. **PMID: 22547818**
66. Bedard KM, *et al.* 2008. The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol.* 82(8):3894-902. **PMID: 18256157**
67. Howie HL, *et al.* 2011. Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog.* 7(8):e1002211. **PMID: 21901101**
68. Giampieri S, Storey A. 2004. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer.* 90(11):2203-9. **PMID: 15150558**
69. Romero-Medina MC, *et al.* 2020. Human papillomavirus type 38 alters wild-type p53 activity to promote cell proliferation via the downregulation of integrin alpha 1 expression. *PLoS Pathog.* 16(8):e1008792. **PMID: 32813746**
70. Accardi R, *et al.* 2006. Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of deltaNp73. *EMBO Rep.* 7(3):334-40. **PMID: 16397624**
71. Accardi R, *et al.* 2011. IkkappaB kinase beta promotes cell survival by antagonizing p53 functions through DeltaNp73alpha phosphorylation and stabilization. *Mol Cell Biol.* 31(11):2210-26. **PMID: 21482671**
72. Saidj D, *et al.* 2013. Oncoprotein E7 from beta human papillomavirus 38 induces formation of an inhibitory complex for a subset of p53-regulated promoters. *J Virol.* 87(22):12139-50. **PMID: 24006445**
73. Belyi VA, *et al.* 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(6):a001198. **PMID: 20516129**
74. Rutkowski R, *et al.* 2010. Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(7):a001131. **PMID: 20595397**

75. el-Deiry WS, *et al.* 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1(1):45-9. **PMID: 1301998**
76. Bourdon JC. 2007. p53 Family isoforms. *Curr Pharm Biotechnol.* 8(6):332-6. **PMID: 18289041**
77. Soussi T, Beroud C. 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 1(3):233-40. **PMID: 11902578**
78. Uversky VN. 2016. p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure-Function Continuum Concept. *Int J Mol Sci.* 17(11):1874. **PMID: 27834926**
79. Madhu P, *et al.* 2022. How viral proteins bind short linear motifs and intrinsically disordered domains. *Essays in Biochemistry.* 66(7):935-44. **PMID: 36504386**
80. Solares MJ, *et al.* 2022. High-Resolution Imaging of Human Cancer Proteins Using Microprocessor Materials. *Chembiochem.* 23(17):e202200310. **PMID: 35789183**
81. Solares MJ, Kelly DF. 2022. Complete Models of p53 Better Inform the Impact of Hotspot Mutations. *Int J Mol Sci.* 23(23). **PMID: 36499604**
82. DeHart CJ, *et al.* 2014. Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53. *Mol Cell Proteomics.* 13(1):1-17. **PMID: 24056736**
83. Wen J, Wang D. 2022. Deciphering the PTM codes of the tumor suppressor p53. *J Mol Cell Biol.* 13(11):774-85. **PMID: 34289043**
84. Momand J, *et al.* 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69(7):1237-45. **PMID: 1535557**
85. Haupt Y, *et al.* 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387(6630):296-9. **PMID: 9153395**
86. Kubbutat MH, *et al.* 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 387(6630):299-303. **PMID: 9153396**
87. Marine JC, Jochemsen AG. 2004. Mdmx and Mdm2: brothers in arms? *Cell Cycle.* 3(7):900-4. **PMID: 15254433**
88. Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137(3):413-31. **PMID: 19410540**
89. Wu Y, *et al.* 2014. Phosphorylation of p53 by TAF1 inactivates p53-dependent transcription in the DNA damage response. *Mol Cell.* 53(1):63-74. **PMID: 24289924**
90. Li HH, *et al.* 2007. A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO J.* 26(2):402-11. **PMID: 17245430**
91. Lozano G. 2010. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(4):a001115. **PMID: 20452944**
92. MacPherson D, *et al.* 2004. Defective apoptosis and B-cell lymphomas in mice with p53 point mutation at Ser 23. *EMBO J.* 23(18):3689-99. **PMID: 15343266**
93. Engeland K. 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 29(5):946-60. **PMID: 35361964**
94. Muller GA, *et al.* 2012. The CHR promoter element controls cell cycle-dependent gene transcription and binds the DREAM and MMB complexes. *Nucleic Acids Res.* 40(4):1561-78. **PMID: 22064854**
95. Aksoy O, *et al.* 2012. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev.* 26(14):1546-57. **PMID: 22802529**
96. Goeman F, *et al.* MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 333: Elsevier; 2017. p. 51-90.
97. Sullivan KD, *et al.* 2018. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death & Differentiation.* 25(1):133-43. **PMID: 29125602**

98. Fischer M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 36(28):3943-56. **PMID: 28288132**
99. Brazda V, Fojta M. 2019. The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure. *Int J Mol Sci*. 20(22):5605. **PMID: 31717504**
100. Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25(3):585-621. **PMID: 13905658**
101. Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 37(3):614-36. **PMID: 14315085**
102. d'Adda di Fagagna F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 8(7):512-22. **PMID: 18574463**
103. Roger L, et al. 2021. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci*. 22(23). **PMID: 34884978**
104. Collado M, et al. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 436(7051):642. **PMID: 16079833**
105. Lujambio A. 2016. To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *Bioessays*. 38 Suppl 1:S56-64. **PMID: 27417123**
106. Chen QM, et al. 2000. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. *Biochem J*. 347(Pt 2):543-51. **PMID: 10749685**
107. Tang Y, et al. 2013. Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53beta, an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene*. 32(22):2792-8. **PMID: 22777358**
108. Horikawa I, et al. 2014. Autophagic degradation of the inhibitory p53 isoform Delta133p53alpha as a regulatory mechanism for p53-mediated senescence. *Nat Commun*. 5(1):4706. **PMID: 25144556**
109. Courtois S, et al. 2002. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. 21(44):6722-8. **PMID: 12360399**
110. Benson EK, et al. 2014. p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene*. 33(30):3959-69. **PMID: 24096481**
111. Aliouat-Denis CM, et al. 2005. p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res*. 3(11):627-34. **PMID: 16317088**
112. Dai CY, Enders GH. 2000. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene*. 19(13):1613-22. **PMID: 10763818**
113. Beausejour CM, et al. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 22(16):4212-22. **PMID: 12912919**
114. Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120(4):513-22. **PMID: 15734683**
115. Herranz N, Gil J. 2018. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 128(4):1238-46. **PMID: 29608137**
116. Narita M, et al. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113(6):703-16. **PMID: 12809602**
117. Takahashi A, et al. 2006. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 8(11):1291-7. **PMID: 17028578**
118. Helmbold H, et al. 2009. Rb2/p130 is the dominating pocket protein in the p53-p21 DNA damage response pathway leading to senescence. *Oncogene*. 28(39):3456-67. **PMID: 19648966**

119. Dotsch V, *et al.* 2010. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(9):a004887. **PMID: 20484388**
120. Vincenzi M, *et al.* 2020. Sam Domains in Multiple Diseases. *Curr Med Chem.* 27(3):450-76. **PMID: 30306850**
121. Deutsch GB, *et al.* 2011. DNA damage in oocytes induces a switch of the quality control factor TAp63alpha from dimer to tetramer. *Cell.* 144(4):566-76. **PMID: 21335238**
122. Helton ES, *et al.* 2006. The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63. *J Biol Chem.* 281(5):2533-42. **PMID: 16319057**
123. Ethayathulla AS, *et al.* 2012. Structure of p73 DNA-binding domain tetramer modulates p73 transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(16):6066-71. **PMID: 22474346**
124. Osterburg C, Dötsch V. 2022. Structural diversity of p63 and p73 isoforms. *Cell Death and Differentiation.* 29(5):921-37. **PMID: 35314772**
125. Enthart A, *et al.* 2016. Solution structure and binding specificity of the p63 DNA binding domain. *Sci Rep.* 6(1):26707. **PMID: 27225672**
126. Lokshin M, *et al.* 2007. p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* 35(1):340-52. **PMID: 17170001**
127. Sauer M, *et al.* 2008. C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 36(6):1900-12. **PMID: 18267967**
128. Laptenko O, *et al.* 2015. The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Mol Cell.* 57(6):1034-46. **PMID: 25794615**
129. Guo X, *et al.* 2009. TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat Cell Biol.* 11(12):1451-7. **PMID: 19898465**
130. Srivastava K, *et al.* 2017. p63 drives invasion in keratinocytes expressing HPV16 E6/E7 genes through regulation of Src-FAK signalling. *Oncotarget.* 8(10):16202-19. **PMID: 26001294**
131. McDade SS, *et al.* 2011. p63 maintains keratinocyte proliferative capacity through regulation of Skp2-p130 levels. *J Cell Sci.* 124(Pt 10):1635-43. **PMID: 21511729**
132. Foschini MP, *et al.* 2004. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch.* 444(4):332-9. **PMID: 14997391**
133. Malaguarnera R, *et al.* 2005. The p53-homologue p63 may promote thyroid cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 12(4):953-71. **PMID: 16322335**
134. Flores ER, *et al.* 2005. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell.* 7(4):363-73. **PMID: 15837625**
135. Koga F, *et al.* 2003. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 9(15):5501-7. **PMID: 14654529**
136. Urist MJ, *et al.* 2002. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol.* 161(4):1199-206. **PMID: 12368193**
137. Su X, *et al.* 2009. TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell.* 5(1):64-75. **PMID: 19570515**
138. Su X, *et al.* 2010. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature.* 467(7318):986-90. **PMID: 20962848**
139. Beaudry VG, *et al.* 2010. Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *PLoS Genet.* 6(10):e1001168. **PMID: 20975948**

140. LeBoeuf M, *et al.* 2010. Hdac1 and Hdac2 act redundantly to control p63 and p53 functions in epidermal progenitor cells. *Dev Cell.* 19(6):807-18. **PMID: 21093383**
141. Ramsey MR, *et al.* 2011. Physical association of HDAC1 and HDAC2 with p63 mediates transcriptional repression and tumor maintenance in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 71(13):4373-9. **PMID: 21527555**
142. Gallant-Behm CL, *et al.* 2012. DeltaNp63alpha represses anti-proliferative genes via H2A.Z deposition. *Genes Dev.* 26(20):2325-36. **PMID: 23019126**
143. Woodstock DL, *et al.* 2021. p63 and p53: Collaborative Partners or Dueling Rivals? *Front Cell Dev Biol.* 9:701986. **PMID: 34291055**
144. Hibi K, *et al.* 2000. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10):5462-7. **PMID: 10805802**
145. Sen T, *et al.* 2011. DeltaNp63alpha confers tumor cell resistance to cisplatin through the AKT1 transcriptional regulation. *Cancer Res.* 71(3):1167-76. **PMID: 21266360**
146. Keyes WM, *et al.* 2011. DeltaNp63alpha is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Stem Cell.* 8(2):164-76. **PMID: 21295273**
147. Liang S, *et al.* 2022. HER2 induces cell scattering and invasion through Δ Np63 α and E-cadherin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire.* 100(5):403-12. **PMID: 36073720**
148. Higashikawa K, *et al.* 2009. DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 124(12):2837-44. **PMID: 19267405**
149. Hu L, *et al.* 2017. DeltaNp63alpha is a common inhibitory target in oncogenic PI3K/Ras/Her2-induced cell motility and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(20):E3964-E73. **PMID: 28468801**
150. Olsen JR, *et al.* 2013. p63 attenuates epithelial to mesenchymal potential in an experimental prostate cell model. *PLoS One.* 8(5):e62547. **PMID: 23658742**
151. Rivetti di Val Cervo P, *et al.* 2012. p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(4):1133-8. **PMID: 22228303**
152. Koster MI, Roop DR. 2004. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci.* 34(1):3-9. **PMID: 14757276**
153. Gebel J, *et al.* 2020. DNA Damaged Induced Cell Death in Oocytes. *Molecules.* 25(23):5714. **PMID: 33287328**
154. Osterburg C, *et al.* 2021. Isoform-Specific Roles of Mutant p63 in Human Diseases. *Cancers.* 13(3):536. **PMID: 33572532**
155. Koster MI, *et al.* 2006. Reactivation of developmentally expressed p63 isoforms predisposes to tumor development and progression. *Cancer Res.* 66(8):3981-6. **PMID: 16618715**
156. Pattison JM, *et al.* 2018. Retinoic acid and BMP4 cooperate with p63 to alter chromatin dynamics during surface epithelial commitment. *Nature Genetics.* 50(12):1658-65. **PMID: 30397335**
157. Murray-Zmijewski F, *et al.* 2006. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 13(6):962-72. **PMID: 16601753**
158. Hilmarsdottir B, *et al.* 2015. MicroRNA-200c-141 and Δ Np63 are required for breast epithelial differentiation and branching morphogenesis. *Dev Biol.* 403(2):150-61. **PMID: 25967125**

159. Watson IR, *et al.* 2006. Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem.* 281(45):34096-103. **PMID: 16980297**
160. Wu H, Leng RP. 2015. MDM2 mediates p73 ubiquitination: a new molecular mechanism for suppression of p73 function. *Oncotarget.* 6(25):21479-92. **PMID: 26025930**
161. Munarriz E, *et al.* 2005. Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun.* 333(3):954-60. **PMID: 15975558**
162. Rossi M, *et al.* 2005. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* 24(4):836-48. **PMID: 15678106**
163. Asher G, *et al.* 2005. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 19(3):316-21. **PMID: 15687255**
164. Gong JG, *et al.* 1999. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature.* 399(6738):806-9. **PMID: 10391249**
165. Sayan BS, *et al.* 2010. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(29):12877-82. **PMID: 20615966**
166. Pediconi N, *et al.* 2003. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 5(6):552-8. **PMID: 12766778**
167. Urist M, *et al.* 2004. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.* 18(24):3041-54. **PMID: 15601819**
168. Flores ER, *et al.* 2002. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.* 416(6880):560-4. **PMID: 11932750**
169. Zaika E, *et al.* 2013. Proinflammatory cytokines and bile acids upregulate DeltaNp73 protein, an inhibitor of p53 and p73 tumor suppressors. *PLoS One.* 8(5):e64306. **PMID: 23717592**
170. Tomasini R, *et al.* 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 22(19):2677-91. **PMID: 18805989**
171. Wilhelm MT, *et al.* 2010. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* 24(6):549-60. **PMID: 20194434**
172. Nakagawa T, *et al.* 2002. Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol.* 22(8):2575-85. **PMID: 11909952**
173. Grob TJ, *et al.* 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* 8(12):1213-23. **PMID: 11753569**
174. Rozenberg JM, *et al.* 2021. Dual Role of p73 in Cancer Microenvironment and DNA Damage Response. *Cells.* 10(12). **PMID: 34944027**
175. Rozenberg JM, *et al.* 2021. The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. *Biol Direct.* 16(1):23. **PMID: 34749806**
176. Chakraborty J, *et al.* 2010. Gain of cellular adaptation due to prolonged p53 impairment leads to functional switchover from p53 to p73 during DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* 285(43):33104-12. **PMID: 20675383**
177. Vikhanskaya F, *et al.* 2007. p73 supports cellular growth through c-Jun-dependent AP-1 transactivation. *Nat Cell Biol.* 9(6):698-705. **PMID: 17496887**
178. Ramadan S, *et al.* 2005. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(3):713-7. **PMID: 15865927**
179. Zaika AI, *et al.* 2002. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med.* 196(6):765-80. **PMID: 12235210**

180. Tomkova K, *et al.* 2004. p73 isoforms can induce T-cell factor-dependent transcription in gastrointestinal cells. *Cancer Res.* 64(18):6390-3. **PMID: 15374945**
181. Zaika AI, *et al.* 1999. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res.* 59(13):3257-63. **PMID: 10397274**
182. Ibrahim N, *et al.* 2010. BRCA1-associated epigenetic regulation of p73 mediates an effector pathway for chemosensitivity in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 70(18):7155-65. **PMID: 20807817**
183. Avraham A, *et al.* 2020. Breast-Specific Epigenetic Regulation of DeltaNp73 and Its Role in DNA-Damage-Response of BRCA1-Mutated Human Mammary Epithelial Cells. *Cancers.* 12(9):2367. **PMID: 32825620**
184. Gong H, *et al.* 2018. p73 coordinates with Delta133p53 to promote DNA double-strand break repair. *Cell Death Differ.* 25(6):1063-79. **PMID: 29511339**
185. Sanchez-Carrera D, *et al.* 2015. Δ Np73 is capable of inducing apoptosis by co-ordinately activating several BH3-only proteins. *Biosci Rep.* 35(3):e00198. **PMID: 26182360**
186. Liu G, *et al.* 2004. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol.* 24(2):487-501. **PMID: 14701724**
187. Wang Y, *et al.* 2016. Dysfunctional telomeres induce p53-dependent and independent apoptosis to compromise cellular proliferation and inhibit tumor formation. *Aging Cell.* 15(4):646-60. **PMID: 27113195**
188. Yao Y, *et al.* 2012. Tumor suppressors p53, p63TAalpha, p63TAy, p73alpha, and p73beta use distinct pathways to repress telomerase expression. *J Biol Chem.* 287(24):20737-47. **PMID: 22496369**
189. Rufini A, *et al.* 2012. TAp73 depletion accelerates aging through metabolic dysregulation. *Genes Dev.* 26(18):2009-14. **PMID: 22987635**
190. Niklison-Chirou MV, *et al.* 2013. TAp73 knockout mice show morphological and functional nervous system defects associated with loss of p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(47):18952-7. **PMID: 24190996**
191. Agostini M, *et al.* 2011. Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(52):21093-8. **PMID: 22160687**
192. Marshall CB, *et al.* 2016. p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell Rep.* 14(10):2289-300. **PMID: 26947080**
193. Inoue S, *et al.* 2014. TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(5):1843-8. **PMID: 24449892**
194. Tissir F, *et al.* 2009. DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(39):16871-6. **PMID: 19805388**
195. Holembowski L, *et al.* 2014. TAp73 is essential for germ cell adhesion and maturation in testis. *J Cell Biol.* 204(7):1173-90. **PMID: 24662569**
196. Santos Guasch GL, *et al.* 2018. p73 Is Required for Ovarian Follicle Development and Regulates a Gene Network Involved in Cell-to-Cell Adhesion. *iScience.* 8:236-49. **PMID: 30340069**
197. Beeler JS, *et al.* 2019. p73 regulates epidermal wound healing and induced keratinocyte programming. *PLoS One.* 14(6):e0218458. **PMID: 31216312**
198. Leone G, *et al.* 2000. Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol.* 20(10):3626-32. **PMID: 10779352**

199. Araki K, *et al.* 2019. Mitochondrial protein E2F3d, a distinctive E2F3 product, mediates hypoxia-induced mitophagy in cancer cells. *Communications Biology*. 2(1):3. **PMID: 30740539**
200. Westendorp B, *et al.* 2012. E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res*. 40(8):3511-23. **PMID: 22180533**
201. Frolov MV, *et al.* 2001. Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev*. 15(16):2146-60. **PMID: 11511545**
202. Giangrande PH, *et al.* 2004. Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members. *EMBO J*. 23(6):1336-47. **PMID: 15014447**
203. Crosby ME, Almasan A. 2004. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biol Ther*. 3(12):1208-11. **PMID: 15662116**
204. Kent LN, Leone G. 2019. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 19(6):326-38. **PMID: 31053804**
205. Milton A, *et al.* 2006. A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene*. 25(22):3212-8. **PMID: 16418725**
206. Zhang Y, Chellappan SP. 1995. Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene*. 10(11):2085-93. **PMID: 7784053**
207. Qiao H, *et al.* 2007. Human TFDP3, a novel DP protein, inhibits DNA binding and transactivation by E2F. *J Biol Chem*. 282(1):454-66. **PMID: 17062573**
208. Gaubatz S, *et al.* 2000. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell*. 6(3):729-35. **PMID: 11030352**
209. Brehm A, *et al.* 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391(6667):597-601. **PMID: 9468139**
210. Magnaghi-Jaulin L, *et al.* 1998. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*. 391(6667):601-5. **PMID: 9468140**
211. Ferreira R, *et al.* 1998. The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(18):10493-8. **PMID: 9724731**
212. Robertson KD, *et al.* 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*. 25(3):338-42. **PMID: 10888886**
213. Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81(3):323-30. **PMID: 7736585**
214. van den Heuvel S. 2005. Cell-cycle regulation. *WormBook*.1-16. **PMID: 18050422**
215. Poon RYC. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. In: Coutts AS, Weston L, editors. *Cell Cycle Oscillators*. 1342. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 3-19. **PMID: 26254915**
216. Wang C, *et al.* 2004. Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. *Cancer Treat Res*. 119:217-37. **PMID: 15164880**
217. Henley SA, Dick FA. 2012. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div*. 7(1):10. **PMID: 22417103**
218. Pavletich NP. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*. 287(5):821-8. **PMID: 10222191**
219. Canepa ET, *et al.* 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 59(7):419-26. **PMID: 17654117**

220. Xu X, *et al.* 1999. Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation. *Biochemistry*. 38(27):8713-22. **PMID: 10393546**
221. Besson A, *et al.* 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 14(2):159-69. **PMID: 18267085**
222. Yoon MK, *et al.* 2012. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem Soc Trans*. 40(5):981-8. **PMID: 22988851**
223. Korenjak M, *et al.* 2004. Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell*. 119(2):181-93. **PMID: 15479636**
224. Lewis PW, *et al.* 2004. Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev*. 18(23):2929-40. **PMID: 15545624**
225. Harrison MM, *et al.* 2006. Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(45):16782-7. **PMID: 17075059**
226. Sadasivam S, DeCaprio JA. 2013. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer*. 13(8):585-95. **PMID: 23842645**
227. Guiley KZ, *et al.* 2015. Structural mechanisms of DREAM complex assembly and regulation. *Genes Dev*. 29(9):961-74. **PMID: 25917549**
228. Hsu J, Sage J. 2016. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle*. 15(23):3183-90. **PMID: 27753528**
229. Lindeman GJ, *et al.* 1997. The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(10):5095-100. **PMID: 9144196**
230. Cuitino MC, *et al.* 2019. Two Distinct E2F Transcriptional Modules Drive Cell Cycles and Differentiation. *Cell Rep*. 27(12):3547-60 e5. **PMID: 31130414**
231. Plesca D, *et al.* 2007. E2F4 function in G2: maintaining G2-arrest to prevent mitotic entry with damaged DNA. *Cell Cycle*. 6(10):1147-52. **PMID: 17507799**
232. Ohtani N, *et al.* 2003. Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol*. 162(2):173-83. **PMID: 12860972**
233. Umemura S, *et al.* 2009. Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome. *Br J Cancer*. 100(5):764-71. **PMID: 19259095**
234. Rakha EA, *et al.* 2004. Expression of E2F-4 in invasive breast carcinomas is associated with poor prognosis. *J Pathol*. 203(3):754-61. **PMID: 15221934**
235. Ruzhynsky VA, *et al.* 2007. Cell cycle regulator E2F4 is essential for the development of the ventral telencephalon. *J Neurosci*. 27(22):5926-35. **PMID: 17537963**
236. Danielian PS, *et al.* 2016. E2f4 and E2f5 are essential for the development of the male reproductive system. *Cell Cycle*. 15(2):250-60. **PMID: 26825228**
237. Kinross KM, *et al.* 2006. E2f4 regulates fetal erythropoiesis through the promotion of cellular proliferation. *Blood*. 108(3):886-95. **PMID: 16861343**
238. Wang A, *et al.* 2001. Molecular cloning and characterization of a novel mouse epidermal differentiation gene and its promoter. *Genomics*. 73(3):284-90. **PMID: 11350120**
239. Waghray A, *et al.* 2001. Identification of differentially expressed genes by serial analysis of gene expression in human prostate cancer. *Cancer Res*. 61(10):4283-6. **PMID: 11358857**
240. Liu J, *et al.* 2021. E2F4 Promotes the Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells through Upregulation of CDCA3. *J Cancer*. 12(17):5173-80. **PMID: 34335934**
241. van Amerongen MJ, *et al.* 2010. E2F4 is required for cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 86(1):92-102. **PMID: 19955219**

242. Dagnino L, *et al.* 1997. Expression patterns of the E2F family of transcription factors during murine epithelial development. *Cell Growth Differ.* 8(5):553-63. **PMID: 9149906**
243. Hsu J, *et al.* 2019. E2F4 regulates transcriptional activation in mouse embryonic stem cells independently of the RB family. *Nature Communications.* 10(1):2939. **PMID: 31270324**
244. Mori M, *et al.* 2017. Cytoplasmic E2f4 forms organizing centres for initiation of centriole amplification during multiciliogenesis. *Nat Commun.* 8(1):15857. **PMID: 28675157**
245. Hazan R, *et al.* 2021. E2F4's cytoplasmic role in multiciliogenesis is mediated via an N-terminal domain that binds two components of the centriole replication machinery, Deup1 and SAS6. *Mol Biol Cell.* 32(20):ar1. **PMID: 34260288**
246. Jin X, *et al.* 2022. E2f4 is required for intestinal and otolith development in zebrafish. *Journal of Cellular Physiology.* 237(6):2690-702. **PMID: 35403704**
247. van Deursen JM. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 509(7501):439-46. **PMID: 24848057**
248. Hernandez-Segura A, *et al.* 2018. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 28(6):436-53. **PMID: 29477613**
249. Wang Y, *et al.* 2022. Unveiling E2F4, TEAD1 and AP-1 as regulatory transcription factors of the replicative senescence program by multi-omics analysis. *Protein & Cell.* 13(10):742-59. **PMID: 35023014**
250. Zhang HS, *et al.* 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* 101(1):79-89. **PMID: 10778858**
251. Kapic A, *et al.* 2006. Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ.* 13(2):324-34. **PMID: 16123778**
252. Alessio N, *et al.* 2013. Silencing of RB1 but not of RB2/P130 induces cellular senescence and impairs the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 70(9):1637-51. **PMID: 23370776**
253. Litovchick L, *et al.* 2011. DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes Dev.* 25(8):801-13. **PMID: 21498570**
254. Iness AN, *et al.* 2019. The cell cycle regulatory DREAM complex is disrupted by high expression of oncogenic B-Myb. *Oncogene.* 38(7):1080-92. **PMID: 30206359**
255. Chicas A, *et al.* 2010. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell.* 17(4):376-87. **PMID: 20385362**
256. Farmer H, *et al.* 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 434(7035):917-21. **PMID: 15829967**
257. Ame JC, *et al.* 2004. The PARP superfamily. *Bioessays.* 26(8):882-93. **PMID: 15273990**
258. Ummarino S, *et al.* 2021. The PARP Way to Epigenetic Changes. *Genes.* 12(3):446. **PMID: 33804735**
259. Suskiewicz MJ, *et al.* 2021. Progress and outlook in studying the substrate specificities of PARPs and related enzymes. *The FEBS Journal.* 288(7):2131-42. **PMID: 32785980**
260. Schweiker SS, *et al.* 2018. Structure, Function and Inhibition of Poly(ADP-ribose)polymerase, Member 14 (PARP14). *Mini Rev Med Chem.* 18(19):1659-69. **PMID: 30112992**
261. Feijs KL, *et al.* 2013. Macrodomain-containing proteins: regulating new intracellular functions of mono(ADP-ribosyl)ation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(7):443-51. **PMID: 23736681**
262. Hottiger MO, *et al.* 2011. Progress in the function and regulation of ADP-Ribosylation. *Sci Signal.* 4(174):mr5. **PMID: 21610250**

263. Aguiar RC, *et al.* 2005. B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J Biol Chem.* 280(40):33756-65. **PMID: 16061477**
264. Goenka S, Boothby M. 2006. Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11):4210-5. **PMID: 16537510**
265. Goenka S, *et al.* 2007. Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly(ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription. *J Biol Chem.* 282(26):18732-9. **PMID: 17478423**
266. Mehrotra P, *et al.* 2013. Poly (ADP-ribose) polymerase 14 and its enzyme activity regulates T(H)2 differentiation and allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 131(2):521-31 e1-12. **PMID: 22841009**
267. Mehrotra P, *et al.* 2011. PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *J Biol Chem.* 286(3):1767-76. **PMID: 21081493**
268. Iansante V, *et al.* 2015. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nature Communications.* 6(1):7882. **PMID: 26258887**
269. Cho SH, *et al.* 2011. Glycolytic rate and lymphomagenesis depend on PARP14, an ADP ribosyltransferase of the B aggressive lymphoma (BAL) family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(38):15972-7. **PMID: 21911376**
270. Yao N, *et al.* 2019. PARP14 promotes the proliferation and gemcitabine chemoresistance of pancreatic cancer cells through activation of NF- κ B pathway. *Molecular Carcinogenesis.* mc.23011. **PMID: 30968979**
271. Nakamura H, *et al.* 2019. Identification of key modules and hub genes for small-cell lung carcinoma and large-cell neuroendocrine lung carcinoma by weighted gene co-expression network analysis of clinical tissue-proteomes. *PLOS ONE.* 14(6):e0217105. **PMID: 31166966**
272. Savary C, *et al.* 2020. Depicting the genetic architecture of pediatric cancers through an integrative gene network approach. *Scientific Reports.* 10(1):1224. **PMID: 31988326**
273. Nicolae CM, *et al.* 2015. A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. *Nucleic Acids Res.* 43(6):3143-53. **PMID: 25753673**
274. Barbarulo A, *et al.* 2013. Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. *Oncogene.* 32(36):4231-42. **PMID: 23045269**
275. Vyas S, *et al.* 2013. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun.* 4(1):2240. **PMID: 23917125**
276. Goswami R, *et al.* 2012. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol.* 188(3):968-75. **PMID: 22180613**
277. Zaffini R, *et al.* 2018. Asthma and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new therapeutic approach. *Drug Des Devel Ther.* 12:281-93. **PMID: 29483769**
278. Iwata H, *et al.* 2016. PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation. *Nature Communications.* 7(1):12849. **PMID: 27796300**
279. Higashi H, *et al.* 2019. A Study into the ADP-Ribosylome of IFN- γ -Stimulated THP-1 Human Macrophage-like Cells Identifies ARTD8/PARP14 and ARTD9/PARP9 ADP-Ribosylation. *Journal of Proteome Research.* 18(4):1607-22. **PMID: 30848916**

280. Caprara G, *et al.* 2018. PARP14 Controls the Nuclear Accumulation of a Subset of Type I IFN-Inducible Proteins. *The Journal of Immunology*. 200(7):2439-54. **PMID: 29500242**
281. Eckeï L, *et al.* 2017. The conserved macrodomains of the non-structural proteins of Chikungunya virus and other pathogenic positive strand RNA viruses function as mono-ADP-ribosylhydrolases. *Sci Rep*. 7(1):41746. **PMID: 28150709**
282. Webb TE, Saad R. 2020. Sequence homology between human PARP14 and the SARS-CoV-2 ADP ribose 1'-phosphatase. *Immunol Lett*. 224:38-9. **PMID: 32534867**
283. Obando-Pereda G. 2021. Can molecular mimicry explain the cytokine storm of SARS-CoV-2?: An in silico approach. *J Med Virol*. 93(9):5350-7. **PMID: 33913542**
284. Tauber AL, *et al.* 2021. The potential association between PARP14 and SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *Future Medicinal Chemistry*. 13(6):587-92. **PMID: 33467912**
285. Taverniti V, *et al.* 2023. The E2F4/p130 Repressor Complex Cooperates with Oncogenic ΔNp73α To Inhibit Gene Expression in Human Papillomavirus 38 E6/E7-Transformed Keratinocytes and in Cancer Cells. *mSphere*. 8(2):e0005623. **PMID: 36883841**
286. Cassonnet P, *et al.* 2011. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat Methods*. 8(12):990-2. **PMID: 22127214**
287. Jolma A, *et al.* 2015. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*. 527(7578):384-8. **PMID: 26550823**
288. Morgunova E, Taipale J. 2017. Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Curr Opin Struct Biol*. 47:1-8. **PMID: 28349863**
289. Stampfel G, *et al.* 2015. Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature*. 528(7580):147-51. **PMID: 26550828**
290. Razavipour SF, *et al.* 2020. p27 as a Transcriptional Regulator: New Roles in Development and Cancer. *Cancer Res*. 80(17):3451-8. **PMID: 32341036**
291. Guan KL, *et al.* 1996. Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell*. 7(1):57-70. **PMID: 8741839**
292. Chan FK, *et al.* 1995. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*. 15(5):2682-8. **PMID: 7739548**
293. Tan W, *et al.* 2015. PTEN/Akt-p27(kip1) Signaling Promote the BM-MSCs Senescence and Apoptosis in SLE Patients. *J Cell Biochem*. 116(8):1583-94. **PMID: 25649549**
294. Krimpenfort P, *et al.* 2007. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature*. 448(7156):943-6. **PMID: 17713536**
295. Fuxe J, *et al.* 2000. Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ*. 11(7):373-84. **PMID: 10939591**
296. Erickson S, *et al.* 1998. Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene*. 17(5):595-602. **PMID: 9704925**
297. Kuilman T, *et al.* 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*. 24(22):2463-79. **PMID: 21078816**
298. Sonzogni SV, *et al.* 2014. p19INK4d is involved in the cellular senescence mechanism contributing to heterochromatin formation. *Biochim Biophys Acta*. 1840(7):2171-83. **PMID: 24667034**
299. Eychene A, *et al.* 2008. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer*. 8(9):683-93. **PMID: 19143053**
300. Pouponnot C, *et al.* 2006. Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene*. 25(9):1299-310. **PMID: 16247450**

301. Narita M, *et al.* 2006. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*. 126(3):503-14. **PMID: 16901784**
302. Kim SH, *et al.* 2022. Emerging role of anti-proliferative protein BTG1 and BTG2. *BMB Rep*. 55(8):380-8. **PMID: 35880434**
303. Zhu R, *et al.* 2013. BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Rep*. 30(5):2137-44. **PMID: 23982470**
304. Lai HC, *et al.* 2014. DNA methylation as a biomarker for the detection of hidden carcinoma in endometrial atypical hyperplasia. *Gynecol Oncol*. 135(3):552-9. **PMID: 25449566**
305. Di C, *et al.* 2018. AJAP1 expression modulates glioma cell motility and correlates with tumor growth and survival. *Int J Oncol*. 52(1):47-54. **PMID: 29115565**
306. Loerakker S, *et al.* 2018. Mechanosensitivity of Jagged-Notch signaling can induce a switch-type behavior in vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(16):E3682-e91. **PMID: 29610298**
307. Bellavia D, *et al.* 2002. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(6):3788-93. **PMID: 11891328**
308. Franciosa G, *et al.* 2016. Prolyl-isomerase Pin1 controls Notch3 protein expression and regulates T-ALL progression. *Oncogene*. 35(36):4741-51. **PMID: 26876201**
309. Do PM, *et al.* 2012. Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev*. 26(8):830-45. **PMID: 22508727**
310. Zhu J, *et al.* 2015. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*. 525(7568):206-11. **PMID: 26331536**
311. Kabbout M, *et al.* 2013. ETS2 mediated tumor suppressive function and MET oncogene inhibition in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 19(13):3383-95. **PMID: 23659968**
312. Nakamura H, *et al.* 2011. Cooperative role of the RNA-binding proteins Hzf and HuR in p53 activation. *Mol Cell Biol*. 31(10):1997-2009. **PMID: 21402775**
313. Duan X, *et al.* 2021. Genetic variants in telomerase-associated protein 1 are associated with telomere damage in PAH-exposed workers. *Ecotoxicol Environ Saf*. 223:112558. **PMID: 34333383**
314. Gabet AS, *et al.* 2008. Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. *FASEB J*. 22(2):622-32. **PMID: 17898088**
315. O'Connor MJ, *et al.* 2021. PARP14 regulates cyclin D1 expression to promote cell-cycle progression. *Oncogene*. 40(30):4872-83. **PMID: 34158578**

PARTIE 7. ANNEXES

Annexe 1 : Cell culture

Human foreskin keratinocytes transformed by the E6 and E7 proteins from beta-HPV 38 (38HK)

38HK are grown in FAD media, supplied in co-culture with murin fibroblastes NIH 3T3 treated with mitomycin C. After treatment with mitomycin C, fibroblasts are called Feeder.

1. Culture of NIH 3T3

Fibroblasts are cultivated in 10ml of DMEM + 10% FCS + Penicillin-Streptomycin (50 U/mL), usually in a T75 flasks. Usual splitting is performed with a 1:4 – 1:8 dilution factor.

Preparation of Feeder

1. Add 400µl (aliquot – see *Material preparation* section) of Mitomycine C directly to cells in culture.
2. Leave in incubator for at least 2 hours.
3. Collect cells by Trypsinization and DMEM +10% FCS media.
4. Centrifuge at 1300-1400 rpm 3-5min. Discard supernatant
5. Resuspend in FAD media.
6. Quantify.

2. Splitting of 38HK

1. Remove feeder with PBS/EDTA (2mM): Add enough volume to cover the dish/flask (around 10ml). Place back in incubator for few minutes (less than 5min). Monitor your cells under the microscope. If necessary, gently tap with your hand the flask. You should see some cells floating.
2. Discard PBS/EDTA(2mM) and add trypsin to detach keratinocytes. Place back in incubator. Keratinocytes need more time to be detached.
3. Collect cells with DMEM + 10% FCS in falcon
4. Centrifuge at 1300-1400 rpm 3-5min. Discard supernatant.
5. Resuspend in FAD media
6. Usual splitting : 1 : 2 -1 : 4 dilution. Be carefull not to split too much since it would take time for the keratinocytes to recover and to start growing again.
7. Add fibroblasts, the number of cells depends on the size of the flask/dish (see table X)

3. Conditioned FAD media

Conditioned media is obtained by incubating FAD media with Feeder. More precisely, Feeder are plated in flask/dish and the media recovered after overnight incubation. You can also recover conditioned media from the supernatant media of the falcon in which fibroblast has been resuspended when collected. It's obtained after placing vertically the falcon in your incubator for at least overnight.

This media can be used instead of feeder when it's not available or haven't been plated. Dilute the conditioned media with fresh media prior adding to keratinocytes (see quantification – dilute proportionally taking into account the amount of feeder which has been plated or present in the falcon).

An important remark is for conditioned media after lipofectamine transfection. The feeder should be resuspended in a FAD medium without Pen/Strep, Cholera Toxin and Ciproxin, as recommended by manufacturer after usage of lipofectamine. This conditioned media is used 4 hours after transfection.

| | |
|---------------|------------------------------------|
| 6 well plate | 2ml media + 100 000 cells feeder |
| T25 | 5ml media + 100 000 cells feeder |
| T75/10cm dish | 10ml media + 300 000 cells feeder |
| 150cm dish | 20ml media + 600 000 cells feeder |
| T175 | 30ml media + 600 000 cells feeder. |

For primary keratinocytes: they are growing without feeder in media for specifically dedicated to keratinocytes: C-20011 from PromoCell.

4. Material preparation

- *FAD media*: 3parts Ham's F12 (21765-029 Gibco), 1 part DMEM (41965-039 Gibco), 2,5% fetal calf serum (FCS) (CVFSVF00-01, Lot S68028-0230 Eurobio), 1% Penicillin-streptomycin (Pen/Strep) (15140-122 Gibco), insulin (5µg/ml) (I9278-5ML Sigma), EGF (10ng/ml) cholera toxin (8.4ng/ml), adenine (24µg/ml), ciproflaxin hydrochloride (10µg/ml) and hydrocortisone (0.4µg/ml)
- *DMEM +++* : DMEM, FCS 10%, Pen/Strep 1%

Adenine solution stock (100x) (A8626-25G Sigma)

- Dissolve 242mg of Adenine in HCl 0.05N
- Filtrate with 0.22µg and aliquot in 4ml and store at -20°C

Cholera Toxin stock (1000x) (C8052-5MG Sigma)

- Resuspend the whole powder in the powder with 602µl to obtain à solution 0.83mg/ml. Do it under the hood as the powder is carcinogenic.
- Dilute 200µl of this solution in 20ml of HEPES 25mM = 10⁻⁷M stock solution
- Filter in 0.22µM and aliquot by 400µl, store at 4°C

Epidermal Growth Factor stock (10µg/ml = 1000x) (236-EG-01M BIO-TECHNE SAS (369))

- Dissolve 1mg of the powder in 100ml of DMEM
- Filtrate with 0.22µM, aliquot at 400µl and store at -20°C

Hydrocortisone stock (400µg/ml = 1000x) (H0888-1G Sigma)

- Dissolve in 100% Ethanol at a concentration of 5mg/ml
- Dilute in DMEM to obtain the stock solution at 400µg/ml
- Filtrate with 0.22µM and aliquot in 400µl, store at -20°C

Ciproxin (ciproflaxin hydrochloride - CIP) stock (10mg/ml = 1000x) (UC5074 Euromedex)

- Dissolve in 0.1N HCl for a final concentration 10mg/ml
- Filtrate and aliquot in 400 µl, store at -20°C

Mitomycin C (M0503-5X2MG Sigma)

- Resuspend 2mg in 4ml of DMEM, aliquot at 400µl and store at -20°C

Annexe 2 : Protein depletion

1. Knockdown of Δ Np73a by sense (S) and antisense (AS) oligos

Day 1 :

Plate cells in 6-well plate

1. 38HK: 350 000 cells/well ; Feeder : 100 000 cells /well
2. CAL-51 : 500 000 cells/well

Day 2 : 18-24h after plating :

1. Prepare transfection mix by setting up the lipofectamine mix and the oligo mix according to the recipe described in Table 1. Incubate the two separate mixes for 5min at RT. Then, add the lipofectamine mix to the oligo mix. Incubate 20min at RT.

Table 1: Oligo mix and lipofectamine mix per well for S/ AS transfection

| Lipofectamine Mix | |
|---|-------------|
| Lipofectamine 2000 | 5 μ l |
| OptiMem | 200 μ l |
| Oligo Mix | |
| Oligonucleotides (0.530 μ g/ μ l) | 1.8 μ l |
| OptiMem | 200 μ l |

Oligos sequences:

S sequence: 5'-CCATGCTGTACGTCGGT-3'

AS sequence: 5'-ACCGACGTACAGCATGG-3'

2. Remove medium of 38HK or Cal51 cultures.
3. Wash with 1 ml PBS + EDTA (to remove feeder of 38i) or PBS only (Cal51)
4. Add 1ml Optimem
5. Add 400 μ l of transfection mix per well
6. Incubate 4 hours and then remove transfection mix. Add 2 ml/well of FAD conditioned media without P/S, CIP and cholera toxin (38HK) or DMEM/FBS without P/S and CIP (CAL-51).

Day 3 : Collect cells after 24h (38HK) or 30h (CAL-51)

Cells are collected using the lysis buffer RP1 from the kit "NucleoSpin RNA/Protein, Mini kit for RNA and protein purification" from Macherey-Nagel (ref. 740933.250) and following the protocol of the kit or by IP lysis buffer (Tris 20mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM, NP-40 0.05%, Protease inhibitor 100%)

2. Knockdown E2F4-5 by siRNA

Day 1 : Plating

Plate cells in 6-well plate :

1. 38HK: 350 000/well.
 - a. Feeder : 100 000/well
2. CAL-51 : 450 000 cells/well

3. HNC-136 : 320 000 cells/well

Day 2 : 18-24h after plating

1. Prepare transfection mix (see below). Meantime the incubation, perform point 2-4.
2. Remove medium
3. Wash with 1 ml PBS + EDTA (to remove feeder of 38HK) or PBS only (CAL-51)
4. Add 1ml Optimem
5. Add 400 µl of transfection mix per well
6. Incubate 4 hours
7. after 4 hours, remove transfection mix and add 2 ml (6well plate) of media FAD without P/S, CIP and cholera toxin (38HK) or DMEM/FBS without P/S and CIP (CAL-51, HNC-136)

Table 2: Oligo mix and lipofectamine mix per well for siRNA transfection.

| Lipofectamine mix | | | |
|--------------------|--------|--|--|
| Lipofectamine 2000 | 5µl | | |
| OptiMem | 200 µl | | |

| siRNA mix | | | |
|-----------|------------------------|--|---|
| | Scramble | Single knockdowns | Double knockdowns |
| siRNA | 4µl of scramble (50µM) | 2µl siE2F4 (100mM) or 2µl siE2F5 (100mM) | 1µl siE2F5 (100mM) + 1µl siE2F4 (100µM) |
| OptiMem | 200µl | | |

The siRNA has been provided from Dharmacon : ON-TARGETplus Human E2F4 (1874) – SMARTpool 20nmol, and ON-TARGETplus Human E2F5 (1875) – SMARTpool 20nmol

1. Prepare Lipofectamine mix and siRNA mix. Incubate 5min at RT
2. Add lipofectamine mix to siRNA Mix (=Transfection mix). Incubate 20min at RT

Day 4 Collect after 48h after transfection

Cells are collected using the lysis buffer RP1 from the kit “NucleoSpin RNA/Protein, Mini kit for RNA and protein purification” from Macherey-Nagel (ref. 740933.250) and following the protocol of the kit or by IP lysis buffer (Tris 20mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM, NP-40 0.05%, Protease inhibitor 100%)

3. Knockdown E2F4-5 by shRNA

Day 1 : Plating

Plate cells in 6-well plate :

1. 38HK: 300 000/well.
 - a. Feeder : 100 000/well

Day 2 : 18-24h after plating

1. Prepare transfection mix. Meantime prepare point 2
2. Remove media and feeder, if it has been plated with it. In conditioned media, no need to change the media.
3. Add drop by drop to the cells

Table 3: Transfection mix (per well)

| | |
|---------------------------|----------------|
| TransIT (Mirus - MIR2800) | 7.5µl |
| OptiMem | 250 µl |
| DNA | Total of 2,5µg |

Prepare mix, incubate at RT for 30min before adding to cells

For rescue experiment, plasmides used : pLKO.1 (SIGMA MISSION® pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA SHC002), pcDNAneo, 3xFlagE2F4, 3xFlagE2F5. The shRNA-E2F4 and shRNA-E2F5 has been cloned from pLKO1 shRNA SHC002 SIGMA plasmid.

Day 4 Collect after 48h after transfection

Cells are collected using the lysis buffer RP1 from the kit “NucleoSpin RNA/Protein, Mini kit for RNA and protein purification” from Macherey-Nagel (ref. 740933.250) and following the protocol of the kit or by IP lysis buffer (Tris 20mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM, NP-40 0.05%, Protease inhibitor 100%)

Annexe 3 : Fractionation of cellular extracts

Buffers volume should be adapted, considering that the original protocol is for $2-5 \times 10^7$ cells (! Can be very dense at 5×10^7 , can be considered to work with slightly bigger volumes)

| Buffer A | | For 5ml | |
|-------------------|-------|-----------------|-------------------|
| | | Stock solutions | Volumes necessary |
| HEPES KOH pH8 | 10mM | 1 M | 50ul |
| MgCl ₂ | 1,5mM | 1 M | 7,5ul |
| KCl | 10mM | 1M | 50ul |
| Igepal | 0,1% | 10% | 50ul |
| DTT | 0,5mM | 1 M | 2,5ul |
| PIC | 1x | 1 tablet in 1ml | 500ul |
| NaF | 10mM | 1M | 50ul |
| H ₂ O | | | 4,29ml |

| Buffer B | | For 1ml | |
|-------------------|-------|-----------------|-------------------|
| | | Stock solutions | Volumes necessary |
| HEPES KOH pH8 | 20mM | 1M | 20ul |
| MgCl ₂ | 1,5mM | 1M | 1,5ul |
| NaCl | 250mM | 5M | 50ul |
| Igepal | 0,1% | 10% | 10ul |
| DTT | 0,5m | 1M | 0,5ul |
| PIC | 2x | 1 tablet in 1ml | 200ul |
| Naf | 10mM | 1M | 10ul |
| Glycerol | 20% | 50% | 400ul |
| EDTA | 0,2mM | 0,5M | 0,4ul |
| H ₂ O | | | 307,4ul |

| Buffer B 10x | | For 100ul | |
|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | Stock solutions | Volumes necessary |
| HEPES KOH pH8 | 200mM | 1M | 20ul |
| MgCl ₂ | 15mM | 1M | 1,5ul |
| NaCl | 2,5M | 5M | 50ul |
| Igepal | 1% | 100% | 1ul |
| DTT | 5mM | 1M | 0,5ul |
| PIC | 4x | 1 tablet in 500ul | 10ul |
| Naf | 100mM | 1M | 10ul |
| EDTA | 2M | 0,5M | 0,4ul |
| H ₂ O | | | 6,6ul |

| Salt solution and equilibration buffer 10X | | For 50ml | |
|--|-------|-----------------|-------------------|
| | | Stock solutions | Volumes necessary |
| Tris HCl pH 7.5 | 20mM | 1M | 1ml |
| NaCl | 100mM | 5M | 1ml |
| MgCl ₂ | 5mM | 1M | 250µL |
| H ₂ O | | | 47,750ml |

| Washing buffer | | For 100ml | |
|-------------------|-------|-----------------|-------------------|
| | | Stock solutions | Volumes necessary |
| Tris HCl pH 7.5 | 20mM | 1M | 2ml |
| NaCl | 150mM | 5M | 3ml |
| MgCl ₂ | 1.5mM | 1M | 150µl |
| EDTA | 0.2mM | 0.5M | 40µl |
| H ₂ O | | | 94,81ml |

Day1:

1. Plate 7-8*10⁶ cells/Dish in 6 150mm dishes. Plate using conditioned media. Optimally 18-24h before lysis of the cells.

Day 2:

1. Remove media and rinse the cells with PBS 1x.
2. Add buffer A to lyse the cells: collect all 6 dishes with 2 ml of Buffer A. Recover them in Eppendorf tubes.
3. Incubate on ice 15min
4. Disrupt cells by passing through a 25 G needle 10-15 times EACH PELLETT FROM EACH TUBE
5. Centrifuge 5min at 12000 rpm 4°C
6. Collect supernatant = cytoplasmic soluble fraction.
7. Wash pellet with buffer A (= avoid contamination of cytoplasmic proteins) : add 100ul of B.A without mixing. Spin 30s.
8. Resuspend pellets in total 200 µl Buffer B, regroup them all in one tube.
9. Incubate on ice 30min
10. Centrifuge 5min 4°C 12 000 rpm
11. Collect supernatant = nuclear fraction
12. Wash 2x the pellet with buffer A (= avoid contamination of cytoplasmic proteins) : add 100ul of B.A without mixing. Spin 30s.
13. Resuspend in 190µl µl of Buffer A and add 6µl CaCl₂ (0.1M) + 2µl BSA (10mg/ml) + 2µl MNase (2000 gel U/µl, NEB)
14. Incubate on rotor 2h at 4°C
15. Disrupt mechanically the pellet with the syringe 27G, x15 up-downs
16. Add 12 µl of ice-cold EGTA 0.1 M to stop MNase If necessary, take an aliquot (10µl) for DNA isolation to confirm the sufficient digest of DNA.
17. Add 23,5µl (1/9 of Volume in the tube) of Buffer B 10x. Be careful to well resuspend and homogenize.
18. Incubate on rotor at 4°C for 40min
19. Centrifuge 5 min 4°C 12 000 rpm.

20. Collect supernatant, carefully without touching the pellet = Chromatin soluble fraction.
If there was a lot of cells and the supernatant is trouble, recover in a new tube and centrifuge again for 15min. Repeat this step if required to obtain clear supernatant as much as possible.

Quantify the proteins. The quantification would give an overestimated value, as the digestion of the chromatin is partial and there is still some non-soluble part collected with the supernatant.

Annexe 4A : Sucrose Gradient Ultracentrifugation:

Use the Gradient Mixer (EL2600) with magnet to form a gradient 10-50% sucrose. Prepare tubes at least 1h before loading the samples.

The best is to prepare the tubes the same day as when you'll launch your ultracentrifugation (Day 2). If necessary, it can be prepared the day before (Day 1).

| | |
|-----------------------------|--|
| Sucrose stock solution 2,2M | 188.265g sucrose in a final volume of 250ml of water |
|-----------------------------|--|

Sucrose dilutions (10 ml each):

- 50%: 1 ml 10X Salt solution, 6.66 ml Sucrose 2,2M, 2.32 ml H₂O
 - 10%: 1 ml 10X Salt solution, 1.34 ml Sucrose 2,2M, 7.66 ml H₂O
1. Wash the columns with ethanol (open valves), let drain all ethanol. Wash 2 times with water. At the end, close the first and second clamp before all water flow out: as we are not using peristaltic pump, this remaining water is used to pull down your sucrose.
 2. Close all valves. Pour 5,5ml of 50% sucrose. Open carefully the valve between the 50% and 10% columns: it fills the valve with sucrose solution: to avoid bubble that could be stuck in. Close it quickly to not let out to the 10% column. Pour 5ml of 10% sucrose.
 3. Open first the valve between columns. You should see a mixing between columns, it's the equilibration of volumes between columns. Open the second valve. The mix shouldn't go yet to the pipe. Carefully, open the second clamp. The water stuck in pipe shouldn't flow out yet.
 4. Put a waste backer at the end of your system. Unscrew the first clamp: the remaining water should start to go out slowly. At the same time, your sucrose mix should enter the pipe. Once all the water goes out, the rate of flow of your sucrose will goes very fast: close rapidly your pipe with the second clamp. Screw the first clamp.
 5. Place your Beckman tube to your system: the needle should reach the very bottom of your tube.
 6. Remove the second clamp and carefully unscrew the first clamp: the first clamp allows to control the flow. Your sucrose mix should flow slowly through the pipe.
 7. Stop the system when your last drop of sucrose mix reaches the indication on the pipe: it's to keep the dead volume and not introduce any bubble to your sucrose tube.
 8. Remove your tube from the needle, cover with parafilm and place in the fridge (! Carefully not to shake and disturb the gradient). Let cool down your tube before introducing your sample.
 9. Load sample carefully on the top of your sucrose tube. Maximum: up to 2mg of proteins or 1ml of volume. For sucrose gradient adapt the volume to 450µl. Check the balance for your ultracentrifuge.
 10. Place in rotor SW41 for 16h, 4°C, 35300rpm

Annexe 4B : Immunoprecipitation

Day 3:

1. Prepare 2x20 tubes, first set for inputs, the second for IP.
2. Remove your tube from the rotor.
3. For this step, work in cold room. Start to collect fractions (500µl) by pipetting from the top and place the fractions in "input" tubes. Your tip should only touch the meniscus. (! The last tube (20) doesn't have exactly 500µl)
4. Prepare your beads with Ab for IP : see below the conditions for each Ab. Distribute in your set of tubes "IP".
5. Depending on the necessity: collect 400µL or 450µl from "input" tubes to "IP" containing already your beads coupled to Ab. The left over is used as input. It can be directly ready to load on sds-page gel (50µl left) or proteins from 100µl left are precipitated by acetone. This second method can be useful if one of the proteins of interest is less abundant/expressed and hardly detectable. However, by this method you also precipitate the salts present in sucrose buffer. This increases the background detectable later on WesternBlot. See below for Acetone precipitation protocol.
6. Incubate the required time (see below) on rotor wheel at 4°C.
7. Centrifuge 5min 4°C 1400rpm. Discard supernatant. (If necessary, can be kept for WB analysis, if there is an issue with co-IP).
8. Add 1ml of washing buffer and resuspend by inverting the tube. Centrifuge 5min 4°C 1400rpm.
9. Repeat step 8 for a total of 3 washes.
10. After the last centrifugation, remove as much as possible of the supernatant.
11. Add 20µl of Loading Dye 1x and heat at 95°C.

1. Immunoprecipitation conditions

All antibody coupled to the beads should be equilibrated with buffer corresponding in salt to the sucrose gradient (equilibration buffer 1X), i.e. 10 mM NaCl; 2 mM TrisHCl pH7,5; 0,5mM MgCl₂. Always pipette beads with cut tips.

HA antibody, (A2095-1ML , Sigma) :

1. 30µl/IP in one falcon or tube. Resuspend well the tube before collecting, do not vortex. For sucrose IP, add 600µl of beads to falcon containing 10ml of equilibration buffer
2. Centrifuge 5min 4°C 1000g. Remove supernatant without touching the beads.
3. Add 1ml of equilibration buffer. Resuspend beads. Dispense 60µl to each Eppendorf tube labelled « IP » (see above).
4. Centrifuge 5min 4°C 1000g. Remove supernatant without touching the beads, as much as possible.
5. Incubation time with sample : 2h

E2F4 antibody (sc-6851, Santa Cruz) :

1. 30µl/IP in one falcon or tube. Resuspend well the tube before collecting, do not vortex. For sucrose IP, add 600µl of beads to falcon containing 10ml of equilibration buffer.
2. Centrifuge 5min 4°C 1300rpm. Remove supernatant without touching the beads.
3. Add 1ml of equilibration buffer. Resuspend beads. Dispense 60µl to each Eppendorf tube labelled « IP » (see above).
4. Centrifuge 5min 4°C 1300rpm. Remove supernatant without touching the beads, as much as possible.
5. Incubation time with sample: 4h

PARP14 antibody (GTX131920, GeneTex)

1. 3µg Ab with 30µl beads Sepharose A/G () in 300µl PBS 1X per IP. Prepare in one tube, couple the Ab to beads overnight.
2. Centrifuge 5 min 4°C 500 rpm. Remove the supernatant.
3. Add 500µl of equilibration buffer x number of IP
4. Centrifuge 5 min 4°C 500 rpm. Remove the supernatant.
6. For sucrose gradient IP's, add 1ml of equilibration buffer. Resuspend beads. Distribute 60µl to each Eppendorf tube labelled « IP » (see above).
7. Centrifuge 5min 4°C 1300rpm. Remove supernatant without touching the beads, as much as possible.
8. Incubation time with sample: at least 4h. The overnight experiment didn't show any difference in efficiency but if necessary it can be performed.

2. Acetone precipitation (Optional)

1. Add x5 volume of pure acetone cooled in -20°C.
2. Put tubes in -20°C for at least 1h. Due to technical organization, all precipitations were performed overnight: following some sources in some conditions it can increase the efficiency.
3. Centrifuge 10min 4°C at maximum speed (>13000rpm).
4. Discard SN without disturbing the sucrose pellet.
5. Wash in 1:4 of H₂O:acetone solution. Water is necessary to solubilize the sucrose still present.
6. Repeat the wash 2 times, until you don't have sucrose pellet anymore.
7. Remove all acetone, as much as possible, and let dry the pellet under chemical hood.
8. Resuspend in LD 1x in a volume adapted to the experiment. In case of less abundant/expressed and hardly detectable, resuspend in 10µl and load the total amount on sds-page gel. During resuspension, collect gently the proteins attached to the wall (pipet along the wall of the tube).
9. Heat at 95°C for 5min

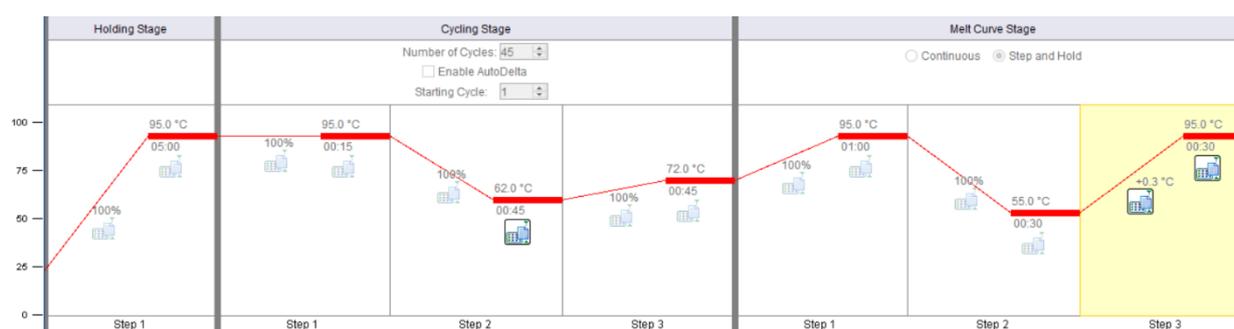
Annexe 5 : RT-qPCR

The RNA is extracted using lysis buffer from Macherey-Nagel 740933.50 RNA-protein extraction kit (see above). The lysis buffer is applied directly on cells from a 6-well plate.

1. The cDNA is synthesised using the kit of Thermo Fisher Scientific (K1621) and following the manufacturer protocol. The standard protocol for cDNA synthesis requires 400ng of RNA. This amount has been increased up to 800ng if the gene is low expressed. In theory, it can go up to 1µg.
2. The obtained cDNA is diluted 1:100 in ultra-pure water (or 1:10 if low expression of genes) prior the RT-qPCR platting.
3. For each biological replicate, prepare a technical triplicate of Master Mix solution. Because of the viscosity of the Mesa Green, prepare n+2 Master Mix solutions for each gene.
*Example : for 3 scrambles and 3 siRNA conditions (3+3 biological replicate), you need to prepare [(3+3)*3]+2= 20 of master mix solution replicates.*
4. Dispense 17,5µl of the Master mix solution in each well of the 96-well plate USING THE SAME TIP.
5. Add 2,5µl of cDNA CHANGING YOUR TIP EACH TIME.

Per replicate/gene:

| | | |
|---------|---|-------|
| Point 5 | MESA GREEN qPCR 2X MasterMix (RT-SY2X-06+WOU, Eurogentec) | 10µl |
| | Forward primer (10pmol/µl) | 0,4µl |
| | Reverse Primer (10pmol/µl) | 0,4µl |
| | H ₂ O (ultra-pure, RNase and DNase free) | 6,7µl |
| Point 6 | DNA | 2,5µl |
| TOTAL | | 20µl |



6. Seal the 96-well plate with MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems™ - 4360954)
7. PCR program :
Rem1: The standard number of cycles for Cycling stage is 35-40, and not 45
Rem2 : The T_m°C (here 62°C) is determined before and specific for each gene.
8. Analyse using ΔΔCt method

Annexe 6 : Senescence Assays

1. Immunofluorescence

Material used for senescence assay :

- Anti-Histone H3 (di methyl K9) antibody [mAbcam 1220] - CHIP Grade ab1220
- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse igG (H+L), Invitrogen (A11029)
- Vectashield Antifade Mounting Media with DAPI (Vector Laboratories, H-1500)

1. Plate cells in 6 well plate. Follow the protocol for knockdowns if required. If the cells don't need to be treated, collect them 24h after plating.
2. Collect cells with Trypsin + DMEM +++ (100µl/well, inhibit trypsin with DMEM +++ (1.5ml), centrifuge 4min 1400rpm, remove SN).
3. Wash with 500µl of PBS + FCS 3%, centrifuge 3min 1300rpm
4. Discard SN, resuspend in 100µl PBS + FCS 3%
5. Place 20µl of cells suspension on slides treated with polyLysine - Sigma (P6285-5MG) (the treatment has been done before, ready to use slides are stored in the fridge). Let dry few minutes
6. Add 50µl of paraformaldehyde 4% and leave for 10-15min in dark
7. Remove by vacuum (without touching cells! carefully remove by capillarity)
8. Wash briefly with PBS + FCS 3% (add 50µl - vacuum)

At this step the slides can be stored in petri dish on humid paper towel to create a humid chamber. The cells should be cover with PBS+FCS 3%. It's to prevent to dry the cells which were fixed thanks to the paraformaldehyde.

1. Add 50µl of Triton 0.1%, leave fo 10-15min in dark - it permeabilises the cells.
2. Wash 3-5 times with PBS+ FCS 3%
3. Incubate with primary Ab 2h (1:250, diluted in PBS + FCS 3%)
4. Wash 3-5 times with PBS + FCS 3%
5. Incubate with secondary Ab 1h (1:1000) Alexa 488 Mouse, diluted in PBS+FCS 3%
6. Add 30-50 µl of DAPI Mounting solution and place small coverslide. Clean the excess of mounting solution and let it dry few minutes in dark.

The slide is ready to analyse of IF microscope. Dapi is analysed on "DAPI" canal, when the H3K9me2 signal is followed on "FITC" canal.

2. β -galactosidase

Cells have been plated on a 6 well plate, followed by transfection of siRNA as described previously. For the staining we used the Staining kit (Cell Signaling Technology #9860) and followed the manufacturer's instructions.

Annexe 7 : RNAseq analysis of Δ Np73 α KD (Chapitre 6)

Tableau 7.1 GO des Processus Biologiques de protéines de gènes dérégulés après déplétion de Δ Np73 α . Seulement les 10 premiers résultats sont indiqués

| #term ID | term description | observed gene count | background gene count | strength | false discovery rate |
|------------|---|---------------------|-----------------------|----------|----------------------|
| GO:0031581 | Hemidesmosome assembly | 6 | 12 | 0.92 | 0.0168 |
| GO:0031065 | Positive regulation of histone deacetylation | 8 | 18 | 0.87 | 0.0043 |
| GO:0060707 | Trophoblast giant cell differentiation | 6 | 14 | 0.85 | 0.0282 |
| GO:1990264 | Peptidyl-tyrosine dephosphorylation involved in inactivation of protein kinase activity | 6 | 15 | 0.82 | 0.0355 |
| GO:1900745 | Positive regulation of p38MAPK cascade | 10 | 26 | 0.81 | 0.0018 |
| GO:0032495 | Response to muramyl dipeptide | 7 | 20 | 0.76 | 0.0275 |
| GO:0080182 | Histone H3-K4 trimethylation | 7 | 20 | 0.76 | 0.0275 |
| GO:1900744 | Regulation of p38MAPK cascade | 12 | 38 | 0.72 | 0.0015 |
| GO:0031063 | Regulation of histone deacetylation | 9 | 29 | 0.71 | 0.0116 |
| GO:0000188 | Inactivation of MAPK activity | 8 | 27 | 0.69 | 0.0279 |

Tableau 7.2 Analyses d'enrichissements des voies de signalisations parmi les gènes régulés à la hausse après déplétion de Δ Np73 α

| #term ID | term description | observed gene count | background gene count | strength | false discovery rate |
|-------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------|----------------------|
| HSA-1280215 | Cytokine Signaling in Immune system | 77 | 681 | 0.27 | 0.0011 |
| HSA-6783783 | Interleukin-10 signaling | 13 | 45 | 0.68 | 0.0189 |
| HSA-449147 | Signaling by Interleukins | 50 | 440 | 0.28 | 0.0264 |
| HSA-6809371 | Formation of the cornified envelope | 22 | 127 | 0.46 | 0.0264 |

Tableau 7.3 Gène régulés à la hausse après déplétion d'E2F4-5 ou de Δ Np73 α .

| Gène | Log2 FC E2F4-5 KD | Valeur p ajustée | Log2 FC Δ Np73a KD | Valeur p ajustée | Gène | Log2 FC E2F4-5 KD | Valeur p ajustée | Log2 FC Δ Np73a KD | Valeur p ajustée |
|---------|-------------------|------------------|---------------------------|------------------|----------|-------------------|------------------|---------------------------|------------------|
| ST3GAL1 | 0.34 | 2.63E-07 | 0.28 | 0.0004 | HLA-B | 0.30 | 0.0019 | 0.29 | 0.0194 |
| CREBBP | 0.31 | 0.0006 | 0.28 | 0.0035 | SH3PXD2A | 0.20 | 0.0020 | 0.21 | 0.0116 |
| MAFB | 0.50 | 0.0003 | 0.38 | 0.0241 | MBD6 | 0.23 | 0.0028 | 0.33 | 0.0209 |
| PDRG1 | 0.28 | 0.0002 | 0.33 | 0.0004 | BAK1 | 0.22 | 0.0059 | 0.26 | 0.0468 |
| LYPD3 | 0.22 | 0.0219 | 0.41 | 0.0017 | PLXNB3 | 0.36 | 0.0082 | 0.60 | 0.0197 |
| SEMA3C | 0.61 | 1.13E-10 | 0.26 | 0.0334 | ABCA1 | 0.93 | 1.55E-20 | 0.55 | 1.71E-07 |
| DNAJC5 | 0.32 | 1.94E-06 | 0.42 | 0.0043 | BTG1 | 0.26 | 7.63E-05 | 0.36 | 9.38E-05 |
| KRI1 | 0.23 | 0.0015 | 0.26 | 0.0428 | KMT2D | 0.41 | 1.51E-05 | 0.37 | 0.0050 |
| ZNF841 | 0.35 | 0.0049 | 0.37 | 0.0014 | ZFYVE26 | 0.39 | 1.58E-07 | 0.29 | 0.0012 |
| MYBBP1A | 0.20 | 0.0035 | 0.35 | 0.0260 | MRTFA | 0.20 | 0.0240 | 0.34 | 0.0212 |
| MUC16 | 0.75 | 8.52E-05 | 0.28 | 0.0040 | AJAP1 | 0.27 | 0.0250 | 0.44 | 0.0002 |
| RTN4RL1 | 0.21 | 0.0430 | 0.37 | 0.0363 | H2BC21 | 0.43 | 0.0264 | 0.42 | 0.0229 |
| KCNK1 | 0.35 | 6.83E-05 | 2.53 | 0.0022 | TNFAIP3 | 0.34 | 0.0009 | 0.55 | 1.70E-08 |
| SART1 | 0.26 | 0.0011 | 0.40 | 0.0140 | ZBTB7B | 0.25 | 0.0072 | 0.46 | 0.0173 |
| ZNF276 | 0.21 | 0.0307 | 0.58 | 1.73E-06 | DUSP5 | 0.36 | 5.76E-06 | 0.22 | 0.0093 |
| CSF1 | 0.28 | 0.0025 | 0.23 | 0.0371 | CLBA1 | 0.31 | 0.0060 | 0.37 | 0.0163 |

| | | | | | | | | | |
|-----------|------|----------|------|----------|----------|------|----------|------|----------|
| BRPF1 | 0.30 | 0.0001 | 0.25 | 0.0337 | FLCN | 0.26 | 0.0061 | 0.52 | 5.01E-05 |
| RPS6KB2 | 0.22 | 0.0111 | 0.35 | 0.0180 | POLR3H | 0.33 | 1.97E-05 | 0.26 | 0.0461 |
| NOTCH3 | 0.52 | 1.52E-06 | 0.88 | 4.22E-05 | C1R | 0.48 | 0.0042 | 0.31 | 0.0231 |
| ZNF385A | 0.38 | 9.86E-07 | 0.39 | 0.0106 | HRAS | 0.38 | 1.35E-06 | 0.50 | 0.0058 |
| SNAPC4 | 0.47 | 1.00E-08 | 0.57 | 0.0010 | SLC26A6 | 0.37 | 7.02E-06 | 0.34 | 0.0160 |
| ZNF316 | 0.39 | 1.43E-05 | 0.42 | 0.0058 | ZNF142 | 0.33 | 1.82E-05 | 0.32 | 0.0020 |
| ENTPD6 | 0.23 | 0.0004 | 0.26 | 0.0340 | AKAP8 | 0.21 | 0.0128 | 0.20 | 0.0478 |
| DOT1L | 0.38 | 0.0003 | 0.34 | 0.0364 | MSS51 | 0.68 | 0.0029 | 0.71 | 0.0016 |
| MN1 | 0.44 | 2.76E-05 | 0.55 | 9.61E-05 | BMF | 0.32 | 0.0256 | 0.36 | 0.0396 |
| LAMP1 | 0.29 | 3.69E-07 | 0.21 | 0.0191 | DSC2 | 0.36 | 2.33E-06 | 0.45 | 2.41E-06 |
| ZNF263 | 0.46 | 9.32E-09 | 0.24 | 0.0219 | PCSK7 | 0.21 | 0.0047 | 0.25 | 0.0402 |
| SMAD7 | 0.31 | 0.0014 | 0.29 | 0.0194 | ZNF202 | 0.31 | 0.0005 | 0.23 | 0.0257 |
| IP6K1 | 0.26 | 0.0019 | 0.20 | 0.0494 | ANKRD10 | 0.25 | 0.0058 | 0.23 | 0.0182 |
| H2AC6 | 1.16 | 1.60E-23 | 0.58 | 3.75E-06 | RDH13 | 0.28 | 0.0162 | 0.47 | 0.0028 |
| NBPF14 | 0.63 | 0.0006 | 0.32 | 0.0200 | TMEM222 | 0.32 | 5.68E-05 | 0.50 | 0.0046 |
| NACC2 | 0.34 | 0.0002 | 0.31 | 0.0243 | REXO1 | 0.29 | 0.0147 | 0.48 | 0.0184 |
| UBXN11 | 0.35 | 0.0021 | 0.45 | 0.0301 | FAM13B | 0.22 | 0.0398 | 0.26 | 0.0191 |
| MIGA2 | 0.30 | 0.0003 | 0.35 | 0.0366 | U2AF2 | 0.22 | 0.0006 | 0.30 | 0.0150 |
| VAV2 | 0.22 | 0.0007 | 0.30 | 0.0223 | COL4A2 | 0.22 | 0.0068 | 0.32 | 0.0343 |
| FLRT2 | 0.22 | 0.0340 | 0.32 | 0.0035 | VPS18 | 0.32 | 3.87E-05 | 0.35 | 0.0297 |
| PLCXD2 | 0.31 | 0.0289 | 0.49 | 6.67E-05 | RCE1 | 0.32 | 0.0005 | 0.30 | 0.0449 |
| POLR3A | 0.24 | 0.0004 | 0.20 | 0.0197 | DDX51 | 0.32 | 2.50E-05 | 0.41 | 0.0036 |
| KITLG | 0.36 | 7.75E-06 | 0.40 | 0.0015 | SIRT7 | 0.24 | 0.0040 | 0.47 | 0.0067 |
| XYLT1 | 0.39 | 0.0215 | 0.37 | 0.0200 | GRHL3 | 0.53 | 0.0235 | 0.71 | 0.0036 |
| RBM33 | 0.24 | 0.0003 | 0.27 | 0.0032 | LYST | 0.33 | 0.0001 | 0.27 | 0.0042 |
| KMT2B | 0.24 | 0.0028 | 0.32 | 0.0416 | ZNF600 | 0.31 | 0.0092 | 0.28 | 0.0241 |
| SMCR8 | 0.27 | 0.0005 | 0.29 | 0.0006 | PPP1R16A | 0.27 | 0.0288 | 0.67 | 0.0070 |
| PRRC2B | 0.34 | 2.94E-06 | 0.26 | 0.0334 | VGLL4 | 0.21 | 0.0116 | 0.22 | 0.0311 |
| CEACAM19 | 0.29 | 0.0039 | 0.59 | 0.0006 | SLC16A2 | 0.36 | 0.0002 | 0.30 | 0.0045 |
| CDKN2B | 0.28 | 0.0011 | 0.23 | 0.0267 | ZNF26 | 0.37 | 0.0005 | 0.26 | 0.0425 |
| ZNF84 | 0.22 | 0.0252 | 0.37 | 0.0014 | CDK20 | 0.45 | 0.0082 | 0.46 | 0.0494 |
| GJB5 | 0.31 | 0.0001 | 0.32 | 0.0025 | RNF44 | 0.34 | 1.04E-05 | 0.38 | 0.0067 |
| SETD1B | 0.28 | 0.0100 | 0.28 | 0.0485 | PFKFB3 | 0.24 | 0.0010 | 0.32 | 0.0058 |
| RAP2B | 0.25 | 0.0011 | 0.23 | 0.0114 | DHX38 | 0.27 | 0.0001 | 0.25 | 0.0387 |
| TNFRSF10D | 0.59 | 2.07E-20 | 0.41 | 3.94E-06 | TRAF4 | 0.38 | 2.46E-12 | 0.37 | 0.0106 |
| COL12A1 | 0.20 | 0.0031 | 0.29 | 0.0004 | ZNF432 | 0.56 | 4.83E-06 | 0.30 | 0.0219 |
| FRAS1 | 0.39 | 0.0003 | 0.46 | 1.02E-05 | TNC | 0.52 | 5.93E-12 | 0.49 | 1.06E-08 |
| CCNL2 | 0.20 | 0.0203 | 0.27 | 0.0069 | PRDM1 | 0.46 | 1.08E-05 | 0.34 | 0.0118 |
| FBXL6 | 0.33 | 0.0011 | 0.56 | 0.0113 | ITGA2 | 0.32 | 2.80E-05 | 0.24 | 0.0097 |
| ATP6VOD1 | 0.22 | 0.0044 | 0.24 | 0.0477 | NKIRAS2 | 0.33 | 6.89E-05 | 0.32 | 0.0016 |
| B4GALNT4 | 0.26 | 0.0105 | 0.41 | 0.0296 | ZNF473 | 0.38 | 5.99E-06 | 0.29 | 0.0058 |
| FBXO32 | 0.43 | 7.15E-09 | 0.21 | 0.0267 | NR1H2 | 0.27 | 0.0318 | 0.43 | 0.0282 |
| BCL11B | 0.81 | 3.21E-15 | 0.37 | 0.0071 | BMP2 | 0.38 | 0.0094 | 0.51 | 0.0001 |
| CENPT | 0.29 | 0.0006 | 0.32 | 0.0177 | ZNF79 | 0.50 | 4.70E-06 | 0.27 | 0.0343 |
| LRRC14 | 0.37 | 5.25E-05 | 0.33 | 0.0421 | TPRG1L | 0.54 | 6.74E-14 | 0.23 | 0.0219 |
| CLASRP | 0.21 | 0.0071 | 0.29 | 0.0465 | TET3 | 0.45 | 7.21E-11 | 0.31 | 0.0012 |

Annexe 8 : Taverniti/Krynska, 2023 et al., mSphere

"The E2F4/p130 Repressor Complex Cooperates with Oncogenic $\Delta Np73\alpha$ To Inhibit Gene Expression in Human Papillomavirus 38 E6/E7-Transformed Keratinocytes and in Cancer Cells."



The E2F4/p130 Repressor Complex Cooperates with Oncogenic Δ Np73 α To Inhibit Gene Expression in Human Papillomavirus 38 E6/E7-Transformed Keratinocytes and in Cancer Cells

Valerio Taverniti,^a Hanna Krynska,^{a,b} Assunta Venuti,^a Marie-Laure Straub,^b Cécilia Sirand,^a Eugenie Lohmann,^a Maria Carmen Romero-Medina,^a Stefano Moro,^b Alexis Robitaille,^a Luc Negroni,^c Denise Martinez-Zapien,^b  Murielle Masson,^b Massimo Tommasino,^{d†}  Katia Zanier^b

^aInternational Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization, Lyon, France

^bBiotechnology and Cell Signaling (CNRS/Université de Strasbourg, UMR 7242), Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brant, Illkirch, France

^cProteomics platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)/INSERM U964/CNRS UMR 7104/Université de Strasbourg, Illkirch, France

^dIRCCS Istituto Tumori Giovanni Paolo II of Bari, Bari, Italy

Valerio Taverniti and Hanna Krynska contributed equally to the study. Author order was determined on the basis of seniority.

ABSTRACT Tumor suppressor p53 and its related proteins, p63 and p73, can be synthesized as multiple isoforms lacking part of the N- or C-terminal regions. Specifically, high expression of the Δ Np73 α isoform is notoriously associated with various human malignancies characterized by poor prognosis. This isoform is also accumulated by oncogenic viruses, such as Epstein–Barr virus (EBV), as well as genus beta human papillomaviruses (HPV) that appear to be involved in carcinogenesis. To gain additional insight into Δ Np73 α mechanisms, we have performed proteomics analyses using human keratinocytes transformed by the E6 and E7 proteins of the beta-HPV type 38 virus as an experimental model (38HK). We find that Δ Np73 α associates with the E2F4/p130 repressor complex through a direct interaction with E2F4. This interaction is favored by the N-terminal truncation of p73 characteristic of Δ Np73 isoforms. Moreover, it is independent of the C-terminal splicing status, suggesting that it could represent a general feature of Δ Np73 isoforms (α , β , γ , δ , ε , ζ , θ , η , and η 1). We show that the Δ Np73 α -E2F4/p130 complex inhibits the expression of specific genes, including genes encoding for negative regulators of proliferation, both in 38HK and in HPV-negative cancer-derived cell lines. Such genes are not inhibited by E2F4/p130 in primary keratinocytes lacking Δ Np73 α , indicating that the interaction with Δ Np73 α rewires the E2F4 transcriptional program. In conclusion, we have identified and characterized a novel transcriptional regulatory complex with potential implications in oncogenesis.

IMPORTANCE The TP53 gene is mutated in about 50% of human cancers. In contrast, the TP63 and TP73 genes are rarely mutated but rather expressed as Δ Np63 and Δ Np73 isoforms in a wide range of malignancies, where they act as p53 antagonists. Accumulation of Δ Np63 and Δ Np73, which is associated with chemoresistance, can result from infection by oncogenic viruses such as EBV or HPV. Our study focuses on the highly carcinogenic Δ Np73 α isoform and uses a viral model of cellular transformation. We unveil a physical interaction between Δ Np73 α and the E2F4/p130 complex involved in cell cycle control, which rewires the E2F4/p130 transcriptional program. Our work shows that Δ Np73 isoforms can establish interactions with proteins that do not bind to the TP73 α tumor suppressor. This situation is analogous to the gain-of-function interactions of p53 mutants supporting cellular proliferation.

KEYWORDS p53, Δ Np73 isoforms, E2F4, p130, protein-protein interactions, gene expression, transformation

Editor Laimonis A. Laimins, Northwestern University

Copyright © 2023 Taverniti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Katia Zanier, zanier@unistra.fr.

This work is dedicated to the memory of our dear friend and colleague Massimo, a great source of inspiration for many of us.

The authors declare no conflict of interest.

†Deceased.

Received 31 January 2023

Accepted 9 February 2023

Published 8 March 2023

The p53 family of proteins plays a key role in cancer prevention. It consists of 3 homologous transcription factors (TFs), namely, p53, p63, and p73, which bind to common DNA promoter sites (p53RE). The TP53, TP63, and TP73 genes can be expressed as multiple isoforms lacking part of the N- or the C-terminal regions. In the case of TP73, the full-length TAp73 protein is transcribed from the P1 promoter upstream of exon 1, whereas Δ Np73 isoforms are generated from the P2 promoter within intron 3. These isoforms lack the N-terminal transactivation domain (TAD) and, consequently, act as dominant negative inhibitors of full-length TAp73 and of its TAp53 and TAp63 homologues (1–3). Interestingly, the Δ N P2 promoter contains a p53 response element (RE) that enables TAp53 and TAp73 to induce expression of Δ N isoforms (4), thus creating a negative feedback loop that fine-tunes p53 and p73 functions. Additional isoforms of TAp73 and Δ Np73 proteins (i.e., α , β , γ , δ , ϵ , ζ , θ , η , and η 1 isoforms) are generated by alternative splicing within the 3' region of the gene (exons 10 to 14), giving rise to differences in the C-terminal regions of the proteins (5, 6).

Expression of the TA and Δ N proteins is highly cell- and tissue-specific. Whereas the Δ N isoforms support proliferation, the TA proteins promote cell cycle arrest, senescence, and apoptosis, suggesting that the ratio between TA and Δ N proteins determines cell fate and oncogenesis (7). In healthy cells, where Δ Np73 levels are low, c-Abl phosphorylation coupled to Pin1 isomerase binding results in the stabilization of TAp73 (8–10), whereas Δ Np73 isoforms are rapidly degraded by other ubiquitin ligases that can discriminate between TA and Δ N isoforms (11) or via the calpain (12) and 20S proteasome (13) pathways.

Mutation of the TP53 gene is the most frequent genetic alteration, present in about 50% of human cancers. In contrast, the TP63 and TP73 genes are rarely mutated but are rather expressed as Δ Np63 and Δ Np73 isoforms in a wide range of human malignancies, which display unfavorable prognosis due to increased drug resistance (7, 14, 15). In particular, the Δ Np73 α isoform, which comprises an intact (unspliced) C-terminal region, is upregulated in several cancers harboring wild-type TP53 and TP73 genes (including breast, prostate, liver, lung, and thyroid cancer), where it inhibits drug-induced apoptosis (15). Although the association of Δ Np73 α with elevated carcinogenicity and chemoresistance can be explained by alterations of p53-regulated gene expression, it is not yet clear whether Δ Np73 α could use additional mechanisms in promoting cellular transformation. Previous independent studies have shown that Δ Np73 α is accumulated upon infection with the well-established oncogenic viruses, Epstein-Barr virus (EBV) (16) and other herpesviruses, such as the human cytomegalovirus (17). Accumulation of the Δ Np73 α isoform is also induced in *in vitro* and *in vivo* experimental models by cutaneous beta (β) human papillomavirus (HPV) types (18–20), which appear to be involved in the development of skin squamous cell carcinoma (21).

In this study, we searched for protein factors that modulate the functions of Δ Np73 α in transformed cells. We identified and characterized a novel interaction of Δ Np73 α with the E2F4/p130 transcriptional repressor complex that modulates the cellular gene expression in *in vitro* HPV38 E6/E7-transformed human keratinocytes (38HK), as well as in cancer-derived cells.

RESULTS

Δ Np73 α associates with the E2F4/p130 transcriptional repressor complex in 38HK. 38HK are human keratinocytes immortalized by the E6 and E7 oncoproteins of cutaneous β -HPV38 (18). Here, we used 38HK as a cellular model to perform proteomics analyses of Δ Np73 α . The entire Δ Np73 α sequence was fused to the N-terminus of the tandem affinity purification (TAP) tag, cloned in a lentiviral vector under the control of the weak promoter of Moloney murine leukemia virus (22), and stably retrotransduced in 38HK (Fig. 1A). The nuclear fraction of 38HK expressing the Δ Np73 α -TAP construct was recovered, and native Δ Np73 α complexes purified using the TAP approach (23) (Fig. 1A and B). Finally, Δ Np73 α binding partners were identified by mass spectrometry (Table S1).

Bioinformatics analysis of the binders show an enrichment of proteins involved in transcriptional and cell cycle control (Fig. 1C). In contrast, the E6 and E7 viral oncoproteins (38.E6 and 38.E7) do not appear to be associated with Δ Np73 α .

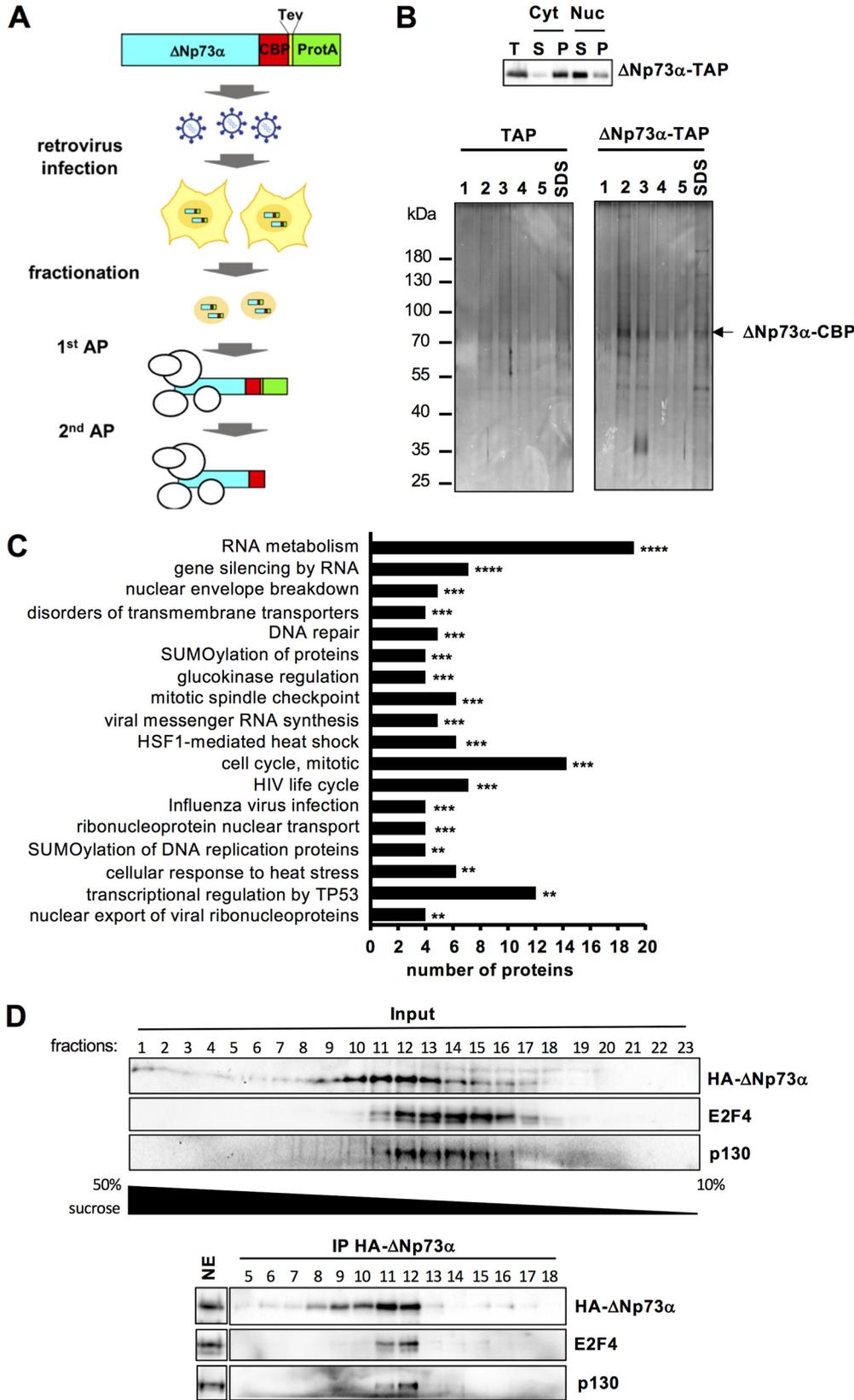


FIG 1 Proteomics analyses in 38HK identify the E2F4/p130 complex as a partner of ΔNp73α. (A) Illustration of the proteomics approach used to identify nuclear binding partners of ΔNp73α. (B) Expression and purification of ΔNp73α-TAP complexes. (B, upper panel) Distribution of ΔNp73α-TAP in cytoplasmic and nuclear fractions of 38HK extracts. The 2 fractions were centrifuged and analyzed by Western blotting using an anti-TAP antibody. T, total extract; S, supernatant; P, pellet. (Continued on next page)

Among the nuclear partners displaying high specificity for Δ Np73 α -TAP, we identified the transcription factor E2F4 and the co-repressor retinoblastoma-like 2 (RBL2/p130) (Table S1). To corroborate this finding, we performed co-immunoprecipitation (co-IP) experiments using nuclear extracts of 38HK stably expressing Δ Np73 α fused to an HA tag (HA- Δ Np73 α). Extracts were first applied to a 50 to 10% sucrose gradient, and then incubated with anti-HA antibody conjugated beads. Results show that endogenous E2F4 and p130 coprecipitate with HA- Δ Np73 α in fractions 11 to 12 containing all 3 proteins (Fig. 1D). By contrast, E2F4 and p130 are not recovered in fractions 13 to 16, presenting lower levels of HA- Δ Np73 α , thereby confirming the co-IP specificity of fractions 11 to 12. Consistently, incubation with an anti-E2F4 antibody coupled to beads coprecipitates HA- Δ Np73 α and p130 in both total and fractionated 38HK nuclear extracts (Fig. S1A and B). As an alternative approach, we also fractionated 38HK nuclear extracts by size exclusion chromatography, which provides more stringent complex fractionation conditions compared to sucrose gradients. Incubation with anti-HA beads coprecipitates endogenous E2F4 and p130 proteins in fractions containing the 3 proteins (Fig. S1C).

These results indicate that Δ Np73 α interacts with several cellular proteins, including transcriptional regulatory complexes.

E2F4 is a binding partner of Δ Np73 α . E2F4 forms stable heterodimers with DP1/2 (24), whereas p73 hetero-tetramerizes with p63 (25, 26). Consistently, 2 unique DP1 peptides and several p63 peptides are detected in our proteomics analyses of Δ Np73 α (Table S1). To identify the binding partner of Δ Np73 α , we evaluated binary interactions within a protein set that comprises Δ Np73 α , TAp63 α , E2F4, DP1, and p130 using the *Gaussia princeps* protein complementation assay (GPCA) (27). Here, the 2 test proteins are overexpressed in HEK293T cells as N-terminal fusions to the Gluc1 and Gluc2 inactive fragments of the *Gaussia princeps* luciferase. Based on previous benchmarking, protein pairs are considered as interacting if the normalized luminescence ratio (NLR) is above 5 (27). In our experiment, Gluc1-E2F4 and Gluc2-DP1 give a high binding response (NLR \sim 500), which is consistent with the high affinity of the E2F4/DP1 heterodimer (Fig. 2A). As a control, we also measured the interaction between Gluc1-E2F4 and Gluc2-p130. The corresponding binding response (NLR $>$ 40) indicates that, in the conditions of overexpression of this assay, only a fraction of Gluc2-p130 is sequestered by the competing E1A and SV40 Large T antigen proteins of HEK293T cells, leaving an excess of Gluc2-p130 free for interaction with E2F4. Besides these well-established interactions, E2F4 also binds to the Δ Np73 α and the Δ Np73 β isoforms (NLRs $>$ 20), but not to p130 or DP1 (Fig. 2A). Moreover, no interaction is observed for TAp63 α , ruling out any direct and sequence specific contributions of this protein in complex assembly.

Next, we evaluated protein-protein interactions (PPIs) in conditions of protein partner depletion. Knockdown of E2F4 by small interfering RNAs (siRNAs) in 38HK leads to an increase in the functional homologue E2F5, and conversely, knockdown of E2F5 raises E2F4 levels (Fig. 2B). Immunoprecipitation of HA- Δ Np73 α from fractionated nuclear extracts of 38HK treated with scramble siRNA or E2F4 siRNA leads to similar recoveries of p130 and DP1 (compare Fig. 2C, upper panels with Fig. S2A). In contrast, simulta-

FIG 1 Legend (Continued)

P, pellet. Δ Np73 α -TAP is present mainly in the nuclear fraction (Cyt[P] and Nuc[S], see also Materials and Methods section). (B, lower panel) Silver-stained 10% SDS-PAGE analysis of elution fractions 1 to 5 from the second affinity purification step (calmodulin resin) for Δ Np73 α -TAP and control (TAP) purifications. An additional elution with SDS was performed to recover all the remaining proteins. (C) Pathway analysis of nuclear Δ Np73 α binding partners using the Reactome database (63). Only significant pathways are shown (defined by a false discovery rate [FDR] value \leq 0.02) and ranked based on the $-\log_{10}$ of the associated *P* value (*: \leq 0.05; **: \leq 0.01; ***: \leq 0.001; ****: \leq 0.0001). Histogram bar size shows the number of input proteins involved in the corresponding pathway. See also S1 Table. (D) Sucrose gradient/co-IP experiments on endogenous 38HK proteins. (D, upper panel) Sucrose fractions of 38HK nuclear extracts stably expressing HA- Δ Np73 α were migrated on a 10% SDS-PAGE gel, and analyzed by Western blotting using antibodies recognizing the HA tag, E2F4, and p130 proteins. (D, lower panel) Indicated fractions were immunoprecipitated using anti-HA conjugated beads. Unfractionated nuclear extract (NE) was loaded on the same gel as a reference for protein migration. Images for NE and sucrose fractions are derived from different exposures of the same membrane. See also original Western blot image on Mendeley data.

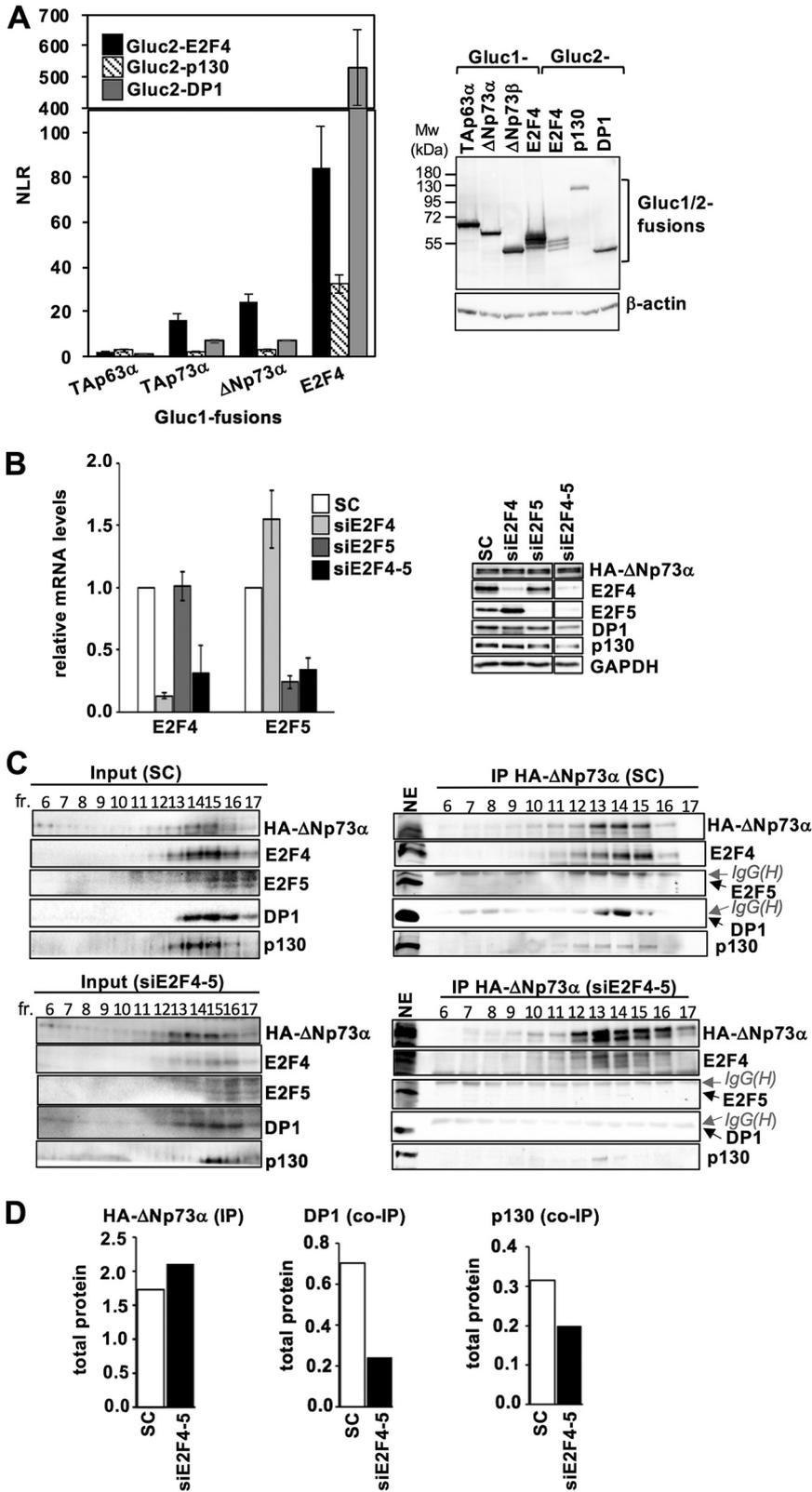


FIG 2 Δ Np73 α establishes a direct PPI with E2F4. (A, left panel) Representative data set for GPCA analysis of binary interactions between Δ Np73/TAp63 proteins and components of the E2F4/p130 complex. Pairwise combinations of Gluc1- Δ Np73/TAp63 and Gluc2-E2F4/DP1/p130 fusion constructs were co-transfected in HEK293T cells. After 48 h, the luciferase activity was measured and expressed as normalized luminescence ratio (NLR) (27). The interactions of Gluc1-E2F4 with Gluc2-E2F4/DP1/p130 proteins are reported as internal controls. Error bars show standard deviations derived from

(Continued on next page)

neous targeting of E2F4 and E2F5 by siRNAs strongly reduces E2F4 and E2F5 protein levels without affecting HA- Δ Np73 α (Fig. 2B). In this condition, the ability of HA- Δ Np73 α to coprecipitate DP1 and p130 clearly decreases (Fig. 2C, lower panels and Fig. 2D).

Together, these results show that E2F4 interacts with Δ Np73 α . In conditions of E2F4 knockdown, the E2F5 homologue is upregulated and interacts with Δ Np73 α .

We then compared E2F4 and E2F5 for binding to Δ Np73 α by GPCA in HEK293T cells. Based on the results obtained, and taking into consideration the differences in the expression levels of the Gluc2-E2F4 and Gluc2-E2F5 fusions, we conclude that the 2 proteins are likely to interact with Δ Np73 α with similar affinities under these assay conditions (Fig. S2C). However, endogenous E2F5 is not a partner of Δ Np73 α , neither in the proteomics analyses (Table S1) nor in the co-IP experiments under the scramble condition (Fig. 2C, upper panels). Hence, additional factors, such as expression levels or post-translational modifications (PTMs), may account for the preference toward endogenous E2F4 in 38HK cells.

E2F4 discriminates between TAp73 and Δ Np73 isoforms. We reproducibly observed that the E2F4 binding response obtained with full-length TAp73 α in GPCA experiments is lower (approximately 50%) than that obtained with the Δ Np73 α isoform (Fig. 3A and B). This intriguing observation was confirmed by *in vitro* pulldown analyses that used recombinantly expressed full-length TAp73 α and Δ Np73 α proteins fused to the maltose binding protein (MBP) and clarified extracts of HEK293T cells overexpressing 3xFlag-E2F4 (Fig. 3C).

To further characterize the interaction between E2F4 and Δ Np73 α , we explored the binding properties of a panel of deletion constructs of Δ Np73 α and E2F4 by GPCA (Fig. 3A). First, we searched for the region of Δ Np73 α that interacts with E2F4. The C-terminal half of Δ Np73 α (residues 349 to 587), comprising the sterile alpha motif (SAM) domain and the disordered linker and C-terminal regions, is dispensable for E2F4 binding, thus indicating that the interaction is independent of the C-terminal splicing status (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , etc.) of Δ Np73 isoforms (Fig. 3D, left panel, compare Δ Np73 α FL with Δ N[1 to 348]). In contrast, deletion of the oligomerization domain (OD) strongly decreases binding, likely due to disruption of the tetrameric state and consequent loss of its avidity contributions (Fig. 3D, left panel, compare Δ Np73 α FL with Δ N[1 to 302]). Hence, the minimal Δ N(1 to 348) construct, which retains the binding properties of Δ Np73 α FL, was further truncated from its N-terminus. Deletion of the first 13 residues specific to Δ Np73 isoforms does not affect the interaction. In contrast, deletion of the entire N-terminal disordered region (residues 1 to 73) reduces binding to 60%, that is to levels comparable to those of full-length TAp73 α , whereas further deletion of the DNA-binding domain (DBD) does not have any effect (Fig. 3D, left panel, compare TAp73, Δ Np73 α FL with Δ N[14 to 348], Δ N[74 to 348], and Δ N[262 to 348]). These results indicate that the N-terminal disordered region of Δ Np73 isoforms harbors a binding site for E2F4.

FIG 2 Legend (Continued)

triplicate measurements. (A, right panel) 8% SDS-PAGE analysis of the expression of Gluc1-fused Δ Np73/TAp63 and E2F4 proteins, and of Gluc2-fused E2F4, DP1 and p130 proteins in HEK293T cells. Proteins were visualized by Western blotting using an anti-Gluc antibody, which allows for detection of both Gluc1 and Gluc2 fragments, albeit with lower efficiency for Gluc2. The multiple bands detected for E2F4 likely correspond to multiple phosphorylation states of the protein as shown in (64). (B) Expression of Δ Np73 α , E2F4-5, DP1, and p130 proteins in 38HK cells transfected with scramble (SC) siRNAs or siRNAs against either E2F4 (siE2F4), E2F5 (siE2F5), or E2F4 plus E2F5 (siE2F4-5). (B, left panel) mRNA levels measured by RT-qPCR. Error bars represent standard deviations derived from three independent experiments. (B, right panel) Protein levels as determined by Western blotting analysis. All samples were migrated on the same gel. See original Western blot image on Mendeley data. (C) Sucrose gradient/co-IP experiments using nuclear extracts from 38HK in the scramble (C, upper panels) and siE2F4-5 (C, lower panels) conditions. Indicated fractions were immunoprecipitated by anti-HA beads. HA- Δ Np73 α , E2F4, E2F5, DP1, and p130 were detected by Western blotting. IgG(H) chains migrate in close proximity with E2F5 and DP1 proteins. NE, unfractionated nuclear extract. See also Fig. S2A and B for experiments under single siE2F4 or siE2F5 conditions. See also legend of Fig. 1D. (D) Quantification of immunoprecipitated HA- Δ Np73 α DP1 and p130 proteins in the scramble and siE2F4-5 conditions of the co-IP experiments shown in panel (C). For each protein, band intensities in the individual fractions are normalized to the intensity of the corresponding band in the NE control (I_{fr}/I_{NE}). Then, the I_{fr}/I_{NE} values of fractions 12 to 16 are summed to get an estimate of the total protein levels. The total DP1 and p130 protein values are additionally normalized to HA- Δ Np73 α levels in the corresponding condition.

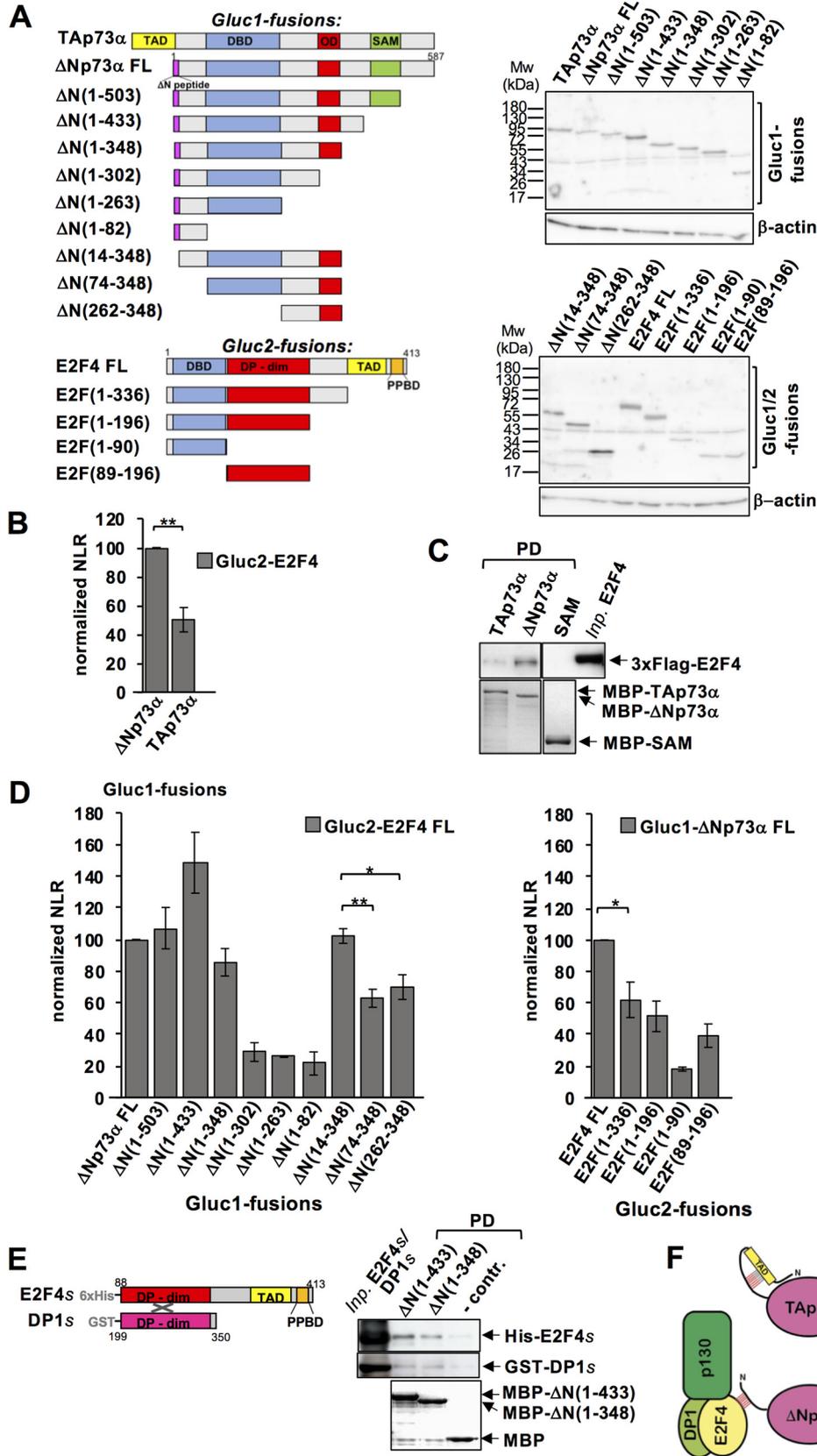


FIG 3 Identification of domains/regions mediating the ΔNp73α-E2F4 interaction. (A, left panel) Schematic representation of the Gluc1-fused TA/ΔNp73α and Gluc2-fused E2F4 constructs analyzed by GPCA. The ΔN(1 to 433) construct corresponds to the ΔNp73β isoform. Domains of TAp73α/ΔNp73α: transactivation domain (Continued on next page)

Then, we searched for the region of E2F4 that interacts with Δ Np73 α . Deletion of residues 197 to 413 from the disordered C-terminus of E2F4, comprising the TAD and the pocket protein binding domain (PPBD), reduces binding activity to 60% (Fig. 3D, right panel, compare E2F4 FL with E2F[1 to 336]), suggesting the existence of a binding site for Δ Np73 within this region. Further deletion of the C-terminus or of the DBD has only moderate effects on the interaction (Fig. 3D, right panel, compare E2F4 FL with constructs E2F[1 to 196] and E2F[89 to 196]), which are probably related to the lower expression levels of these constructs (Fig. 3A, right panel). In contrast, deletion of the DP-binding and dimerization (DP-dim) domain decreases binding to 20% (Fig. 3D, right panel, compare E2F4 FL with E2F[1 to 90]). This domain of E2F4 provides avidity contributions but, unlike the OD of Δ Np73 α , is also a well-known region for PPIs. Therefore, a contribution of the DP-dim domain toward Δ Np73 binding cannot be excluded.

To further corroborate these findings, we performed interaction analyses using recombinant purified proteins. Since E2F4 needs to be stabilized by the cognate DP1 partner in order to be purified (24), we used co-expression approaches in bacteria to produce a minimal E2F4/DP1 heterodimer (E2F4s/DP1s), which comprises the E2F4 regions required for the interaction with Δ Np73 α (i.e., DP-dim and C-terminal regions, residues 88 to 413) and the DP-dim domain of DP1 (residues 199 to 350) (Fig. 3E, left panel). In this way, we were able to obtain low concentration samples of E2F4s/DP1s, which were sufficient for pulldown analyses. Results from these analyses reproducibly show that E2F4s/DP1s interacts with 2 minimal MBP-fused Δ Np73 constructs (Δ N[1 to 433], equivalent to the Δ Np73 β isoform, and Δ N[1 to 348]) but not with the MBP control (Fig. 3E, right panel).

Taken together, our results show that the minimal E2F4s/DP1s heterodimer is sufficient for the interaction with Δ Np73 α . This interaction occurs through E2F4 recognition of a binding site within the N-terminal disordered region of Δ Np73 isoforms that is not accessible in TAp73, likely due to intramolecular interactions (Fig. 3F). Yet, our results do not rule out the possibility that additional protein(s) may further stabilize the Δ Np73 α -E2F4 interaction *in vivo*.

Expression and regulation of Δ Np73 α -E2F4/p130 complex components in transformed versus untransformed cells. We evaluated the levels of Δ Np73 α , E2F4 and p130 proteins in different primary keratinocyte (HPK) and transformed 38HK cell lines. Consistently with previous findings (18), Δ Np73 α is observed in 38HK cell lines only, at both early (38HK[D2]) and late (38HK[D3]) stages of transformation (Fig. 4A and B, left panels). In contrast, the E2F4 and p130 proteins are expressed in both primary HPK and 38HKs. λ -phosphatase treatment induces a small shift in the migration of p130, which suggests

FIG 3 Legend (Continued)

(TAD, yellow); DNA-binding domain (DBD, blue); oligomerization domain (OD, red); sterile alpha motif domain (SAM, green); 13-amino-acid peptide specific for Δ Np73 isoforms (Δ N peptide, purple). Domains of E2F4: DNA-binding domain (DBD, blue); DP-binding and dimerization domain (DP-dim, red); transactivation domain (TAD, yellow); pocket protein binding domain (PPBD, orange). (A, right panel) Expression levels of Gluc1- and Gluc2-fused TA/ Δ Np73 α and E2F4 constructs in HEK293T cells. Proteins were resolved on a 25%/10% gradient SDS-gel and visualized by Western blotting using an anti-Gluc antibody. (B) GPCA analysis of the pairwise interactions of Gluc1-TAp73 α or Gluc1- Δ Np73 α FL with Gluc2-E2F4 FL. (C) MBP-pulldown analysis of the interactions of TAp73 α and Δ Np73 α FL with E2F4 FL. Amylose resin coupled to MBP-TAp73 α or MBP- Δ Np73 α FL constructs was incubated with clarified extracts from HEK293T cells transiently expressing 3xFlag-E2F4 FL. PD reactions were migrated on 2 separate 10% SDS-PAGE gels. One gel was used for E2F4 detection by Western blotting using an anti-Flag antibody, the second gel for detection of MBP fusions by Coomassie staining. The negative control MBP-SAM construct (residues 405 to 502 of Δ Np73 α) was migrated on the same gel (see original Western blot images on Mendeley data). (D) GPCA analyses of pairwise Δ Np73 α /E2F4 interactions. (D, left panel) Gluc1- Δ Np73 α deletion constructs versus Gluc2-E2F4 FL. (D, right panel) Gluc1- Δ Np73 α FL versus Gluc2-E2F4 deletion constructs. (B and D) The NLR values were normalized to the Δ Np73 α -E2F4 FL interaction and are averages from 3 independent experiments (with each experiment being performed in triplicate). *P* values are obtained from unpaired *t* test, *n* = 3 biological replicates (*: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01). (E) Interaction analyses using recombinant purified proteins. (E, left panel) Schematic representation of the constructs used for the minimal E2F4s/DP1s heterodimer. (E, right panel) Pulldown (PD) experiment using MBP- Δ N(1 to 433) (i.e., - Δ Np73 β) and MBP- Δ N(1 to 348) or MBP (negative control) proteins and the minimal E2F4s/DP1s heterodimer. PD samples were migrated on 2 separate 10% SDS-PAGE gels. One gel was used for E2F4s/DP1s detection by Western blotting using anti-His and anti GST antibodies, and the second gel for detection of MBP- Δ Np73 fusions by Coomassie staining. (F) Proposed mechanism of Δ Np73 α interaction with the E2F4/p130 complex. Red hatched box: E2F4 binding site.

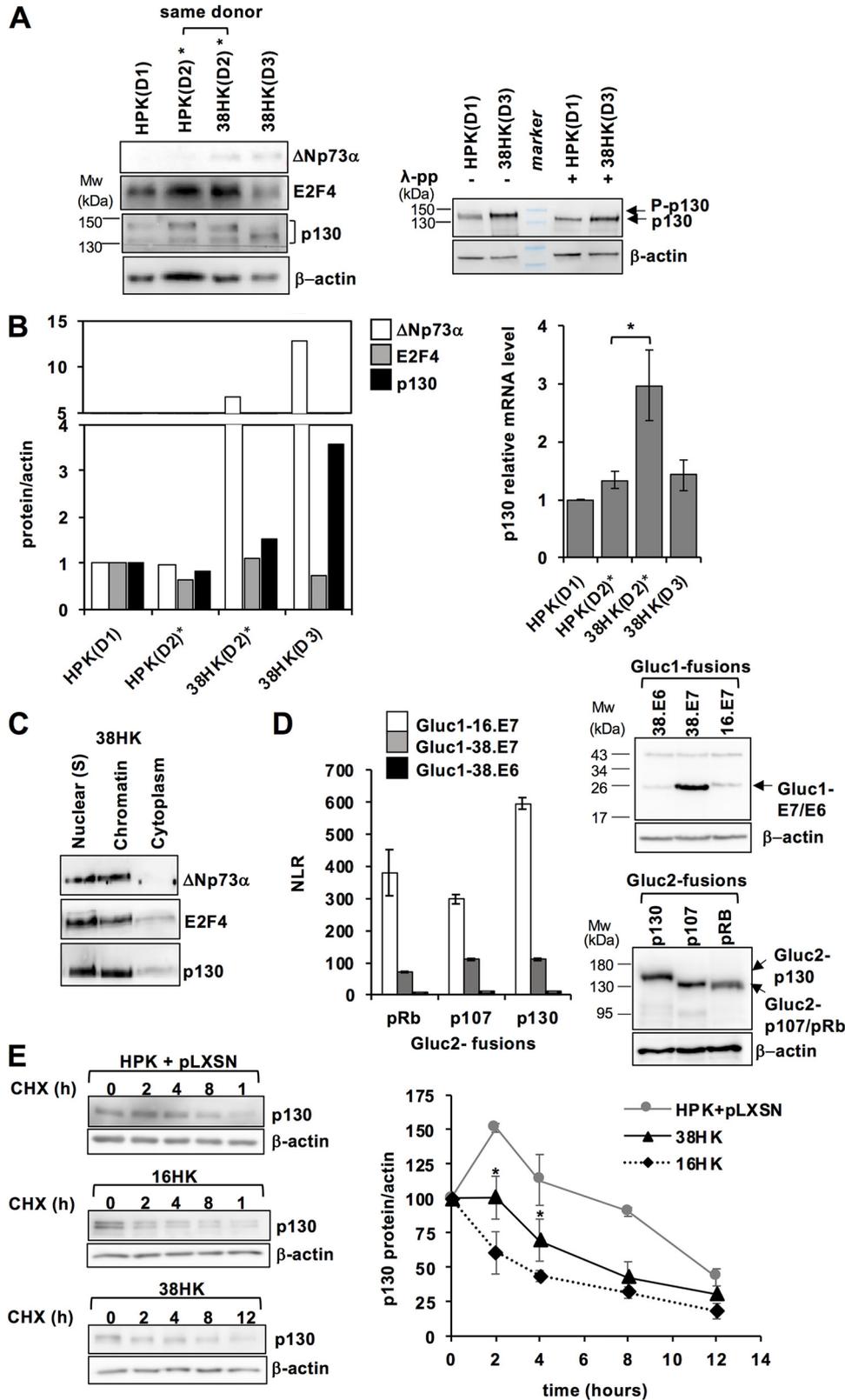


FIG 4 Expression and regulation of ΔNp73α-E2F4/p130 complex components in primary HPK and transformed 38HK cells. (A, left panel) Immunoblotting of ΔNp73α, E2F4, and p130 proteins in human foreskin HPK and 38HK cell lines from 3 different donors (D1 to D3). *: HPK(D2) and 38HK(D2) are from the same donor. 38HK (D2) is an early passage (i.e., passage 16) cell line, whereas the 38HK(D3) is a late passage cell line, which was used throughout this study. (A, right panel) Phosphorylation of p130. Total lysates of HPK and 38HK cells were (Continued on next page)

that this protein is phosphorylated to a certain degree in both HPKs and 38HKs (Fig. 4A, right panel). Interestingly, the p130 protein levels appear to be higher in 38HK compared to HPK. To further investigate this observation, we measured the mRNA levels of the p130 gene by RT-qPCR. The results obtained from the cell lines from the same donor (HPK[D2] versus 38HK[D2]) show a clear increase of p130 expression upon HPV38 E6/E7 transformation (Fig. 4B, right panel).

In line with these results, analysis of the cancer database shows that E2F4, and, albeit at a lower extent, the E2F5 homologue, as well as DP1 and p130 are expressed in both normal and cancer tissues from different anatomical sites (Fig. S3). Cellular fractionation experiments show that Δ Np73 α , E2F4, and p130 mostly localize to the nucleus of 38HK, and are equally distributed between the nuclear soluble (i.e., nuclear[S]) and chromatin fractions (Fig. 4C).

It is well-established that HPV E7 binds to RB family members, inhibiting their interactions with E2F factors and promoting RB protein degradation. We, thus, performed a comparative analysis of the interactions between the E7 proteins from the HPV38 and HPV16 viruses (38.E7 and 16.E7), and pRb, p107 or p130 by GPCA. Results show that, despite the high expression levels, the binding responses of 38.E7 are much lower compared to those of 16.E7 (Fig. 4D). To evaluate the impact of these different binding affinities on degradation, we assessed p130 protein levels in 38HKs versus keratinocytes transformed by the E6/E7 oncoproteins from HPV16 (16HK) or primary HPKs in conditions of cycloheximide treatment. Results show that p130 is degraded in both 16HK and 38HK, with small yet significant variations at the early time points, which point to a possible lower efficiency of the 38.E7 protein (Fig. 4E).

Together, these observations suggest that in 38HK upregulation of p130 at the transcriptional level compensates for degradation by the 38.E7 protein, thus enabling the preservation of a nuclear pool of E2F4/p130, which becomes available for interactions with other factors.

Δ Np73 α cooperates with E2F4/p130 to inhibit the expression of specific genes.

We used a three-step approach to search for genes that are targeted by both E2F4/p130 and Δ Np73 α and, thus, may represent potential targets of the complex. First, we performed mRNA-seq analyses on 38HK in conditions of E2F4-5 depletion versus control. E2F4-5 knockdown by siRNAs reduces the levels of E2F4 and E2F5 proteins to 20% and 55%, respectively (Fig. S4A). This, in turn, leads to the upregulation of 2802 genes and to the downregulation of 2110 genes (adjusted P -value ≤ 0.05) (Fig. S5A, and Tables S2A and B). Gene set enrichment analysis of upregulated genes identifies biological processes related to cell cycle, tumor suppressor signaling, cancer, and viral infection pathways (Fig. S5B, upper panel). In contrast, downregulated genes are enriched in pathways linked to metabolism, DNA replication, and extracellular matrix-receptor interactions (Fig. S5B, lower panel).

In the second step, we performed RT-qPCR validation of a sample of genes from the upregulated mRNA-seq data set, with or without p53/p73 response elements (REs) within

FIG 4 Legend (Continued)

incubated in presence or absence of λ -phosphatase (λ -pp) (8 U/ μ L). Note the small migration shift between the λ -pp- and λ -pp+ conditions. (B, left panel) Quantification of protein bands from the Western blot analyses shown in panel (A), left. (B, right panel) mRNA levels of the p130 gene in the different cell lines as measured by RT-qPCR. *: $P < 0.05$. (C) Distribution of Δ Np73 α and E2F4 and p130 proteins in the nuclear soluble (Nuclear [S]), chromatin, and cytoplasm fractions of 38HK. (D, left panel) Representative data set of the GPCA analysis of the pairwise interactions between Gluc1-38.E7/E6 or Gluc1-16.E7 proteins and Gluc2-fused RB proteins co-expressed in HEK293T cells. Error bars show standard deviations derived from triplicate measurements. (D, right panels) Expression levels of Gluc1-38.E7/E6 and Gluc1-16.E7 proteins and Gluc2-RB proteins in HEK293T cells. Gluc1-38.E7/E6 and Gluc1-16.E7 were migrated on a 12% SDS-PAGE gel, whereas Gluc2-RB proteins on a 8% gel. (E) Kinetics of p130 degradation in different keratinocyte cell lines. (E, left panels) Western blot analyses of total lysates of 38HK, 16HK, and primary HPKs stably transfected with pLXSN plasmid. All cells were treated with cycloheximide (10 μ g/mL) during 12 h. Cells were collected at the indicated time points. (E, right panel) p130 levels in the three cell lines at the different time points. The data reported are normalized to actin and to the values at time = 0 (100%). Error bars represent standard deviation values derived from 3 (16HK and 38HK) or 2 (HPK + pLXSN) independent experiments. P values (*: $P < 0.05$) refer to the differences between 38HK and 16HK at 2 and 4 h, and are calculated using the unpaired t test, $n = 3$ biological replicates.

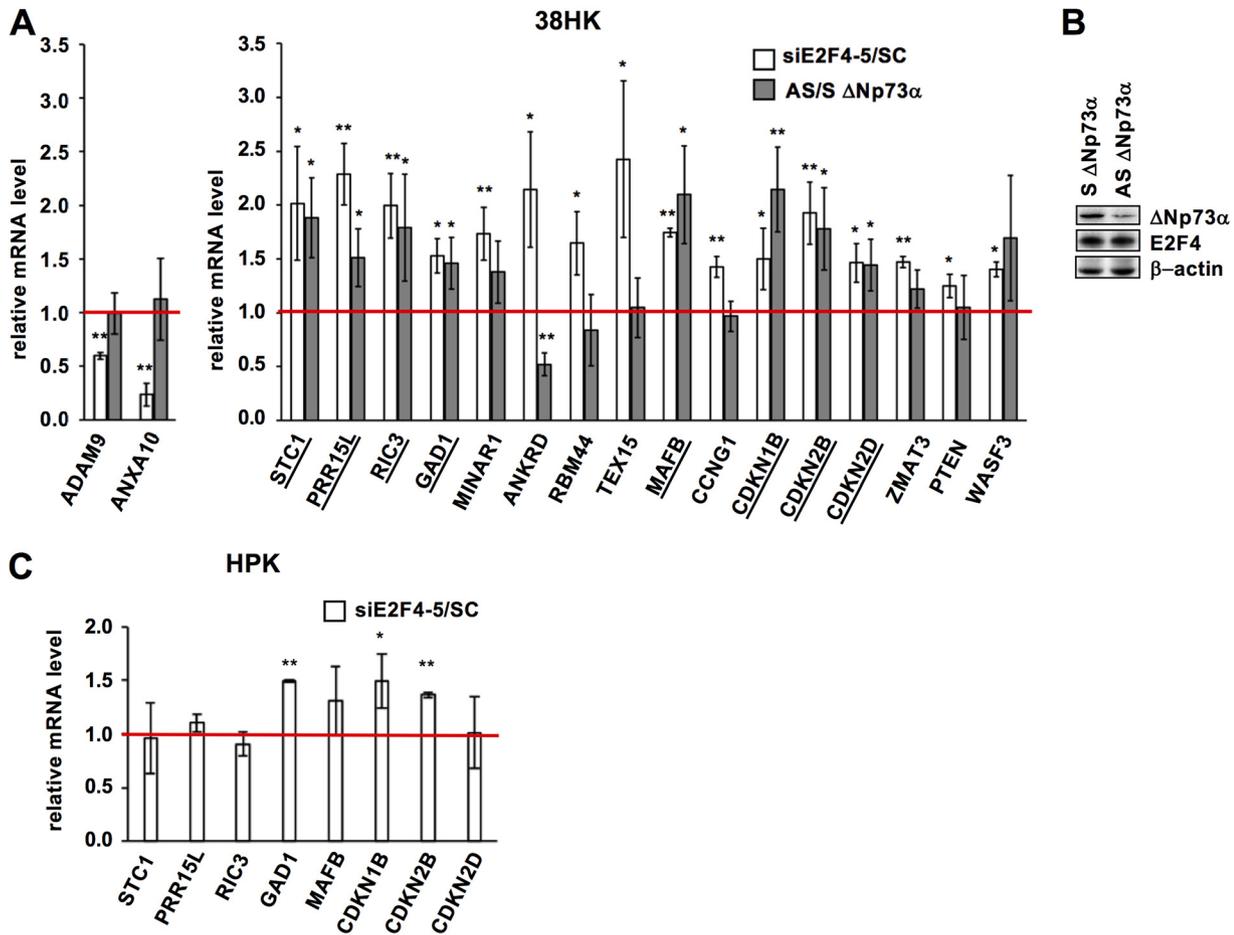


FIG 5 Identification of genes coregulated by E2F4-5, and Δ Np73 α in 38HK. (A) Expression of selected genes in 38HK in conditions of E2F4-5 (white histograms) or Δ Np73 α (gray histograms) depletion. mRNA levels are measured by RT-qPCR, first normalized to GAPDH expression, and then to the SC or S control conditions. The red line refers to the mRNA level in the SC or S control conditions (set to 1). “siE2F4-5/SC” and “AS/S Δ Np73 α ” values > 1 and < 1 indicate upregulation and downregulation of gene expression, respectively. Underlined genes are significantly upregulated upon either E2F4 and 5 or Δ Np73 α knockdown (i.e., coregulated genes). (B) Δ Np73 α and E2F4 protein levels in 38HK in control and Δ Np73 α knockdown conditions using S and AS oligos. See also Fig. S4B. (C) Gene expression in primary HPKs in conditions of E2F4-5 knockdown. Only genes that are coregulated by E2F4-5, and Δ Np73 α in 38HK (A) are investigated. See also Fig. S4C for efficiency of knockdown in primary HPKs. (A and C) The values reported are averages of 3 independent experiments. *P* values are obtained from unpaired t test, *n* = 3 biological triplicates (*: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01).

their long promoter regions (defined as 2500 nucleotides upstream of the transcription start site [TSS]) (Table S2C and Table S3). A total of 16 genes were validated with significantly higher mRNA levels in the E2F4-5 knockdown condition compared to the scramble control (Fig. 5A, right panel, white histograms, siE2F4-5/SC > 1). In this validation, we also included 2 genes from the downregulated mRNA-seq data set (ADAM9 and ANXA10), for which we confirmed inhibition upon E2F4-5 depletion (Fig. 5A, left panel, white histograms, siE2F4-5/SC < 1).

In the third step, we silenced Δ Np73 α expression by treating 38HK with antisense (AS) oligonucleotides that target the N-terminal 13 aa peptide unique to Δ Np73 isoforms (Fig. 3A, left panel). Notably, knockdown of Δ Np73 α induces cell death in 38HK (18) and, for this reason, a compromise between cell viability and protein depletion needs to be reached. Here, we succeeded in decreasing Δ Np73 α protein levels by about 50%, while leaving E2F4 levels unchanged (Fig. 5B and Fig. S4B). Δ Np73 α depletion does not affect the expression of ADAM9 and ANXA10 (Fig. 5A, left panel, gray histograms). In contrast, it enhances the mRNA levels of 8 out of the 16 upregulated and validated genes (Fig. 5A, right panel, gray histograms, AS/S Δ Np73 α > 1). These genes are STC1, PRR15L, RIC3, GAD1, MAFB, CDKN1B/p27^{Kip1}, CDKN2B/p15^{INK4b}, and CDKN2D/p19^{INK4d}. Three of these genes have no REs for p53/p73 within their long promoter regions (i.e., MAFB, GAD1, and

CDKN2D/p19^{INK4d}) (Table S3). Together, these results provide evidence that E2F4/p130 and Δ Np73 α coregulate specific genes in 38HK.

The changes in mRNA levels observed in these experiments are limited by the only partial depletion of E2F4-5 or Δ Np73 α proteins that we were able to achieve. We also attempted different protocols for triple knockdown of Δ Np73 α and E2F4-5 in 38HK, which all resulted in too high toxicity, thus preventing further gene expression analyses. To evaluate the synergy between these TFs, we analyzed the expression of the 8 coregulated genes identified above albeit in primary HPKs, which do not express Δ Np73 α . Results show that the expression of STC1, PRR15L, RIC3, MAFB, and CDKN2D/p19^{INK4d} is not affected by E2F4-5 silencing (Fig. 5C and Fig. S4C). In the case of CDKN2B/p15^{INK4b}, the increment in expression upon E2F4-5 silencing is lower in primary HPKs compared to 38HK. This indicates that, in the absence of Δ Np73 α , E2F4/p130 is unable to target these genes or inhibits their expression to a lower extent.

Hence, the synergy deriving from the Δ Np73 α -E2F4 interaction can result in the re-direction of the complex to genes that are different from those targeted by the individual components.

The Δ Np73 α -E2F4 interaction enhances recruitment to DNA regulatory regions.

We evaluated the recruitment of the Δ Np73 α -E2F4/p130 complex to the promoter regions of coregulated genes by chromatin immunoprecipitation (ChIP). For this, we selected STC1, whose promoter hosts both E2F and p53/p73 REs, and MAFB, which hosts E2F REs only (Table S3). 38HK stably expressing HA- Δ Np73 α were treated with scramble or E2F4-5 siRNAs, and processed for ChIP using anti-HA, anti-p73, and anti-E2F4 antibodies. The eluted DNA was analyzed by qPCR with primers flanking regions 1, 2, and 3 of the STC1 promoter (Fig. 6A), regions 1 and 2 of the MAFB promoter (Fig. 6B), or the negative control region reported in another transcriptomics study of E2F4 by Lee et al. (28) (Fig. 6C).

Results show that both HA- Δ Np73 and E2F4 are recruited to regions 1 and 2 of the STC1 and MAFB genes (Fig. 6, gray histograms, compare panels A and B with panel C). E2F4-5 knockdown significantly reduces the recruitment, not only of E2F4, but also of HA- Δ Np73 α to the E2F REs of region 1 of the STC1 gene, and of regions 1 and 2 of the MAFB gene (Fig. 6A and B, compare gray and white histograms). In contrast, the contributions of E2F4-5 to Δ Np73 α recruitment at the p53RE of region 2 of the STC1 gene are more difficult to interpret because of the variability between the samples, which is probably due to technical limitations related to DNA shearing of this region.

These data indicate that Δ Np73 α and E2F4 bind to the same promoter regions of coregulated genes. Δ Np73 α recruitment to these regions takes place even in the absence of p53/p73 REs and is lost upon E2F4-5 knockdown, demonstrating its dependence on the Δ Np73 α -E2F4 interaction.

Contributions of the Δ Np73 α -E2F4/p130 complex in cancer cells. Because several studies have highlighted the importance of Δ Np73 α in different types of cancer, we evaluated whether the Δ Np73 α -E2F4 interaction occurs in cancer-derived cell lines. We previously identified an HPV-negative head and neck cancer cell line (HNC-136) and a breast cancer cell line (CAL-51), both with high levels of Δ Np73 α and wild-type TP53 (20). Nuclear extracts from HNC-136 were treated by sucrose density gradient. Immunoprecipitation of endogenous Δ Np73 α using anti-p73 antibody-coupled beads leads to recovery of endogenous E2F4 and p130 proteins (Fig. 7A, lower panel, fractions 15 to 17), thereby confirming Δ Np73 α -E2F4/p130 complex formation in these cells. Interestingly, the complex from HNC-136 extracts migrates in fractions of lower sucrose density compared to the complex from 38HK extracts (compare Fig. 7A with Fig. 1D). This suggests that Δ Np73 α -E2F4/p130 may include auxiliary proteins that depend on the cellular context. In addition, although HNC-136 extracts exhibit clear expression of E2F5, no E2F5 is recovered upon Δ Np73 α immunoprecipitation.

Then, we evaluated the expression levels of the genes, which are coregulated by Δ Np73 α and E2F4/p130 in 38HK. E2F4-5 depletion in both HCN-136 and CAL-51 (Fig. S4D) increases the mRNA levels of most of these genes (Fig. 7B, white histograms, and Fig. S6). In contrast, Δ Np73 α silencing by antisense oligonucleotides induces cell death at levels that are

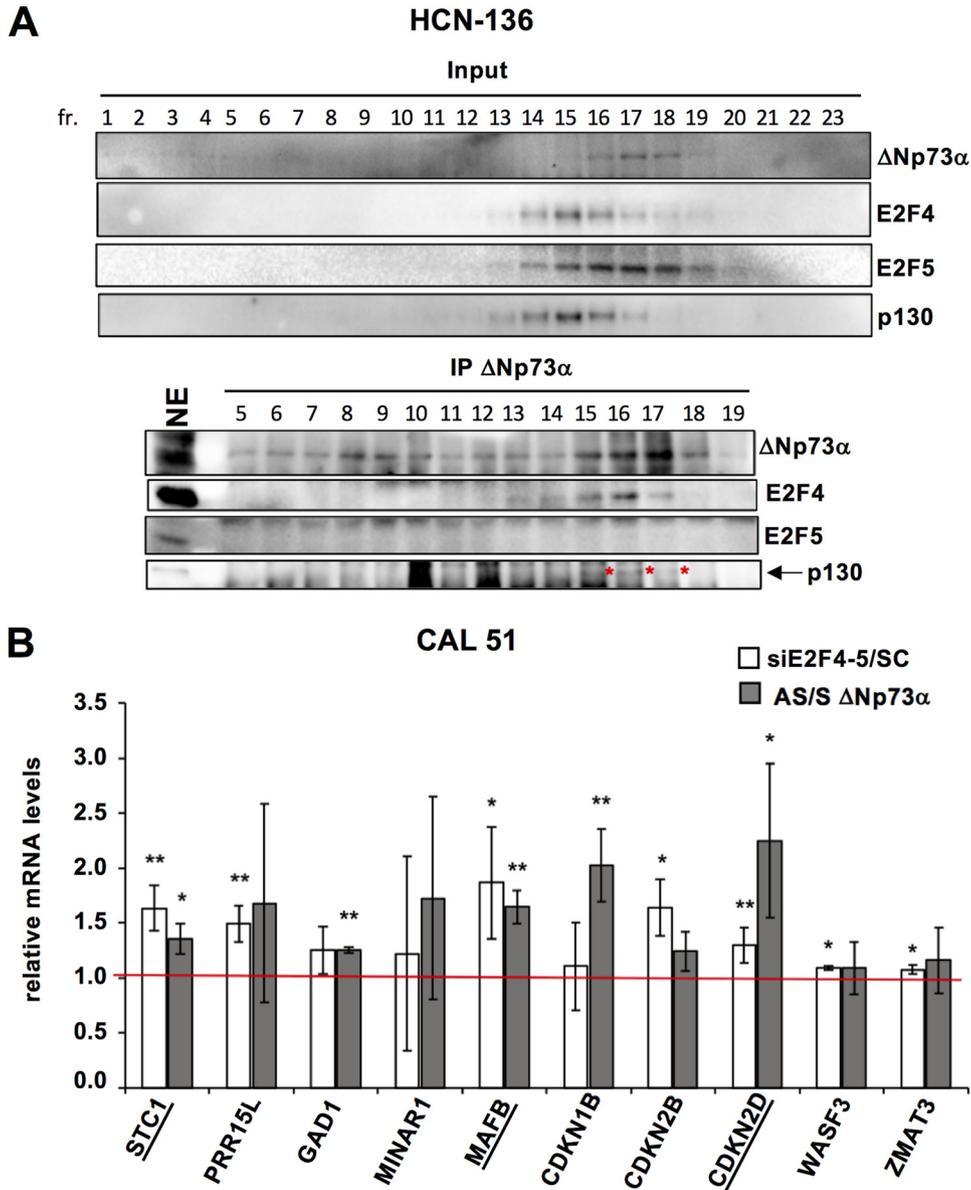


FIG 7 ΔNp73α cooperates with E2F4/p130 in HPV-negative cancer cells. (A) Sucrose gradient/co-IP experiments using nuclear extracts of HNC-136 cells. Sucrose fractions were immunoprecipitated using anti-p73 antibody-coupled beads and analyzed for endogenous ΔNp73α, E2F4, E2F5, and p130 proteins. Note that the p130 signal (highlighted by a red asterisk) is partially masked by closely migrating nonspecific band. See also expanded Western blot images on Mendeley data. See also legend of Fig. 1D. (B) Expression profiles of selected genes in CAL-51 cells. mRNA levels determined by RT-qPCR under conditions of E2F4-5 (white histograms) or ΔNp73α (gray histograms) depletion. The red line refers to the mRNA level in the SC or S conditions (set to 1). “siE2F4-5/SC” and “AS/S ΔNp73α” values > 1 and < 1 indicate upregulation and downregulation of gene expression, respectively. The data are averages from 3 independent experiments, with error bars representing standard deviation values. P values are obtained from unpaired t test, n = 3 biological triplicates (*: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001). See also Fig. S4D to F for E2F4-5, and ΔNp73α levels in the scramble and knockdown conditions.

study showed that the p19^{INK4d} protein is involved in senescence by contributing to formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) (29). To test whether similar mechanisms occur in our model system, we retro-transduced p19^{INK4d} or negative control pLXSN-GFP plasmid in 38HK (Fig. 8A), and performed senescence analyses. Results show that expression of p19^{INK4d} induces a 2-fold increase in the number of senescent cells in the β-galactosidase assay (Fig. 8B) and a 3-fold increase in the number of cells positive for the H3K9me3 marker of SAHF foci (Fig. 8C). This suggests that repression of the CDKN2D/p19^{INK4d} gene by the ΔNp73α-E2F4/p130 complex favors cell survival.

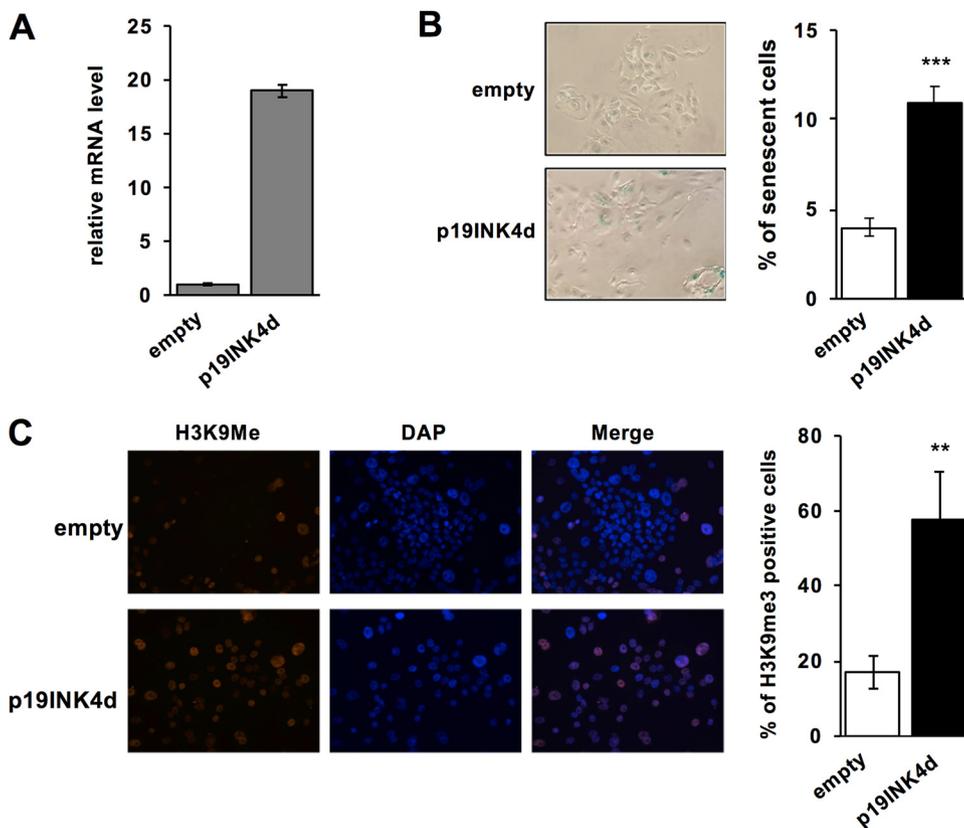


FIG 8 Expression of p19^{INK4d} induces senescence in 38HK. (A) p19^{INK4d} mRNA levels determined by RT-qPCR in 38HK retro-transduced with pMSCV-p19^{INK4d}-IRES-GFP or with pLXSN-GFP (negative control). (B) *In situ* senescence-associated β -galactosidase staining. (B, left panel) Representative photomicrographs of β -galactosidase staining at pH 6. (B, right panel) Percentage of senescent 38HK in the negative control and p19^{INK4d} expression conditions. The data are averages and standard deviations from 3 independent experiments. (C) Immunofluorescent staining for SAHF. (C, left panel) Representative immunofluorescence images. Cells were layered on coverslips coated with polylysine and probed using an anti-H3K9me3 antibody, followed by secondary Alexa Fluor 555-conjugated antibody. Nuclei were stained with DAPI (colored blue). (C, right panel) Quantification of cells positive for H3K9me³ marks in the negative control and p19^{INK4d} expression conditions was performed using ImageJ software. (A to C) The data are averages from 3 independent experiments, with error bars representing standard deviation values. (B to C) More than 100 cells were counted for each condition. *P* values are obtained from unpaired *t* test, *n* = 3 biological triplicates (**: *P* < 0.01, ***: *P* < 0.001).

DISCUSSION

In this study, we present what is, to the best of our knowledge, the first reported proteomics analysis on a Δ Np73 isoform, which has enabled us to identify the E2F4/p130 repressor complex as a nuclear partner of Δ Np73 α . E2F4 belongs to the E2F family of proteins, whose members act as transcriptional activators (E2F1/2/3/6) and repressors (E2F4-5). E2F TFs associate with DP1-4 proteins through the dimerization domain and interact with the retinoblastoma (RB) family proteins (pRb, p130, p107) via the TAD. This interaction with RB proteins prevents recruitment of the transcriptional machinery. In the canonical model of cell cycle progression, E2F4 and E2F5 mediate the repression of cell cycle genes and cell cycle arrest in the G0 phase and are part, together with p107/p130, DP1/2, and MuvB, of the DREAM complex (30, 31). Here, besides E2F4, DP1, and p130, none of the other DREAM complex subunits (i.e., LIN proteins, RBBP4) could be detected in association with Δ Np73 α , suggesting that Δ Np73 α -E2F4/p130 and DREAM are distinct complexes. In addition to the canonical functions, E2F4 has also activator functions that are RB independent (32). Here, E2F4-5 depletion in 38HK leads to downregulation of a large set of genes related to different biological pathways.

E2F4-5 and associated proteins (DP1 and p130) are expressed in both healthy and cancer tissue. In this work, we unveil a direct PPI between E2F4 and Δ Np73 α . Despite

the homology with E2F5, E2F4 appears to be the preferred partner of Δ Np73 α in transformed cells. This is in line with previous studies showing oncogenic functions for E2F4 but not for E2F5 (33–35).

Many of our analyses are performed in the 38HK model of viral transformation, in which Δ Np73 α is the main expressed isoform, whereas TAp73 levels are under the detection limit (18). Neither the E6 nor the E7 viral proteins were detected among the Δ Np73 α partners. Interestingly, we have also observed an increase in the expression of the p130 gene in 38HK compared to primary HPKs, which appears to compensate for the degradation of the p130 protein by 38.E7. Furthermore, the detection of a Δ Np73 α -E2F4/p130 complex in extracts of the HPV-negative HNC-136 cancer cell line confirms that the Δ Np73 α -E2F4 interaction is independent of the viral oncoproteins.

Results from binding analyses suggest that truncation of the TAD region of p73, giving rise to Δ N isoforms, leads to the exposure of a binding site for E2F4 and that this interaction mechanism is independent of the C-terminal splicing status of Δ Np73 isoforms. This, in turn, also suggests that the interactome of Δ Np73 isoforms may be quite different from that of TAp73. This situation is reminiscent of the gain-of-function PPIs established by oncogenic mutants of p53 with other TFs (36, 37). However, unlike mutant p53 interactions, which generally lead to activation of transcription, the interaction of Δ Np73 α with the E2F4/p130 complex results in the inhibition of gene expression.

It is well established that direct PPIs between TFs belonging to different families enhance cooperative binding to DNA and that this can result in TF redirection to different sites (38–40). Here, we show that most genes, which are found to be coregulated by Δ Np73 α and E2F4/p130 in 38HK, are not targeted by E2F4/p130 in primary HPKs lacking Δ Np73 α . Then, in complementary ChIP experiments, we demonstrate that E2F4 mediates recruitment of Δ Np73 α to E2F REs. These findings provide evidence that the Δ Np73 α -E2F4 interaction modulates the DNA-binding specificities of both Δ Np73 α and E2F4/p130.

In this work, we have identified 3 genes, namely, STC1, MAFB, and CDKN2D/p19^{INK4d}, that are repressed by either Δ Np73 α or E2F4/p130 in 2 different transformed cell lines (38HK and CAL51), and which are not targeted by E2F4/p130 in primary HPKs lacking Δ Np73 α . Stanniocalcin 1, the product of the STC1 gene, is one of the most highly secreted factors in senescent cells (41). MAFB instead belongs to the AP1 family of TFs (42). Besides its well-established role as an oncogene, MAFB acts as a tumor suppressor in certain cellular contexts, by antagonizing oncoproteins, such as HRAS and BRAF (43). CDKN2D/p19^{INK4d} belongs to the *Cdkn* family, which encodes for negative regulators of cell cycle progression by binding and inhibiting cyclin-dependent kinases CDK1/2 (p27^{Kip1}) and CDK4/6 (p27^{Kip1}, p15^{INK4b}, and p19^{INK4d}) (44–46). p19^{INK4d} has been shown to have antiproliferative properties and to be inactivated in several human cancers (47–49). In agreement with a previous study (29), here we find that expression of p19^{INK4d} induces cellular senescence associated to heterochromatin formation in 38HK.

Altogether, our results on the repression of specific genes implicated in cellular proliferation/survival suggest that the interaction with oncogenic Δ Np73 α may alter the biological properties of E2F4 in transformed cells. Yet, our data do not exclude that Δ Np73 α or E2F4/p130 act alone or as part of other complexes also exerting oncogenic functions.

Our interaction analyses suggest that the E2F4 binding site is hindered in TAp73 by intramolecular interactions. p73 proteins are known to encompass a C-terminal transcription inhibitory domain (TID), which transiently interacts with the TAD domain (50). Deletion of the TID domain did not increase TAp73 binding to E2F4 (data not shown), suggesting that TID is not involved in the masking of the E2F4 interaction site. Future biochemical and structural studies are required to understand the precise mechanisms underlying the Δ Np73 α -E2F4 interaction.

In conclusion, our study shows that, in transformed cells, the Δ Np73 α isoform interacts with and redirects the E2F4/p130 transcriptional complex to specific genes.

MATERIALS AND METHODS

DNA constructs. The ORFs encoding human E2F4, human E2F5, and human DP1 were purchased from Addgene, whereas the ORF encoding human p130 from Origene.

(i) Retroviral constructs. Δ Np73 α -TAP was generated in 2 steps: First, the Δ Np73 α open reading frame (ORF) was amplified by PCR and cloned in the pCDNA-TAP vector (23). Second, the pCDNA Δ Np73 α -TAP plasmid was used as a template for PCR amplification of the Δ Np73 α -TAP fusion, which was cloned into pBABE-puro retroviral vector (22) (pBABE Δ Np73 α -TAP). For HA- Δ Np73 α , the Δ Np73 α ORF was amplified with an oligo complementary to its N-terminus and containing the HA tag and directly cloned into pBABE-puro (pBABE HA- Δ Np73 α). pMSCV-p19Ink4d-IRES-GFP plasmid expressing mouse p19INK4d (sharing 87% sequence identity with human p19INK4d) (51) was obtained from Addgene.

(ii) Constructs for expression in mammalian cells. ORFs encoding for Δ Np73 α , Tap73 α , Tap63 α , E2F4, E2F5, DP1, and p130 were amplified by PCR, and cloned into the pDONR207 vector by recombination cloning (Gateway system, Invitrogen). The resulting pEntry clones were then transferred into the GPCA destination vectors pSPICA-N1 and pSPICA-N2 (27), and into a pcDNA3 vector enabling expression of an N-terminal 3xFlag tag.

(iii) Constructs for *Escherichia coli* expression. ORFs encoding for Δ Np73 α , Tap73 α , and constructs of these proteins were cloned in the NcoI and KpnI sites of a modified pETM-41 vector containing an N-terminal MBP tag followed by a TEV cleavage site. The E2F4(84 to 413) and DP1(199 to 350) DNA constructs for expression of the minimal E2F4s/DP1s heterodimer were cloned in the NdeI and BamHI sites of the pmCS and pnEA vectors, which allow for fusion to N-terminal 6xHis and GST tags, respectively (52).

All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell lines and cell culture. Phoenix, NIH 3T3, HEK293T, HNC-136, and CAL-51 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% calf serum (NIH 3T3) at 37°C with 5% CO₂.

38HK (53) were grown together with NIH 3T3 feeder layers in FAD medium containing 3 parts Ham's F12, 1 part DMEM, 2.5% fetal calf serum, insulin (5 μ g/mL), epidermal growth factor (10 ng/mL), cholera toxin (8.4 ng/mL), adenine (24 μ g/mL), and hydrocortisone (0.4 μ g/mL). Feeder layers were prepared by treating NIH 3T3 with mitomycin C for 2 h. Around 3x10⁵ of treated NIH 3T3 were cocultured with 38HK cells in T75 cell culture flasks. Feeder layers were removed by incubating the cell cocultures with 5 mL of PBS 1X supplemented with 2 mM EDTA. In this way, more than 95% of the feeder cells were removed. Then, 38HK cells were collected by scraping for analysis.

HPK cells were freshly isolated from neonatal foreskin and cultured in Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell).

Cell line generation. Retrovirus transduction system was used to generate 38HK cells stably expressing Δ Np73 α -TAP, HA- Δ Np73 α , and p19INK4d constructs. High-titer retroviral supernatants were generated by transient transfection of Phoenix cells with the retroviral constructs described above and used to infect 38HK, as described previously (54). Briefly, 500 μ L of DNA mix (10 μ g plasmid DNA, 248 mM CaCl₂) were gently mixed to 500 μ L of 2X HBS-buffered saline (1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, and pH 7.05). The transfection mix was then used to transfect Phoenix cells cultured in 5 mL fresh medium supplemented with 25 μ M Chloroquine for 6 to 8 h. After 48 h, the culture medium containing the retrovirus was filtered (0.2 μ m filter), mixed with 5 μ L of Polybrene (Sigma), and used to infect 38HK cell cultures for 3 h. After 24 h of infection, 38HK were selected in 0.2 μ g/mL of puromycin for 3 to 5 days.

Transfection conditions. 38HK, HNC-136, and CAL-51 cell lines were transiently transfected with siRNAs and sense/antisense oligonucleotides (Table S4) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 4 h, the transfection mix was removed, and the cells cultured in FAD medium (without antibiotic and cholera toxin). HEK293T cells were transfected using JetPEI (Polyplus transfection).

Proteomics. 38HK (about 2x10⁸ total cells) stably expressing Δ Np73 α -TAP or TAP tag alone (negative control) were resuspended in 8 mL of cold buffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail mix 1x, and 10 mM NaF) and incubated for 30 min on ice. Then, cells were lysed by passing the mix through a 25-gauge needle 15 times, and centrifuged for 10 min at 13400 rpm at 4°C. The supernatant (cytoplasmic soluble fraction) was flash-frozen and stored at -80°C, while the pellet (the nuclear fraction) was resuspended in 7 mL of cold buffer B (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 250 mM NaCl, 20% glycerol, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail mix 1x, and 10 mM NaF) and incubated on ice for 1 h. The mix was centrifuged for 10 min at 13,400 rpm at 4°C and the supernatant (nuclear soluble fraction) was collected. Each lysis step was checked by Western blotting (Fig. 1B, upper panel).

Buffer A was added to the nuclear soluble fraction to reach a final concentration of 200 mM NaCl and 16% glycerol. The resulting nuclear protein extract was transferred to an ultra-clear polycarbonate tube and centrifuged at 40,000 rpm for 1 h at 4°C using a SW41 rotor (Beckmann). After centrifugation, the supernatant was carefully collected and incubated overnight with 100 μ L (dry bead volume) of prewashed IgG Sepharose beads. Beads were then washed 3 times with 10 mL of IPP150 buffer (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1% NP40) and once with 10 mL of TEV buffer (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5 mM EDTA, and 1 mM DTT). Subsequently, beads were resuspended in 1 mL of TEV cleavage buffer containing 15 μ L (10 U/ μ L) of acTEV protease (Invitrogen) and incubated with gentle agitation for 4 h at 16°C. Protein complexes were eluted by gravity flow. Then, 3 mL of calmodulin binding buffer (10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, and 0.1% NP40) and 3 μ L of 1 M CaCl₂ were added to the 1 mL eluate containing the protein complexes to chelate the EDTA present in the TEV cleavage buffer. The resulting mix was incubated with 100 μ L of prewashed (dry bead volume) calmodulin-Sepharose beads (Agilent Technologies) for 2 h with gentle agitation at 4°C. Beads were then washed 3 times with 10 mL of calmodulin binding buffer. The protein complexes were recovered with 5 consecutive elutions (200 μ L each) with calmodulin elution buffer (10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, 2 mM EGTA, and 0.1% NP40). An additional elution with 1% SDS was performed to recover all the remaining proteins (Fig. 1B, lower panel).

Elution fractions 2 from the Δ Np73 α -TAP and TAP purifications were partially digested with trypsin and analyzed by LC-MS using an Orbitrap ELITE instrument equipped with a C18 Accucore 50 cm column. The generated data were analyzed using the Proteome Discoverer 2.4 tool. Proteins enriched more than 10-fold in Δ Np73 α -TAP compared with the control (TAP-only) experiment are listed in Table S1. Enrichment is calculated from the ratio of the sums of peptide peak areas in test and control experiments.

Cellular fractionation. 38HK (out 2.5×10^7 total cells) stably expressing HA- Δ Np73 α were resuspended in 1 mL of cold buffer A (described in the proteomics section) and incubated for 15 min on ice. Then, cells were lysed by passing the mix through a 25-gauge needle 15 times and centrifuged for 5 min at 12000 rpm at 4°C. The supernatant, corresponding to the cytoplasmic soluble fraction, was recovered, while the pellet (the nuclear fraction) was resuspended in 200 μ L of cold buffer B (described in the proteomics section), and incubated on ice for 30 min. Then, the mix was passed through a 27-gauge needle 15 times and centrifuged for 10 min at 12000 rpm at 4°C. The supernatant (i.e., the nuclear extract) was recovered and used for the co-IP experiments.

Sucrose gradient/co-IP. Sucrose density gradients were performed as previously described (55), with minor modifications. Briefly, step gradients were made by superposing sucrose solutions of different concentration (50%, 40%, 30%, 20%, and 10%) in an ultra-clear polycarbonate tube (Beckman), and a linear gradient was allowed to form overnight at 4°C. Then, 1.5 to 2 mg of nuclear extracts from 38HK HA- Δ Np73 α or HNC-136 cells were carefully transferred to the top of the sucrose gradient and the protein complexes were separated based on their molecular weight by ultracentrifugation at 35,300 rpm for 16 h at 4°C using the SW41 rotor. After centrifugation, 500 μ L fractions were collected from the bottom of the tube by gravity flow.

Δ Np73 α complexes were immunoprecipitated from each fraction using 30 μ L of slurry anti-HA-agarose beads (Sigma-Aldrich, ref. A2095) or 20 μ L of pre-coupled anti-E2F4 or anti-p73 Sepharose beads (dry bead volume). Briefly, each fraction was incubated with the beads for 2 h (HA beads) or 4 h (E2F4 and p73-beads). After incubation, the beads were washed 5 times with 1 mL of washing buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and 0.1% Igepal). The protein complexes were eluted in 1x loading dye buffer.

GPCA assay. HEK293T cells were transfected using the reverse transfection method. Transfection mixes containing 100 ng of pSPICA-N2 and 100 ng of pSPICA-N1 plasmids expressing test protein, plus JetPEI (Polyplus transfection) were dispensed in white 96-well plates. HEK293T cells were then seeded on the DNA mixes at a concentration of 4.2×10^4 cells per well. At 48 h after transfection, cells were washed with 50 μ L of PBS and lysed with 40 μ L of Renilla lysis buffer (Promega, E2820) for 30 min with agitation. *Gaussia princeps* luciferase enzymatic activity was measured using a Berthold Centro LB960 luminometer by injecting 50 μ L per well of luciferase substrate reagent (Promega, E2820) and counting luminescence for 10 s. Results are expressed as a fold change normalized over the sum of controls, specified herein as normalized luminescence ratio (NLR) (27). For a given protein pair A/B, $NLR = (\text{Gluc1-A} + \text{Gluc2-B}) / ((\text{Gluc1-A} + \text{Gluc2}) + (\text{Gluc1} + \text{Gluc2-B}))$.

Protein expression in *E. coli* and pulldown assays. The minimal E2F4s/DP1s heterodimer was produced by co-expression of 6 \times His-E2F4 (84 to 413) and GST-DP1(199-350) in *E. coli* BL21 DE3 cells overnight at 15°C. The bacterial pellet (500 mL expression) was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 400 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, lysozyme, 100 μ g/mL DNase I, 100 μ g/mL RNase, and cOmpete EDTA-free [Roche]) and lysed by sonication. Cleared extracts were applied to Ni²⁺-NTA resin previously equilibrated in buffer A (20 mM Tris pH 8.0, 400 mM NaCl, 10% glycerol, and 2 mM DTT). After extensive washing, the E2F4/DP1 heterodimer was eluted by applying buffer A supplemented with 250 mM imidazole. Subsequently, the sample was concentrated and then buffer exchanged using a Nap10 (GE health care) column equilibrated in buffer B (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, and 2 mM DTT).

Over-expression of Δ Np73 α and TAp73 α proteins (full-length and truncated constructs) fused to MBP was carried out overnight in *E. coli* BL21 DE3 cells at 15°C. Cell pellets (50 mL expressions) were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2% NP-40, 2 mM DTT, lysozyme, 100 μ g/mL DNase, 100 μ g/mL RNase, and cOmpete EDTA-free [Roche]), lysed by sonication, and cleared by centrifugation. Supernatants were then incubated with 100 μ L of pre-equilibrated amylose resin beads for 2 h at 4°C. Subsequently, resin was extensively washed with PD buffer (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and cOmpete EDTA-free). For the pulldown experiment, 10 μ L of amylose resin coupled to MBP-p73/ Δ Np73 α proteins were incubated with clarified lysates of HEK293T expressing 3xFlag-E2F4 or recombinant purified E2F4s/DP1s heterodimer for 2 h at 4°C. After 2 quick washing steps with PD buffer, complexes were eluted by incubation with 20 μ L of PD buffer supplemented with 20 mM maltose for 15 min at 4°C. PD reactions were migrated onto 2 separate 10% SDS-PAGE gel. One gel was used for Western blot to detect E2F4 or E2F4s/DP1s, the other for Coomassie staining to detect MBP-p73/ Δ Np73 α proteins.

Immunoblotting. Western blot detection of endogenous proteins was performed using the following antibodies: p73 (Abcam, ref. ab215038), E2F4 (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-398543X), E2F5 (Genetex, ref. GTX129491), DP1 (Abcam, ref. ab124678), p130 (Cell Signaling, ref. 13610S) β -actin (clone C4, MP Biomedicals), and GAPDH (6C5, ref. sc-32233; Santa Cruz). Detection of tagged constructs was done using: HA-peroxidase antibody (Roche, ref. 12013819001), anti-TAP antibody (ThermoFisher Scientific, ref. CAB1001), anti-Flag antibody (Sigma, ref. F3165) antibody, and anti-Gluc antibody (New England Biolabs, ref. E8023).

mRNA-seq. 38HK cells transfected with scramble siRNA or E2F4-5 siRNAs were collected at 48 h after transfection. Total RNA was extracted from 38HK (about 10^6 cells per sample) using the RNeasy minikit from Qiagen and quantified by Qubit.

A total of 6 samples (3 for scramble siRNA and 3 for E2F4-5 siRNA) were analyzed by the GenomEast platform of IGBMC (Illkirch, France). RNA-seq libraries were generated from 500 ng of total RNA using the TruSeq

Stranded mRNA Library Prep Kit and TruSeq RNA Single Indexes kits A and B (Illumina), according to the manufacturer's instructions. The read length was 50 nt. The mean total reads per sample was 59,103,999.

Mapping of the reads was processed with STAR 2.7.3a on the primary assembly of the latest release of the human genome (56) (GRCh38.p13, release 33, PRI version: <https://www.gencodegenes.org/human/>) with corresponding comprehensive gene annotations. No soft clipping was accepted. Of the reads, 79% mapped once on the genome, 14% multiple times and 6.4% were below the minimum length threshold to map. Reads were counted using htseq-count version 0.11.2 (57) with reverse strand matching (option "stranded reverse"). Differential expression analysis was done with DESeq2 1.24.0 (58) with Benjamini-Hochberg correction for multiple tests on R 3.6.2.

RT-qPCR. Total RNA was extracted from cultured cells using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). The RNA obtained was reverse-transcribed to cDNA using the RevertAid H minus First Strand cDNA Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the LightCycler 480 SYBR green I Master (Roche) or the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) with the primers listed in Table S4. Primers were selected on PrimerBank database (59). Reactions were run in triplicate, and expression was normalized to GAPDH. The expression analysis was performed using the MxPro QPCR software (Agilent).

ChIP. ChIP was performed using the Shearing ChIP and OneDay ChIP kits (Diagenode) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were sonicated to obtain DNA fragments of 200 to 500 bp. Sheared chromatin was immunoprecipitated with antibodies against the following proteins/tags: HA (Abcam, ref. ab9110), p73 (Abcam, ref. ab215038), E2F4 (Santa Cruz Biotechnology, ref. SC-398543X), and p130 (Cell Signaling, ref. 13610S). 10% of the sheared chromatin was kept as the input for the ChIP.

Immunoprecipitated chromatin has been analyzed by q-PCR using the LightCycler 480 SYBR green I Master (Roche) on a LightCycler 96 Instrument or the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) on a Stratagene Mx3005P Multiplex Quantitative Real-Time PCR System. The sequences of primers used for qPCR are described in Table S4. Primers surrounding the target region were checked for specificity using the NCBI Primer designing tool. ChIP qPCR results were analyzed by evaluating signal of enrichment over noise normalized to Input.

β -galactosidase and SAHF staining for senescence analyses. 38HK cells were transduced with p19INK4d and cultured for 72 h. The NIH 3T3 feeder layer was removed with PBS/EDTA from 38HK cultures prior to senescence analyses.

Senescence was assessed using the Senescence β -Galactosidase Staining Kit at pH 6 following the manufacturer's instructions (Cell Signaling Technology). For SAHF staining, 38HK cells were layered on slides coated with polylysine and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 15 min at room temperature, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min (60). Cells were incubated with H3K9me3 antibody (abcam; ab1220) for 2 h at room temperature, followed by incubation with Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature, and mounted using Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI. The slides were visualized using a Nikon Eclipse Ti wide-field inverted fluorescence video microscope. The images captured were analyzed by NIS-Element software from Nikon.

Quantification and statistical analysis. Quantification of protein levels from Western blot bands was done using the Evolution-Capt Edge software (Vilber) or ImageLab software (Bio-Rad). The data presented are expressed as means \pm SD. *P* values are calculated using unpaired Student's *t* test.

Data availability. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (61) partner repository with the data set identifier [PXD022947](https://doi.org/10.17632/pw2j5fzj4.1). The RNAseq analyses have been deposited to the GEO database (62) with the identifier [GSE162816](https://doi.org/10.17632/pw2j5fzj4.1). Original data files for Western blot analyses are deposited on the public repository Mendeley Data (<https://doi.org/10.17632/pw2j5fzj4.1>).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.1 MB.

FIG S2, PDF file, 0.4 MB.

FIG S3, PDF file, 0.04 MB.

FIG S4, PDF file, 0.1 MB.

FIG S5, PDF file, 0.2 MB.

FIG S6, PDF file, 0.04 MB.

TABLE S1, XLSX file, 0.01 MB.

TABLE S2, XLSX file, 0.8 MB.

TABLE S3, DOCX file, 0.01 MB.

TABLE S4, XLSX file, 0.01 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bertrand Seraphin and Christophe Romier (IGBMC, Strasbourg), and Yves Jacob (Institut Pasteur, France) for providing expression vectors. The authors are grateful to Gunter Stier (BZH, University of Heidelberg), Christian Gaidon (INSERM U1113, Strasbourg), the engineers of the GenomEast platform of IGBMC (Christelle Thibault-Charpentier and Bernard Jost), and members of the IARC and BSC-UMR7242 teams for precious help and

advice. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the 'France Genomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

This work received institutional support from IARC/WHO, CNRS, and Université de Strasbourg. The work was supported by grants from 'Fondation ARC pour la recherche sur le cancer' (ref. PJA 20151203192) and the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (ref. ENV201610) to M.T., and Agence Nationale de la Recherche (ANR JCJC, ref. ANR-13-JSV8-0004-01), 'Ligue contre le Cancer' (Région Grand Est – CCIR), 'Fondation pour La Recherche Médicale' (Equipes FRM, ref. DEQ20180339231), 'Institut National du Cancer' (INCa, ref. PLBIO21-151), and 'Alsace contre le Cancer' to K.Z. This research was partially funded by the Italian Ministry of Health (to M.T.), Ricerca Corrente 2022, Del. 219/2022.

Where authors are identified as personnel of the International Agency for Research on Cancer/World Health Organization and the Istituto Tumori Giovanni Paolo II, the authors alone are responsible for the views expressed in this article and they do not necessarily represent the decisions, policy, or views of the institutions with which they are affiliated.

Valerio Taverniti, Massimo Tommasino, and Katia Zanier conceptualized the study. Valerio Taverniti, Hanna Krynska, Assunta Venuti, Marie-Laurie Straub, Cécilia Sirand, Maria Carmen Romero-Medina, Stefano Moro, and Denise Martinez-Zapien, performed the investigation of the study. The formal analysis was completed by Valerio Taverniti, Hanna Krynska, Eugenie Lohmann, Alexis Robitaille, Luc Negroni, and Katia Zanier. Further, visualization was taken care of by Valerio Taverniti, Hanna Krynska, and Katia Zanier. The methodology was performed by Marie-Laure Straub, Cécilia Sirand, Luc Negroni, and Murielle Masson. Eugenie Lohmann curated the data. Both Massimo Tommasino and Katia Zanier supervised the study, wrote the manuscript, administered the project, and acquired funds.

We declare that we have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- Lee C-W, Thangue NBL. 1999. Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. *Oncogene* 18:4171–4181. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202793>.
- Fontemaggi G, Kela I, Amariglio N, Rechavi G, Krishnamurthy J, Strano S, Sacchi A, Givol D, Blandino G. 2002. Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J Biol Chem* 277:43359–43368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205573200>.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon J-C. 2006. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 13:962–972. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401914>.
- Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, Laurenzi VD, Fey MF, Melino G, Tobler A. 2001. Human Δ Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* 8:1213–1223. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400962>.
- Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K. 1999. New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* 18:4993–4998. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202817>.
- Vikhreva P, Melino G, Amelio I. 2018. p73 alternative splicing: exploring a biological role for the C-terminal isoforms. *J Mol Biol* 430:1829–1838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.034>.
- Melino G, Laurenzi VD, Vousden KH. 2002. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2:605–615. <https://doi.org/10.1038/nrc861>.
- Gong J, Costanzo A, Yang H-Q, Melino G, Kaelin WG, Levrero M, Wang JYJ. 1999. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399:806–809.
- Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. 1999. Interaction of c-Abl and p73 α and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399:809–813.
- Mantovani F, Piazza S, Gostissa M, Strano S, Zacchi P, Mantovani R, Blandino G, Sal GD. 2004. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell* 14:625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.007>.
- Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW, Melino G. 2010. Differential control of TAp73 and Δ Np73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12877–12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911828107>.
- Munarriz E, Bano D, Sayan AE, Rossi M, Melino G, Nicotera P. 2005. Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun* 333:954–960. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.188>.
- Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y. 2005. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev* 19:316–321. <https://doi.org/10.1101/gad.319905>.
- Candi E, Agostini M, Melino G, Bernassola F. 2014. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat* 35:702–714. <https://doi.org/10.1002/humu.22523>.
- Di C, Yang L, Zhang H, Ma X, Zhang X, Sun C, Li H, Xu S, An L, Li X, Bai Z. 2013. Mechanisms, function and clinical applications of Δ Np73. *Cell Cycle* 12:1861–1867. <https://doi.org/10.4161/cc.24967>.
- Accardi R, Fathallah I, Gruffat H, Mariggio G, Calvez-Kelm FL, Voegelé C, Bartosch B, Hernandez-Vargas H, McKay J, Sylla BS, Manet E, Tommasino M. 2013. Epstein-Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein Δ Np73 α . *PLoS Pathog* 9:e1003186. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003186>.
- Allart S, Martin H, Détraves C, Terrasson J, Caput D, Davrinche C. 2002. Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of δ N-p73 α . *J Biol Chem* 277:29063–29068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201974200>.
- Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet A, Sylla BS, Gissmann L, Hainaut P, Tommasino M. 2006. Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of Δ Np73. *EMBO Rep* 7:334–340. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400615>.
- Cornet I, Bouvard V, Campo MS, Thomas M, Banks L, Gissmann L, Lamartine J, Sylla BS, Accardi R, Tommasino M. 2012. Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J Virol* 86:2366–2370. <https://doi.org/10.1128/JVI.06579-11>.
- Accardi R, Scalise M, Gheit T, Hussain I, Yue J, Carreira C, Collino A, Indiveri C, Gissmann L, Sylla BS, Tommasino M. 2011. I κ B kinase β promotes cell survival by antagonizing p53 functions through Δ Np73 α phosphorylation and stabilization. *Mol Cell Biol* 31:2210–2226. <https://doi.org/10.1128/MCB.00964-10>.
- Rollison DE, Viarisis D, Amorrorrtu RP, Gheit T, Tommasino M. 2019. An emerging issue in oncogenic virology: the role of beta human papillomavirus types

- in the development of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Virol* 93:e01003-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01003-18>.
22. Morgenstern JP, Land H. 1990. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18:1068–1068. <https://doi.org/10.1093/nar/18.4.1068>.
 23. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17:1030–1032. <https://doi.org/10.1038/13732>.
 24. Liban TJ, Medina EM, Tripathi S, Sengupta S, Henry RW, Buchler NE, Rubin SM. 2017. Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:4942–4947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619170114>.
 25. Joerger AC, Rajagopalan S, Natan E, Veprintsev DB, Robinson CV, Fersht AR. 2009. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc National Acad Sci* 42:17705–17710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905867106>.
 26. Gebel J, Luh LM, Coutandin D, Osterburg C, Löhr F, Schäfer B, Frombach A-S, Sumyk M, Buchner L, Krojer T, Salah E, Mathea S, Güntert P, Knapp S, Dötsch V. 2016. Mechanism of TAp73 inhibition by Δ Np63 and structural basis of p63/p73 hetero-tetramerization. *Cell Death Differ* 23:1930–1940. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.83>.
 27. Cassonnet P, Rolloy C, Neveu G, Vidalain P-O, Chantier T, Pellet J, Jones L, Muller M, Demeret C, Gaud G, Vuillier F, Lotteau V, Tangy F, Favre M, Jacob Y. 2011. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat Methods* 8:990–992. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1773>.
 28. Lee B-K, Bhinge AA, Iyer VR. 2011. Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res* 39:3558–3573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1313>.
 29. Sonzogni SV, Ogara MF, Belluscio LM, Castillo DS, Scassa ME, Cánepa ET. 2014. p19INK4d is involved in the cellular senescence mechanism contributing to heterochromatin formation. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj* 1840:2171–2183. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.015>.
 30. Litovchick L, Sadasivam S, Florens L, Zhu X, Swanson SK, Velmurugan S, Chen R, Washburn MP, Liu XS, DeCaprio JA. 2007. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell* 26:539–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.015>.
 31. Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, Schmitt K, Franke C, von EB, Gagrira S, Hanel F, Brehm A, Gaubatz S. 2007. LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell Cycle* 6:1903–1913. <https://doi.org/10.4161/cc.6.15.4512>.
 32. Hsu J, Arand J, Chaikovskiy A, Mooney NA, Demeter J, Brison CM, Oliverio R, Vogel H, Rubin SM, Jackson PK, Sage J. 2019. E2F4 regulates transcriptional activation in mouse embryonic stem cells independently of the RB family. *Nat Commun* 10:2939–2952. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10901-x>.
 33. Hsu J, Sage J. 2016. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle* 15:3183–3190. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1234551>.
 34. Waghay A, Schober M, Feroze F, Yao F, Virgin J, Chen YQ. 2001. Identification of differentially expressed genes by serial analysis of gene expression in human prostate cancer. *Cancer Res* 61:4283–4286.
 35. Rakha EA, Armour JAL, Pinder SE, Paish CE, Ellis IO. 2005. High-resolution analysis of 16q22.1 in breast carcinoma using DNA amplifiable probes (multiplex amplifiable probe hybridization technique) and immunohistochemistry. *Int J Cancer* 114:720–729. <https://doi.org/10.1002/ijc.20738>.
 36. Freed-Pastor WA, Prives C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26:1268–1286. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>.
 37. Kim MP, Lozano G. 2018. Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ* 25:161–168. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.185>.
 38. Jolma A, Yin Y, Nitta KR, Dave K, Popov A, Taipale M, Enge M, Kivioja T, Morgunova E, Taipale J. 2015. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature* 527:384–388. <https://doi.org/10.1038/nature15518>.
 39. Morgunova E, Taipale J. 2017. Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Curr Opin Struc Biol* 47:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.03.006>.
 40. Stampfel G, Kazmar T, Frank O, Wienerroither S, Reiter F, Stark A. 2015. Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature* 528:147–151. <https://doi.org/10.1038/nature15545>.
 41. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, Holtz A, Shah S, Sharma V, Ferrucci L, Campisi J, Schilling B. 2020. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* 18:e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>.
 42. Eychène A, Rocques N, Pouponnot C. 2008. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:683–693. <https://doi.org/10.1038/nrc2460>.
 43. Pouponnot C, Sii-Felice K, Hmitou I, Rocques N, Lecoin L, Druillennec S, Felder-Schmittbuhl M-P, Eychène A. 2006. Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 25:1299–1310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209171>.
 44. Razavipour SF, Harikumar KB, Slingerland JM. 2020. p27 as a transcriptional regulator: new roles in development and cancer. *Cancer Res* 80:3451–3458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3663>.
 45. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, O'Keefe CL, Noh S, Wu X, Zariwala M, Matera AG, Xiong Y. 1996. Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* 7:57–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.1.57>.
 46. Chan FKAM, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A. 1995. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15:2682–2688. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2682>.
 47. Bai F, Chan HL, Smith MD, Kiyokawa H, Pei X-H. 2014. p19Ink4d is a tumor suppressor and controls pituitary anterior lobe cell proliferation. *Mol Cell Biol* 34:2121–2134. <https://doi.org/10.1128/MCB.01363-13>.
 48. Wang Y, Jin W, Jia X, Luo R, Tan Y, Zhu X, Yang X, Wang X, Wang K. 2014. Transcriptional repression of CDKN2D by PML/RAR α contributes to the altered proliferation and differentiation block of acute promyelocytic leukemia cells. *Cell Death Dis* 5:e1431. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.388>.
 49. Dreidax D, Bannert S, Henrich K-O, Schröder C, Bender S, Oakes CC, Lindner S, Schulte JH, Duffy D, Schwarzl T, Saadati M, Ehemann V, Benner A, Pfister S, Fischer M, Westermann F. 2014. p19-INK4d inhibits neuroblastoma cell growth, induces differentiation and is hypermethylated and downregulated in MYCN-amplified neuroblastomas. *Hum Mol Genet* 23:6826–6837. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu406>.
 50. DeYoung MP, Ellisen LW. 2007. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26:5169–5183. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210337>.
 51. Forget A, Ayrault O, den Besten W, Kuo M-L, Sherr CJ, Roussel MF. 2008. Differential post-transcriptional regulation of two Ink4 proteins, p18Ink4c and p19Ink4d. *Cell Cycle* 7:3737–3746. <https://doi.org/10.4161/cc.7.23.7187>.
 52. Diebold M-L, Fribourg S, Koch M, Metzger T, Romier C. 2011. Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: Application to complexes as large as the histone octamer. *J Struct Biol* 175:178–188. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.001>.
 53. Gabet A-S, Accardi R, Bellopede A, Popp S, Boukamp P, Sylla BS, Londoño-Vallejo JA, Tommasino M. 2008. Impairment of the telomere/telomerase system and genomic instability are associated with keratinocyte immortalization induced by the skin human papillomavirus type 38. *FASEB J* 22:622–632. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8389.com>.
 54. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392–8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8392>.
 55. Panda A, Martindale J, Gorospe M. 2017. Polysome fractionation to analyze mRNA distribution profiles. *Bio-protocol* 7:e2126. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2126>.
 56. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
 57. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
 58. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
 59. Wang X, Spandidos A, Wang H, Seed B. 2012. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res* 40:D1144–D1149. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1013>.
 60. Venuti A, Pastori C, Pennisi R, Riva A, Sciortino MT, Lopalco L. 2016. Class B β -arrestin2-dependent CCR5 signalosome retention with natural antibodies to CCR5. *Sci Rep* 6:39382. <https://doi.org/10.1038/srep39382>.
 61. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, Inuganti A, Griss J, Mayer G, Eisenacher M, Pérez E, Uszkoreit J, Pfeuffer J, Sachsenberg T, Yilmaz Ş, Tiwary S, Cox J, Audain E, Walzer M, Jarnuczak AF, Ternent T, Brazma A, Vizcaino JA. 2018. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* 47:D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
 62. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang

- N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. 2013. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res* 41:D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>.
63. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, Haw R, Jassal B, Korninger F, May B, Milacic M, Roca CD, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Viteri G, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. 2018. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 46:D649–D655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1132>.
64. Paquin M-C, Cagnol S, Carrier JC, Leblanc C, Rivard N. 2013. ERK-associated changes in E2F4 phosphorylation, localization and transcriptional activity during mitogenic stimulation in human intestinal epithelial crypt cells. *BMC Cell Biol* 14:33–46. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-33>.
65. Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M. 2019. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res* 47:D590–D595. <https://doi.org/10.1093/nar/gky962>.
66. Fornes O, Castro-Mondragon JA, Khan A, van der Lee R, Zhang X, Richmond PA, Modi BP, Correard S, Gheorghe M, Baranašić D, Santana-Garcia W, Tan G, Chèneby J, Ballester B, Parcy F, Sandelin A, Lenhard B, Wasserman WW, Mathelier A. 2020. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 48:D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>.

Abstract

The tumor suppressor p53 family of proteins is composed of p53, p63 and p73. In 50% of human cancers, the *TP53* gene presents a genetic alteration, whereas cancers harbouring a wild-type *TP53* gene often display expression of oncogenic isoforms of p53 family proteins. The present dissertation focuses on the highly carcinogenic $\Delta Np73\alpha$ isoform that acts as a dominant negative inhibitor of p73/p53 signalling in a wide range of cancers. Throughout this work we used a cellular model of transformation that consists of human foreskin keratinocytes immortalized by the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 38 from the β genus (38HK), which is associated with non-melanoma skin cancer. 38HK cells overexpress $\Delta Np73\alpha$ in comparison with primary keratinocytes and were used here for the identification and characterization of protein-protein interactions of $\Delta Np73\alpha$.

In the first part of the Ph.D. project, we demonstrated that $\Delta Np73\alpha$ forms an inhibitory complex with E2F4/p130 that represses the expression of genes among which we found tumor suppressors and senescence factors. Moreover, we showed that this complex is also present in HPV-negative cancer cell lines overexpressing $\Delta Np73\alpha$. Consistently, we found that silencing of E2F4 results in the induction of premature senescence in these cells, suggesting that E2F4 gains pro-proliferative properties specifically in transformed cells through its interaction with $\Delta Np73\alpha$.

In the second part of the project, we characterized the interaction of $\Delta Np73\alpha$ with the poly(ADP-ribose) polymerase PARP14. Our results indicate that PARP14 is upregulated upon β -HPV38 E6/E7 transformation and acts as a repressor of p53 signalling by maintaining p53 levels low. This finding opens new perspectives on the study of p53 deregulation by β -HPVs and their impact on carcinogenesis.

Keywords: HPV, p53, $\Delta Np73\alpha$, E2F4, RB, protein-protein interactions, transcription regulation, cancer

Résumé

La famille des protéines du suppresseur de tumeur p53 est composée de p53, p63 et p73. Dans 50% des cas de cancers humains, le gène *TP53* présente une altération génétique, alors que les cancers avec un gène *TP53* de type sauvage présentent souvent l'expression d'isoformes oncogènes des protéines de la famille p53. Les travaux décrits dans cette thèse portent sur $\Delta Np73\alpha$, une isoforme hautement oncogène qui agit comme un inhibiteur dominant négatif de la signalisation p73/p53 dans un large spectre de cancers. Ces travaux sont en grande partie basés sur un système modèle de transformation cellulaire qui consiste à l'utilisation de kératinocytes humains du prépuce immortalisés par les oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus humain 38 (38HK) appartenant au genre β et associé au développement du cancer de la peau non-mélanome. Les cellules 38HK surexpriment $\Delta Np73\alpha$ en comparaison aux kératinocytes primaires et ont été utilisés ici pour l'identification et la caractérisation des interactions protéine-protéine de $\Delta Np73\alpha$.

Dans la première partie du projet de thèse, nous avons montré que $\Delta Np73\alpha$ forme un complexe inhibiteur en s'associant à E2F4/p130. Ce complexe réprime l'expression de gènes, parmi lesquels nous retrouvons des suppresseurs de tumeur ou des facteurs de sénescence. De plus, nous avons démontré que ce complexe est également présent dans les lignées cellulaires cancéreuses HPV-négatives qui surexpriment $\Delta Np73\alpha$. De manière cohérente, nous avons constaté que la déplétion d'E2F4 induit la sénescence prématurée dans ces cellules, ce qui suggère que E2F4 acquiert des propriétés pro-prolifératives dans les cellules transformées grâce à son interaction avec $\Delta Np73\alpha$.

Dans la deuxième partie du projet, nous avons caractérisé l'interaction de $\Delta Np73\alpha$ avec la poly(ADP-ribose) polymérase PARP14. Nos résultats indiquent que la transformation par les protéines E6/E7 du β -HPV38 augmente les niveaux de PARP14, qui, à son tour, agirait comme répresseur de la signalisation p53 en maintenant les niveaux de p53 bas. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives à l'étude de la dérégulation de p53 par les HPV β et de leur impact sur la carcinogénèse.

Mot-clés : HPV, p53, $\Delta Np73\alpha$, E2F4, RB, interactions protéine-protéine, régulation de la transcription, cancer