

Université de Montréal

**Étude de la régulation des activités transcriptionnelle,
répllicative et de l'instabilité de la protéine régulatrice
E2 des papillomavirus**

par

Hélène Sénéchal

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

Février 2013

© Hélène Sénéchal, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude de la régulation des activités transcriptionnelle, répllicative et de l'instabilité
de la protéine régulatrice E2 des papillomavirus

Présentée par :
Hélène Sénéchal

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Dr Jacques Archambault, directeur de recherche
Dre Léa Brakier-Gingras, membre du jury
Dr Jean-François Laliberté, examinateur externe
Dr Christian Beauséjour, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les papillomavirus sont de petits virus à ADN double brin qui infectent les cellules de l'épithélium de la peau et des muqueuses d'une variété de vertébrés causant des lésions bénignes telles des verrues. Certains de ces virus sont également associés au développement de lésions malignes, notamment le cancer du col utérin. La protéine régulatrice E2 des papillomavirus est impliquée dans diverses fonctions contribuant à l'établissement de l'infection par ces virus. Entre autre, E2 régule la transcription des gènes viraux, participe à l'initiation de la réplication de l'ADN viral en s'associant à l'hélicase virale E1 et est responsable du maintien et de la ségrégation de l'épisome viral au cours de la division cellulaire. Toutes ces activités sont attribuables à la capacité de E2 à s'associer au génome viral et à interagir avec des protéines virales et cellulaires. De plus, ces fonctions sont elles-mêmes régulées par des modifications post-traductionnelles de la protéine E2. Plusieurs études ont été réalisées afin de découvrir les mécanismes de régulation des fonctions de E2 mais le rôle exact des différents domaines de E2 dans ces contrôles reste à être défini.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre E2 et Brd4(L) qui avait été définie comme étant essentielle à la ségrégation de l'épisome. Plusieurs caractéristiques associées à la protéine Brd4(L) telles que sa capacité à lier les lysines acétylées des histones, son interaction avec le complexe Mediator et sa participation à l'activation de la transcription en formant un complexe avec pTEFb, nous ont permis d'émettre l'hypothèse que l'interaction E2-Brd4(L) est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de E2. Nous avons démontré que la protéine Brd4(L) interagit avec le domaine de transactivation de E2 de divers types de papillomavirus. De plus, cette interaction implique les résidus de E2 essentiels à son activité transcriptionnelle. Ainsi, ces résultats proposent que l'association E2-Brd4(L) serve à la régulation de la transcription des gènes viraux. Dans un second temps, nos recherches se sont concentrées sur l'existence d'une interface de dimérisation au sein du domaine de transactivation de E2 et de son

implication dans les activités transcriptionnelles et réplcatives de la protéine. Nos études ont aussi mis en évidence que l'intégrité de la structure de ce domaine contribue au bon fonctionnement de la réplication du génome viral. Cette découverte suggère que la dimérisation de E2 peut réguler l'initiation de la réplication et propose l'existence d'un niveau de régulation additionnel impliquant l'état de la structure quaternaire de la protéine E2 et une modulation de l'interaction entre E1 et E2 à cette étape du cycle viral. Finalement, l'étude de l'instabilité de la protéine E2 nous a permis de définir une région importante dans le domaine flexible de la protéine, nécessaire à sa dégradation par le protéasome. De plus, la présence de résidus conservés localisés dans ce domaine, sont associés à la dégradation et portent la signature d'un signal de localisation nucléaire de type PY-NLS, suggérant que la stabilité de la protéine E2 est régulée par sa localisation au sein de la cellule.

Ces études démontrent l'existence de nouvelles stratégies de régulation des activités transcriptionnelle et réplcative de la protéine E2 des papillomavirus. La compréhension de ces mécanismes nous permet de mieux cerner les étapes favorisant l'établissement et la progression du cycle viral et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre les infections aux papillomavirus.

Mots-clés : Papillomavirus, E2, transcription, Brd4(L), réplication, interaction protéine-protéine, interface dimérique, dégradation, protéasome, localisation cellulaire.

Abstract

Papillomaviridae is a family of small double-stranded DNA viruses known as papillomaviruses (PV) which infect skin and mucosal epithelial cells where they cause benign lesions such as warts. A subset of these viruses is associated with the development of malignant lesions and is the causal agent of cervical cancer. Papillomavirus E2 regulatory protein is involved in several functions leading to the establishment of the viral infection. These activities include the regulation of viral genes transcription, its participation to the initiation of viral DNA replication by recruiting the viral helicase E1, and to the maintenance and segregation of the viral episome during cellular division. All these functions are associated to the ability of E2 to bind specifically the viral genome, to interact with viral and cellular proteins and to acquire post-translational modifications.

The first article of this thesis led to the identification of Brd4(L) as the major protein associated to E2 protein of different papillomavirus types. This interaction involves the amino acids associated to the transcription function of E2. The protein Brd4(L) was identified originally as a factor that maintains epigenetic memory by its interaction with acetylated histones during mitosis. This association with the chromatin, its interaction with *Mediator* complex and its participation to the cellular transcription by recruiting pTEFb complex allowed us to propose that the interaction between Brd4 and E2 is essential to the regulation of viral gene transcription. The second part of this work based on previous characterization of the transactivation domain dimerization interface; investigate the role of this surface in the transcriptional and replicative activities of E2. Our studies demonstrated that the integrity of the TAD dimerization interface may contribute to the DNA replication activity of E2. This discovery suggests that the dimerization interface may regulate the viral DNA replication by the redox state of the E2 protein. A fine characterization of this interface may provide new aspect of the interaction between E1 and E2 in the context of viral cycle. Finally, the third section of this thesis defines a region of E2 protein associated to its degradation by the proteasome. This study also demonstrates that the stability of E2 is related to its cellular

localization and suggests that the highly conserved residues found in this region may represent a PY-NLS nuclear localization signal signature.

This thesis shows the existence of different approaches to regulate the transcriptional and the replicative activities as well as the stability of the papillomavirus E2 protein to favor the establishment and the progression of viral cycle.

Keywords: Papillomavirus, E2, transcription, Brd4(L), replication, protein-protein interaction, dimeric interface, degradation, proteasome, cellular localization.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xv
Liste des abréviations.....	xvii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature.....	3
1.1 Description des papillomavirus.....	3
1.1.1 Classification des papillomavirus.....	3
1.1.2 Infection par les papillomavirus.....	4
1.1.2.1 Infections causées par les papillomavirus à tropisme cutané.....	5
1.1.2.2 Infections causées par les papillomavirus à tropisme muqueux.....	7
1.1.3 Traitements disponibles et en développements.....	12
1.1.3.1 Traitements disponibles.....	12
1.1.3.2 Traitements en développement.....	15
1.1.4 La prévention et les vaccins prophylactiques.....	20
1.1.5 Les modèles animaux et cellulaires utilisés pour l'étude des papillomavirus.....	23
1.2 Biologie moléculaire des papillomavirus.....	26
1.2.1 La structure du virion et l'entrée virale.....	26
1.2.2 L'organisation génomique des papillomavirus.....	31
1.2.3 Le cycle viral.....	36
1.2.4 Les protéines virales.....	42
1.2.4.1 Les protéines précoces.....	42

1.2.4.2	Les protéines tardives.....	59
1.3	E2 : la protéine régulatrice des papillomavirus.....	61
1.3.1	Structure de la protéine E2.....	61
1.3.1.1	Le domaine de transactivation (TAD)	62
1.3.1.2	La région charnière	65
1.3.1.3	Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)	67
1.3.2	L'interaction entre la protéine E2 et l'ADN	69
1.3.3	La localisation cellulaire de la protéine E2	71
1.3.4	Les fonctions de la protéine E2.....	73
1.3.4.1	La transcription des gènes viraux.....	74
1.3.4.2	La réplication de l'ADN du génome viral	79
1.3.4.3	La ségrégation du génome viral	81
1.3.4.4	L'apoptose.....	86
1.3.4.5	La régulation du cycle cellulaire et de la mitose.....	90
1.3.5	Les partenaires d'interaction de la protéine E2.....	92
1.3.6	Les modifications post-traductionnelles de la protéine E2	101
1.3.6.2	La phosphorylation	101
1.3.6.2	L'ubiquitination	103
1.3.6.2.2	Le système de dégradation dépendant du protéasome	104
1.3.6.2.2	Régulation de la stabilité de la protéine E2	107
1.4	Hypothèses des projets de recherche	112
Chapitre 2: Article no.1		114
AMINO ACID SUBSTITUTIONS THAT SPECIFICALLY IMPAIR THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF PAPILOMAVIRUS E2 AFFECT BINDING TO THE LONG ISOFORM OF BRD4		114
2.1	Contribution des auteurs à l'article	115
2.2	Abstract	116
2.3	Introduction.....	116

2.4 Results.....	118
2.4.1 Identification of cellular proteins that bind to the transactivation domain of E2	118
2.4.2 Brd4(L) binds to the E2 TAD of different papillomaviruses.....	119
2.4.3 Substitutions of R37 and I73 impair the binding of Brd4(L) to the E2 TAD of HPV11, HPV31 and CRPV	120
2.5 Discussion	121
2.6 Materials and methods	124
2.7 Acknowledgments.....	126
2.8 References.....	127
2.9 Figures Legend.....	135
2.10 Figures.....	138
 Chapitre 3: Article no.2.....	 142
GENETIC ANALYSIS OF THE E2 TRANSACTIVATION DOMAIN DIMERIZATION INTERFACE FROM BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 1	 142
3.1 Contribution des auteurs à l'article	143
3.2 Abstract	144
3.3 Introduction.....	144
3.4 Results.....	147
3.4.1 Expression of BPV1 E2 mutant proteins with amino acid substitutions in the TAD dimerization interface.	147
3.4.2 The integrity of the TAD dimerization interface is not required for the nuclear localization of BPV1 E2.....	148
3.4.3 Transcriptional transactivation activities of the BPV1 E2 mutant proteins..	148
3.4.4 Development of a luciferase-based BPV1 DNA replication assay.....	150
3.4.5 DNA replication activities of the BPV1 E2 mutant proteins.	151
3.5 Discussion	152

3.6 Materials and Methods.....	154
3.7 Acknowledgements.....	158
3.8 References.....	159
3.9 Figure Legends.....	165
3.10 Figures.....	169
 Chapitre 4: Article no.3.....	 175
IDENTIFICATION OF A REGION OF THE BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 E2 PROTEIN CRITICAL FOR THE REGULATION OF ITS DEGRADATION.....	175
4.1 Contribution des auteurs à l'article.....	176
4.2 Abstract.....	177
4.3 Introduction.....	178
4.4 Materials and Methods.....	181
4.5 Results.....	186
4.5.1 Use of a Renilla luciferase fusion protein to study the degradation of Bovine Papillomavirus Type 1 E2.....	186
4.5.2 Identification of BPV1 E2 domains responsible for its instability.....	188
4.5.3 Serines 298 and 301 within the hinge region are not required for E2 degradation.....	189
4.5.4 A region encompassing amino acid 259 to 277 is associated with the stability of BPV1 E2.....	190
4.5.5 The degradation of BPV1 E2 is related to its nuclear localization.....	190
4.6 Discussion.....	192
4.7 Acknowledgments.....	197
4.8 References.....	198
4.9 Figure Legend.....	208
4.10 Figures.....	214

Chapitre 5: Discussion	223
5.1 Domaine de transactivation : lieu de la régulation.....	224
5.1.1 Interaction entre E2 et les protéines cellulaires.....	224
5.1.2 Intégrité de la structure de E2	228
5.2 Stabilité de E2	237
Chapitre 6 : Conclusion.....	246
Annexe 1 : Alignements des séquences protéiques des E2.....	253
Annexe 2 : Mutants de la protéine E2 du VPB1 étudiés.....	257
Annexe 3 : Article no.4.....	259
PROTEASOMAL DEGRADATION OF THE PAPILLOMAVIRUS E2 PROTEIN IS INHIBITED BY OVEREXPRESSION OF BROMODOMAIN-CONTAINING PROTEIN 4	259
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

CHAPITRE 3

Table I Summary of the expression and activities of BPV1 E2 mutant proteins.....164

CHAPITRE 4

Table I Primers used in this study.....218

Liste des figures

CHAPITRE 1:

Figure 1.1. Classification phylogénique des genres de papillomavirus.	4
Figure 1.2. Représentation schématique de l'épiderme.	7
Figure 1.3. Progression d'une lésion bénigne à maligne causée par l'infection au VPH.	9
Figure 1.4. Image de la capsid virale des papillomavirus.	26
Figure 1.5. Représentation des voies d'entrée virales par endocytose.	30
Figure 1.6. Représentation de la carte génomique des papillomavirus.	32
Figure 1.7. Représentation de la région de contrôle (LCR) des papillomavirus.	33
Figure 1.8. Exemple des transcrits précoces et tardifs ayant un potentiel codant.	36
Figure 1.9. Cycle viral des papillomavirus.	38
Figure 1.10. Représentation schématique de l'hélicase E1 des papillomavirus.	42
Figure 1.11. Représentation de l'initiation de la réplication chez les papillomavirus.	44
Figure 1.12. Structure de l'oncogène E6 des papillomavirus.	49
Figure 1.13. Les activités de l'oncoprotéine E6 ciblant les voies de signalisation et protéines cellulaires.	52
Figure 1.14. Structure de l'oncogène E7 des papillomavirus.	54
Figure 1.15. Les activités de l'oncogène E7 ciblant les voies de signalisation par l'interaction avec diverses protéines cellulaires.	57
Figure 1.16. Structure du facteur de transcription E2.	62
Figure 1.17. Domaine de transactivation de la protéine E2.	63
Figure 1.18. Schématisation de la formation de dimère de E2 via le TAD.	65
Figure 1.19. Structure du domaine de liaison de la protéine E2.	69
Figure 1.20. Schématisation de l'activité transcriptionnelle de E2.	75
Figure 1.21. Fonction de la protéine E2 dans la réplication du génome viral.	81
Figure 1.22. La ségrégation du génome viral par la protéine E2.	86
Figure 1.23. Représentation de l'isoforme long de Brd4.	97

Figure 1.24. Effet de la phosphorylation de la sérine 301 de la protéine E2 du VPB1.	103
Figure 1.25. Système d'ubiquitination dépendant du protéasome (UPS).....	107

CHAPITRE 2:

Figure 2.1. Purified GST-E2 TAD proteins used in this study.	138
Figure 2.2. Purification of Brd4(L) by affinity chromatography with the HPV11 and HPV31 E2 TAD.	139
Figure 2.3. Binding of Brd4(L) to other viral and cellular transactivation domains.	140
Figure 2.4. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of E2 reduce binding to Brd4(L).	141
Table I. Summary of the expression and activities of BPV1 E2 mutant proteins.....	168

CHAPITRE 3:

Figure 3.1. Structure of the BPV1 E2 TAD dimer showing the location of amino acids mutated in this study.	169
Figure 3.2. Expression and intracellular localization of BPV1 E2 mutant proteins.	170
Figure 3.3. Transcriptional activities of wild type and mutant BPV1 E2.....	171
Figure 3.4. Development of a luciferase-based BPV1 DNA replication assay.	172
Figure 3.5. Sensitivity of the luciferase-based BPV1 DNA replication assay to DNA replication inhibitors.	173
Figure 3.6. DNA replication activities of wild type and mutant BPV1 E2.....	174

CHAPITRE 4:

Figure 4.1. Functional activities of Bovine papillomavirus type 1 E2 protein fused to the RLuc3F.....	214
Figure 4.2. Stability of Papillomavirus E2 proteins as a fusion with Renilla luciferase measured using luciferase activity.	215

Figure 4.3. Protein expression of Bovine Papillomavirus E2 domains as a fusion with Renilla luciferase.....	216
Figure 4.4. Effect of proteasome inhibition on stability of BPV1 E2 domains.	217
Figure 4.5. Protein expression of BPV1 E2 major phosphorylation site mutants.....	218
Figure 4.6. Effect of proteasome inhibition on Bovine Papillomavirus type 1 E2 C-terminal truncations stability.	219
Figure 4.7. Localization of BPV-1 E2 proteins in C33A cells.....	220
Figure 4.8. Fibropapillomavirus E2 hinge region associates with the stability of the protein.	221

CHAPITRE 5:

Figure 5.1. Les résidus R172 et D175 ne sont pas responsables de la dégradation de la protéine E2 du VPB1.	234
Figure 5.2. Effet de la protéine E2 du VPB1 sur l'activation de la transcription d'un gène régulé par le promoteur CMV.	239
Figure 5.3. La phosphosérine 240 n'est pas associée à la dégradation de la protéine E2 du VPB1.....	241

CHAPITRE 6:

Figure 6.1 Régulation des fonctions de E2 selon la nature de son interaction avec Brd4(L).	248
Figure 6.2. Implication des résidus de l'interface dimérique de E2 dans la réplication de l'ADN viral.	249
Figure 6.3. Relation entre la localisation et la dégradation de la protéine E2 de VPB1 dictée par les résidus 259 à 277 de la région charnière.	251

*La connaissance est limitée tandis que
l'imagination englobe le monde entier,
stimule le progrès et suscite l'évolution.*

Albert Einstein

Remerciements

La décision d'entamer des études doctorales semble simple à prendre car nous ne connaissons pas l'aventure qui nous attend. Au cours de ce périple, des obstacles et des joies se sont tour à tour présentés à moi ce qui m'a permis de gagner une certaine maturité scientifique. Ainsi, j'ai développé un sens critique à l'égard des recherches et de respecter une certaine rigueur dans l'accomplissement de mes études conservant en tête que ces aptitudes sont toujours en constante évolution. J'aimerais remercier tout d'abord mon Directeur de recherche, le Dr Jacques Archambault, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a enseigné à sa façon, les différentes facettes du monde de la recherche afin justement que j'acquière les qualités de scientifique. Je le remercie pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité qui m'ont permis d'obtenir des bourses et de cheminer dans ces études.

J'aimerais remercier les membres de mon jury : Dr Nikolaus Heveker, Dre Léa Brakier-Gingras, Dr Jean-François Laliberté et le Dr Christian Beauséjour qui ont accepté d'évaluer ma thèse. De plus, un merci particulier aux membres de mon comité de thèse tout particulièrement le Dr Jim Omichinski et Dr François Coutlée pour m'avoir conseillée et encouragée. Il ne faudrait pas passer sous silence le personnel des différents plateaux technologiques qui sont d'une aide inestimable qui nous permettent d'utiliser et de comprendre des appareils à la fine pointe de la technologie. Merci à Dr Dominic Filion (Microscopie), Dr Odiles Neyret (Séquençage), ainsi qu'à de Richard Cimon (Équipements spécialisés).

Je tiens à remercier tous les collègues que j'ai côtoyé lors de mon passage au laboratoire soit Dre Amélie Fradet-Turcotte, Alexandra Côté-Martin, Dr Simon Joubert, Michaël Lehoux, Dre Claudia D'Abramo, Dr David Gagnon, Jennifer Alvarez et Dre Andreea Gomez. Être étudiant au doctorat nécessite beaucoup d'heures de travail et ces moments doivent être des plus agréables pour vouloir poursuivre cet investissement de soi.

Ainsi, grâce à votre présence, vos conseils, votre support et nos sorties mémorables je vous dits un gros merci. Il ne faudrait pas passer sous silence le soutien inconditionnel de mes parents Réal Sénéchal et Claire Lévesque et mes amis de toujours Benoît Côté, Fabrice Baro et Nickolas Svitek qui ont su me faire sortir de ma sphère.

L'aboutissement de ces études doctorales est aussi attribuable à l'énorme support de mon conjoint Alexandre Gougeon, Je te remercie sincèrement pour ton amour, ta présence, ta patience, ta persévérance et ta compréhension. Tes encouragements m'ont aidée dans mon cheminement scolaire et personnel et sans toi je ne sais pas si j'aurais atteint mes buts. Merci.

Finalement, j'aimerais remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour m'avoir octroyé une bourse d'étude Frederick Banting et Charles Best.

Liste des abréviations

A:	Adénine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR:	ATM and <i>rad3</i> related
Bak:	BCL2-antagonist killer 1
BAP31:	B-cell receptor-associated protein 31
Bax:	BCL2-associated X protein
Bcl2:	B-cell lymphoma 2
BET:	Bromo-domain and Extra-Terminal domain
Brd4:	Bromodomain-containing protein 4
°C:	Degré Celsius
CKI:	Caséine kinase I
CKII:	Caséine kinase II
COPV:	Canine oral papillomavirus
CIN:	Cervical intraepithelial neoplasia
CHD6:	Chromodomain helicase DNA binding protein 6
ChlR1:	Chromosome loss-related protein 1 (hélicase de la famille DEAH)
CR:	Conserved region
CRPV:	Cotton-rabbit papillomavirus
CBP/p300:	CREB (cAMP-response element)-binding protein/p300
CBM:	Cyclin-binding motif
Cdk1:	Cyclin-dependent kinase 1
Cdk2:	Cyclin-dependent kinase 2
C :	Cytosine
CpG (îlots):	Îlots de cytosines et de guanines
DBD:	DNA binding domain (domaine de liaison à l'ADN)
DRB:	5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole

hDlg:	human discs large
E4-DBP:	E4-DEAD box protein
E6-AP:	E6 associated-protein
EGFR:	epidermal growth factor receptor
FADD:	Fas associated via death domain
FasL:	Fas ligand
c-FLIP:	cellular FLICE-like inhibitory protein
FRET:	fluorescence resonance energy transfert
Gps2/AMF-1:	G protein pathway suppressor 2
G1:	phase G1 (gap) ou intervalle 1 du cycle cellulaire
G2:	phase G2 (gap 2) ou second intervalle du cycle cellulaire
G:	Guanine
HDAC:	Histone deacetylase
HAT:	Histone acetyltransferase
HSP:	Heat shock protein
HeLa:	Cellules du cancer du col utérin de Madame Henrietta Lacks
Ini1/hSNF5:	Integrase integrator 1/ human Sucrose Non Fermentable
kb:	kilobases
kDa:	kiloDalton
LANA-1:	Latency-associated nuclear antigen 1
LCR:	Long Control Region
M:	Phase M ou de mitose (cycle cellulaire)
MAGI:	Membrane associated guanylate kinase
μ:	Micro
min:	Minute (s)
MKLP2:	Mitotic kinesin-like protein 2
MME:	Minichromosome maintenance element
MRC5:	Fibroblastes de poumon fœtal, p53 ^{+/+}

MUPP1:	Multiple PDZ domain protein
nm:	Nanomètre
NLS:	Nuclear Localization Signal
NES:	Nuclear Export Signal
ND10:	Nuclear domain 10
NRIP:	Nuclear receptor interaction protein
ORF:	Open Reading Frame
PML:	Promyelocytic Leukemia
pCAF:	p300/CBP-Associated Factor
pTEFb:	Positive Transcription Elongation Factor b
PDZ:	PSD95/DlgA/ZO-1
PTPN3:	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 3
RPA:	Replication Protein A
S:	Phase S ou de synthèse (cycle cellulaire)
Saos-2:	Lignée cellulaire d'ostéosarcome p53 ^{-/-}
hScrib:	human Scribbled
shRNA:	small or short hairpin RNA
siRNA:	small interfering RNA
SWI/SNF:	Switch/Sucrose Non Fermentable
T:	Thymine
TAD:	Transactivation domain (domaine de transactivation)
TaxBP1:	Binding Protein of the hTLV TAX protein
TBP:	TATA box Binding Protein
TFIIB:	General Transcription Factor II B
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor alpha
TopBP1:	Topoisomerase II Binding Protein 1
UBC:	Ubiquitin-conjugating enzyme
UPS:	Ubiquitine Proteasome System
VLP:	Virus-Like Particule

xx

VP: Virus du papillome ou papillomavirus

VPB: Virus du papillome bovin

VPH: Virus du papillome humain

Introduction

Les papillomavirus ou virus du papillome (VP) sont des virus à ADN qui infectent l'épithélium d'une variété d'animaux tels que les bovins, les rongeurs, les oiseaux, les reptiles ainsi que l'homme. Plus d'une centaine de type de virus du papillome ont été répertoriés chez l'Humain (virus du papillome humain, VPH) selon leur spécificité tissulaire et certains, comme le VPH16 et -18, sont directement responsables du développement du cancer du col utérin, le 3^e type de cancer en importance chez la femme au niveau mondial (Bosch and de Sanjose, 2007; Ferlay et al., 2010).

L'infection génitale par le VPH est l'infection la plus fréquemment transmise sexuellement atteignant 75% des hommes et des femmes au cours de leur vie sexuelle active (Koutsky et al., 1988). Pour la plupart des personnes infectées, le virus sera éliminé par le système immunitaire, par contre, une faible proportion des gens infectés vivra avec une infection persistante pouvant mener à des lésions précancéreuses ou cancéreuses. Aussi, des preuves grandissantes démontrent que le VPH est un facteur d'importance dans d'autres types de cancers affectant les régions anogénitales, les voies aérodigestives supérieures ainsi que la peau (Harwood and Proby, 2002; Parkin and Bray, 2006; Steenbergen et al., 2005).

Heureusement, les avancements scientifiques et le désir de réduire le nombre d'infection, ont conduit au développement et à l'homologation de deux vaccins pour prévenir les verrues génitales et les cancers du col utérin causés par les types les plus fréquents de VPH. Le vaccin de la compagnie GlaxoSmithKline nommé Cervarix^{MC} cible les VPH de type 16 et 18 associés aux cancers du col de l'utérus et le vaccin Gardasil^{MC}, de la compagnie Merck Frosst, protège contre les VPH de types 6, -11, retrouvés dans 90% des condylomes. Par contre, cette immunisation protège uniquement contre quatre types de VPH sur plus d'une centaine infectant l'Humain et ne permettent pas d'enrailler une

infection déjà acquise chez une personne. Ces faits démontrent la nécessité de poursuivre les études sur les VPH afin de mieux comprendre la biologie moléculaire du virus ainsi que ses interactions avec les composantes de la cellule hôte, dans le but de produire un traitement efficace s'adressant aux personnes porteuses du virus.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Description des papillomavirus

Les papillomavirus sont des virus à ADN bicaténaire qui infectent les cellules de la couche basale de l'épithélium de plusieurs espèces animales. Plus de 189 types de VP ont été décrits et classifiés selon l'hôte infecté et leur spécificité tissulaire. Jusqu'à ce jour, 120 types du virus du papillome ont été isolés chez l'Humain et certains sont connus pour causer des lésions bénignes telles que les verrues, et d'autres sont associés à des lésions malignes comme le cancer du col utérin.

1.1.1 Classification des papillomavirus

Les papillomavirus ont un génome circulaire d'ADN double brin d'environ 8 kb qui contient, chez la plupart des VP, huit à dix gènes. La séquence d'un de ces gènes, du nom de L1, codant pour la protéine principale de la capsidie du virion, a été historiquement exploitée pour définir les différents types de VP. L'utilisation de la séquence nucléotidique de L1 découle du fait qu'elle est raisonnablement bien conservée au sein du taxon des papillomavirus et permet d'effectuer des analyses comparatives. Ainsi, la famille des *Papillomaviridae* a été subdivisée en genre, en espèce, en type, sous-type et en variant selon la divergence de la séquence nucléotidique du gène L1 (Bernard et al., 2010).

La reconnaissance d'un nouveau type de VP est acceptée si le génome entier du virus a été séquencé et si la séquence nucléotidique du gène L1 présente une divergence de plus de 10% avec la séquence du gène L1 du type connu le plus proche. Les types sont identifiés par des chiffres suivant l'ordre de découverte. De façon similaire, les différents types de VP sont regroupés en espèces s'ils présentent une homologie de la séquence du gène L1 de plus de 70%. Finalement, les espèces formeront un genre qui sera identifié par une lettre grecque si plus de 60% de la séquence de L1 est homologue (Figure 1.1).

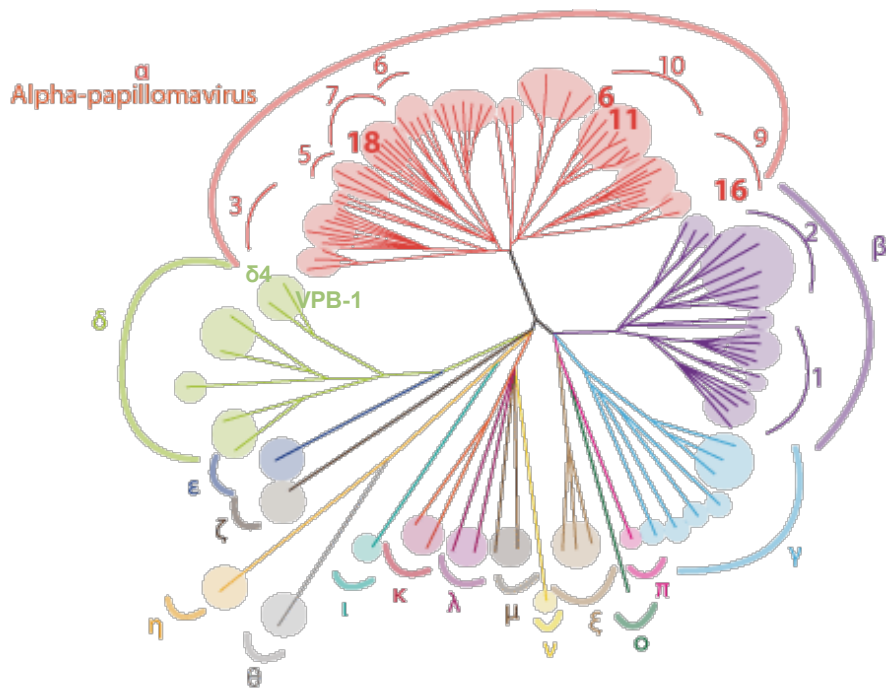


Figure 1.1. Classification phylogénique des genres de papillomavirus.

Cet arbre phylogénique a été créé à partir de l'homologie des séquences d'ADN du gène L1 des différents papillomavirus. Les genres de papillomavirus sont représentés par des lettres grecques. Les VPH de type 6, -11, -16, -18 (α -papillomavirus) et VPB1 (δ -papillomavirus) sont représentés. Adaptée de http://www.afd-id.org/~fdp_viro/content.php?page=papillomavirus, Université Catholique de Louvain, site visité le 2011-05-05.

1.1.2 Infection par les papillomavirus

Plus de 189 types différents de VP ont été identifiés et classifiés selon la divergence de la séquence d'ADN de L1. Cette différence génétique des VP fait aussi en sorte que les hôtes infectés sont très divers mais que chaque génotype est spécifique à une espèce donnée, possède un tropisme tissulaire ainsi qu'un pouvoir oncogénique variable. Par exemple, nous retrouvons plus de 120 types de VP infectant uniquement l'Humain. Ces

VPH sont par la suite divisés en deux catégories soit ceux ciblant les tissus cutanés et ceux infectant l'épithélium des muqueuses anogénitales et oro-pharyngées. Les types de VPH à tropisme muqueux sont ensuite répertoriés selon leur potentiel à induire des lésions cancéreuses. Il y a les VPH à bas risque oncogénique qui sont associés à des lésions bénignes telles que les condylomes, et les VPH à haut risque, qui sont plutôt liés à des lésions malignes et peuvent mener au développement du cancer du col de l'utérus. Ce type de classification basée sur l'activité oncogénique n'existe pas pour les VPH à tropisme cutané malgré le fait qu'il y a plus de 40 types de VPH affectant la peau et que certains types sont associés au développement de lésions malignes (Orth, 1987).

1.1.2.1 Infections causées par les papillomavirus à tropisme cutané

Les VPH à tropisme cutané vont s'infiltrer dans les cellules épithéliales de la peau saine lors de microtraumatismes et provoquer des lésions bénignes dont les plus communes sont les verrues (papillomes) retrouvées sur les mains et les pieds (Jablonska et al., 1997). Plusieurs types de verrues existent et se distinguent phénotypiquement selon le VPH en cause. Ainsi, nous retrouvons principalement le VPH de type 1 dans les cas de verrues plantaires au niveau de la paume des pieds et le VPH3 dans les cas de verrues planaires ciblant le visage et les membres supérieurs. La plupart des infections causées par les VPH cutanés vont subsister pendant plusieurs mois et disparaître dans les deux années suivantes grâce au système immunitaire de l'hôte.

La plupart des VPH à tropisme cutané sont responsables des infections bénignes, par contre, certains parmi ce groupe ont un potentiel oncogénique qui va se traduire dans le développement de lésions malignes chez certaines personnes prédisposées. Notamment, une maladie rare du nom d'*epidermodysplasia verruciformis* (EV) est observée chez des patients ayant une susceptibilité unique aux infections par des types de VPH cutanés

considérés inoffensifs pour la population en générale (Orth, 1987). Les patients atteints d'EV ont développé depuis leur enfance des lésions cutanées pouvant être disséminées sur tout le corps mais plus particulièrement, au niveau des régions exposées au soleil. Pour certains de ces individus, les lésions progresseront en cancer de la peau sans mélanome au début de l'âge adulte. Cette maladie est associée principalement à des mutations génétiques dans deux gènes adjacents, *EVER1* et *EVER2* situés sur le chromosome 17 (Ramos et al., 2002), (Padlewska et al., 2001). Le risque de développer des lésions malignes augmente si les VPH5 et -8 y sont retrouvés, étant les types responsables de 90% des cas de cancer de la peau chez les personnes souffrant d'EV (Harris et al., 1997).

Une autre forme de lésion maligne extrêmement commune dans la population est le cancer de la peau sans mélanome non-associé aux gènes *EVER1* et *EVER2*. Ces cancers prennent place au niveau de deux strates de l'épiderme soit au niveau de la couche de cellules basales ou soit au sein de la couche épineuse composée de kératinocytes (Figure 1.2). Ces types de carcinomes sont généralement localisés sur les surfaces de la peau exposées à la lumière du soleil faisant des rayons ultra-violets, le principal facteur de risque au développement du cancer de la peau sans mélanome. L'association entre ce type de cancer et l'implication des VPH n'est pas encore clairement établie mais plusieurs indices pointent dans cette direction. Effectivement, ce lien a été suggéré pour la première fois en observant l'apparition de cancer sans mélanome chez les personnes ayant reçu une transplantation d'organe (Berkhout et al., 1995; zur Hausen, 1996). Aussi, ces personnes étaient 100 fois plus susceptibles de développer l'apparition de lésions bénignes causées par une infection au VPH, que les individus immunocompétents (Lindelof et al., 2000; Stockfleth et al., 2001). De plus, l'analyse de certains carcinomes chez des patients non-immunosupprimés et n'étant pas atteint d'EV, a démontré la présence d'ADN et d'ARN des VPH de types 5 et 8, suggérant que des VPH pourraient être associés aux cancers de la peau sans mélanome (de Villiers et al., 1997; Orth, 2005; Purdie et al., 2005; Shamanin et

al., 1996). Jusqu'à présent, des évidences montrent un lien entre les cancers de la peau sans mélanome et la présence de VPH comme facteur de risque important dans le développement de la maladie mais le (les) rôle(s) du virus dans ces carcinomes restent inconnus (Harwood and Proby, 2002).

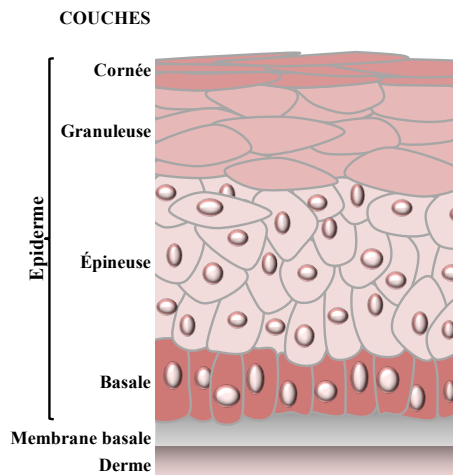


Figure 1.2. Représentation schématique de l'épiderme.

Les différentes couches de l'épiderme sont la cornée, composée de cellules squameuses qui sont des kératinocytes morts, la couche granuleuse contenant des cellules aplaties et en apoptose, la couche épineuse où se trouve plusieurs strates de cellules conférant la souplesse et la rigidité de la peau et la couche basale renfermant les cellules répliquatives. L'épiderme est séparé du derme par la membrane basale. (Adaptée de Lehoux *et al.*, 2009, (Lehoux et al., 2009)).

1.1.2.2 Infections causées par les papillomavirus à tropisme muqueux

Les papillomavirus infectant les cellules épithéliales des muqueuses de l'Humain sont la cause la plus commune d'infections transmises sexuellement dans nos sociétés (Santé-Canada, 2010; Wiley and Masongsong, 2006). Environ 40 types de VPH sont connus pour infecter les muqueuses de l'Homme mais seulement une très faible proportion des infections conduit au cancer du col utérin. Ces infections ont été associées à certains

types de VPH ce qui a permis de classifier les virus selon leur pouvoir à induire des lésions malignes. Ainsi nous distinguons les VPH à faible risque oncogénique des VPH à haut risque. Ces deux groupes vont infecter principalement les régions anogénitales et oropharyngée de la femme et de l'homme. Ils vont induire l'apparition de verrues ou de condylomes si c'est un VPH à faible risque tel que les VPH6 et -11, ou mener rarement à la progression d'un cancer si certains VPH à haut risque sont en cause. On estime que 75% des hommes et des femmes actifs sexuellement sont susceptibles de contracter une infection au VPH localisée dans la région anogénitale (Koutsky et al., 1988). Quoique la plupart des infections sont asymptomatiques et disparaissent sans traitement, une faible proportion d'individus développera des symptômes nécessitant des soins plus poussés. La présence des VPH à haut risque oncogénique dans 99,9% des cancers du col utérin a permis d'établir que les VPH sont la principale cause du cancer de l'utérus (revue dans (Bosch et al., 2002)).

Le cancer du col de l'utérus est le 3^{ième} cancer en importance chez la femme dans le monde avec une estimation de 529 000 nouveaux cas en 2008 et causant la mort à environ 275 000 femmes annuellement (Ferlay et al., 2010). Malgré sa prévalence, le cancer du col de l'utérus affecte principalement les femmes des pays en voie de développement où 85% des nouveaux cas ont été déclarés en 2008. Notons aussi que 85% de tous les cancers du col utérin sont des cancers des cellules squameuses et pour les autres cas, la majorité sont des adénocarcinomes définis comme étant des tumeurs malignes ayant un aspect glandulaire. Certaines cellules infectées par le VPH vont subir de nombreux changements dysplasiques suite à la réplication du génome viral et à la production des protéines virales, pouvant mener à une lésion maligne (Wright TC, 1994). La progression d'une lésion bénigne à maligne va impliquer l'invasion des cellules de l'épithélium par les cellules basales infectées et le degré de remplacement observé, indiquera la sévérité de la dysplasie. Ainsi, une dysplasie intra-épithéliale de grade 1 (CIN 1) correspond à un changement de 1/3 de la

surface superficielle du col de l'utérus, de grade 2, 2/3 d'échange avec les cellules basales et finalement le grade 3 présentera une dysplasie sévère (Figure 1.3).

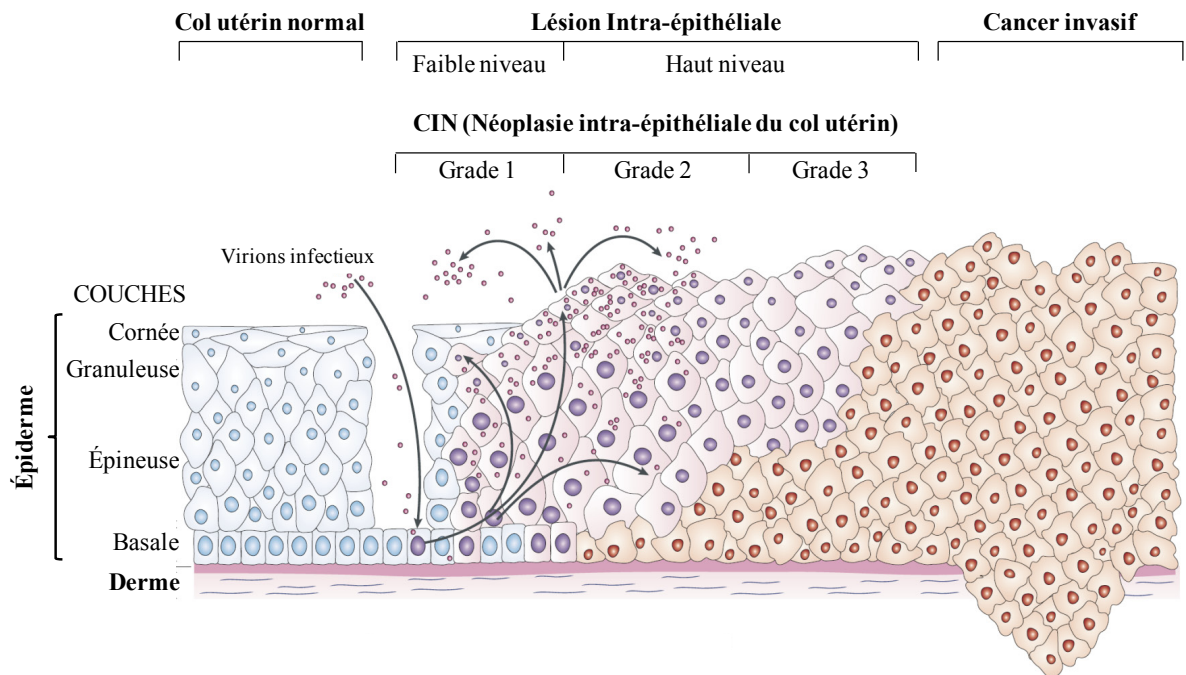


Figure 1.3. Progression d'une lésion bénigne à maligne causée par l'infection au VPH.

Le virus du VPH va infecter les cellules de la couche basale suite à un microtraumatisme dans l'épithélium. Suite à l'infection, les gènes viraux seront exprimés et selon les différentes activités des protéines virales, les cellules des différentes couches de l'épiderme subiront une invasion des cellules dysplasiques vers les couches suprabasales menant à une lésion maligne. Au cours de ces étapes de carcinogenèse, le virus du VPH va être aussi en mesure de répliquer son génome et d'établir la production de nouveaux virions. Adaptée de Woodman *et al.*, 2007 (Woodman *et al.*, 2007).

Une étude récente a montré la présence de 15 types de VPH à haut risque dans les cas de cancer des cellules squameuses dont 8 (VPH16, -18, -31, -33, -45, -52, -58 et -35) étaient retrouvés dans 95% des cas (Munoz *et al.*, 2003). Cette étude a aussi démontré que les VPH de type 16 (58,9%) et 18 (15%) étaient majoritairement présents dans ce type de

cancer (Clifford et al., 2005; Clifford et al., 2003; Khan et al., 2005; Munoz et al., 2003). Les cas d'adénocarcinomes du col utérin sont eux aussi principalement associés à une infection aux VPH16 et -18 (82% des cas), suivi par les VPH de type 45, 59 et 35 (Castellsague et al., 2006). De toutes évidences, les VPH16 et -18 ont un potentiel oncogénique très élevé et sont majoritairement responsables des cas de cancers du col de l'utérus en plus d'être retrouvés dans d'autres types de cancer de la région anogénitale. Entre autre, le VPH16 est le type de VPH le plus fréquemment retrouvé dans les cas de cancer anal, de la vulve et du pénis. Par contre, il faut noter que la présence de ces cancers à ces sites n'est pas strictement associée à une infection aux VPH et que d'autres facteurs comme le tabagisme et les pratiques sexuelles peuvent être en cause (Parkin and Bray, 2006).

Une autre infection aussi commune dans nos sociétés causée par les VPH chez les jeunes adultes sexuellement actifs, est l'apparition de condylomes ou de verrues génitales (Baseman and Koutsky, 2005; Partridge and Koutsky, 2006). Les VPH6 et -11 à tropisme muqueux à bas risque sont majoritairement impliqués dans ce type d'infection et vont provoquer des verrues hautement contagieuses avec un taux de transmission d'environ 65% entre un individu infecté ayant des relations sexuelles avec une personne saine (Lacey, 2005). La période d'incubation avant l'apparition de condylomes se situe entre 3 semaines et 8 mois et peuvent disparaître spontanément dans l'année suivante ou être traité par des applications d'onguents topiques ou par chirurgie. Les verrues génitales sont en générale indolores et ne causent pas la mort, par contre elles ont un impact sur l'état psychologique du patient et sont responsables d'une augmentation des dépenses en soin de santé. En effet, il est difficile d'éliminer l'infection au premier traitement, souvent une réponse inadéquate et même une réapparition des verrues sont souvent remarquées après une thérapie, ce qui en fait une infection dispendieuse en temps et en argent.

Plusieurs études ont localisé des cancers suite à des infections aux VPH à tropisme muqueux à haut risque oncogénique dans les voies aéro-digestives supérieures. Ce type de cancer affectant plus précisément la cavité orale, l'oropharynx, le larynx, l'hypopharynx et les cavités aériennes de la figure, est maintenant classé comme le 6^{ième} en incidence au niveau mondial (Kamangar et al., 2006). Les estimations du pourcentage des cancers des voies aéro-digestives supérieures associés exclusivement à une infection au VPH varient entre 3% à 40% selon les études (revue dans (Snow and Laudadio, 2010)). Ces différences sont attribuables à la diversité des méthodes de détection des VPH utilisées, à la population et aux sites anatomiques étudiés. Jusqu'à maintenant, il est estimé que 38% des cas de cancers oro-pharyngés sont imputables aux VPH à haut risque, plus particulièrement au VPH16 (Kreimer et al., 2005; Leemans et al., 2011; Snow and Laudadio, 2010; Termine et al., 2008). D'autres facteurs de risque sont aussi associés aux cancers des voies aéro-digestives supérieures incluant le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et les prédispositions génétiques (Leemans et al., 2011). Il est aussi important de noter que ces facteurs peuvent être, certes indépendants, mais aussi synergiques à la progression d'un cancer lorsqu'une infection au VPH est présente.

Les VPH6 et -11 sont aussi responsables d'une infection rare ciblant le tractus respiratoire des jeunes enfants du nom de *laryngeal papillomatosis* ou papillomatose laryngée récurrente (Major et al., 2005). Cette maladie est caractérisée par une croissance récurrente de papillomes bénins dans tout le système respiratoire mais surtout au niveau du larynx causant une obstruction des voies respiratoires. Malgré sa pathogénicité bénigne, cette maladie pose un problème économique au niveau de la santé publique par le fait que de nombreuses chirurgies doivent être pratiquées dû à l'apparition fréquente des papillomes et que ces patients finissent pas perdre la voix.

1.1.3 Traitements disponibles et en développements

La plupart des infections par les VPH se résorbent grâce à l'efficacité du système immunitaire. Par contre, dû à des facteurs environnementaux et spécifiques à l'hôte, certains individus ayant une infection au VPH, vont développer des lésions bénignes comme des condylomes ou malignes tel le cancer du col de l'utérus. Aucune cure médicale n'existe pour éradiquer une infection au VPH mais des traitements ont été développés pour contrer la présence des symptômes.

1.1.3.1 Traitements disponibles

Plusieurs traitements sont utilisés pour enrayer la présence des verrues de la région anogénitale. Certaines méthodes vont être préconisées selon le type et la grosseur des condylomes ainsi que l'étendue de la surface à traiter. Les interventions incluent l'ablation chirurgicale, la destruction des cellules infectées, l'utilisation d'un stimulateur de la réponse immunitaire locale par l'application d'onguents topiques seul ou en combinaison avec un traitement au laser. L'excision de la verrue génitale va s'effectuer à l'aide d'un bistouri ou bien avec un électrocautère qui utilise l'électricité pour chauffer une boucle métallique servant à couper les condylomes. Les traitements qui vont amener une nécrose de la région infectée regroupent entre autre l'utilisation de l'énergie infrarouge d'un laser au dioxyde de carbone et la cryothérapie qui consiste à appliquer de l'azote liquide au niveau de la zone à traiter. L'application locale d'agents corrosifs comme les acides trichloroacétique et salicylique, vont aussi être utilisés pour détruire les cellules de la région infectée.

Les traitements locaux administrés sous la forme d'onguents, de gels, ou de solutions, vont contenir des agents réduisant la prolifération cellulaire. Nous retrouvons dans ce groupe la podophyllotoxine qui est une toxine se liant à la tubuline empêchant la

formation de microtubule et induisant un arrêt du cycle cellulaire provoquant la nécrose dans les tissus traités (von Krogh, 1981). Un autre agent antiprolifératif couramment utilisé est le 5-fluorouracil (5-FU). Il bloque l'activité de la thymidylate synthase et inhibe la synthèse d'ADN générant un arrêt du cycle cellulaire. Le cidofovir, un analogue de nucléoside pour lequel le mécanisme d'action envers les PV n'est pas complètement connu, a été développé initialement pour contrer les infections par le cytomégalovirus mais il est maintenant fréquemment utilisé pour les lésions sévères et récurrentes causées par les VPH (Coremans and Snoeck, 2009). Une étude prometteuse mais qui reste à être confirmée, propose que le cidofovir pourrait supprimer la prolifération des cellules transformées par les VPH et induire l'apoptose. Le mécanisme impliquerait une protéine virale qui ajouterait des groupements phosphates au cidofovir créant une forme du médicament causant la mort cellulaire (Andrei et al., 2000). De plus, les cellules traitées au cidofovir accumulent dans la phase S du cycle cellulaire en réduisant le niveau de la protéine p21 sans affecter la quantité de p53 (Johnson and Gangemi, 1999).

La classe de médicament modulant le système immunitaire regroupe l'interféron et l'imiquimod, deux agents approuvés pour lutter contre les verrues génitales. L'imiquimod inhibe la réplication des VPH et provoque la régression des condylomes. Son action repose sur l'activation de l'immunité innée par la stimulation de la production d'interféron alpha (IFN- α) et d'autres cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'activation des lymphocytes T (Garland, 2003; Scheinfeld and Lehman, 2006). Il est appliqué localement sous la forme d'onguent à une concentration de 5% où l'on constate une régression des condylomes ainsi qu'une diminution de l'ADN viral dans 51,6% des cas (Garland et al., 2006). Une thérapie approuvée pour contrer les lésions bénignes causées par les VPH, est l'utilisation d'IFN. Il existe principalement deux types d'IFN, les IFN de type I, tel que l'IFN- α et l'IFN- β , synthétisés par de nombreux types cellulaires et l'IFN de type II, tel que l'IFN γ produit principalement par les lymphocytes T après l'induction de la réponse adaptative. Les IFN

mènent à l'activation de plus de 300 protéines et de voies enzymatiques pour la plupart ayant une activité antivirale telle que la synthèse d'ARNases, l'activation de la protéine kinase R (PKR) répondant à la présence d'ARN double brin et modulant la synthèse de protéines, en plus d'accroître l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 et d'activer le système immunitaire adaptatif. Tous ces éléments peuvent directement inhiber la réplication et la propagation virale.

L'IFN- α , l'IFN- β et l'IFN γ ont été testés pour enrayer les condylomes génitaux, mais la plupart des informations disponibles révèlent que l'IFN- α est le plus efficace. Cette protéine sécrétée possède des facultés anti-tumorales ainsi qu'antivirales en modulant l'activation des lymphocytes T et leurs effets cytotoxiques (Cirelli and Tying, 1994; Czelusta et al., 1999). De plus, la production d'IFN lors d'une infection virale induit une augmentation de la protéine p56. Il a été démontré que la protéine p56 interagit spécifiquement avec la protéine virale E1 des VPH nécessaire à la réplication de l'ADN du virus. Cette interaction modifie la localisation nucléaire de E1 et aussi inhibe son activité hélicase empêchant ainsi la synthèse de l'ADN viral dans les cellules basales de l'épithélium (Terenzi et al., 2008). Aussi, l'efficacité du traitement à l'interféron est d'autant plus augmentée lorsqu'il est appliqué localement et en combinaison avec une thérapie physique telles que la chirurgie ou bien l'utilisation du laser à CO₂ (Yang et al., 2009). Finalement, la thérapie photodynamique peut être avantageuse pour le traitement de condylomes génitaux de petites tailles ou des néoplasies intra-épithéliales. Cette technique requière l'utilisation d'un agent photosensibilisant qui est sensible à la lumière. Ce médicament est appliqué sur la zone à traiter et reste inactif jusqu'à ce qu'il soit exposé à lumière d'un laser à une longueur d'onde précise. L'illumination active l'agent présent dans la lésion et permet la production de radicaux libre qui sont cytotoxiques (Barnett et al., 2003). Malgré l'existence de diverses approches pour contrer les condylomes causés par les

VPH, aucun d'entre eux ne vont éradiquer les verrues génitales et pour la majorité des patients, les thérapies doivent être reprises dû à la récurrence de l'infection.

Les traitements des lésions précancéreuses et du cancer du col de l'utérus à un stade précoce visent à enlever complètement les cellules anormales et regroupent donc les mêmes techniques chirurgicales utilisées pour contrer les condylomes. Une étude récente montre que le cidofovir, utilisé pour le traitement des verrues, aurait aussi des effets anti-métastatiques ciblant les cellules exprimant les protéines oncogéniques des VPH (Amine et al., 2009). Pour certains cas de cancers plus avancés, l'utilisation de méthodes d'excision incluant la conisation qui consiste à l'ablation d'une partie du col et l'hystérectomie, définie comme l'enlèvement complet de l'utérus, sont envisagées. D'autres cas de cancers invasifs vont nécessiter des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie.

1.1.3.2 Traitements en développement

Sachant que les traitements approuvés et offerts sur le marché ne permettent pas une guérison complète d'une infection aux VPH, il est essentiel d'explorer des méthodes alternatives pour diminuer le taux d'échec dans la lutte contre les condylomes et les lésions malignes causés par les papillomavirus. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont en cours de développement et elles ciblent essentiellement les différentes phases de l'infection virale, soit l'attachement et l'entrée du virus, la réplication du génome viral et les oncogènes E6 et E7, ainsi que les protéines cellulaires interagissant avec les composantes virales des VPH (Bharti et al., 2009).

Une première stratégie envisagée est le développement de molécules ciblant les activités communes à tous les VPH comme la réplication virale. Par exemple, des inhibiteurs sont en développement pour tenter d'intervenir au niveau de l'interaction entre

les protéines virales E1 et E2, essentielles à cette activité. Entre autre, les inhibiteurs de la famille des indandiones, créés par Boehringer Ingelheim, ont montré une forte activité à contrer l'interaction entre E1 et E2 en s'associant spécifiquement et de façon réversible aux protéines E2 des VPH6 et -11 (Wang et al., 2004; White et al., 2003). Une autre tactique déployée est l'utilisation de polyamides qui bloquent l'interaction entre les protéines virales E1 et E2 et l'ADN, ce qui empêche l'initiation de la synthèse de l'ADN des VPH (Fisher, 2006).

Une voie intéressante est le développement d'inhibiteurs ciblant l'interaction entre les protéines virales des VPH et les protéines de l'hôte (revue dans (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007)). Des inhibiteurs de la kinase essentielle à la prolifération cellulaire Cdk2, donnent de bons espoirs de traitement. Deux protéines des VPH sont connues pour interagir avec Cdk2, soit E1 et E7, et ces liaisons promeuvent la réplication virale, la prolifération cellulaire et l'instabilité génomique (Duensing and Munger, 2003a; Lin et al., 2000; Ma et al., 1999). D'autres inhibiteurs réduisent la propagation du génome viral en s'associant avec des co-facteurs de transcription cellulaire. Le co-facteur transcriptionnel *Bromodomain-containing 4* (Brd4) est reconnu pour être le partenaire cellulaire majeur de E2 et cette interaction permet une ségrégation du génome viral dans les cellules en division ainsi qu'une activation de la transcription des oncogènes (revue dans (McBride et al., 2004; Wu and Chiang, 2007)). Une équipe a construit un peptide de la région C-terminale de la protéine Brd4 qui empêche l'interaction entre E2 et Brd4 et inhibe la ségrégation du génome viral ainsi que l'activité transcriptionnelle de E2 (Abbate et al., 2006; Schweiger et al., 2006).

L'utilisation des inhibiteurs des histones déacétylases de classe I (HDAC) est devenue une voie intéressante pour lutter contre les cancers car ils induisent la différenciation, l'arrêt de la croissance et l'apoptose chez différentes cellules cancéreuses.

De plus, ces inhibiteurs tels que le sodium butyrate, le phénylbutyrate et la trichostatine A, génèrent une très faible toxicité chez les cellules saines. Les HDAC sont des enzymes qui vont réguler négativement la transcription des gènes en enlevant un groupement acétyl retrouvé sur les acides aminés arginines et lysines localisés au sein de la queue des histones. Ce retrait permet une augmentation de la charge positive des histones et favorise un meilleur contact avec l'ADN chargé négativement, générant ainsi une condensation du matériel génétique. Des études ont montré que les inhibiteurs de HDAC utilisés pour le traitement des cancers du col de l'utérus vont provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S en neutralisant les fonctions des oncogènes E6 et E7. Ce mode d'action fait intervenir l'augmentation de la transcription des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines p21 et p27 tout en supprimant l'activité de cdk2 (Finzer et al., 2001; Finzer et al., 2003). De plus, il semble que les inhibiteurs des HDAC induisent l'apoptose en provoquant la dégradation de pRb sans affecter son partenaire E2F-1 qui s'accumule dans la cellule et peut alors activer la transcription du gène proapoptotique p73 (un homologue de p53) (Finzer et al., 2004). Récemment, une étude a démontré qu'un prétraitement avec des inhibiteurs des HDAC et le TNF- α dans les kératinocytes exprimant l'oncogène E7, va induire l'apoptose par la voie extrinsèque en réprimant la production de c-FLIP une protéine anti-apoptotique (Darvas et al., 2010). D'autres études sont nécessaires afin de mieux cerner le mécanisme d'action des inhibiteurs des HDAC au sein des cancers causés par les VPH mais cette voie thérapeutique reste prometteuse.

Des stratégies thérapeutiques ciblant les oncogènes viraux E6 et E7 des VPH à haut risque ont été mises de l'avant. Entre autre, des molécules antivirales sont utilisées pour inhiber la dégradation du suppresseur de tumeur p53 par la protéine E6 en bloquant l'association entre E6 et l'ubiquitine ligase E6AP qui forment un complexe menant à la destruction de p53 par le protéasome (revue dans (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007)). En bloquant la dégradation de p53, ces molécules thérapeutiques permettent

l'augmentation de la quantité du suppresseur de tumeur dans la cellule infectée ce qui va mener à un arrêt du cycle cellulaire et subséquemment, l'apoptose. D'autres approches vont cibler directement l'expression des oncogènes par des ARN interférents ou des ribozymes. Le principe d'ARN interférent est basé sur la création de petits ARN (ARN interférents) qui vont s'associer spécifiquement à des ARN messagers (ARNm) provoquant la dégradation de ces derniers par le système d'interférence cellulaire. Ainsi, de petits ARN interférents (*small interfering RNA*, siRNA) et des ARN courts en épingle à cheveux (*small or short hairpin RNA*, shRNA) ont été créés afin de s'associer spécifiquement aux ARNm des oncogènes viraux E6 et E7 et de promouvoir la diminution de l'expression des oncogènes (revue dans (Bharti et al., 2009)). La déplétion de E6 et E7 génère une diminution de la croissance cellulaire ainsi qu'une inhibition de la formation de tumeurs dans un modèle murin (Steele et al., 1993; Steele et al., 1992; von Knebel Doeberitz et al., 1992). Par contre, le problème majeur rencontré avec l'utilisation des ARN interférents est qu'ils doivent être injectés localement et en grande quantité dû à leur instabilité. Afin d'améliorer la livraison des ARN interférents au niveau des noyaux des cellules malignes, des particules ressemblant au virus du VPH sont utilisées comme moyen de transport (Kirnbauer et al., 1993; Le Cann et al., 1994). Ces pseudovirions (*virus-like particle*, VLP) sont composés d'une agglomération de la protéine L1 de la capsidie des VPH dans lesquelles les ARN interférents, codés sur des vecteurs d'expression, ont été insérés (Bousarghin et al., 2009). En plus d'augmenter la spécificité de localisation, l'utilisation de pseudo-VPH permet de stimuler une protection immunitaire contre une réinfection par un VPH. Une autre façon élaborée afin de cibler les oncogènes viraux est l'utilisation des ribozymes qui sont des ARN ayant une activité catalytique pouvant cliver les ARNm sans requérir la présence du système d'interférence. De plus, une molécule de ribozyme peut lier et cliver plusieurs molécules d'ARNm permettant de réduire la dose.

Une autre méthode préconisée pour le traitement des lésions bénignes et malignes causées par les VPH est l'utilisation de vaccins thérapeutiques qui ont pour but d'activer les lymphocytes T envers les protéines virales E6 et E7 retrouvées dans les cellules précancéreuses et malignes (Stern et al., 2000). Les essais cliniques qui sont présentement en cours utilisent des peptides des oncogènes E6 et E7 des VPH16 et -18 en présence d'un adjuvant servant à induire une réponse immunitaire innée. Ces protéines sont favorisées dû à leur caractère oncogénique et aussi à leur présence constante au cours de la progression en cancer du col utérin. De plus, ces protéines sont requises pour le maintien du phénotype transformé des cellules infectées (zur Hausen, 2002). Aussi, ces immunogènes sont responsables de la production d'une réponse immunitaire humorale mais surtout cellulaire en activant les lymphocytes T cytotoxiques et T auxiliaires (*helper*) qui sont requis pour permettre une régression des lésions cancéreuses (van der Burg and Melief, 2011). L'administration des vaccins thérapeutiques chez les animaux a démontré des résultats encourageants. Par contre, ces vaccins génèrent une réponse immunitaire de courte durée et demandent des rappels, en plus d'être dispendieux à préparer.

Beaucoup d'espoirs sont fondés sur les dérivés naturels de plantes qui ciblent notamment l'expression des gènes des VPH et induisent l'apoptose des cellules infectées (revue dans (Bharti et al., 2009)). Entre autre, le cumin et les polyphénols du thé vert semblent être des agents anti-oxydants possédant des activités anti-inflammatoires et anti-tumorales (Divya and Pillai, 2006). En 2006, un nouvel onguent à base de catéchines extraites du thé vert ayant des activités immuno-modulatoire, anti-proliférative et anti-tumorale, nommé Polyphenon-E, a été approuvé pour le traitement des verrues génitales (Tatti et al., 2010). Une crème à base de neem, un arbre venant d'Inde, est présentement en phase II d'étude clinique où elle montre une élimination du VPH16 dans 80% des cas (Shukla et al., 2009). Le carraghénane prévient l'entrée virale dans la cellule et a été suggéré comme un microbicide qui promet d'être efficace pour pallier aux infections aux

VPH (Marais, 2010). Par contre, il est important de noter que ces composés naturels ne sont pas spécifiques aux infections induites par les VPH et peuvent donc activer des processus cellulaires indésirables et non-caractérisés. Malgré la disponibilité d'une variété de traitements contre les infections aux VPH, la prévention et la recherche fondamentale sur les VPH sont les fondements pour contrer ce fléau.

1.1.4 La prévention et les vaccins prophylactiques

L'absence de traitement efficace pour guérir une infection au VPH nécessite le maintien d'un programme de dépistage pour les femmes, impliquant des visites régulières chez le gynécologue où un examen visuel est effectué pour déceler la présence de condylomes et aussi pour effectuer un examen cytologique. Ce test, du nom de son créateur Georgios Papanicolaou, le test Pap, détecte la présence de cellules pré-cancéreuses et/ou malignes et doit être effectué couramment afin de prévenir le cancer du col de l'utérus qui représente un problème de santé publique sérieux. Ces examens doivent être maintenus même si les personnes sont devenues monogames ou ne sont plus actives sexuellement dû au potentiel d'activation d'une infection persistante aux VPH contractée antérieurement. Lors de ces rencontres médicales un dépistage de l'ADN de VPH peut être aussi utilisé afin de prévenir le cancer du col de l'utérus, par contre, l'accessibilité et la disponibilité de ces analyses peuvent être limitées surtout dans les pays en voie de développement. Différents moyens de prévention sont proposés afin de réduire les cas d'infection tels que la diminution du nombre de partenaires sexuels ainsi que l'utilisation d'un préservatif. Contrairement aux autres infections transmises sexuellement, le port du condom n'élimine pas le risque d'une infection mais diminue la probabilité d'attraper ou de transmettre le VPH. En effet, seule la zone recouverte par le préservatif sera protégée laissant des régions à découvert pouvant être contaminées ou bien devenir un vecteur de contamination. Ces efforts pour prévenir les infections aux VPH ont été hautement efficaces dans les pays développés mais le manque de ressource dans les pays en développement à empêcher la

diminution des infections. Ceci a poussé la communauté scientifique à aller de l'avant dans l'avancement de nos connaissances sur la biologie de l'infection aux VPH et a permis le développement de vaccins prophylactiques contre ces virus.

Au niveau de la santé publique, l'importance des conséquences des infections génitales par les VPH les plus courants, a entraîné la création de deux vaccins prophylactiques brevetés en 2006 et homologués par Santé Canada. Le vaccin recombinant quadrivalent Gardasil^{MC} de la compagnie Merck Frosst, cible les VPH de types 6, -11, -16 et -18, les VPH retrouvés dans 90% des condylomes (VPH6 et -11) et 70% des cancers du col de l'utérus (VPH16 et -18). Le second vaccin recombinant se nomme Cervarix^{MC} de la compagnie GlaxoSmithKline et il est dirigé contre les types de VPH16 et -18. Dans les deux cas, le but recherché lors de l'injection des vaccins est d'induire la production d'anticorps neutralisant contre les virus afin d'obtenir une protection contre les lésions précancéreuses de grade modéré à élevé et d'acquérir une immunité envers les infections au niveau du col de l'utérus. Gardasil^{MC} et Cervarix^{MC} ont une efficacité de protection de près de 100% contre les types de VPH ciblés en plus d'être sécuritaires (Schiller et al., 2008). L'action maximale de ces vaccins a été observée chez les jeunes femmes et la vaccination doit être effectuée de préférence avant le début de leur vie sexuelle active, car aucun des vaccins n'a démontré une activité thérapeutique sur des infections préexistantes. Au Canada, les vaccins sont administrés aux personnes âgées de 9 à 26 ans et de sexe féminin.

La stratégie de développement des deux vaccins est basée essentiellement sur les VLP (*virus-like particule*) ou pseudovirions des VPH considérés. Comme les VLP ne contiennent ni ADN viral, ni les éléments essentiels à l'établissement de l'infection, ils sont donc non-infectieux et non-oncogéniques. De plus, ils génèrent de très hauts titres d'anticorps neutralisant qui est le principal critère pour la conception d'un vaccin prophylactique efficace. Ces anticorps dirigés contre L1 préviennent l'infection en inhibant

la liaison du virus à la surface d'une cellule de l'hôte réduisant l'entrée virale (Booy et al., 1998). Aussi, la protéine L1 native peut être produite à partir de différents systèmes biologiques tel que les cellules d'insectes (Cervarix^{MC}) ou de levures (Gardasil^{MC}). Les deux vaccins contiennent un adjuvant à base d'alun afin d'augmenter la réaction immunitaire d'un individu et aussi parce que l'alun semble aider à la stabilisation des VLP. Par contre, certaines limitations sont associées à l'utilisation de ces deux vaccins acceptés par Santé Canada. Entre autre, ils n'induisent pas la régression de condylomes préexistant dû au fait que l'expression de la protéine L1 est restreinte à la couche supérieure dans les cellules squameuses stratifiées de l'épithélium tandis que les virus infectieux sont maintenus dans les cellules de la couche basale. Ils ne permettent pas non plus une protection efficace contre d'autres types de VPH, ainsi il est primordial que les femmes continuent à suivre un dépistage du VPH à l'aide d'un test de Pap. Aussi, le coût de la vaccination est très élevé et comme les pays en voie de développement sont les plus touchés par ce fléau, il est difficile de prévenir les infections aux endroits nécessitant.

Une alternative aux vaccins VLP-L1 est l'immunisation contre la protéine mineure de la capsid, L2. Des essais en modèle animal utilisant la protéine L2 du virus du papillome bovin (VPB) générée en bactérie dans le contexte d'une protéine fusionnée à la glutathione-S-transférase (GST), ont montré que l'immunisation menait à une très haute protection contre le virus. De plus, cette protection avait une durée d'au moins 1 an et permettait la production d'anticorps neutralisant ainsi que la génération de cellules mémoires capables de répondre à une autre infection des années après la vaccination (Campo et al., 1993). Les déterminants neutralisant ont été identifiés au niveau d'une région de 30 acides aminés situés dans l'extrémité N-terminale de la protéine L2. Les anticorps générés contre ce peptide étaient aussi capables de reconnaître les équivalents des protéines L2 de différents papillomavirus humains et animaux (Campo et al., 1997). Cette immunisation à large spectre réside dans l'existence d'une forte homologie au sein des

papillomavirus dans cette région en N-terminal de la protéine L2. Habituellement, la protéine L2 ne se retrouve pas à la surface de la capsid, mais lorsque le virus se lie à son récepteur localisé sur la cellule, l'épitope devient exposé à la surface. L'infection requiert le clivage de la partie N-terminale de L2 incluant l'épitope neutralisant ce qui permet la liaison et l'entrée virale dans les kératinocytes (Day et al., 2008a; Day et al., 2008b; Richards et al., 2006). Ainsi, les anticorps reconnaissant ces 30 acides aminés, empêchent ce clivage et bloquent l'entrée virale. Malgré ces résultats encourageants, le niveau d'anticorps produit contre L2 reste faible comparativement à ceux obtenus avec les VLP-L1. Des alternatives sont à l'étude afin de créer des vaccins prophylactiques plus immunogènes et elles englobent l'insertion de l'épitope neutralisant de L2 à la surface des VLP-L1, ou bien la production d'un lipopeptide synthétique de L2 dans lequel le peptide neutralisant de L2 est lié à un épitope reconnu par les lymphocytes T auxiliaires (épitope P25) et un ligand (Pam₂Cys) pour le récepteur 2 des Toll (TLR 2, *Toll-like receptor 2*) (Alphs et al., 2008). Le lipopeptide agit comme adjuvant permettant la génération d'anticorps par les lymphocytes B reconnaissant l'épitope présenté par les cellules dendritiques matures via leur complexe majeur d'histocompatibilité de classe II grâce à la voie TLR2-MyD88 (Alphs et al., 2008).

1.1.5 Les modèles animaux et cellulaires utilisés pour l'étude des papillomavirus

L'étude des papillomavirus a été freinée par le manque de modèle de laboratoire pouvant imiter des épithéliums stratifiés en différenciation nécessaires à la propagation des virus. De plus, le caractère de spécificité d'espèces des papillomavirus a limité grandement les recherches sur ces virus infectant l'Homme. Par contre, les scientifiques ont utilisé des modèles animaux infectés par des papillomavirus qui leur étaient spécifiques afin de mieux comprendre la biologie du virus, sa relation avec l'hôte, d'étudier la réponse immunitaire et

de développer les premiers vaccins anti-VP. Les animaux utilisés sont le lapin infecté par le CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*), les bovins ou les chevaux pouvant être infecté par le VPB (le papillomavirus bovin), le chien et son virus le COPV (*canine oral papillomavirus*) et finalement, la souris africaine *Mastomys coucha* est utilisée pour l'étude des tumeurs de la peau associés aux papillomavirus car elle est naturellement infectée par les papillomavirus *Mastomys natalensis* (MnVP) et *M. coucha* VP2 (MnVP2) (Muller and Gissmann, 1978; Tan et al., 1994). Les scientifiques ont aussi développé des modèles de souris transgéniques pour étudier la carcinogenèse chez l'Homme causée par les VPH. Certains modèles murins exprimant soit les oncogènes E6 et E7 ou bien toute la région des gènes précoces sous la direction d'un promoteur spécifique aux kératinocytes ont été générés (Arbeit et al., 1996).

La faiblesse de certains modèles animaux est qu'ils ne permettent pas l'étude des différents aspects du cycle viral, entre autre, au niveau de l'implication des différentes protéines virales dans l'infection par les papillomavirus. L'apprentissage de ces facettes a pu être fait par l'utilisation du virus du papillome bovin de type 1 qui est devenu le virus prototype pour les analyses moléculaires des papillomavirus. VPB1 est associé au développement de lésions bénignes comme les verrues chez les bovins, de fibropapillomes caractérisés par l'apparition de verrue au niveau des tissus fibreux (tendons et ligaments) chez le chat et de sarcoïdes équinaux chez les chevaux (tumeurs cutanées non métastatiques). VPB1 a été grandement utilisé car son génome a été le premier à être cloné ce qui a permis d'amplifier l'épisome viral en laboratoire. De plus, depuis les années 1960, il est connu que ce virus a la capacité de transformer une variété de cellules de rongeur telle que les cellules de souris C127 et NIH 3T3 cultivées en laboratoire ce qui a permis l'étude des fonctions virales impliquées dans la transformation et l'induction de la prolifération cellulaire (Black et al., 1963). De plus, le génome de VPB1 a la capacité de se répliquer de façon autonome, comme un plasmide, dans ces cellules favorisant ainsi les études de la biologie moléculaire

impliquant les protéines virales et les différentes fonctions qui leur sont associées (Law et al., 1981). Par contre, ce modèle n'est pas permissif à la production de virion et ainsi l'étude des phases tardives des papillomavirus demeure impossible chez le VPB1.

Une des approches pour permettre la propagation des VP utilise des cultures organotypiques obtenues à partir de kératinocytes primaires qui seront transfectés avec le génome d'un VPH. Cette technique exige de faire croître les kératinocytes en présence de cellules nourricières et d'introduire une interface air-liquide. Les cellules forment alors un épithélium complet, organisé et différencié avec l'apparition d'une membrane basale, promouvant la récapitulation du cycle viral mais uniquement dans une minorité de cellules (Asselineau and Prunieras, 1984). Une seconde méthode employée consiste à induire la différenciation des kératinocytes, préalablement transfectés avec le génome d'un VPH, à l'aide d'un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose. Cette différenciation cellulaire va permettre l'amplification de l'épisome viral ainsi que l'expression des gènes tardifs récapitulant le cycle viral des VPH. Ces deux techniques ont permis l'analyse de différents aspects de la biologie des VP et de leur génétique (revue dans (Wilson and Laimins, 2005)).

1.2 Biologie moléculaire des papillomavirus

1.2.1 La structure du virion et l'entrée virale

Les papillomavirus sont de petits virus non-enveloppés d'environ 55 nm, de symétrie icosaédrique, possédant un ADN bicaténaire d'environ 8 kb de forme circulaire communément appelé épisome qui est protégé dans une coque protéique nommée capsid (Baker et al., 1991) (Figure 1.4). La capsid est composée de 72 capsomères pentamériques et chaque capsomère contient cinq monomères totalisant 360 molécules de la protéine majeure de la capsid, la protéine L1. Une seconde protéine, la protéine mineure L2, est aussi retrouvée dans la capsid du virion mais dans des proportions plus modestes de l'ordre de une molécule de L2 pour cinq de L1 (Buck et al., 2008; Finnen et al., 2003). La protéine L1 est responsable de l'attachement initial du virus à la surface de la cellule, tandis que la protéine L2 est nécessaire pour l'empaquetage et l'entrée virale (Holmgren et al., 2005; Roden et al., 1994a; Roden et al., 1994b).

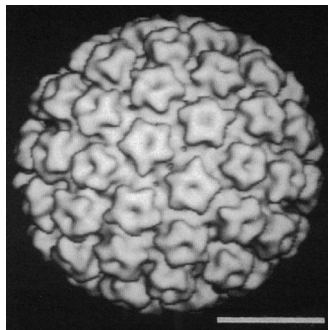


Figure 1.4. Image de la capsid virale des papillomavirus.

Représentation de la capsid virale du virus du papillome bovin obtenue par une reconstruction tridimensionnelle à partir d'images obtenues par cryo-microscopie électronique. Le trait = 20 nm. D'après Baker *et al.*, 1991 (Baker et al., 1991).

L'infection par les VP s'effectue initialement dans les cellules basales de l'épithélium de la peau et des muqueuses. Pour s'y rendre, les virus vont possiblement

emprunter une lésion causée par un traumatisme mineur dans les différentes strates de la peau. L'attachement viral nécessite la liaison d'une protéine de la capsidie du virion à un récepteur situé à la surface de la cellule permettant par la suite l'entrée virale dans cette cellule. Chez les VP, l'identification exacte de ce récepteur pouvant interagir avec la protéine L1 n'a pas encore été faite, mais des évidences suggèrent l'implication d'un second récepteur ou d'un co-récepteur qui serait aussi impliqué dans l'entrée virale.

Le premier candidat a été l'intégrine α -6 identifiée en complexe avec des molécules de VLP-L1 (Evander et al., 1997). Les VLP (*virus-like particles*) sont formés par l'agglomération spontanée de la protéine L1 de la capsidie des virus, créant ainsi une particule virale sans génome et ni déterminant nécessaire à l'établissement de l'infection mais ayant les mêmes caractéristiques morphologiques que les virions des VPH (Hagensee et al., 1993; Kirnbauer et al., 1992). L'intégrine α -6 est une molécule ubiquitaire, exprimée dans une variété de types cellulaires où elle est impliquée dans les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules ainsi que dans les liaisons entre les cellules. Des recherches ont montré que l'intégrine α -6 servait de récepteur pour l'entrée virale pour d'autres virus (Evander et al., 1997). Aussi, des essais ont démontré que l'utilisation d'anticorps spécifiques à l'intégrine α -6, ou bien la présence de son ligand naturel, la laminine-5, bloque l'adhésion des VLP-L1 aux cellules et que la diminution de l'association entre l'intégrine α -6 et les pseudo-virions est proportionnelle à la quantité d'intégrine α -6 (Evander et al., 1997; Yoon et al., 2001). Toutes ces caractéristiques ont placé en premier plan l'intégrine α -6 comme étant le récepteur principal pour l'entrée des VP dans les cellules basales de l'épithélium. Par contre, des études ont illustré que certains types de VP pouvaient tout de même infecter des cellules ne possédant pas l'intégrine α -6 délogeant cette molécule du statut de récepteur d'entrée virale des VP (Sibbet et al., 2000).

Un autre candidat faisant office de récepteur cellulaire pour l'entrée des VP, est l'héparane-sulfate protéoglycane (HSPG) de la famille des glycosaminoglycanes, retrouvé à la surface cellulaire (Joyce et al., 1999). Ces protéines sont impliquées dans une variété de phénomènes biologiques tels que l'angiogenèse, la cicatrisation, l'action des facteurs de croissance et des cytokines et dans l'adhésion cellulaire. De plus, l'héparane-sulfate sert aussi de récepteur d'entrée pour plusieurs virus mais, pour la plupart, ils sont dépendants de la présence d'un second récepteur pour permettre une internalisation efficace (Knappe et al., 2007). L'implication de l'héparane-sulfate dans le rôle de récepteur des VP a été démontrée par le clivage de cette molécule de la surface des kératinocytes ce qui réduisait de 80 à 90% la liaison des VLP-L1 (Combita et al., 2001; Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999). Une étude récente a démontré *in vivo* que l'infection par le VPH31 était dépendante de l'héparane-sulfate. Par contre, une analyse antérieure montrait exactement le contraire *in vitro* (Johnson et al., 2009; Patterson et al., 2005). Tout récemment, une analyse a montré, à l'aide d'un modèle murin, que le virion s'attache initialement à la membrane basale plutôt qu'aux cellules basales. Cette interaction permettrait des changements conformationnels de la capsid nécessaires à sa translocation sur les cellules basales. Cette première liaison entre le virus et la membrane basale serait véhiculée par le récepteur HSPG (Kines et al., 2009). Face à toutes ces controverses, il est maintenant suggéré que les infections par les VP sont initiées par plus d'une seule molécule et qu'un ou des récepteurs secondaires sont nécessaires à l'entrée cellulaire.

Il ne faudrait pas passer sous silence l'implication de la protéine L2 dans l'établissement de l'infection par les VP. La protéine L2 de tous les VP contient au niveau de son extrémité N-terminale un motif de clivage par la convertase furine. Ce clivage semble être nécessaire à l'attachement et à l'entrée virale dans une cellule. Deux modèles sont proposés pour expliquer le rôle de L2 dans l'infection. Le premier mécanisme consiste en un attachement initial de L1 au récepteur héparane-sulfate provoquant un changement de

conformation de la capside ce qui exposerait la partie N-terminale de la protéine L2 qui serait ensuite clivée par la furine. Cette coupure génèrerait aussi une modification de la capside permettant l'interaction avec un second récepteur et l'internalisation du virion (Day et al., 2008b). D'autres études suggèrent que le clivage par la furine pourrait survenir à la surface de la cellule ou dans les compartiments endosomaux permettant au génome viral de s'associer à la partie C-terminale de L2 et de s'échapper de l'endosome (Kamper et al., 2006). Cette diversité retrouvée dans l'attachement et l'entrée des papillomavirus dans une cellule, suggère que ces virus ont évolué en dissimulant l'accessibilité des régions essentielles pouvant être reconnues par le système immunitaire, et éviter de se faire remarquer à initier une infection cellulaire.

Suite à l'attachement du virion à la membrane plasmique de la cellule, les différents types de papillomavirus vont entrer dans la cellule selon des mécanismes distincts, soit par endocytose dépendante de la clathrine ou de la cavéoline. La voie d'internalisation dépendante de la clathrine utilisée par VPB, nécessite la liaison d'un ligand, tel que la protéine L1 des VP, à un récepteur cellulaire (par exemple l' $\alpha 6$ -intégrine ou l'héparane-sulfate). Ce complexe est enrobé de clathrine au niveau de la membrane plasmique et s'invagine pour former une vésicule tapissée de clathrine qui est par la suite injectée dans le cytoplasme cellulaire. Ces vésicules contenant des virions vont transiter dans les endosomes précoces et tardifs pour finalement aboutir dans les lysosomes où une dégradation complète de la vésicule sera effectuée pendant que les virus s'évadent. Lors de ces passages entre ces compartiments, les virus subiront une diminution de pH qui modifiera la conformation des virions. Des essais ont démontré que les VPH de types 16 et 58 ainsi que le papillomavirus bovin, utilisent cette voie de transport dans laquelle l'altération de la structure du virus permet au génome viral ou bien, au complexe génome/protéine L2 de s'évader de l'endosome (Bousarghin et al., 2003; Day et al., 2003). Pour sa part, il semblerait que l'endocytose via les puits de cavéoline soit favorisée par le

VPH31 (Bousarghin et al., 2003; Hindmarsh and Laimins, 2007). Ce moyen de transport est moins populaire et est utilisé par des virus non-enveloppés d'une taille inférieure à 55 nm, des caractéristiques auxquels répondent les VP. Comparativement à la formation des puits de clathrine, les vésicules de cavéolines se forment beaucoup plus lentement. Aussi, cette voie favorise le passage dans les cavéosomes plutôt que les endosomes évitant l'acidification des vésicules et vont directement vers le Golgi et le réticulum endoplasmique (Figure 1.5).

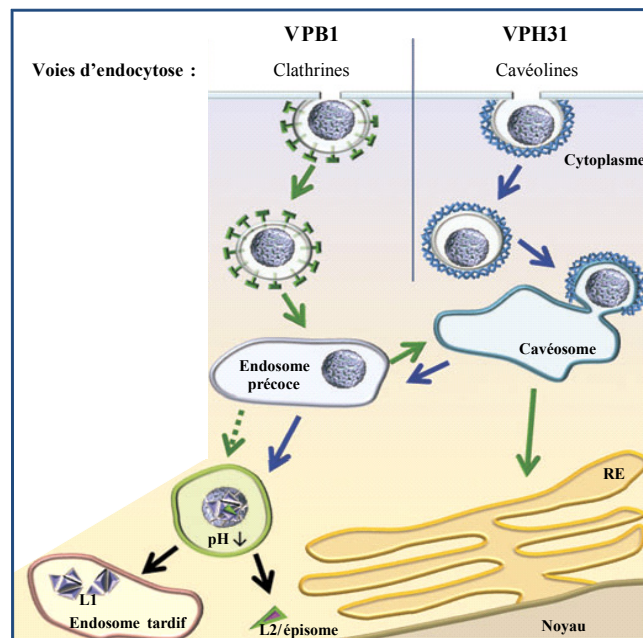


Figure 1.5. Représentation des voies d'entrée virales par endocytose.

La voie d'entrée dépendante des puits de clathrine utilisée par VPB1 permet le transport des virions vers les endosomes précoces et tardifs dans lesquels la capsid subit des modifications permettant l'évasion du complexe L2/épisode de ces compartiments. La voie dépendante des puits de cavéolines favorisée par VPH31 utilise le passage par les cavéosomes avant d'atteindre le réticulum endoplasmique. Adaptée de Sapp and Bienkowska-Haba, 2009 (Sapp and Bienkowska-Haba, 2009).

1.2.2 L'organisation génomique des papillomavirus

Les papillomavirus contiennent un ADN circulaire pouvant être divisé en trois régions majeures soit les régions précoces et tardives codant pour les protéines virales, et une séquence de régulation nommée LCR (*long control region*). Le génome viral code pour environ 8 à 10 cadres de lecture ouverts ou ORF (*open reading frame*) selon le type de papillomavirus et sont exprimés à partir d'ARNm polycistroniques transcrits d'un seul brin d'ADN. Ces ORF sont classés selon leur localisation par rapport au LCR comme précoces ou tardifs. La région précoce occupe environ 50% du génome viral et code pour des protéines nécessaires au cycle viral, dont six sont communes à tous les VP (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) (Figure 1.6). L'expression de ces protéines non-structurales se produit tout au long de la différenciation des kératinocytes mais à des quantités variables selon l'état de différenciation cellulaire.

Les protéines E1 et E2 sont impliquées dans la réplication du génome viral. La protéine E2 régule également la transcription des gènes précoces. La protéine E4 est exprimée tout au long de l'infection et est associée à l'affaissement des filaments de cytokératines et à l'amplification de l'épisome (Peh et al., 2002). Les protéines E6 et E7 sont les oncogènes des papillomavirus ainsi que la protéine E5 du VPB, et leur expression induit l'immortalisation et la transformation cellulaire. Spécifiquement, les protéines E6 et E7 des VPH à risque élevé, vont inactiver respectivement p53 et pRb, deux suppresseurs de tumeur cellulaire. Deux autres ORF, E3 et E8, ont été assignés à la région précoce mais seul le cadre de lecture codant pour E8 chez le papillomavirus de lapin (CRPV) ou en fusion avec le C-terminal de E2 (E8^{E2C}) chez VPB1 et le VPH de type 31 produit une protéine. Chez CRPV, la protéine E8 a été caractérisée d'oncogène (Harry and Wettstein, 1996). La version E8^{E2C} retrouvée sert de régulateur négatif à la transcription virale et a été détectée chez VPB1, VPH11, -16, -31 et 33 (Lambert et al., 1987; Stubenrauch et al., 2000; Stubenrauch et al., 2001). Pour leur part, les protéines L1 et L2 de la région tardive

occupent 40% du génome viral. Elles sont les composantes structurales de la capside du virion et leur expression est observée dans les kératinocytes différenciés de l'épithélium où l'assemblage des virions s'effectue.

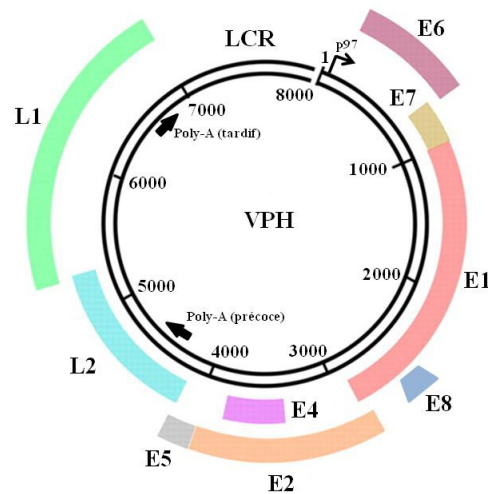


Figure 1.6. Représentation de la carte génomique des papillomavirus.

Les principaux cadres de lecture codant pour les protéines précoces (E) et tardives (L) ainsi que la région de contrôle (LCR) du virion sont localisés autour du génome circulaire. Le promoteur principal des gènes précoces ainsi que les sites de polyadénylation sont aussi représentés. Les nombres à l'intérieur du génome indiquent les positions en nucléotide sur l'ADN. Adaptée de Riemer *et al.*, 2010 (Riemer et al., 2010).

La région régulatrice, le LCR, est d'une longueur approximative de 1 kb, ne contient aucun cadre de lecture mais renferme l'origine de réplication ainsi que les éléments de contrôle de la transcription virale et de la ségrégation de l'épisome (Figure 1.7).

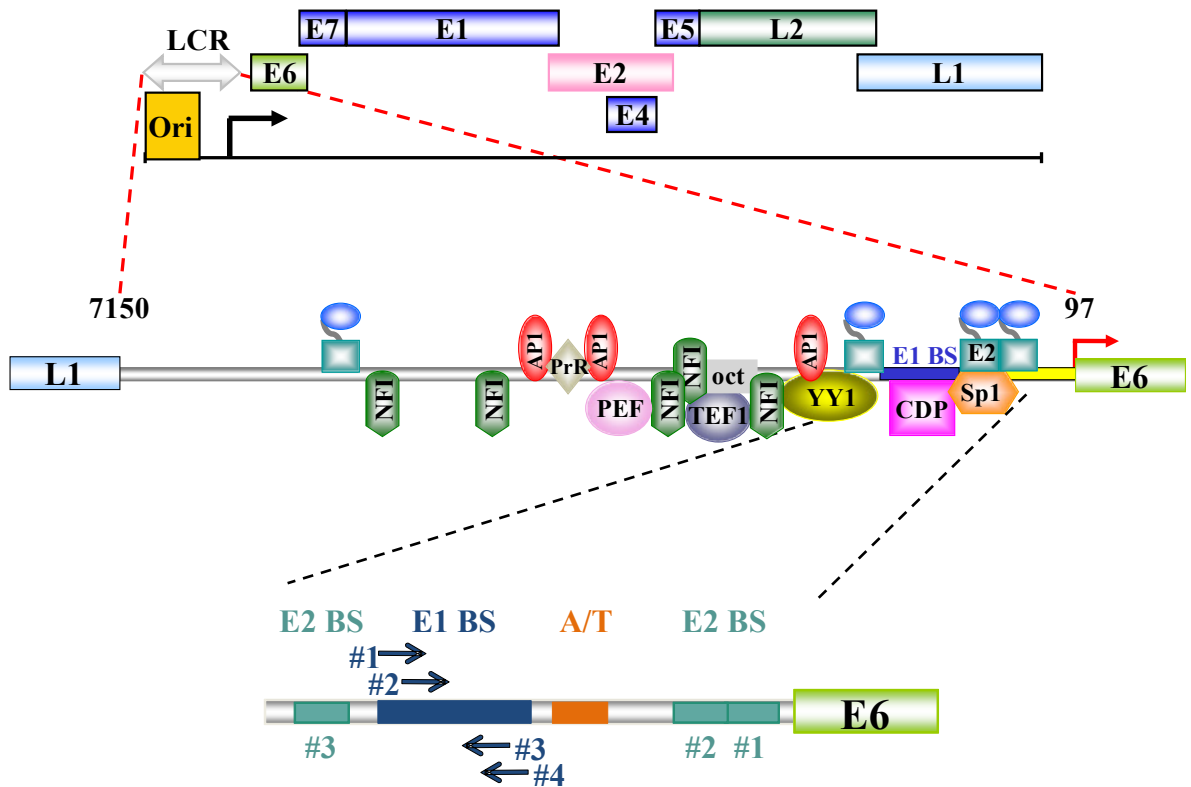


Figure 1.7. Représentation de la région de contrôle (LCR) des papillomavirus.

D'une longueur d'environ 1 kb, le LCR possède l'origine de réplication où se lient les protéines virales E1 et E2, en plus de plusieurs sites de liaison pour des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de la transcription. Ces protéines peuvent affecter la régulation de l'expression des gènes viraux précoces. L'origine de réplication des papillomavirus situé en 3' du LCR comprend quatre sites de liaison à l'hélicase virale E1 (E1 BS #1 à #4, en bleu), une région riche en A/T ainsi que 3 sites de liaison au facteur de transcription du virus, la protéine E2 (E2 BS #1 à 3, en vert).

L'origine de réplication située près du promoteur précoce majeur, contient une région de liaison à l'hélicase E1 composée de paires de séquences répétées inversées permettant la formation d'un double hexamère de E1 sur l'ADN, une section riche en adénine et en thymine (AT) ainsi que trois sites de liaison pour la protéine E2 (Chen and Stenlund, 2001; Frattini and Laimins, 1994). Un quatrième site de liaison par E2 est aussi

retrouvé dans le LCR en aval du gène L1. La transcription des gènes précoces est régulée par la liaison de facteurs viraux et cellulaires à des séquences retrouvées dans le LCR, spécifiques aux kératinocytes (Sen et al., 2002). Une diversité de facteurs activateurs et répresseurs peuvent s'associer à des séquences du LCR chez les différents types de papillomavirus mais tous les génomes des VP, sans exception, contiennent des sites de liaison aux protéines Ap-1, Sp-1 et TFIID. Il est aussi à noter que différentes protéines régulatrices de la transcription vont lier le LCR selon le stade du cycle viral et de différenciation des kératinocytes, permettant un contrôle précis de la transcription des gènes précoces. L'expression des gènes précoces chez les VPH à haut risque se fait par l'intermédiaire de deux promoteurs majeurs et une série de promoteurs mineurs. Le promoteur précoce majeur, p97, p99 et p105 chez le VPH de type 31, 16 et 18 respectivement, est constitutivement actif dans les cellules basales non-différenciées de l'épithélium (Hummel et al., 1992; Rohlfs et al., 1991). Ce promoteur est responsable de la transcription des gènes viraux précoces E6, E7, E1, E2, E5 et E4 et est régulé par des éléments contenus dans le LCR. La plupart des transcrits précoces se terminent à une séquence de poly-adénylation (pA) précoce (pA_E) située en aval du gène E5. En plus, des séquences inhibitrices retrouvées dans les gènes L1 et L2, empêchent l'extension de ces transcrits dans les cellules non-différenciées. Cette inhibition est, toutefois, levée lors de la différenciation cellulaire (Collier et al., 2002; Oberg et al., 2003). Le deuxième promoteur viral est dit tardif et est activé suite à la différenciation des kératinocytes. Ce promoteur tardif, p742, p670, p814 pour les VPH de type 31, -16 et -18 respectivement, dirige deux ensembles de transcrits. L'un se terminant au site précoce de poly-adénylation et inclut les transcrits de E1[^]E4, E5 E1 et E2. Le deuxième continuant jusqu'au site de poly-adénylation tardif (pA_L) situé en aval du gène L1 et regroupe les transcrits codant pour la capsid du virion soit L1 et L2. La régulation des transcrits tardifs, amorcée lors de la différenciation des kératinocytes, s'effectue à l'aide de facteurs de transcription de la cellule. Les protéines CDP (*CCAAT displacement protein*) et YY1 (*Yin Yang 1 protein*) s'associent à la région environnante du promoteur p670 du génome du VPH16 (nucléotides 531 à 780) et

suppriment la transcription basale obtenue à partir de ce promoteur (Ai et al., 2000; Ai et al., 1999; Sato et al., 2007). D'autres parts, des chercheurs ont analysé le rôle de certains facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des kératinocytes et l'activation du promoteur tardif des VPH. Ainsi, des études ont démontré que le facteur de transcription de la famille POU, hSkn-1a, qui induit la différenciation des kératinocytes, active la transcription à partir du promoteur p670 en déplaçant le répresseur YY1 et en s'associant à ses sites en amont du promoteur tardif (Kukimoto and Kanda, 2001; Kukimoto et al., 2006). De même, le facteur de transcription C/EBP β (*CCAAT/enhancer binding protein*) qui induit la différenciation terminale des kératinocytes, reconnaît et lie deux sites aussi situés en amont du promoteur tardif du VPH16, augmentant alors la transcription à partir de ce promoteur dans les cellules HeLa et HFK (*primary human foreskin keratinocytes*) (Kukimoto et al., 2006). Finalement, le changement de la configuration de la chromatine et aussi l'accroissement du nombre d'épisomes semblent être des facteurs d'importances dans l'augmentation de la quantité totale des transcrits tardifs (del Mar Pena and Laimins, 2001).

Les transcrits des papillomavirus, obtenus à partir des mêmes sites de départ et de polyadénylation, vont encodés plusieurs gènes viraux. De plus, certains transcrits vont subir de l'épissage alternatif permettant l'expression de certains gènes (Figure 1.8). Plus de 20 et de 10 ARNm différents ont été identifiés dans les cellules infectées par le VPB1 et VPH31 respectivement, et ces derniers, sont retrouvés en faibles quantité permettant de croire que d'autres espèces d'ARNm existent. La régulation de la transcription des papillomavirus par des mécanismes de contrôle tel que l'épissage alternatif ainsi que l'expression des gènes précoces et tardifs selon le stade de différenciation cellulaire, expliquent la petite taille du génome des papillomavirus tout en exprimant plusieurs protéines virales.

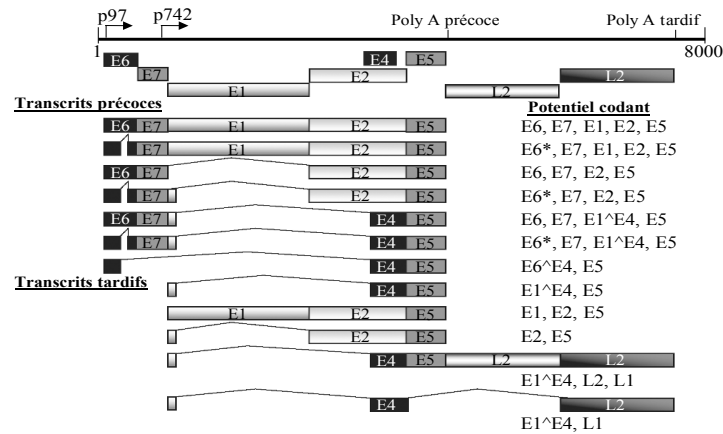


Figure 1.8. Exemple des transcrits précoces et tardifs ayant un potentiel codant.

Représentation du génome linéaire du VPH31 sur lequel les protéines virales, les promoteurs précoce (p97) et tardif (p742) ainsi que les sites précoce et tardif de polyadénylation sont illustrés. Les sites d'épissage sont caractérisés par des lignes joignant les cadres de lecture des différentes protéines (rectangles). Les protéines potentielles de chaque transcrit sont indiquées à la droite de la figure. Adaptés de Lee and Laimins, *The Papillomavirus*, Chapitre 4, (2007).

1.2.3 Le cycle viral

Les cellules non-infectées de l'épiderme vont se différencier tout en migrant vers les strates supérieures afin d'atteindre la surface de l'épithélium. Ce déplacement est occasionné par la division des cellules de la couche basale qui sont les seules cellules de l'épiderme ayant une activité mitotique. Ces divisions vont permettre à une des cellules filles de rester au niveau de la couche basale et à l'autre, de se déplacer vers la surface et prendre place dans les strates supérieures. Au cours de cette migration, les cellules se différencient et amorcent un changement de leur profil d'expression protéique où notamment, l'expression de kératines est augmentée. À la couche granuleuse, les cellules renfermeront des grains de kératohyaline qui sont associés à la destruction des organelles provoquant la perte du noyau. La différenciation terminale des kératinocytes est définie par la génération de cellules squameuses remplies de filaments très résistants de kératine au

niveau de la couche la plus superficielle, la cornée. La cornée est composée de kératinocytes morts et une fois rendue à la surface, ces cellules rentrent dans le processus de desquamation, c'est-à-dire, des agglomérats de cellules, les squames, décollent et tombent (Sherwood, 1997).

Le cycle viral des papillomavirus est intimement lié à la différenciation cellulaire de l'épithélium de l'hôte. Une lésion amorce le cycle viral permettant l'entrée du virus dans les cellules basales de la couche squameuse de l'épithélium. La capsid virale va préalablement s'associer à la membrane basale et suite à des changements de conformation, le virion sera transféré et attaché aux cellules basales (Kines et al., 2009). La différenciation des kératinocytes génère un changement d'expression protéique que le virus va exploiter pour réguler l'expression et la réplication de ses protéines. De plus, la présence des facteurs cellulaires de la phase S sont requis afin de maintenir l'activité mitotique dans les cellules infectées. Ces dernières conserveront leur capacité à se diviser tout au long de la différenciation permettant du même fait, la réplication de l'ADN du virus (revue dans (Kadaja et al., 2009)) (Figure 1.9).

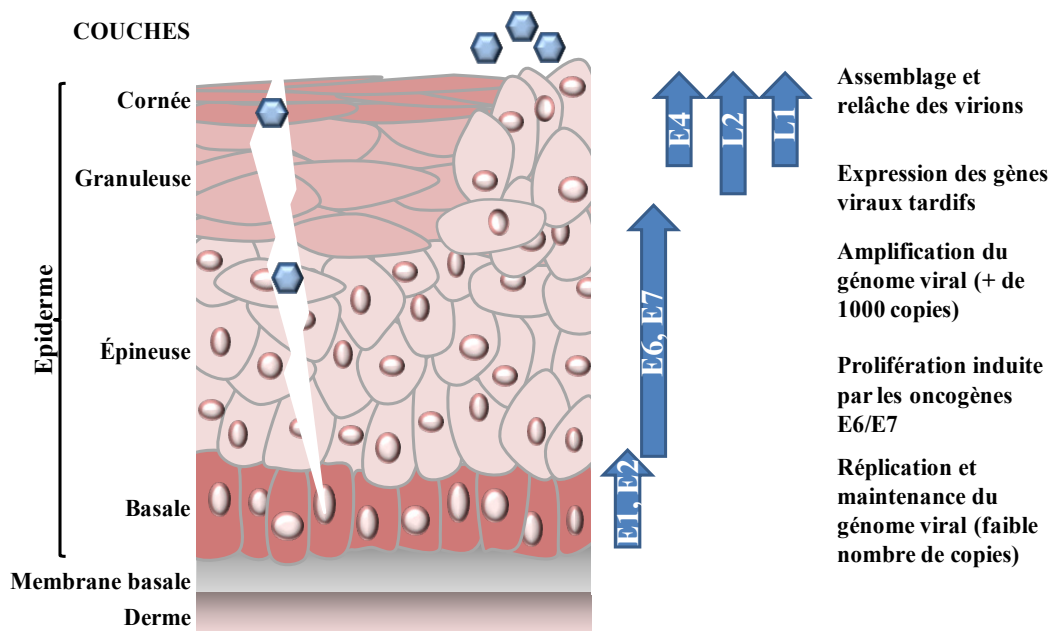


Figure 1.9. Cycle viral des papillomavirus.

Suite à un microtraumatisme, le virus va infecter les cellules basales capables de se diviser. À ce niveau la réplication et le maintien du génome viral est observé grâce à l'action de certaines protéines virales telles E1 et E2. Au fur et à mesure que la différenciation cellulaire progresse, l'expression des oncogènes E6 et E7 est notée ainsi que la production des protéines tardives nécessaires à l'assemblage et l'encapsidation des virions. (Adaptée de Lehoux *et al.*, 2009, (Lehoux *et al.*, 2009)).

Suite à l'entrée virale, le génome circulaire des papillomavirus va se répliquer à raison d'environ 100 copies par cellule dans le noyau en utilisant la machinerie de réplication de l'hôte ainsi que les facteurs viraux E1 et E2. Ce maintien de l'épisome viral est l'étape essentielle à la phase d'établissement de l'infection et les protéines précoces E6, E7, E1 et E2 sont nécessaires à cette activité (Park and Androphy, 2002; Stubenrauch *et al.*, 1998b; Thomas *et al.*, 1999). Les protéines E1 et E2 coopèrent pour initier la réplication de l'ADN viral tandis que les oncogènes E6 et E7 modulent les régulateurs du cycle cellulaire, entre autre en phase S, afin de conserver un maintien à long terme de la réplication cellulaire (Frattini and Laimins, 1994; Sedman and Stenlund, 1995). À ce stade, ces

protéines virales sont faiblement exprimées dans les cellules non-différenciées possiblement dans le but d'échapper à la surveillance du système immunitaire et de contribuer à la persistance du génome dans les cellules infectées.

L'ADN viral va être répliqué de façon coordonnée avec la synthèse des chromosomes cellulaires au cours de la phase S où il pourra utiliser les facteurs cellulaires requis pour la répllication de son ADN. Les épisomes nouvellement produits seront répartis dans les cellules sœurs grâce à l'interaction de la protéine E2 qui s'associe d'une part avec le génome viral et d'autre part, avec certains facteurs cellulaires liant les chromosomes mitotiques tel que Brd4 chez VBP1 et ChlR1 (*chromosome loss-related protein 1*) (Parish et al., 2006a; You et al., 2004). Cette fonction de ségrégation de l'épisome par la protéine E2 contribue au maintien du génome viral dans le noyau et à la coordination du partitionnement dans les cellules filles lors de la mitose. Un autre pré-requis à la persistance virale dans les cellules infectées est de conserver un niveau stable du nombre de copies du génome viral par cellule. La protéine E2 est probablement le régulateur majeur pour cette fonction car elle peut activer ou inhiber le promoteur viral précoce nécessaire à la production des transcrits d'ARNm des protéines E6, E7, E1 et E2 elle-même (Steger and Corbach, 1997).

Lorsque les cellules infectées par les papillomavirus quittent la couche basale et entament les étapes de différenciation, la production des protéines virales s'accroît. Cette augmentation protéique localisée dans les cellules différenciées permet de retarder l'exposition des antigènes viraux à la surveillance par le système immunitaire (Frazer, 2009). Par contre, parce que les cellules différenciées sortent du cycle cellulaire et arrêtent leur division cellulaire, les virus se heurtent à l'inhibition de l'expression de la machinerie de répllication de l'ADN de l'hôte et ne peuvent plus du même fait, répliquer leur génome. Afin de pallier à ce problème, les papillomavirus forcent les cellules différenciées à rester

actives dans le cycle cellulaire. Ce maintien de la réplication se fait grâce à la protéine virale E7 qui inactive les protéines membres de la famille pRb (Munger et al., 2004) et contrôle la transition des phases de croissance et de synthèse (G1-S) du cycle cellulaire en régulant l'activité des facteurs de transcription E2F. En s'associant avec pRb et en dégradant cette dernière, E7 lève la répression du complexe pRb-E2F ce qui résulte en une expression constitutive des gènes régulés par E2F impliqués dans l'entrée de la phase S et l'induction de la synthèse de l'ADN. L'oncogène E6 des VPH à haut risque oncogénique va pour sa part s'associer et induire la dégradation du suppresseur de tumeur p53, limitant sa capacité à stopper le cycle cellulaire et à induire l'apoptose.

La différenciation cellulaire amène une nouvelle phase du cycle viral qui est l'activation du promoteur viral tardif dans les couches supérieures de l'épithélium. Ce promoteur est responsable de l'induction à haut niveau de l'expression des protéines virales telles que E1, E2, E3, E4 et E5. De plus, le nombre d'épisomes passe de 50-200 copies/cellule à plusieurs milliers. Suite à cette amplification génomique, les protéines tardives de la capsid, L1 et L2, sont produites et les virions, assemblés. Dû à leur fort potentiel immunogénique, un contrôle strict de l'expression de L1 et L2 est mis en place tel que la régulation de l'utilisation des sites d'épissage dépendant de la différenciation cellulaire, le changement de l'utilisation des signaux de poly-adénylation précoces à tardifs, la régulation de la stabilité des ARNm et l'utilisation des codons rares. Les virions assemblés seront finalement répandus dans l'environnement avec les cellules desquamantes de la peau en absence de lyse ou de nécrose cellulaire, contribuant à la persistance du virus tout en évitant l'inflammation. Il est à noter que la muqueuse devient alors très contagieuse et le risque de transmission est important. Malgré tous les systèmes mis en place par les papillomavirus dans une cellule infectée, la plupart des infections sont contrôlées par des mécanismes immunitaires qui ne sont pas encore parfaitement connus. Par contre, pour certains cas, l'infection virale va entraîner l'établissement d'un cancer.

L'évènement terminal d'intégration du génome viral dans celui de l'hôte est souvent observé et associé aux papillomavirus à haut risque oncogénique. L'intégration de l'épisome n'est pas une étape normale du cycle viral en ne permettant plus la multiplication virale par contre, c'est une prémisse à la carcinogenèse. L'intégration du génome viral nécessite préalablement la linéarisation de ce dernier. Cette linéarisation peut s'effectuer n'importe où dans le génome des VPH par contre, lorsque l'intégration rompt les cadres de lecture de E1 et E2, cela confère un avantage prolifératif à la cellule. En effet, l'interruption de l'expression de la protéine régulatrice de la transcription E2 qui habituellement réprime la production de E6 et E7, va permettre la production active des oncogènes. L'expression constitutive de E6 et E7 est à l'origine de l'immortalisation et la transformation des cellules infectées menant au développement de cancers. La capacité de transformation des VPH est à la base de la classification des virus à faible ou à haut risque oncogénique où certains types de VPH sont plus fréquemment observés dans le passage d'une cellule normale à une cellule cancéreuse. Ce changement va être le résultat de la capacité des VPH à interférer avec la prolifération cellulaire et la stabilité du génome de l'hôte. Ainsi les évidences du pouvoir transformant des VPH vont inclure entre autre l'activation des oncogènes, des signaux de croissance et de l'angiogenèse, l'inhibition des signaux anti-prolifératifs et de l'apoptose et une prolifération cellulaire illimitée (immortalisation).

1.2.4 Les protéines virales

Le génome circulaire des papillomavirus code pour environ 8 à 10 cadres de lecture majeurs permettant l'expression de deux groupes de protéines: les protéines dites précoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8), et les protéines tardives (L1 et L2). Toutes les protéines virales ont un rôle à jouer dans les différentes étapes du cycle viral et certaines sont primordiales dans le processus de carcinogenèse.

1.2.4.1 Les protéines précoces

La protéine E1

Le cadre de lecture le plus conservé chez les papillomavirus est celui codant pour la protéine E1. Cette dernière possède un poids moléculaire se situant entre 67,5 et 76,2 kDa selon le type de VP, et est faiblement exprimée dans les cellules infectées (Deng et al., 2003). La protéine E1 est la seule protéine virale à posséder des fonctions enzymatiques: elle possède une fonction d'hydrolyse d'ATP et 3'-5' hélicase d'ADN (Bream et al., 1993; Enemark and Joshua-Tor, 2006; Seo et al., 1993; Yang et al., 1993). Cette protéine, composée de trois domaines, est requise pour l'initiation et l'élongation de la synthèse d'ADN (Figure 1.10) (Liu et al., 1995).

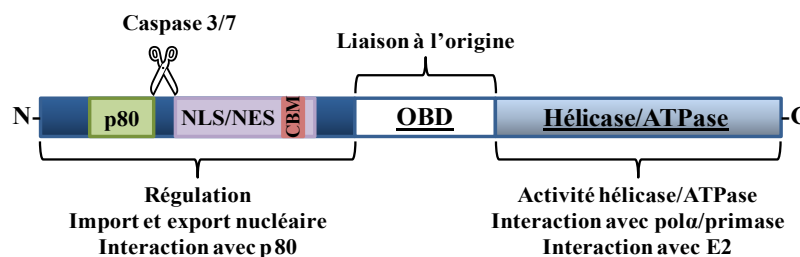


Figure 1.10. Représentation schématique de l'hélicase E1 des papillomavirus.

La protéine E1 des papillomavirus possède trois domaines. Le domaine N-terminal possède plusieurs signaux de régulation dont ceux d'import et d'export nucléaire. Le domaine central est celui liant l'origine de

réplication et le domaine C-terminal regroupe les activités hélicase et ATPase en plus d'interagir avec le facteur de transcription viral, la protéine E2.

Le domaine C-terminal seul de la protéine E1 possède les activités ATPase/hélicase et est suffisant pour l'oligomérisation de la protéine *in vitro* mais est incapable de supporter la réplication (Amin et al., 2000; Hughes and Romanos, 1993; Titolo et al., 2000; White et al., 2001). Pour permettre la réplication, le domaine central de E1 (OBD) va reconnaître et s'associer à l'origine de réplication des VP. Cette origine comprend entre autre, une région de 18 nucléotides formant quatre sites de liaison spécifiques à E1 ayant le consensus ATTGTT. De plus, une séquence riche en AT située près de ces sites sera liée par la partie C-terminale de E1, facilitant l'initiation du déroulement de l'ADN (Frattini and Laimins, 1994; Titolo et al., 2003; Titolo et al., 2000). Un monomère de la protéine E1 lie l'ADN double brin avec une certaine spécificité mais de faible affinité pour ces sites de liaison ayant pour résultat que l'hélicase E1 est incapable de se lier à l'origine en présence de séquences compétitrices (Dixon et al., 2000). En effet, le domaine de liaison à l'ADN de E1 lie spécifiquement l'ADN, son domaine C-terminal a pour sa part, une faible spécificité pour l'origine (Titolo et al., 2003; Wilson et al., 2002). L'interaction entre le C-terminal de E1 et le N-terminal de la protéine E2 devient primordiale et facilite le recrutement de E1 à l'origine de réplication en lui conférant une haute affinité et spécificité pour l'origine, tout en inhibant la liaison non-spécifique du C-terminal de E1 à l'ADN (Bonne-Andrea et al., 1997; Sedman and Stenlund, 1995; Stenlund, 2003). Ce recrutement de E1 par E2 est possible par la capacité de E2 de reconnaître des sites qui lui sont spécifiques au niveau de l'origine de réplication. Cette interaction entre E1-E2 et l'origine permet l'association d'un monomère de E1 qui génère un assemblage séquentiel d'un dimère, d'un double trimère et finalement d'un double hexamère, actif capable de dérouler l'ADN en avant de la fourche de réplication (Schuck and Stenlund, 2005). Cette structure en forme d'anneau assure le passage de l'ADN monocaténaire au centre de l'hexamère de E1 qui catalyse le déroulement de l'ADN (Figure 1.11).

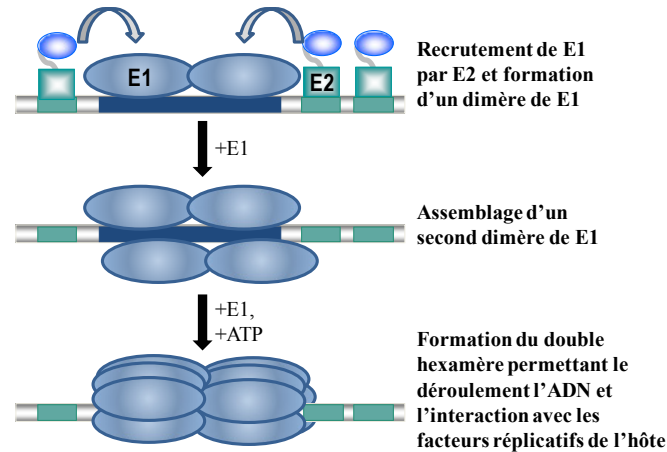


Figure 1.11. Représentation de l'initiation de la réplication chez les papillomavirus.

La protéine E2 va recruter l'hélicase E1 au niveau de l'origine de réplication générant l'oligomérisation de E1 jusqu'à la création d'un double hexamère actif capable de dérouler l'ADN. La réplication du génome viral va être possible par l'interaction de E1 avec entre autre la polymérase α /primase.

Des protéines cellulaires telles que, Hsp40, Hsp70, l'histone H1 ainsi que la topoisomérase I viennent faciliter l'activité hélicase de E1. La protéine de réplication A (RPA), pour sa part, va s'associer et maintenir la forme simple brin d'ADN. De plus, ces protéines vont recruter d'autres éléments de la machinerie de réplication de l'ADN cellulaire nécessaires à la réplication du génome viral ou bien au déplacement des nucléosomes de l'ADN (Clower et al., 2006a; Liu et al., 1998; Loo and Melendy, 2004; Swindle and Engler, 1998). Des complexes de remodelage de la chromatine comme Ini1/hSNF5, une composante du complexe SWI/SNF, sont aussi recrutés par E1 afin de réguler le positionnement des nucléosomes et permettre la progression de la fourche de réplication (Lee et al., 1999). De plus, l'hélicase E1 interagit avec l'ADN polymérase alpha/primase et la recrute sur l'ADN simple brin pour initier la synthèse du génome viral (Conger et al., 1999; Park et al., 1994).

Le domaine N-terminal de la protéine E1 est la région la plus variable au sein des VP. Ce domaine contient plusieurs séquences régulatrices dont des signaux d'import (*nuclear localization signal*, NLS) et d'export nucléaire (*nuclear exportation signal*, NES) (Deng et al., 2004; Fradet-Turcotte et al., 2010a). De plus, le domaine N-terminal renferme un motif RxL permettant la liaison des cyclines A/E-Cdk2 (*cyclin-binding motif*, CBM) ainsi que deux (VPH31) ou trois (VPH11) sites de phosphorylation ciblés par ces complexes cyclines/Cdk (Deng et al., 2004; Ma et al., 1999). Aussi, cette région de E1 est le site d'interaction entre E1 des VPH anogénitaux et la protéine cellulaire p80. Cette association s'est révélée très importante pour le maintien du génome viral à long terme dans les cellules infectées, par contre, la fonction exacte de l'interaction E1-p80 reste à être élucidée (Cote-Martin et al., 2008).

La protéine E1 subi certaines modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la sumoylation. Comme il a été mentionné, la région N-terminale de E1 contient un motif de liaison aux cyclines A/E ainsi que des sites de phosphorylation par Cdk2 (Fradet-Turcotte et al., 2010a; Ma et al., 1999). Ces séquences vont permettre une régulation du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine E1. En effet, les cyclines A/E/Cdk2 peuvent s'associer et phosphoryler E1 par l'entremise du motif de liaison par les cyclines et ainsi séquestrer E1 au noyau afin de promouvoir la réplication. Par contre, des mutations au niveau des sites de phosphorylation par Cdk2 vont favoriser l'export nucléaire de E1 (Fradet-Turcotte et al., 2010a). Cette redistribution vers le cytoplasme semble être requise pour le maintien à long terme du génome tandis qu'une accumulation de la protéine dans le noyau empêche la progression du cycle cellulaire (Fradet-Turcotte et al., 2010a). La sumoylation est une modification post-traductionnelle ayant divers rôles dans la régulation de la localisation cellulaire, la réplication et la transcription du matériel génétique ainsi que dans la progression du cycle cellulaire. Cette modification a été aperçue chez la protéine E1

du VPB ainsi que les VPH de types 1 et 18. Pour l'hélicase du virus bovin, il a été proposé que la sumoylation serait requise pour la réplication transitoire et l'accumulation nucléaire de E1 (Hsu et al., 2007; Rangasamy and Wilson, 2000; Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Toutefois, la sumoylation de E1 des VPH11 et -16 ne semble pas affecter la localisation de la protéine ainsi que sa capacité de répliquer (Fradet-Turcotte et al., 2009). De plus, certaines mutations supposées abolir la sumoylation de E1 sont reconnues pour affecter l'oligomérisation et/ou l'interaction entre l'hélicase et l'origine de réplication (Yasugi et al., 1997). Suite à ces découvertes, il a été suggéré qu'une protéine du système de sumoylation, Ubc9, pourrait interagir avec les oligomères de E1 liés à l'origine sans pour autant perturber la réplication (Fradet-Turcotte et al., 2009). Le rôle de la sumoylation reste peu connu et d'autres études sont requises afin de démystifier son implication dans les activités de E1.

La protéine E2

En plus d'être requise lors de l'initiation de la réplication virale, la protéine E2 possède des fonctions de régulation de la transcription des gènes viraux et permet la ségrégation de l'épisome des papillomavirus dans les cellules filles lors de la mitose. La protéine E2 est le sujet principal de cette thèse et les détails relatifs à ce constituant viral seront élaborés à la section 1.3 de cet ouvrage (page 61).

La protéine E1^{E4} ou E4

La protéine E1^{E4} ou E4 est la plus abondante de toutes les protéines des papillomavirus et elle est exprimée par l'épissage d'un transcrit d'ARNm contenant une séquence codant pour les cinq premiers acides aminés de la protéine E1 fusionnés à l'ORF codant pour E4 (Doorbar et al., 1986; Nasser et al., 1987). Des transcrits de E1^{E4} sont retrouvés à toutes les étapes du cycle viral mais le niveau d'expression atteint son

maximum dans les couches cellulaires différenciées supérieures de l'épithélium. Il a été observé que le passage entre le maintien de la réplication du génome viral à l'amplification de l'épisome est associé à une quantité élevée de la protéine E1^{E4} (Peh et al., 2002). Les fonctions de E1^{E4} au sein du cycle viral restent à être élucidées mais des études ont montré que cette protéine s'associe aux kératines du cytosquelette via un motif riche en leucine (LLxLL) et que cette liaison provoquerait des modifications post-traductionnelles aux kératines telles que la phosphorylation et l'ubiquitination menant à l'affaissement du réseau de cytokératine cellulaire permettant ainsi le relâchement des virions (Bryan and Brown, 2000; Doorbar et al., 1991; McIntosh et al., 2010; Roberts et al., 1993). Aussi, l'utilisation d'un mutant de E1^{E4} dans le contexte du génome du VPH31 a démontré que E1^{E4} serait nécessaire à l'amplification du génome et à l'augmentation des transcrits dans les cellules différenciées (Wilson et al., 2005). En effet, une surexpression de E1^{E4} induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M en modifiant la localisation nucléaire du complexe actif Cdk1/Cycline B1 et en le séquestrant dans le cytoplasme ce qui génèrerait une augmentation de la synthèse de l'épisome (Davy et al., 2005). Par contre, une étude récente a démontré que l'arrêt en G2/M occasionné par E1^{E4} du VPH18 n'est pas essentiel au début de l'amplification virale ainsi qu'à la production de la protéine L1 de la capsidie dans les couches supérieures de l'épiderme (Knight et al., 2011). Finalement, la protéine E1^{E4} pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la stabilité des ARNm viraux ainsi que dans la maturation des pré-ARNm en s'associant avec une hélicase d'ARN nommée E4-DBP (Doorbar et al., 2000). D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser le rôle de E1^{E4} au sein du cycle viral.

La protéine E5

La protéine E5 des papillomavirus est un petit peptide hydrophobe de 83 acides aminés pour le VPH de type 16 et de 44 acides aminés pour le virus du papillome bovin (VPB) de type 1, localisé dans le réticulum endoplasmique (pour le VPH16) ou au niveau

du Golgi (pour le VPB1) (Conrad et al., 1993). Contrairement à la protéine E5 du VPB1 qui montre un pouvoir oncogénique fort, E5 de VPH16 possède une faible activité transformante mais, de concert avec les oncogènes E6 et E7, elle augmente leur activité oncogénique (Bouvard et al., 1994; Stoppler et al., 1996; Valle and Banks, 1995). L'expression de la protéine E5 est stimulée lors de la différenciation cellulaire et, ce faisant, promeut la prolifération cellulaire et la réplication virale (Maufort et al., 2007). Ces activités sont liées à la capacité de E5 de faciliter le passage des protéines membranaires dans le réticulum endoplasmique (RE) comme c'est le cas avec BAP31, une protéine régulatrice du transport des protéines membranaires, trouvée associée avec E5 (Regan and Laimins, 2008). Des analyses ont aussi rapportées que E5 augmente l'activité du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) en altérant les événements de fusion entre les vésicules contenant l'EGFR et les endosomes, donc en facilitant son recyclage à la membrane cellulaire (Borzacchiello et al., 2010). Des études ont démontré qu'en absence de la protéine E5 l'amplification du génome viral est inhibée (Fehrmann et al., 2003; Genter et al., 2003). D'autres activités associées à E5, dont la réduction du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des lymphocytes T, la modulation de la voie de signalisation des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et l'augmentation du niveau de cavéoline 1, contribuent à la capacité de transformation de la protéine E5 (Ashrafi et al., 2006; Gu and Matlashewski, 1995; Suprynowicz et al., 2008). Finalement, des études effectuées dans un modèle de souris transgénique ont montré qu'en présence d'œstrogène, l'expression de E5 peut mener au développement d'un cancer du col utérin, permettant de croire que dans certaines situations E5 agirait comme un oncogène (Maufort et al., 2010). Le rôle de la protéine E5 dans la progression des tumeurs reste un sujet d'investigation majeur.

La protéine E6

L'oncogène E6 des papillomavirus possède plusieurs fonctions et en présence de la protéine E7 permet l'immortalisation et la transformation des cellules primaires infectées (revue dans (Howie et al., 2009)). La protéine E6 est composée d'environ 150 acides aminés (16-18 kDa) et contient 2 motifs à doigts de zinc ayant deux motifs cystéine-x-x-cystéine pour chaque structure capturant une molécule de zinc via les résidus cystéines. Chez les VPH à haut risque oncogénique, nous retrouvons à leur extrémité C-terminale un domaine de liaison aux protéines contenant un motif PDZ (Figure 1.12). E6 est principalement retrouvée au noyau mais une faible fraction est aussi retrouvée dans le cytoplasme des cellules infectées. Une forme tronquée de la protéine E6, nommée E6*, est produite à partir d'un transcrit épissé et possède la capacité de réguler les activités de E6 en liant et ainsi, inactivant la protéine E6 pleine longueur (Nomine et al., 2006; Pim and Banks, 1999).

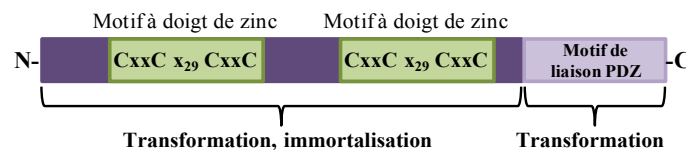


Figure 1.12. Structure de l'oncogène E6 des papillomavirus.

La protéine E6 est composée de 150 acides aminés contenant quatre motifs C-x-x-C formant deux structures à doigt de zinc nécessaires à l'activation de la transcription, la transformation et l'immortalisation. Le domaine C-terminal de E6 des VPH à haut-risque oncogénique contient un motif de liaison aux domaines PDZ impliqué dans le potentiel transformant de la protéine.

Une des activités importantes associées à E6 est de permettre le déroulement du cycle cellulaire en promouvant la dégradation de la protéine p53. La protéine p53 est un suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation de deux étapes critiques du cycle cellulaire, soit dans la transition G1/S et G2/M. En réponse à un stress cellulaire ou à un dommage à l'ADN, p53 va initier la transcription de régulateurs impliqués dans les voies

de réparation de l'ADN tel que la protéine PCNA, de l'arrêt cellulaire, comme l'inhibiteur de protéine kinase dépendante de cycline, p21, ou bien de l'apoptose en stimulant l'expression de la protéine Bax. Afin de contrecarrer l'activité pro-apoptotique de p53, la protéine E6 des VPH à haut risque va se lier à une ubiquitine ligase cellulaire nommée E6-AP (*E6 associated protein*) et former un complexe trimérique avec p53. E6-AP va transférer des molécules d'ubiquitine sur p53 qui la marque pour la voie de dégradation par le protéasome. Cette dégradation rapide de p53 favorise la progression du cycle cellulaire permettant ainsi la réplication du génome viral. La progression du cycle va aussi provoquer la duplication des chromosomes et générer des anomalies chromosomiques dirigeant la cellule infectée vers un état transformé. De plus, E6 empêche l'activité transcriptionnelle de p53 indépendamment de sa dégradation, d'une part en séquestrant p53 dans le cytoplasme et d'autre part, en s'associant et inactivant les co-activateurs de la transcription de p53, CBP/p300. La protéine E6 des papillomavirus à faible risque oncogénique va aussi lier p53 par contre, cette interaction se situe au niveau de la région C-terminale de p53. Seule l'association au niveau de la région centrale de p53, comme le font les protéines E6 des virus à haut risque, permet sa dégradation (Crook et al., 1991; Li and Coffino, 1996).

E6 va aussi inhiber la voie menant à l'apoptose en réponse aux cytokines associées à la suppression de la croissance, par son action avec le récepteur de TNF- α , FADD et la caspase 8. Lors de l'entrée virale, la cellule infectée produit des médiateurs de l'inflammation telle que TNF- α , qui est un puissant inhibiteur de la prolifération des kératinocytes. Les cytokines peuvent activer la voie extrinsèque de l'apoptose via le récepteur du TNF- α . E6 empêche l'apoptose induite par le TNF- α en s'associant directement à son récepteur, ce qui inhibe la formation des complexes menant à la mort cellulaire. De plus, E6 peut interagir avec la protéine adaptatrice FADD, les caspases 8 et 10 et TNF et FasL afin de bloquer l'apoptose. E6 peut aussi intervenir au niveau de la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose (via les mitochondries) en interagissant avec les

protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2, Bak et Bax et ainsi inhiber la mort cellulaire programmée (revue dans (Howie et al., 2009)). Par son domaine C-terminal, l'oncogène E6 des VPH à haut-risque oncogénique interagit aussi avec certaines protéines contenant un domaine composé d'une série de 90 acides aminés nommé PDZ (PSD95/DlgA/ZO-1 sont les 3 premières protéines découvertes possédant ce domaine) qui est souvent retrouvé chez les protéines impliquées dans la signalisation et l'adhésion cellulaire. La liaison avec E6 mène à la dégradation des protéines à domaine PDZ comme hDlg (Lee et al., 1997), MUPP1 (Lee et al., 2000b), MAGI (Glaunsinger et al., 2000), PTPN3 (Jing et al., 2007), TIP-2/GIPC (Favre-Bonvin et al., 2005) et hScrib (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Il semblerait que ces associations aient un impact majeur sur le cycle viral et cellulaire car l'infection des kératinocytes par un génome de VPH31 portant une protéine E6 n'ayant plus la capacité de lier le motif PDZ, montrent une réduction de la croissance cellulaire ainsi qu'une diminution des transcrits précoces et du maintien de l'épisome. La liaison de E6 aux protéines à domaine PDZ peut aussi contribuer à la carcinogénèse car certaines d'entre elles, telle que Dlg, MAGI et MUPP1, sont reconnues pour avoir des fonctions de suppresseur de tumeur (Massimi et al., 2008; Nguyen et al., 2003; Shai et al., 2007).

Une autre fonction importante de la protéine E6 est l'activation de la télomérase dans les cellules infectées (Klingelutz et al., 1996). Chez les cellules saines, chaque cycle de réplication de l'ADN mène à la réduction des extrémités des télomères provoquant, à long terme, l'instabilité chromosomique et la sénescence cellulaire. L'oncogène E6 des VPH à haut risque maintient la viabilité cellulaire en activant la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT, générant une élongation des télomères dans les cellules infectées (Gewin et al., 2004). De plus, E6 augmente la transcription de hTERT en s'associant directement avec le facteur de transcription du gène codant pour hTERT, MYC, et en le recrutant à son promoteur (Veldman et al., 2003). D'autres activités sont associées à la protéine E6 comme sa capacité d'interférer dans l'adhésion, la polarité et la différenciation

cellulaire, d'altérer la voie de signalisation des protéines G ainsi que de réduire la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire (revue dans (Howie et al., 2009)). Ces fonctions diverses ciblant les différents effecteurs cellulaires par l'oncogène E6 permettent d'assurer la réplication de l'épisome et la collaboration entre E6 et l'oncogène E7 des papillomavirus, contribue à la transformation des cellules infectées (Figure 1.13).

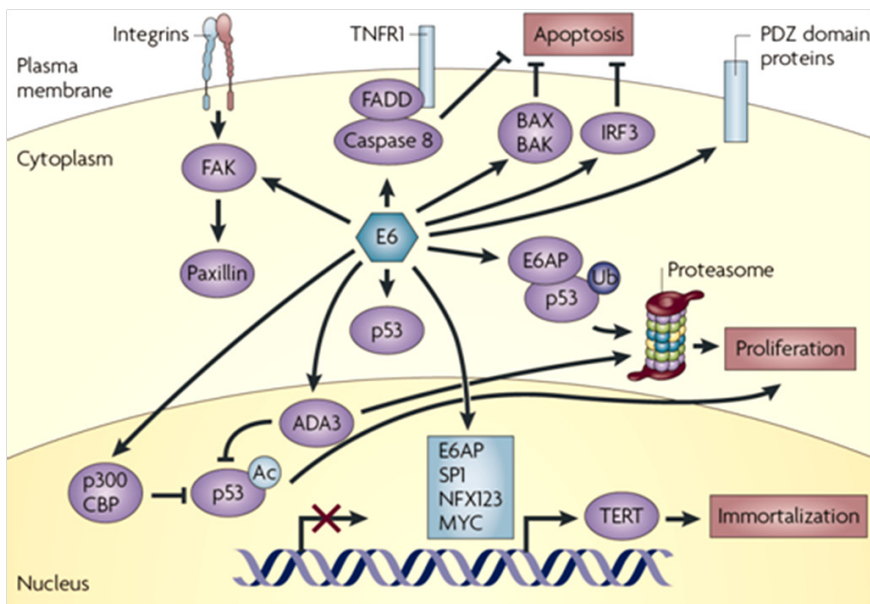


Figure 1.13. Les activités de l'oncoprotéine E6 ciblant les voies de signalisation et protéines cellulaires.

La protéine E6 possède plusieurs fonctions qui vont permettre l'immortalisation et la transformation de la cellule infectée entre autre en ciblant les voies de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Se référer au texte pour plus de détails. Figure tirée de Moody, C.A. et Laimins, L.A., Nature Reviews Cancer, (2010) (Moody and Laimins, 2010).

La protéine E7

L'oncoprotéine E7 possède une centaine d'acides aminés totalisant un poids moléculaire de 13 kDa et est retrouvée dans le noyau des cellules infectées mais est aussi observée dans le cytoplasme, dépendamment de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule (Dreier et al., 2011). En effet, dans les cellules CaSki (cellules épithéliales du col de l'utérus ayant plus 600 copies du VPH16 intégrés dans le génome) en mitose, l'oncoprotéine E7 est retrouvée dans le cytoplasme au niveau du cytosquelette tandis que certaines cellules en interphase accumulent la protéine E7 dans leur noyau. La protéine E7 seule peut transformer des lignées cellulaires de rongeurs (NIH3T3) mais en synergie avec l'oncogène E6, E7 permet l'immortalisation des cellules épithéliales humaines. E7 est séparé en trois régions conservées (*conserved regions*, CR) nommées CR1, CR2 et CR3. La région CR1 se retrouve en N-terminal de la protéine et est nécessaire à la dégradation de la protéine du rétinoblastome pRb, un suppresseur de tumeur. Le domaine CR2 contient un motif LxCxE qui permet la liaison avec les membres de la famille pRb soit, pRb (p105), p107 et p130. Aussi, un site de phosphorylation par la caséine kinase II qui agit au cours des phases G1 et S du cycle cellulaire en promouvant la croissance, est retrouvée dans ce domaine, par contre, l'importance de cette phosphorylation au sein du cycle viral n'est pas définie (Massimi and Banks, 2000; Tugizov et al., 2005). Finalement, le domaine CR3 possède un domaine à doigts de zinc composé de deux motifs cystéine-x-x-cystéine requis pour l'association avec pRb ainsi qu'avec d'autres protéines cellulaire et est important pour la dimérisation de la protéine (Figure 1.14) (Hebner and Laimins, 2006).

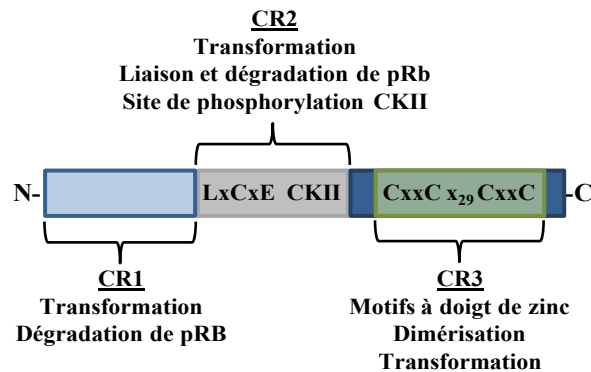


Figure 1.14. Structure de l'oncogène E7 des papillomavirus.

La protéine E7 est un polypeptide nucléaire d'environ 100 acides aminés séparés en trois régions conservées (CR1, CR2 et CR3). Le domaine CR1 est nécessaire à la transformation cellulaire et à la dégradation de pRb mais ne contribue pas directement à son interaction. La région CR2 lie directement pRb via la séquence LxCxE et possède un site de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII). En C-terminal nous retrouvons deux copies du motif C-x-x-C formant une structure en doigt de zinc impliqué dans l'interaction avec pRb et d'autres facteurs cellulaires. Ce domaine serait important pour la dimérisation de l'oncogène E7.

L'activité principale de l'oncogène E7 dans le cycle viral est de lier et promouvoir la dégradation, par le protéasome, les protéines pRb, p130 et p107, afin de faciliter la progression du cycle cellulaire. Les protéines pRb sont des régulateurs majeurs du cycle cellulaire selon leur état de phosphorylation. La fonction la plus étudiée des protéines Rb est leur capacité à réguler l'entrée et la progression de la phase S du cycle cellulaire en modulant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription E2F: des hétérodimères ayant une sous-unité E2F (E2F1 à E2F8) et une sous-unité DP (DP-1,2) (revue dans (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)). Le complexe pRb/E2F formé agit en tant que répresseur de la transcription au niveau des sites de liaison retrouvés au sein des promoteurs des gènes impliqués dans la régulation de la progression de la phase réplivative (S) du cycle cellulaire, la différenciation, la mitose et l'apoptose (DeGregori and Johnson, 2006). Dans les cellules normales, la dissociation du complexe pRb/E2F est causée par la phosphorylation de pRb par Cdk4/6 et Cdk2 au cours de la phase G1 tardive. Cette

perturbation permet à E2F d'agir en tant qu'activateur de la transcription des gènes impliqués dans l'entrée et la progression de la phase S. La capacité de l'oncogène E7 de lier et de dégrader pRb sous sa forme hypophosphorylée, génère la libération des facteurs E2F initiant ainsi l'hyperprolifération cellulaire en activant les gènes de la phase S. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les gènes codant pour les cyclines A/E-Cdk2 qui en plus, phosphorylent pRb ainsi que ceux impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Chellappan et al., 1992; Stevaux and Dyson, 2002). La protéine E7 peut aussi interagir et inhiber, entre autre, le répresseur transcriptionnel E2F6 qui réduit l'expression des gènes de la phase S. Ainsi, le complexe E7-E2F6 permet le maintien de la phase S nécessaire à la réplication du génome viral dans les kératinocytes en différenciation (McLaughlin-Drubin et al., 2008).

E7 influence aussi les gènes régulés par les facteurs E2F en interagissant avec certaines HDAC de classe I. Les HDAC agissent comme corépresseurs de la transcription en induisant le remodelage de la chromatine par la déacétylation des histones. E7 lie directement les HDAC via son domaine à doigts de zinc, empêchant la déacétylation des histones et augmentant ainsi le niveau de transcription des gènes orchestré par les facteurs E2F dans les cellules différenciées. Cette action de E7 conserve les cellules dans la phase S du cycle cellulaire et favorise la réplication et le maintien du génome viral en plus d'augmenter la croissance cellulaire (Longworth and Laimins, 2004; Longworth et al., 2005). Une autre tactique utilisée par la protéine E7 afin de contribuer cette fois à l'immortalisation cellulaire, est d'interagir avec les facteurs cruciaux contrôlant la progression du cycle cellulaire comme les inhibiteurs des kinases dépendantes de cycline (Cdk), p27 et p21 (Jones et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996). Ces derniers ciblent Cdk2 qui est une kinase importante pour l'entrée et la progression en phase S par son interaction avec les cyclines A/E. L'association de E7 avec p21/p27 empêche l'effet inhibiteur sur les activités des cyclines A/E permettant la progression du cycle cellulaire. Une conséquence majeure de l'activité de E7 sur les complexes RB-E2F et sur d'autres

régulateurs du cycle cellulaire, est l'augmentation de l'expression de p53 qui induit l'apoptose. Par contre, l'activité de l'oncogène E6 ciblant spécifiquement p53 pour la dégradation vient freiner cet effet en soutenant la prolifération cellulaire plutôt que la mort programmée.

Une autre conséquence de l'expression de la protéine E7 des papillomavirus à haut-risque oncogénique est le déclenchement de l'instabilité génomique observé dans plusieurs cancers. L'instabilité génomique est notamment provoquée par l'augmentation de l'expression de Cdk2 par E7 ainsi que par la perturbation des différents points de contrôle des passages des phases G2/M et de la mitose, générée par les oncogènes E6 et E7. Cette perte de régulation va promouvoir l'aneuploïdie qui est caractérisée par un nombre anormal de chromosome souvent observée dans les cellules exprimant E7 (Hashida and Yasumoto, 1991; Southern et al., 2001). De plus, E7 va interagir avec la tubuline- γ reconnue pour être un régulateur du centrosome, l'empêchant de se lier aux fuseaux mitotiques et provoquant ainsi la formation de nouveaux centrosomes. Les irrégularités du nombre de centrosomes sont observées lorsque la protéine E7 est produite ce qui est un évènement précurseur de l'instabilité génomique (Duensing and Munger, 2003b). L'instabilité génomique occasionnée par l'oncogène E7 peut être aussi associée aux dommages à l'ADN. En effet, la présence de foyers de réparation a été observée dans les cellules exprimant E7 du VPH16, suggérant que E7 peut induire le clivage de l'ADN bicaténaire ou bien interféré avec les composantes de réparation de l'ADN. Entre autre, E7 semble activer la voie ATM dans les kératinocytes lors de l'amplification du génome viral au cours de la différenciation cellulaire. Cette instabilité génomique paraît faciliter l'intégration de l'épisome viral dans le génome de l'hôte et contribue au développement de cancers (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009; Moody and Laimins, 2009). Une autre association entre E7 et l'instabilité génomique est aperçue chez les patients atteints de l'anémie de Fanconie (AF) qui développent des carcinomes avec une incidence élevée aux sites infectés par le VPH (zur

Hausen, 2002). Cette maladie, caractérisée par une instabilité chromosomique, est associée à une défektivité d'un des treize gènes de la voie de Fanconie. Cette voie est activée par l'arrêt des fourches de réplifications et par l'oncogène E7 des VPH qui induit l'expression de l'effecteur FANCD2 par l'activation du facteur de transcription E2F (Hoskins et al., 2008; Spardy et al., 2007).

Finalement, l'oncogène E7 intervient aussi dans l'inhibition de l'apoptose en interférant avec une seconde voie apoptotique nommée anoïkose. Cette voie est activée lorsque les intégrines d'une cellule ne s'associent plus à la matrice extracellulaire ce qui envoie un message de mort programmée. E7 va interagir avec une protéine associée à pRb, une ubiquitine ligase nommée p600, impliquée dans l'anoïkose. Ainsi le complexe E7-p600 va permettre la croissance cellulaire indépendamment de l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire (Figure 1.15) (DeMasi et al., 2007).

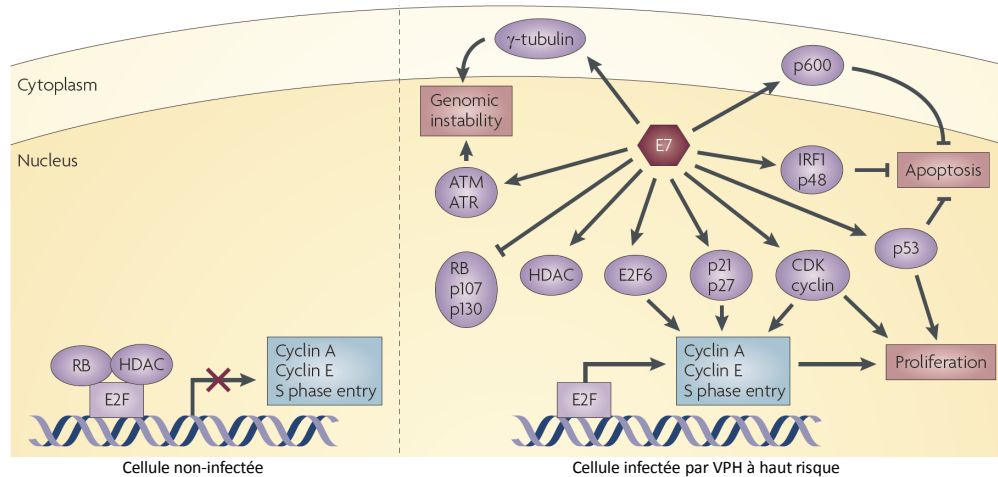


Figure 1.15. Les activités de l'oncogène E7 ciblant les voies de signalisation par l'interaction avec diverses protéines cellulaires.

La protéine E7 possède plusieurs activités qui vont permettre l'immortalisation et la transformation de la cellule infectée entre autre en ciblant les voies de la prolifération cellulaire et de l'apoptose en plus de générer

l'instabilité génomique. Se référer au texte pour plus de détails. Figure tirée de Moody, C.A. et Laimins, L.A., Nature Reviews Cancer, (2010) (Moody and Laimins, 2010).

La protéine E8^{E2C} ou E8

Certains papillomavirus dont le virus du papillome bovin de type 1, VPH11, -16, -31 et -33, codent pour un produit alternatif venant de l'épissage du transcrit de E2 nommé E8^{E2C}. Cette protéine contient 12 acides aminés de l'ORF de E8 fusionnés à la région charnière et au domaine de liaison/dimérisation en C-terminal de la protéine E2. E8^{E2C} est reconnu pour inhiber l'activité transcriptionnelle de la protéine E2 en compétitionnant pour les sites de liaison à l'ADN spécifiques à E2 ainsi qu'à certains facteurs de transcription cellulaire comme Sp1 et TBP, retrouvés dans la région de contrôle (LCR) de l'épisome (Dostatni et al., 1991). Cette association à l'ADN via la partie C-terminale de E8^{E2C} génère la formation d'homo- et d'hétérodimères inactifs avec E2 pleine longueur et réprime la transcription des oncogènes E6 et E7 (McBride et al., 1991). De plus, des études ont montré qu'un génome du VPH31 déficient dans la production de E8^{E2C} génère une augmentation des transcrits de E6/E7, se réplique à haut niveau mais, est incapable de se maintenir à long terme (Zobel et al., 2003). Récemment, une étude a montré que la protéine CHD6 (*chromodomain helicase DNA binding domain 6*) peut interagir avec la partie C-terminale de E2 dans le contexte E8^{E2C}, promouvant l'activité répressive de cette protéine (Fertey et al., 2010). Ainsi, il est reconnu que E8^{E2C} joue un rôle dans le maintien du nombre de copies du génome viral dans les cellules infectées (Stubenrauch et al., 2000). Il a été aussi démontré que l'activité répressive n'est pas uniquement générée par le domaine de liaison à l'ADN E2C mais aussi par la région E8, car le transfert de cette partie à un autre domaine de liaison à l'ADN mène à la répression de la transcription (Stubenrauch et al., 2007; Stubenrauch et al., 2001). Pour appuyer ces observations, des études récentes ont montré l'association de la partie E8 à un répresseur de la transcription cellulaire NCoR1 (*nuclear receptor corepressor 1*), une composante de l'HDAC3 (Ammermann et al., 2008; Powell et al., 2010). Le mécanisme fonctionnel de répression de la transcription par E8^{E2C} est peu

connu mais semble faire intervenir sa capacité de lier l'ADN ainsi que des facteurs de la cellule hôte.

1.2.4.2 Les protéines tardives

Les protéines tardives sont représentées par L1 et L2 qui sont respectivement les composantes majeures et mineures de la capsidie des papillomavirus. Les protéines L1 et L2 sont exprimées tardivement au cours du cycle viral au niveau des cellules différenciées des couches suprabasales de l'épithélium. Plus précisément, L1 et L2 sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules et sont emmenées au noyau afin d'emmagasiner le génome viral compacté en chromatine à l'aide d'histones cellulaires. La protéine L1 est dirigée vers les pores nucléaires à l'aide d'un adaptateur/récepteur d'import nucléaire, la karyophérine $\alpha 2\beta 1$ (Nelson et al., 2000; Nelson et al., 2002). Pour sa part, la protéine L2 possède deux signaux de localisation nucléaires (NLS) et sera dirigée directement au noyau de la cellule. L2 renferme en son extrémité N-terminale un domaine de liaison à l'ADN lui permettant de s'associer au génome viral et de le transporter au noyau dans les domaines ND10 (*nuclear domain 10* ou *promyelocytic leukemia nuclear bodies*) (Lin et al., 2009). Les ND10 sont des structures intranucléaires dynamiques qui nécessitent la présence de la protéine PML (*promyelocytic leukemia protein*) pour leur formation. Plusieurs protéines sont aussi abondamment retrouvées dans les ND10 dont Sp100 et Daxx, et d'autres protéines y sont observées dépendamment du type cellulaire et du degré de différenciation cellulaire. Plusieurs fonctions ont été associées à ces corps nucléaires dont la réparation de l'ADN, la réponse au stress, l'apoptose, la transcription, la réponse à l'interféron (immunité virale), la réplication de génomes viraux et l'infection virale (revue dans (Everett and Chelbi-Alix, 2007)). Il est proposé qu'au cours de l'infection initiale par un papillomavirus, la protéine L2 accompagne le génome viral dans le noyau jusqu'aux ND10 ce qui permettrait la transcription précoce et le début de la réplication de l'ADN viral (Day et al., 2004). L2 lie l'ADN nouvellement synthétisé dans ces domaines et recrute L1, qui a la capacité de

s'auto-assembler, afin de créer de nouveau virion. De plus, il semblerait que L2 ait la capacité de redistribuer les composantes virales au cours de l'assemblage des virions, entre autre en s'associant et en relocalisant la protéine E2 des papillomavirus au niveau des ND10 (Day et al., 1998; Heino et al., 2000). Cette interaction inhibe l'activité transcriptionnelle de E2 sans affecter la réplication du génome viral, suggérant une régulation par L2 du cycle viral en favorisant l'amplification de l'ADN des papillomavirus avant son encapsidation (Okoye et al., 2005).

Comme il a été mentionné précédemment, à l'entrée virale, la capsidite va subir un changement conformationnel permettant l'exposition du N-terminal de L2. La proprotéine convertase, la furine, va cliver une portion de L2 générant une modification de la structure de la capsidite et favorisant l'association par L1 ou L2 à un second récepteur nécessaire à l'entrée virale (Richards et al., 2006). Suite à l'internalisation dans les endosomes, le complexe L2-génome viral transite par le réseau de microtubules via l'interaction entre L2 et la dynéine, une protéine motrice des microtubules, jusqu'au noyau de la cellule infectée afin d'entamer la réplication de l'ADN et la production des protéines virales (Florin et al., 2006).

1.3 E2 : la protéine régulatrice des papillomavirus

La protéine E2 joue plusieurs rôles dans le cycle viral des papillomavirus contribuant à l'instauration de l'infection causée par ces virus. Étant le facteur de transcription des virus du papillome, E2 va réguler l'expression des oncogènes et des autres protéines virales. De plus, E2 participe à l'initiation de la réplication en recrutant l'hélicase E1 à l'origine, est nécessaire à la ségrégation des épisomes lors de la division cellulaire, est un modulateur de la mitose et peut aussi induire l'apoptose. Toutes ces fonctions de E2 sont régies par différentes interactions avec l'épisome, les protéines cellulaires et virales ainsi que par des modifications post-traductionnelles altérant la protéine régulatrice.

1.3.1 Structure de la protéine E2

L'ORF de E2 code pour une protéine contenant entre 365 et 410 acides aminés environnant les 40-45 kDa selon le type de papillomavirus. Cette protéine modulaire est composée d'un domaine de transactivation (TAD) dans sa région N-terminale et d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) à son extrémité C-terminale, tous deux liés par une région flexible d'une longueur variable selon le type de VP nommée région charnière (Figure 1.16).

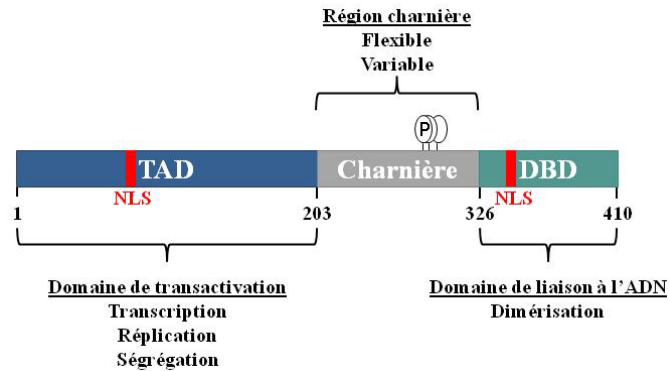


Figure 1.16. Structure du facteur de transcription E2.

Représentation schématique de la protéine E2 du VPB1 possédant 410 acides aminés séparés en trois domaines. En N-terminal, il y a le domaine de transactivation (TAD) essentiel aux activités transcriptionnelles, de réplication et de ségrégation de E2. La région centrale ou charnière de la protéine est très flexible et variable en termes de nombre et de composition en acides aminés chez différents papillomavirus. Le domaine de liaison à l'ADN est aussi responsable de la dimérisation de E2. Chez VPB1 des signaux de localisation nucléaire (NLS) et des sites de phosphorylation ont été identifiés.

1.3.1.1 Le domaine de transactivation (TAD)

Le TAD de E2 comprend environ 200 acides aminés et est responsable de l'activation et la répression de la transcription des gènes viraux ainsi que de la réplication du génome viral. Des structures à haute résolution récoltées à partir d'analyses par diffractions de rayons X du TAD de la protéine E2 des VPH11, -16, -18 et du VPB1, ont été obtenues et révèlent que ce domaine possède une forme en « L » (Antson et al., 2000; Harris and Botchan, 1999; Sanders et al., 2007; Wang et al., 2004). Le TAD est composé de deux domaines soit N1, qui regroupe 3 hélices- α antiparallèles, et le domaine N2, formé de feuillets- β antiparallèles. Entre ces deux domaines nous retrouvons deux boucles servant de point d'appui entre les deux domaines N1 et N2 permettant de définir leur orientation (Figure 1.17).

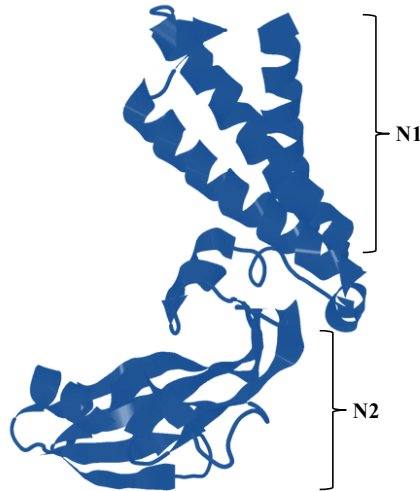


Figure 1.17. Domaine de transactivation de la protéine E2.

Représentation en ruban du TAD de la protéine E2 du VPB1 où les deux régions, N1 composée de trois hélices- α antiparallèles et N2 regroupant des feuillets- β , y sont indiquées. Code d'accèsion de Protein Data Bank : 2JEU (Sanders et al., 2007).

Les études structurales des TAD de E2 chez VPH16 et VPB1 ont démontré la présence d'une seconde surface de dimérisation au sein de ce domaine en plus de celle connue dans le DBD (Antson et al., 2000; Sanders et al., 2007). Pour le VPH16, la structure cristallographique a montré une association dimérique entre deux monomères du TAD. Plus précisément, l'interface dimérique implique sept résidus conservés des deux monomères dont R37, A69, I73, Q76, L77, T81 et E80 et des liens directs ou faits par des ponts hydrogènes venant de molécules d'eau (Antson et al., 2000). Comme plusieurs de ces résidus avaient été impliqués dans l'activité transcriptionnelle de E2, les auteurs de l'étude ont suggéré que cette deuxième interface de dimérisation au niveau du TAD serait nécessaire à la formation de boucles d'ADN rapprochant les sites lointains activant la transcription (figure 1.18 A, (Antson et al., 2000)). En effet, il existe quatre sites de liaison par E2 dans la région de contrôle (LCR) chez les VPH. Les sites 1, 2 et 3 sont à proximité un de l'autre mais sont séparés par plus de 400 nucléotides du site 4 (voir figure 1.7 p.17).

Il est reconnu que ces sites sont liés spécifiquement par le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de E2 d'une part. D'autre part, des études de microscopie électronique et atomique ont montré qu'en présence d'ADN contenant des sites de liaison à E2 ou du LCR, E2 liait ces sites via son DBD et formait des boucles d'ADN grâce à la présence du TAD. Une forme tronquée de la région N-terminale de E2 ou des mutations au niveau des résidus impliqués dans l'interface dimérique ne permettaient plus la formations de ces boucles d'ADN (Hernandez-Ramon et al., 2008; Knight et al., 1991). Ainsi, il a été suggéré que des dimères de E2 associés à leur site consensus lointain interagissent ensembles via leur domaines N-terminal assez fortement pour stabiliser la formation de boucle d'ADN et permettre d'amener E2 à proximité du site d'initiation de la transcription des gènes viraux.

Une interface de dimérisation a aussi été notée au niveau du TAD de VPB1 mais elle est différente de celle retrouvée chez le VPH16. Cette surface de dimérisation semble être stabilisée par un pont disulfure au niveau de la cystéine 57. Il est important de mentionner que l'interaction TAD-TAD chez VPB1 est plus faible que celle déjà observée entre les DBD. Chez VPH16, les acides aminés impliqués dans l'interface dimérique sont aussi nécessaires pour l'activité transcriptionnelle de E2. Pour VPB1 l'interface de dimérisation est différente, et met en jeu des résidus qui sont impliqués dans l'interaction avec l'hélicase E1. Les études de Sanders *et al.* ont montré que l'interface dimérique au niveau du TAD de E2 de VPB1 se forme après l'association en dimères via l'interaction des DBD de monomères de la protéine. L'interaction entre deux TAD de E2 se fait par l'entremise de ponts hydrogènes entre la glutamine 12 et l'arginine 58 et un lien ionique entre les chaînes latérales de l'arginine 172 et l'asparagine 175. Cette interface incluant aussi les résidus nécessaires à l'interaction avec E1, est stabilisée par un pont disulfure au niveau de la cystéine 57. Ils ont aussi démontré que cette cystéine est plus sensible à l'oxydation que la cystéine 340 régulant la liaison à l'ADN de la protéine, ce qui fournirait un palier de régulation de la réplication supplémentaire selon l'état d'oxydo-réduction de la

protéine (figure 1.18 B, (Sanders et al., 2007)). Pour leur part, les TAD de E2 des VPH11 et -18 n'ont pas été retrouvés en forme dimérique suggérant l'existence de différences structurales et même, de régulation des activités de la protéine E2 au sein des papillomavirus (Abbate et al., 2004; Harris and Botchan, 1999; Wang et al., 2004).

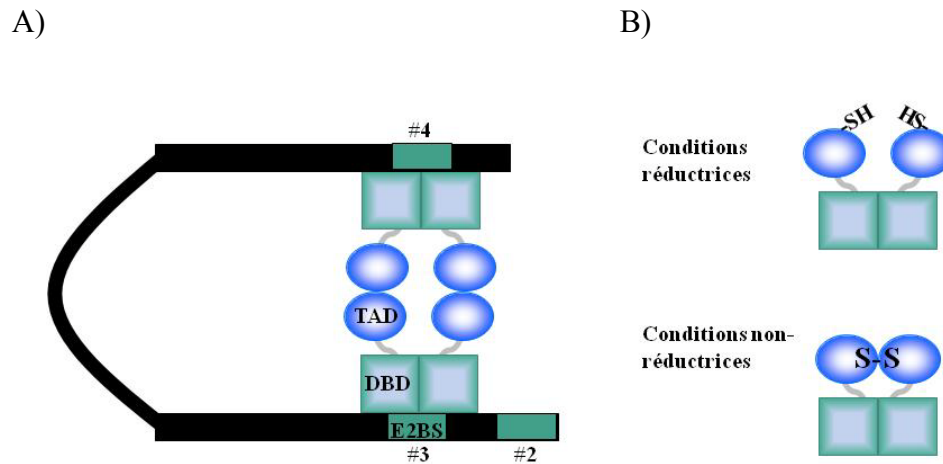


Figure 1.18. Schématisation de la formation de dimère de E2 via le TAD.

A) Chez le VPH16, la deuxième interface de dimérisation située au niveau du TAD comprend des résidus impliqués dans l'activité transcriptionnelle de E2. Cette interface serait nécessaire à la formation de boucles d'ADN rapprochant les sites de liaison par E2 (BS) à proximité du site d'initiation de la transcription des gènes viraux (13). B) Chez VPB1, l'interface dimérique au niveau du TAD de E2 se forme après l'association en dimère via l'interaction entre les DBD. L'interaction entre deux TAD de E2 inclut les résidus nécessaires à l'interaction avec E1 et est stabilisée par un pont disulfure (S-S) au niveau de la cystéine 57 suggérant une régulation de la réplication dépendante de l'état d'oxydo-réduction de la protéine (290).

1.3.1.2 La région charnière

La région charnière séparant le TAD du DBD de E2, est la partie la moins conservée au sein des papillomavirus et elle peut être composée de 40 à 200 acides aminés selon le type de VP. Malgré le peu d'informations fonctionnelles disponibles, la région

charnière est reconnue pour avoir une très grande flexibilité due à la prévalence de proline retrouvées dans ce domaine (Giri and Yaniv, 1988). Chez VPB1, cette partie comprend un motif PEST défini comme une séquence en acides aminés riche en prolines, en acides glutamique, en sérines et en thréonines. Chez le virus bovin le motif PEST inclus des sérines pouvant être phosphorylées et qui semblent être requises à la stabilité de la protéine E2 et au maintien de l'épisome viral dans la cellule infectée (Allikas et al., 2001; Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989; McBride and Howley, 1991; Penrose et al., 2004; Penrose and McBride, 2000). Au total, cinq sérines retrouvées dans la région charnière de VPB1 (S235, S240, S277, S298 et S301) peuvent être phosphorylées, dont deux sites majeurs de phosphorylation aux résidus 298 et 301 qui sont associés à la stabilité de la protéine E2 et un site mineur à l'acide aminé 235 (Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989). Un peptide englobant les acides aminés 283 à 311 du motif PEST a démontré la présence d'une hélice- α pouvant être modifiée par la phosphorylation de la sérine 301 générant un changement de la structure ce qui initierait la dégradation de la protéine E2 (Garcia-Alai et al., 2006).

Des évidences suggèrent aussi que la région charnière de la protéine E2 du VPH11 est nécessaire à la localisation nucléaire de la protéine en plus d'être essentielle à la régulation de la transactivation et la répllication du génome viral (Zou et al., 2000). D'autres activités ont été associées à la région charnière de la protéine E2 de différents VPH. Cette région de E2 du VPH8 est en mesure d'augmenter le niveau d'expression protéique de l'inhibiteur de Cdk, p21, dans une lignée cellulaire de kératinocytes non-infectés par le VPH et n'exprimant pas la protéine p53 (Steger et al., 2002). Le promoteur contrôlant l'expression de p21 contient cinq sites de liaison par la protéine Sp1 mais aucun site consensus reconnu par E2. Cette étude a pu démontrer que la région charnière interagit avec la protéine Sp1 et est suffisante pour activer la transcription du promoteur contenant des sites de liaison à la protéine Sp1 (Steger et al., 2002). Finalement, ce domaine flexible de la protéine E2 du VPH5, semble posséder une fonction d'interaction avec des facteurs

d'épissage. En effet, la région charnière est composée de séquences répétées riches en arginine et en sérine qui est une caractéristique des protéines SR impliquées dans l'épissage des pré-ARNm et l'épissage alternatif. En faisant le lien entre la présence de séquences RS dans la région charnière de E2 du VPH5, Lai *et al.* ont montré que cette région interagit avec plusieurs facteurs d'épissage cellulaire de la famille des protéines SR tels que ASF/SF2 et SC35 et de la famille des protéines associées aux snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) soit U1-70 kD et U5-100 kD. De plus, ils ont montré que la région charnière de cette protéine E2 participe à l'épissage d'un précurseur d'ARNm obtenu par l'activité transcriptionnelle de E2 elle-même (Lai *et al.*, 1999).

1.3.1.3 Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Par sa forme de tonneau- β dimérique, le DBD de E2 est le représentant d'une classe structurale de domaine de liaison à l'ADN qui comprend entre autre le facteur de transcription EBNA-1 du virus Epstein-Barr (Bochkarev *et al.*, 1995). Constitué d'environ 80 acides aminés, le DBD de la protéine E2 existe en solution et lie l'ADN sous la forme dimérique (Dostatni *et al.*, 1988). Les structures des DBD de E2 du VPH6, -16, -18, -31 et du VPB1 ont été déterminées et montrent que chaque monomère de tonneau- β possède quatre feuillets- β et deux hélices- α formant la topologie $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ (Bussiere *et al.*, 1998; Hegde and Androphy, 1998; Hegde *et al.*, 1992; Hegde *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Nadra *et al.*, 2004) (figure 1.19 A). Il a été démontré que suite à la dimérisation, les feuillets $\beta 2$ et $\beta 4$ situés sur les côtés de chaque unité monomérique du DBD de E2, vont s'associer par des liaisons hydrogènes et vont former un dimère ayant la structure d'un tonneau- β contenant huit feuillets- β (figure 1.19 B). L'interface dimérique constituée de liens hydrogènes entre les sous-unités et d'une importante région hydrophobe venant du tonneau- β , est vaste et occupe entre 1500 Å² à 2500 Å² selon les structures des DBD déterminées (Hegde, 2002). Des études ont aussi montré que l'état dimérique du DBD génère une structure très stable indiquant que probablement ce domaine de la protéine E2 possède cette

forme *in vivo* (de Prat-Gay et al., 2005; Mok et al., 1996). L'hélice- α 1 est responsable de la reconnaissance et de l'interaction avec une séquence d'ADN palindromique ayant le consensus ACCgNNNNcGGT où les lettres «N» (ADN espaceur) peuvent être représentées par n'importe lesquels nucléotides et celles en minuscules sont préférables. Ces hélices- α 1 sont relativement mobiles et participent directement à la liaison à l'ADN (Figure 1.19 B). La liaison par E2 à ces différents sites retrouvés au niveau de la région de contrôle de l'épisome va réguler l'activation ou la répression de la transcription, la réplication ou bien la ségrégation du génome viral. Globalement, les séquences en acides aminés des DBD des protéines E2 sont assez conservées passant de 54% d'identité entre les types de VPH du même genre comme VPH16 et -18, jusqu'à 33% d'identité chez des genres distincts tel que VPH16 et VBP1. Il est à noter que les séquences en acides aminés de l'hélice- α 1 et de l'interface dimérique sont les plus conservées au sein des DBD répertoriés. Spécifiquement, les résidus localisés à la surface de l'hélice de reconnaissance et faisant un contact direct avec les nucléotides conservés de la séquence consensus, soit l'asparagine 296, la lysine 299, la cystéine 300 et la glutamine 239 sont hautement conservés chez les papillomavirus. Au sein de l'interface dimérique, la sérine 313 située dans la boucle stabilisatrice entre les feuillets- β 2 et β 3, les histidines 290 et 320, les tryptophanes 319 et 321 et la proline 353 sont aussi essentiels aux contacts entre les monomères chez les papillomavirus (Blakaj et al., 2009).

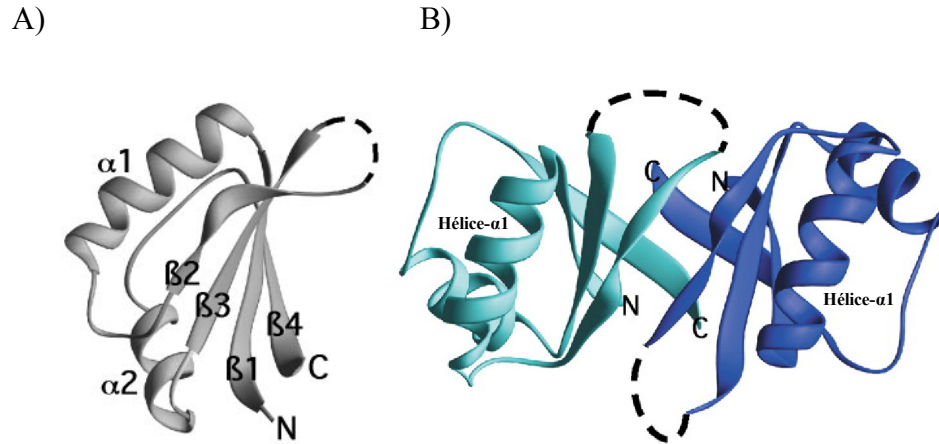


Figure 1.19. Structure du domaine de liaison de la protéine E2.

A) Représentation de la topologie feuillet- $\beta1$, hélices- $\alpha1$, feuillet- $\beta2$, feuillet- $\beta3$, hélice- $\alpha2$, feuillet- $\beta4$ d'un monomère du DBD de la protéine E2. B) Représentation d'un dimère du DBD de la protéine E2 du VPB1 où chaque monomère est représenté en cyan et en bleu. L'hélice- $\alpha1$ du DBD responsable de la reconnaissance du site consensus de liaison par E2 (ACCGNNNNcGGT) est indiquée sur les monomères (Hegde, 2002). Code d'accèsion de Protein Data Bank : 1JJH.

1.3.2 L'interaction entre la protéine E2 et l'ADN

La protéine régulatrice E2 s'associe à des séquences palindromiques ayant le consensus ACCgNNNNcGGT nommées site de liaison à E2 (E2BS pour *E2 binding sites*) (Androphy et al., 1987). Les bases représentées en majuscules sont essentielles tandis que celles en minuscule sont préférables mais non-requises. La longueur de la région centrale affichée par des « N » est absolument conservée mais sa composition varie selon le type de papillomavirus et sa localisation dans l'épisome viral. Excepté pour VPB1 où 12 sites de liaison sont retrouvés dans la région de contrôle, le LCR, et 5 autres localisés ailleurs dans l'épisome, la plupart des papillomavirus possèdent quatre séquences palindromiques localisés dans le LCR (figure 1.7). Trois de ces E2BS sont trouvés immédiatement en

amont du promoteur précoce qui régule l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 ainsi que les gènes E1 et E2 et le quatrième se situe en aval du gène L1 dans la région de contrôle.

L'interaction entre la protéine E2 dimérique et l'ADN est possible grâce à la capacité de E2 de « lire » directement et indirectement l'ADN, favorisant une reconnaissance spécifique d'une séquence en nucléotides. En effet, des analyses structurales des complexes E2-ADN ont montré que chacune des hélices- α 1 des monomères de E2, est insérée dans le sillon majeur de l'ADN faisant un contact direct avec la moitié de la séquence palindromique sans trop de changement dans la structure de la protéine (Hegde and Androphy, 1998; Hegde et al., 1992; Kim et al., 2000). Seule la protéine E2 de VPB1 doit modifier sa structure au niveau de la boucle reliant les feuillettes- β 2 et β 3 afin d'établir un contact direct avec l'ADN. Ainsi, E2 a la capacité de reconnaître des séquences spécifiques d'ADN directement via l'intermédiaire de ponts hydrogènes reliant les nucléotides de la séquence palindromique aux acides aminés de l'hélice- α 1 de E2. Les nucléotides variables formant la région centrale des sites de liaison ne sont pas sollicités pour un contact avec E2 mais ce domaine « espaceur » va plutôt moduler l'affinité de liaison par E2 (Hegde, 2002; Kim et al., 2000). Cette propriété de la protéine régulatrice des papillomavirus à reconnaître la conformation de l'ADN, soit sa courbure, sa flexibilité ou bien sa géométrie, sans dépendre d'un contact direct protéine-ADN, se nomme lecture indirecte de l'ADN. Ainsi, en s'associant directement avec une portion de la séquence, E2 va induire un changement conformationnel de l'ADN qui favorisera l'interaction protéine-ADN. Il a été noté que le domaine espaceur tend à être constitué d'adénines (A) et de thymines (T) et que l'affinité de la protéine E2 pour les E2BS est augmentée si la région centrale est composée des nucléotides A et T (Bedrosian and Bastia, 1990; Hines et al., 1998). De plus, Hines *et al.*, ont pu déterminer que la protéine E2 du VPH16 possède une meilleure affinité aux sites consensus ayant comme région centrale la séquence AATT tout comme le VPH18 (Hines et al., 1998). Cette affinité est diminuée si le domaine espaceur est composé des nucléotides AAAA et encore plus faible si les bases TTAA y sont

retrouvées, prouvant que malgré l'absence de contact entre ce domaine et la protéine E2 du VPH16, cette dernière différencie la structure de la région centrale. Il est à noter que les E2BS possédant ces différents domaines espaceurs sont retrouvés dans le génome du VPH16, suggérant l'existence d'une hiérarchie d'interaction entre E2 et ses sites qui va moduler les différentes activités de E2.

1.3.3 La localisation cellulaire de la protéine E2

La protéine E2 est principalement localisée dans le noyau des cellules infectées grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS), toutefois, E2 peut se retrouver partiellement au niveau des domaines nucléaires 10 (ND10 ou PODs) (Blachon et al., 2005; Klucevsek et al., 2007; Skiadopoulos and McBride, 1996; Swindle et al., 1999; Zou et al., 2000). Les études de localisation du facteur de transcription des VP ont montré qu'il y avait une différence entre les virus à faible risque oncogénique et ceux à haut risque. Il a été démontré que les protéines E2 des VPH6 et -11 possèdent un NLS monopartite classique RKRAR (arginine-lysine-arginine-alanine-arginine) au niveau de la région charnière leur permettant d'interagir avec la matrice nucléaire et d'être confinées exclusivement au noyau (Zou et al., 2000). Par contre, une étude d'homologie de séquence chez VPH16, -18 et VPB1 montre qu'aucun NLS n'est retrouvé dans leur région charnière. Une équipe a plutôt identifié un NLS monopartite dans l'extrémité C-terminale de la protéine E2 du VPH16, plus précisément au niveau de l'hélice- α 1 de reconnaissance (Klucevsek et al., 2007). Ils ont aussi démontré que les deux résidus lysines, K111 et K112, retrouvés dans le NLS peuvent être acétylés par CPB/p300, modifiant ainsi la localisation de E2 du VPH16. Une analyse des séquences en acides aminés a montré que ces résidus lysines importants pour la localisation nucléaire sont présents chez les protéines E2 du VPB1 et VPH18 mais non chez les VPH de bas risques comme VPH6 et -11.

Il a été aussi observé que les protéines E2 du VPB1 et des VPH16 et 18 sont principalement nucléaires mais qu'une faible accumulation de E2 est remarquée dans le cytoplasme (Blachon et al., 2005; Skiadopoulos and McBride, 1996). Tout comme le VPH16, la protéine E2 du VPH18 possède un seul NLS en C-terminal mais en plus, cette protéine contient une séquence d'export nucléaire (NES) située dans son TAD qui serait responsable de l'exportation active de la protéine du noyau vers le cytoplasme (Blachon et al., 2005). Les fonctions principales de la protéine E2 sont d'intervenir lors de la transcription et de la réplication des gènes viraux, des activités se déroulant dans le noyau des cellules infectées. Une fonction secondaire associée spécifiquement aux protéines E2 à haut risque oncogénique des VPH16 et -18 est l'induction de l'apoptose et cette activité pourrait être liée la localisation cytoplasmique des protéines E2 (Blachon et al., 2005; Klucsevsek et al., 2007). En effet, une étude a démontré que l'expression cytoplasmique de la protéine E2 déclenchait le mécanisme d'apoptose. Étant donné que la protéine E2 des virus à haut risque oncogénique VPH16 et -18 est partiellement retrouvée dans le cytoplasme, Blachon *et al.*, ont dirigé artificiellement E2 d'un virus à faible risque oncogénique dans le cytoplasme et ont noté une augmentation de l'apoptose dans les cellules contenant cette protéine (Blachon et al., 2005). Dans le cas de VPB1, la protéine E2 est aussi nucléaire et possède deux NLS, un situé dans le TAD et l'autre au niveau du DBD. Des analyses ont montré que le NLS situé en C-terminal de la protéine est lui aussi retrouvé au niveau de l'hélice de reconnaissance et que la liaison à l'ADN ainsi que la dimérisation du DBD ne sont pas requises à la localisation ou même la rétention nucléaire de E2 de VPB1. Par contre, ce NLS ne peut permettre seul le transport de E2 vers le noyau car une faible fraction de E2 reste dans le cytoplasme indiquant que d'autres signaux sont requis pour le transport nucléaire de la protéine (Skiadopoulos and McBride, 1996).

Des études récentes ont été en mesure de visualiser que la portion nucléaire de la protéine E2 du VPB1 est spécifiquement associée aux chromosomes mitotiques tout au

long de la mitose, un indicatif supplémentaire promouvant le rôle de E2 dans la ségrégation de l'épisome lors de la division cellulaire (Baxter et al., 2005). Par la suite, une autre analyse a été effectuée sur la localisation de treize protéines E2 représentant sept genres de papillomavirus. Il a été observé que la plupart d'entre elles sont aussi associées aux chromosomes mitotiques mais avec certaines variations. En effet, les protéines E2 des genres β - (VPH8) et α -papillomavirus (VPH11, -16, -31 et -57) adoptent une localisation péricentromérique (E2 du VPH8) ou étaient visualisées liées aux chromosomes mitotiques uniquement aux stades précoces et tardifs de la mitose (Oliveira et al., 2006). Ainsi, le facteur de régulation E2 des papillomavirus se retrouve au noyau des cellules, généralement associé aux chromosomes mitotiques mais avec quelques variantes pouvant être attribuables à l'évolution des différents genres au sein de ce groupe de virus (Oliveira et al., 2006).

1.3.4 Les fonctions de la protéine E2

Dans les lésions malignes, l'intégration de l'épisome linéaire au sein des sites fragiles des chromosomes est souvent observée. Cette linéarisation s'effectue souvent aux dépens des gènes E1 et E2 laissant l'expression des oncogènes sans régulation par la protéine E2. Cette absence de répression contribue à un phénotype plus agressif de cancer où l'expression constitutive de E6 et E7 est à l'origine de l'immortalisation et la transformation des cellules infectées (Hebner and Laimins, 2006). La réintroduction de la protéine E2 dans les lignées cellulaires de cancers causées par les papillomavirus telles que les cellules HeLa, génère la répression de la transcription des oncogènes E6 et E7, la stabilisation de p53, un arrêt de cycle cellulaire dans la phase G1 et finalement l'apoptose cellulaire. Ces observations ainsi que les activités de régulation de la transcription, de réplication et de la ségrégation de l'épisome viral, ne font que réitérer l'importance de la protéine E2 au sein du cycle viral des papillomavirus (Dowhanick et al., 1995; Goodwin et al., 2000).

1.3.4.1 La transcription des gènes viraux

En absence de la protéine E2, la transcription des gènes précoces des VPH est activée par des facteurs de transcription cellulaire qui vont lier des séquences en 5' du promoteur précoce majeur et favoriser l'entrée de la machinerie de transcription. Ces facteurs dont Sp1, TBP, AP-1, E2F2, Oct-1, c-Jun, C/EBP- α et C/EBP- β , induisent l'expression des gènes viraux dans les cellules non-différenciées de l'épithélium à partir du promoteur précoce, le maintenant constitutivement actif et ainsi, permettant la production du facteur de régulation E2 (Bernard, 2002; Hummel et al., 1992; Rohlfes et al., 1991; Wooldridge and Laimins, 2008). La protéine E2 est un facteur de transcription qui s'associe aux séquences palindromiques ACCgNNNNcGGT retrouvées dans le LCR. La modulation de la transcription par E2 s'effectue lorsque cette dernière s'associe à ces sites de reconnaissance tout en interagissant directement ou indirectement avec les facteurs cellulaires nécessaires à la transcription ou bien, en empêchant ces facteurs de lier les séquences en 5' du promoteur.

Pour la majorité des papillomavirus à haut risque oncogénique, nous retrouvons quatre sites de liaison par la protéine E2 dans la région de régulation tandis que chez le VPB1, 12 sites ont été localisés dans le LCR. En liant ses sites, la protéine E2 du VPB1 va fortement activer le promoteur précoce responsable des transcrits codant pour les gènes E6, E7, E1, E2, E4 et E5. Par contre, les études effectuées sur E2 des VPH ont démontré que la protéine possède plutôt un rôle de répresseur de la transcription virale. Les sites de liaison par la protéine E2 chez les VPH sont positionnés de façon conservée, où les sites numéro un et deux sont juxtaposés et à une distance de 50 nucléotides en amont du gène E6, tandis que les sites trois et quatre sont respectivement à 150 et 550 nucléotides du gène E6 (Figure 1.20).

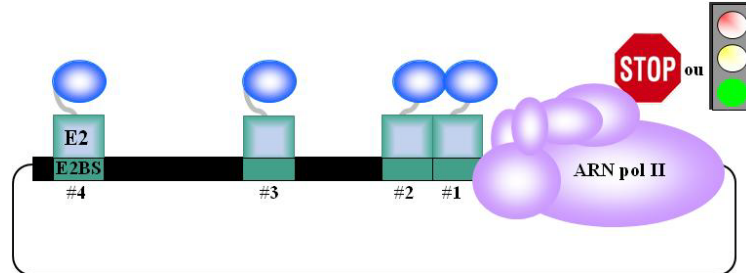


Figure 1.20. Schématisation de l'activité transcriptionnelle de E2.

Chez les VPH à haut risque oncogénique, 4 sites de liaison par la protéine E2 sont retrouvés le LCR. L'occupation de ces sites par le facteur de transcription viral va définir l'inhibition ou l'activation de la transcription des gènes viraux par l'ARN polymérase II.

La conséquence biologique de l'interaction entre E2 et ses sites varie selon l'ordre d'occupation de ces séquences d'ADN, et aura un impact direct sur le cycle viral car E2 régule l'expression des gènes E6, E7, E1 et E2 lui-même. Ainsi, la liaison par E2 aux sites un, deux et trois, seuls ou en combinaison, mène généralement à une inhibition de la transcription des transcrits précoces. Cette répression du promoteur est causée par le déplacement de facteurs de transcription comme TBP et Sp1 par compétition avec leurs sites de liaison se trouvant à proximité ou chevauchant les sites de liaison par E2 (Demeret et al., 1997; Newhouse and Silverstein, 2001; Soeda et al., 2006; Stubenrauch et al., 1998b; Thierry and Howley, 1991). E2, liant le site numéro quatre, promeut l'augmentation du niveau des transcrits des oncogènes (Dong et al., 1994; Rapp et al., 1997; Steger and Corbach, 1997). Il est à noter que l'interruption du gène E2 lors de l'intégration de l'épisome dans le génome de l'hôte va initier la transcription active des oncogènes menant à l'accumulation excessive des protéines E6 et E7, un phénotype associé au cancer. Le degré d'affinité que possède E2 pour chacun de ces sites aura aussi un impact sur l'activité transcriptionnelle du régulateur des papillomavirus. Par exemple, E2 du VPH16 possède une très grande affinité pour le site 4 et une plus faible association pour les sites 1 et 2.

Ainsi, une basse concentration de E2 favorisera le site numéro 4 et une augmentation de la transcription sera remarquée tandis qu'une haute concentration de E2 inhibera la transcription des oncogènes (Sanders and Maitland, 1994). Malgré l'affinité et la spécificité de E2 pour ses sites de liaison dans le LCR, d'autres facteurs vont aussi influencer la modulation de la transcription de l'épisome viral. Ainsi, certaines protéines s'associent à des séquences spécifiques dans le LCR et vont activer ou inhiber la transcription selon l'état de différenciation cellulaire comme Sp1 et Sp3 (Apt et al., 1996). Il ne faut pas oublier l'état compacté de l'épisome viral par la présence de nucléosomes qui subiront des modifications par les histones-acétyltransférases (HAT) et déacétylases (HDAC) permettant ou pas la transcription. Finalement, la méthylation des cytosines des îlots CpG retrouvées dans le génome viral vont aussi influencer la transcription ainsi que la réplication virale. Il a été observée que la méthylation dans les E2BS empêche sa liaison et inhibe la transcription des oncogènes et que l'état de méthylation varie selon la différenciation cellulaire (Kim et al., 2003b).

Certains papillomavirus codent pour des versions tronquées de la protéine E2 qui contiennent le DBD de la protéine (E8^{E2C} et E2-TR). Ces protéines sont surtout associées à la répression de la transcription par leur capacité à lier l'ADN sans recruter les facteurs nécessaires à l'activation car le domaine d'interaction entre ces composants et E2, le TAD, est manquant. Le TAD est le domaine qui interagit avec l'hélicase E1 afin de promouvoir la réplication de l'épisome, ainsi qu'avec des facteurs cellulaires favorisant la transcription virale, comme la protéine Brd4 (Abbate et al., 2004; Abbate et al., 2006; Benson and Howley, 1995; Wu and Chiang, 2007). L'interaction entre la protéine E2 du VPB1 et Brd4 a été définie, dans un premier temps, essentielle à la ségrégation de l'épisome viral lors de la mitose (You et al., 2004; You et al., 2005). Des analyses subséquentes ont montré que cette interaction était aussi importante pour l'activation et la répression des gènes viraux (Baxter et al., 2005; McPhillips et al., 2006; Schweiger et al., 2006; Senechal et al., 2007;

Wu et al., 2006). Des études de mutagenèse ont permis de séparer les fonctions de réplication et de transcription de la protéine E2 et plus particulièrement, les substitutions de l'arginine 37 et de l'isoleucine 73 par une alanine, abolissent la capacité de E2 d'activer ou de réprimer la transcription sans affecter la réplication du génome viral (Abroi et al., 1996; Breiding et al., 1996; Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Ferguson and Botchan, 1996; Gossel et al., 1996; Nishimura et al., 2000; Sakai et al., 1996). De plus, ces mutations empêchent l'interaction entre les protéines Brd4 et E2, soutenant l'idée que Brd4 est un facteur essentiel à l'activité transcriptionnelle de E2 (Ilves et al., 2006; Senechal et al., 2007). Il ne faut pas oublier que ces deux résidus seraient aussi impliqués dans la formation d'un dimère de E2 favorisant le rapprochement des sites de liaison par E2 retrouvés dans le LCR, et d'activer la transcription virale (section 1.3.1.1). L'importance de cette surface d'interaction pour l'activité transcriptionnelle de E2, a poussé une équipe à produire un peptide codant pour le C-terminal de Brd4 qui lie spécifiquement la protéine E2 dans la région comprenant les résidus R37 et I73. L'ajout de ce peptide en présence des protéines E2 et Brd4 a pour effet d'affecter négativement la ségrégation et la transcription du génome viral tout en stabilisant la protéine E2, ouvrant la voie à une nouvelle approche thérapeutique contre les infections au VPH (Abbate et al., 2006; Gagnon et al., 2009; Schweiger et al., 2006).

Plusieurs études ont été entamées afin de découvrir si la protéine E2 des papillomavirus était en mesure d'influencer directement l'activité transcriptionnelle des gènes cellulaires. Entre autre, une équipe a analysé si la protéine E2 du VPB1 s'associait à des régions spécifiques des chromosomes humains. Ils ont faiblement exprimé la protéine E2 dans la lignée cellulaire C33A (cellules du col utérin) pour ensuite, effectuer une immunoprécipitation de la chromatine suivi d'une hybridation sur des puces d'ADN (chIP-Chip) contenant les régions promotrices de 23000 gènes. Ils concluent que la protéine E2 lie les régions transcriptionnellement actives, sans toutefois influencer le niveau de

transcription ainsi que le recrutement des autres facteurs de transcription (Jang et al., 2009). Aussi, cette même étude a observé la présence simultanée de la protéine E2 et du facteur cellulaire Brd4 dans les régions promotrices. Étant donné l'absence d'activité transcriptionnelle, ils concluent que cette interaction entre E2 et Brd4 au sein des promoteurs actifs assure que le génome viral est retenu dans les domaines actifs du noyau afin d'échapper à la répression génique (Jang et al., 2009). Une autre étude a analysé la présence et la fonctionnalité des sites de liaison par la protéine E2 du VPH11 (E2BS) au sein du génome humain. Leurs études informatiques ont indiqué que la plupart des sites sont retrouvés dans les régions répétées du génome et que leur séquence espaceur (N dans ACCgNNNNcGGT) est composée surtout de guanines et de cytosines (G et C) plutôt que des adénines et des thymines (Vosa et al., 2012). En utilisant E2 du VPH11 afin d'immunoprécipiter la chromatine, ils ont pu déterminer eux aussi, que E2 s'associait au niveau des régions transcriptionnellement actives de la chromatine. Par contre, cette liaison ne présentait que très peu ou pas d'effet sur la transcription des gènes cellulaires. Ils concluent que la préférence de E2 pour un domaine espaceur riche en adénines et thymines, assurait une liaison spécifique au génome viral plutôt qu'à l'ADN cellulaire empêchant ainsi, des changements importants dans la transcription des gènes cellulaires en réponse à la protéine virale (Vosa et al., 2012). Une autre analyse, a remarqué que le niveau d'interleukine-10 (IL-10) exprimé dans les cellules de l'épithélium du col utérin de patientes atteintes de dysplasie, était anormalement élevé comparativement à celui des cellules du col de l'utérus normal (Bermudez-Morales et al., 2008; Clerici et al., 1997; Diaz-Benitez et al., 2009; El-Sherif et al., 2001). Aussi, l'expression d'IL-10 est directement reliée au degré de sévérité des lésions utérines associées à une infection au VPH (Clerici et al., 1997). Ces indications suggèrent que l'IL-10 est produite par les cellules de l'épithélium du col utérin en réponse à une infection au VPH ou par l'entremise des protéines virales. Des analyses de la région régulatrice de l'IL-10 ont montré qu'en plus des sites de liaison de facteurs de transcription cellulaire, il y avait la présence d'un site de liaison par la protéine E2 des VPH (Kube et al., 1995). Récemment, une équipe a démontré

par retard sur gel que la protéine E2 du VPH s'associe à ce site dans la région de contrôle de l'IL-10 et que cette interaction résulte à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. De plus, la présence de E2 dans les cellules épithéliales du col de l'utérus induit une production du transcrite en ARNm de l'IL-10. Cette étude suggère que la protéine E2 serait responsable de l'augmentation de l'IL-10 dans les cellules infectées afin de créer un environnement privé d'une réponse immunitaire locale, un des rôles associés à l'IL-10 (Bermudez-Morales et al., 2011). De la même façon, la protéine E2 du VPH8 active la transcription du promoteur de la métalloprotéinase-9 de la matrice des kératynocytes humains (MMP9), une composante associée à la croissance tumorale des cancers de la peau (Akgul et al., 2011).

1.3.4.2 La réplication de l'ADN du génome viral

L'assemblage d'un complexe ternaire entre les protéines E1-E2 et l'origine virale est requis pour l'initiation de la réplication de l'ADN des papillomavirus. L'hélicase E1 monomérique possède une faible spécificité pour l'origine de réplication (Dixon et al., 2000). Cette caractéristique est causée par la dualité de ces 2 domaines : son domaine de liaison à l'ADN (OBD) lie spécifiquement les séquences de reconnaissance de E1 retrouvées dans le LCR, toutefois, l'interaction non-spécifique de son domaine hélicase empêche E1 de s'associer à l'origine de réplication (Titolo et al., 2003; Wilson et al., 2002). L'interaction entre E1 et E2 devient ici primordiale afin de permettre au domaine central de E1 de lier spécifiquement l'ADN au niveau de l'origine de réplication.

Une surface d'interaction a été définie entre le domaine ATPase/hélicase de la région C-terminale de E1 et le TAD de la protéine E2 (Abbate et al., 2004). Plus spécifiquement, des études de mutagenèse sur la protéine E2 ont permis d'identifier certains résidus essentiels à l'interaction E1-E2. Entre autre, le résidu hautement conservé

de la protéine E2, l'acide glutamique situé au centre de la troisième hélice- α du domaine N1 du TAD (E39 chez VPH11, -16, -31 et VPB1; E43 chez VPH18), est nécessaire à l'interaction avec la protéine E1. Ainsi, des substitutions par une alanine ou une glutamine au niveau de cet acide glutamique de E2, résultent une forte diminution de la réplication du génome viral (Ferguson and Botchan, 1996; Fradet-Turcotte et al., 2010b; Sakai et al., 1996; Storey et al., 1995; Wang et al., 2004). Une structure cristalline du complexe E1-E2 du VPH18 a confirmé ce résultat en montrant que le résidu E43 de E2 forme un pont salin avec l'arginine 454 (R454) située dans la région C-terminale de E1 (Abbate et al., 2004). Dans le cas de E2 du VPH11, en plus du résidu E39, la leucine 15 (L15), la tyrosine 19 (Y19) et la sérine 98 (S98) sont aussi requises pour l'assemblage du complexe E1-E2 au niveau de l'origine (Wang et al., 2004). Cette région d'interaction du TAD de E2 importante pour la réplication du génome, se situe sur la face opposée des résidus R37 et I73 qui eux, sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle de E2 (Abbate et al., 2006; Cooper et al., 1998; Sakai et al., 1996; Storey et al., 1995). Aussi, il est à noter que même si le domaine ATPase/hélicase de E1 est impliqué dans cet interaction, l'hydrolyse d'ATP n'est pas nécessaire à cette liaison. Lorsque le complexe E1-E2 est assemblé à l'origine de réplication, il y aurait le recrutement de nouvelles molécules de E1 afin de former dans un premier temps, un double dimère (tétramère) et/ou un double trimère, pour finalement former un double hexamère actif qui est en mesure de dérouler l'ADN. L'oligomérisation de l'hélicase E1, nécessite la liaison d'ATP au niveau de son domaine C-terminal afin de stabiliser l'interaction entre E1 et l'origine de réplication ainsi que pour permettre l'interaction entre les monomères de E1. L'association et/ou l'hydrolyse d'ATP par E1 provoquerait un changement conformationnel délogeant la protéine E2 du complexe d'initiation favorisant ainsi le déroulement de l'ADN par l'hélicase E1 (Abbate et al., 2004; Sanders and Stenlund, 1998, 2000, 2001; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001). La liaison de la protéine E2 au niveau de ses séquences de reconnaissance numéro un, deux et trois au sein de l'origine de réplication, est nécessaire pour une activation optimale de la réplication de l'ADN. Par contre, l'utilisation des sites un et deux

lors d'essais transitoires, s'est révélée suffisant pour obtenir un niveau satisfaisant de la réplication (Chiang et al., 1992; Remm et al., 1992; Russell and Botchan, 1995; Sverdrup and Khan, 1994, 1995; Titolo et al., 1999). La liaison de E2 aux trois sites va promouvoir la synthèse de l'épisome viral où le site numéro deux est le plus important pour accomplir cette fonction suivi du site un et enfin du trois (Chiang et al., 1992; Demeret et al., 1998; Lu et al., 1993; Newhouse and Silverstein, 2001; Remm et al., 1992; Stubenrauch et al., 1998b; Sverdrup and Khan, 1995). Ces interactions entre la protéine E2 et ses sites de liaison vont permettre à la protéine E1 de s'associer à l'origine de réplication de façon stable (figure 1.21). L'initiation de la réplication bidirectionnelle de l'ADN est entamée par l'hélicase ainsi que par le recrutement des protéines de la machinerie de réplication de l'hôte qui interagissent avec E1. Il y a entre autre, la protéine de réplication A (RPA), les topoisomérase I et le complexe de la polymérase alpha/primase (Clower et al., 2006a; Han et al., 1999; Loo and Melendy, 2004; Park et al., 1994). Ainsi, en jouant un rôle auxiliaire mais primordial, la protéine E2 permet la formation du complexe ternaire E1-E2 avec l'origine de réplication, ce qui initie la réplication du génome viral.

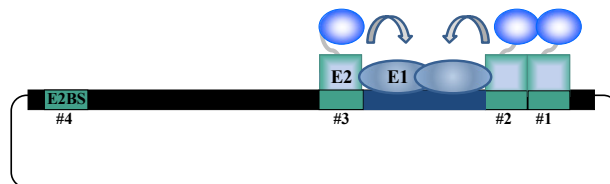


Figure 1.21. Fonction de la protéine E2 dans la réplication du génome viral.

La protéine E2 des papillomavirus permet le recrutement de l'hélicase virale E1 au niveau de l'origine de réplication, ce qui initie la réplication du génome viral.

1.3.4.3 La ségrégation du génome viral

Certains virus ont développé un mécanisme robuste afin de retenir leur génome dans le noyau des cellules infectées en division. Chez les papillomavirus, cette fonction est régie

par la protéine E2. Suite à l'infection, le génome des papillomavirus se réplique à faible nombre de copies et est maintenu en tant qu'élément répliatif extrachromosomique. Sous cette forme épisomale, l'ADN sera répliqué en même temps que celui de l'hôte. Par sa capacité à se lier à plusieurs sites spécifiques retrouvés dans le LCR via son DBD, E2 va s'attacher à l'épisome d'une part, et d'autre part, s'associera aux chromosomes ou aux fuseaux mitotiques par son TAD, avec ou sans l'intermédiaire de partenaires d'interaction (Abroi et al., 2004; Bastien and McBride, 2000; Ilves et al., 1999; Lehman and Botchan, 1998; Skiadopoulos and McBride, 1998; Van Tine et al., 2004). Ce mécanisme assure la propagation et le maintien du génome viral, pour une longue période, dans le noyau des cellules infectée et dans celui des cellules filles après chaque division cellulaire (Abroi et al., 2004; Piirsoo et al., 1996). Ce processus aide à conserver une infection persistante dans l'hôte en s'infiltrant dans les cellules basales qui sont le réservoir de cellules infectées ayant conservées leur capacité à se diviser et qui vont se différencier tout en migrant vers les couches supérieures de l'épithélium en propageant le virus.

Pour le VPB1, 12 sites de liaison par E2 sont retrouvés dans le LCR et forment l'élément de maintien du génome (MME, *minichromosome maintenance element*). La liaison de E2 par son DBD à au moins 8 de ces sites ainsi que l'origine de répliation minimale, sont suffisantes pour le maintien à long terme de l'épisome viral dans une cellule (Piirsoo et al., 1996). Le TAD de E2 du VPB1 va, quant à lui, s'associer aux chromosomes mitotiques de l'hôte tout au long de la mitose, en interagissant avec le domaine C-terminal de l'isoforme long de la protéine Brd4 (Abroi et al., 2004; Bastien and McBride, 2000; Skiadopoulos and McBride, 1998; You et al., 2004; Zheng et al., 2005). Brd4 contient deux bromodomains qui s'associent aux histones acétylées des nucléosomes lui conférant une interaction avec la chromatine tout au long de la mitose. Il a été démontré que la forme dimérique de la protéine E2 est requise pour une interaction efficace avec Brd4 et avec les chromosomes de l'hôte (Cardenas-Mora et al., 2008). Ainsi, Brd4 va servir de pont entre le

complexe viral E2-épisode et l'ADN de l'hôte en mitose et permettre la ségrégation du génome viral (Abbate et al., 2006; Baxter et al., 2005; You et al., 2004).

Oliveira *et al.* ont fait des études de localisation de treize protéines E2 animales et humaines et ont découvert que neuf des protéines E2 étudiées, s'associent aux chromosomes mitotiques tout au long de la mitose comme la protéine E2 du VPB1 (Oliveira et al., 2006). Ils ont noté que certaines protéines E2 s'associaient de façon aléatoire aux chromosomes en mitose tandis que pour d'autres, une interaction plus localisée était observée. Cette différence a mené McPhillips *et al.* à découvrir que malgré l'association avec les chromosomes mitotiques et leur capacité d'interagir avec Brd4, les protéines E2 de différents genres n'utilisaient pas la protéine Brd4 comme intermédiaire d'interaction. De plus, l'utilisation de la protéine E2 du VPH31 portant les mutations empêchant l'interaction avec Brd4, était tout de même associées aux chromosomes mitotiques (McPhillips et al., 2006). Ainsi, certaines protéines E2 n'utilisent pas la protéine Brd4 pour leur association aux chromosomes mitotique. C'est le cas de E2 du VPH8, qui lie la région péricentromérique des chromosomes, et plus précisément, au niveau des locus d'ADN ribosomiaux (McPhillips et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Poddar et al., 2009). Des études subséquentes ont révélé que les 16 derniers acides aminés de la région charnière de la protéine E2 du VPH8 en présence du domaine de liaison à l'ADN, sont suffisants pour lier les chromosomes mitotiques (Poddar et al., 2009). Cette section de la région charnière contient un motif arginine-X-X-sérine (RXXS) où l'arginine et la sérine sont toutes deux requises pour l'association avec les chromosomes et ainsi, permettent la ségrégation de l'épisode viral dans les cellules infectées en division (Sekhar et al., 2010).

Oliveira *et al.* ont aussi analysé la localisation des protéines E2 du genre α -papillomavirus (VPH11, -16, -31 et -57). Ces dernières divergent du lot, en s'associant aux chromosomes mitotiques uniquement au stade précoce (prophase) et tardif (télophase) de la

mitose. Ces protéines E2 n'étaient pas visibles lors de la métaphase et l'anaphase, ou lorsqu'elles l'étaient, elles se situaient dans le cytosol. Oliveira *et al.* expliquent cette différence par l'absence d'un facteur viral ou cellulaire qui permettrait de stabiliser l'association de E2 aux chromosomes mitotiques (Oliveira et al., 2006). Ce résultat diffère de celui obtenu par Van Tine *et al.* où la protéine E2 du VPH11 est associée aux fuseaux mitotiques via une partie de son DBD (Van Tine et al., 2004). Cette association a été définie comme étant dynamique, identique à celle observée chez les protéines dites de passage, s'associant aux fuseaux mitotiques lors des phases tardives de la mitose afin de se retrouver dans les cellules filles après la division cellulaire (Dao et al., 2006). De façon similaire, il a été montré par microscopie qu'une faible quantité de la protéine E2 du VPB1 co-localisait au niveau des fuseaux mitotiques en s'associant avec la protéine MKlp2 (*mitotic kinesin-like protein 2*) (Yu et al., 2007). La fonction de cette protéine motrice est de transporter ou bien, de positionner des composantes cellulaires le long des microtubules lors de la mitose. Ainsi, il est possible que la protéine E2 du VPB1 se lie à MKlp2 afin de favoriser la ségrégation du génome viral. D'autres protéines cellulaires semblent être requises pour le partitionnement du génome viral. Tout d'abord, la protéine TopBP1 (*topoisomerase II binding protein 1*) est impliquée à différents niveaux lors de la transcription, la réplication de l'ADN et les processus de réparation de l'ADN (revue dans (Sokka et al., 2010)). Dans un premier temps, l'interaction entre la protéine E2 du VPH16 et le domaine C-terminal de TopBP1 a été identifiée et les auteurs avaient suggéré que leur association modulait les fonctions de transcription et de réplication de E2 (Boner and Morgan, 2002; Boner et al., 2002). Par la suite, une autre étude a montré que ces deux protéines co-localisaient sur les chromosomes mitotiques uniquement à un stade tardif de la mitose. Ces études suggèrent que la protéine TopBP1 aurait un rôle de récepteur pour E2 au niveau des chromosomes mitotiques et que l'association entre ces deux protéines serait importante dans la ségrégation du génome viral (Donaldson et al., 2007). L'hélicase ChlR1 est une autre protéine d'importance qui a été identifiée comme étant nécessaire à la ségrégation de l'épisome des papillomavirus. Cette protéine est associée au complexe de

cohésines impliqué dans la stabilisation des chromatides sœurs lors de la mitose (Hirota and Lahti, 2000; Parish et al., 2006c). Parish *et al.* ont démontré que la substitution du tryptophane 130 par une arginine (W130R) chez la protéine E2 du VPB1 empêchait l'interaction avec ChlR1 et ne permettait plus l'association de E2 avec les chromosomes mitotiques, malgré la capacité de E2 à lier Brd4 et TopBP1 (Feeney et al., 2011). Aussi, la diminution de la quantité de ChlR1 par ARN interférant, menait à la perte du génome viral (Parish et al., 2006a). Finalement, des études de FRET ont permis de définir que le complexe E2-ChlR1 s'associait uniquement au cours de la phase G1 et S du cycle cellulaire, au début de la mitose, suggérant que l'hélicase ChlR1 a pour rôle de charger le complexe E2-épisode sur les chromosomes mitotiques afin de permettre la ségrégation lors de la division cellulaire (Feeney et al., 2011). Cette interaction serait rompue pour permettre l'association de E2 à une autre protéine afin de rester attachée aux chromosomes en mitose.

Malgré ces variations, le mécanisme de ségrégation des génomes des papillomavirus reste commun et est véhiculé par la protéine E2 en association avec les chromosomes mitotiques, en complexe ou non avec d'autres partenaires cellulaires (Figure 1.21).

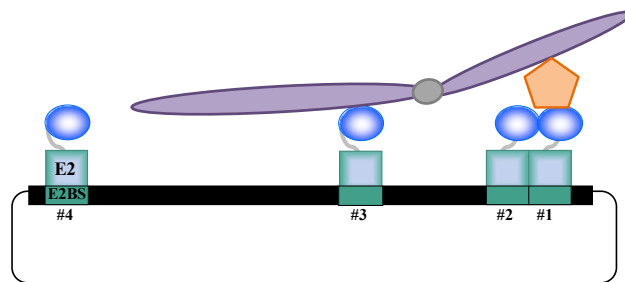


Figure 1.22. La ségrégation du génome viral par la protéine E2.

En liant l'épisome viral par son DBD et les chromosomes ou les fuseaux mitotiques via son TAD, la protéine E2 des papillomavirus permet la répartition du génome viral dans les cellules filles lors de la mitose. Pour plusieurs VP, la ségrégation de l'ADN viral se fait par l'interaction entre E2 et la protéine cellulaire Brd4, mais d'autres partenaires de E2 sont impliqués dans cette activité.

1.3.4.4 L'apoptose

Il est connu que la surexpression de la protéine E2 des VPH à haut risque, telles que les VPH16 et -18, induit l'apoptose, par contre, selon les études, ce facteur de transcription viral y est impliqué de différentes façons. Tout d'abord, il a été démontré que l'expression cytoplasmique de la protéine E2 des VPH à haut risque tels que VPH16 et -18, induit l'apoptose (Blachon et al., 2005; Klucsevsek et al., 2007). De plus, la production de la protéine E2 d'un virus à faible risque oncogénique dans le cytoplasme va aussi induire l'apoptose, suggérant que la localisation cytoplasmique de la protéine E2 est un pré-requis pour mener à la mort cellulaire programmée (Blachon et al., 2005).

La surexpression de la protéine E2 dans les cellules transformées par un VPH de haut risque mais où le gène codant pour E2 est interrompu telles que les cellules SiHa et HeLa, va induire l'apoptose (Desaintes et al., 1997; Parish et al., 2006b; Sanchez-Perez et al., 1997). La mort cellulaire programmée est amorcée lorsque la protéine E2 lie ses sites de liaison dans le LCR, empêchant ainsi les facteurs de transcription cellulaire TBP et Sp1 de

s'associer à la région de contrôle. Cette liaison a pour effet de réprimer la transcription des oncogènes E6 et E7 et permettre l'accumulation du suppresseur de tumeur p53 qui déclenche l'apoptose (Demeret et al., 1994; Desaintes et al., 1997; Desaintes et al., 1999; Dong et al., 1994; Dostatni et al., 1991; Dowhanick et al., 1995; Tan et al., 1992). Il a été aussi démontré que la protéine E2 des VPH16, -18 et -31 peut provoquer l'apoptose dans les cellules non-infectées par un VPH. En effet, Frattini *et al.* ont utilisé un adénovirus recombinant exprimant la protéine E2 du VPH31 qu'ils ont introduite dans les cellules CIN 612-9E ayant la capacité de maintenir l'épisome viral sur une longue période. Cette surexpression de E2 a déclenché un arrêt du cycle cellulaire en phase S avec l'apparition de cellules ayant moins d'ADN, une caractéristique de l'apoptose (Frattini et al., 1997). Webster *et al.* ont confirmé ces résultats en observant une augmentation des cellules apoptotiques dans les lignées non-transformées par des VPH mais dans lesquelles E2 est exprimée, suggérant que l'activité pro-apoptotique de E2 est indépendante du type cellulaire et des autres facteurs viraux tels les oncogènes (Webster et al., 2000). De plus, même si la protéine E2 du VBP1 exprimée dans les cellules HeLa génère la stabilisation de p53, la version tronquée du domaine N-terminal de E2 qui réprime l'expression des oncogènes, E2-TR, n'est pas en mesure d'initier l'expression de p53 et d'induire l'apoptose (Desaintes et al., 1997; Desaintes et al., 1999). Des analyses subséquentes ont montré que seul l'expression du domaine de transactivation de E2 est responsable de l'induction de l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle ainsi que la présence de la protéine p53 (Demeret et al., 2003; Desaintes et al., 1999; Webster et al., 2000).

Le déclenchement de la mort cellulaire programmée serait dépendant de la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, la protéine E2 du VPH18 active la caspase 8 par une interaction directe entre les acides aminés 27 à 53 de la deuxième hélice- α du domaine N-terminal de E2 et le domaine effecteur (*death effector domain*, DED) porté par la caspase 8 (Blachon et al., 2005; Demeret et al., 2003; Thierry and Demeret, 2008). Cette interaction

provoque l'oligomérisation de la caspase 8 et amorce une cascade menant à la mort cellulaire. Une autre étude a démontré, par l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase 8, le Z-IETD-FMK, que l'induction de l'apoptose par la protéine E2 du VPH16 vient de l'activation de la caspase 3 via la caspase 8 (Wang et al., 2011). De façon un peu différente à ce qui avait été observé avec E2 du VPH18, ils ont observé par co-immunoprécipitation, une interaction entre E2 et c-FLIP. c-FLIP est un régulateur de la mort cellulaire impliqué dans la voie de signalisation des récepteurs de l'apoptose Fas/FasL. Le recrutement de c-FLIP au niveau du complexe de signalisation de la mort cellulaire (DISC, *death-inducing signaling complex*, complexe regroupant les domaines effecteurs) des récepteurs Fas, va inhiber l'activation de la caspase 8 en l'empêchant de s'associer au récepteur. Leur données suggèrent que l'interaction entre E2 et c-FLIP abolie les effets anti-apoptotiques de c-FLIP activant la caspase 8 et rendant ainsi la cellule sujette à l'apoptose via la voie Fas/FasL (Wang et al., 2011).

D'autres analyses ont montré une induction de l'apoptose mais contrairement à ce qu'il vient d'être vu, par une voie dépendante du suppresseur de tumeur p53 (Massimi et al., 1999; Parish et al., 2006b; Webster et al., 2000). Dans un premier temps, des essais d'interaction protéine-protéine *in vitro* de « GST pull-down » et de « far western », ainsi qu'*in vivo* par co-immunoprécipitation, ont démontré que le domaine de liaison à l'ADN de la protéine E2 du VPH16 interagit avec la protéine p53 (Massimi et al., 1999; Parish et al., 2006b). Cette interaction n'influence pas l'activité transcriptionnelle ainsi que la capacité à lier l'ADN des deux protéines. Aussi, le DBD de la protéine E2 portant les substitutions en alanines du tryptophane 341 (W341A) et des acides aspartiques 344 (D344A) et 338 (D338A) n'interagit plus avec p53 *in vitro* (Parish et al., 2006b). Cette protéine mutante est en mesure d'induire l'apoptose dans les lignées cellulaires transformées par le VPH mais, contrairement à la protéine sauvage, elle est incapable d'initier la mort cellulaire dans les cellules non-transformées par un VPH (Parish et al., 2006b). Ces données sur l'induction de

l'apoptose de façon dépendante de la protéine p53 selon le type cellulaire, suggèrent qu'il existerait deux mécanismes distincts véhiculés par E2. Le premier nécessiterait l'interaction directe entre le DBD de E2 et p53 dans les cellules transformées ou non par un VPH mais exprimant le suppresseur de tumeur. Le second utiliserait plutôt la réduction de l'expression des oncogènes par la liaison de E2 au niveau du LCR situé au sein du génome viral (Parish et al., 2006b).

Afin de réconcilier la manière que E2 utiliserait pour promouvoir l'apoptose soit de façon dépendante ou indépendante de p53, Bellanger *et al.* suggèrent que la voie dépendante de p53 s'effectuerait uniquement dans les cellules exprimant le suppresseur de tumeur, tandis que pour l'activation de la voie extrinsèque, où le TAD de E2 est requis, l'apoptose s'amorcerait autant dans les cellules exprimant ou pas p53 (Bellanger et al., 2011). À ce jour, l'implication de cette fonction de la protéine E2 dans le cycle viral n'est pas bien comprise. L'hypothèse la plus probable est que lorsque la protéine est exprimée en plus grande quantité au niveau des couches supérieures de l'épithélium, elle provoquerait l'apoptose des cellules et ainsi favoriserait la relâche des virions dans l'environnement.

1.3.4.5 La régulation du cycle cellulaire et de la mitose

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases que subit une cellule entre deux divisions. La phase G₀/G₁ est l'étape de croissance cellulaire où le contenu du cytoplasme augmente, suivra la phase S où la duplication de l'ADN s'effectue, la phase G₂ est une autre étape de croissance et de préparation à la division cellulaire et finalement la dernière phase, la mitose, où l'on observe la formation de deux cellules filles. Afin d'assurer la succession des quatre phases du cycle, des complexes de kinases cyclines-dépendantes (Cdk) ainsi que d'autres molécules (des inhibiteurs de Cdk, entre autre) vont intervenir au niveau de différents mécanismes de surveillance du cycle et arrêter le cycle si des dommages à l'ADN ou des défauts mitotiques sont révélés.

Un des premiers effets sur le déroulement du cycle cellulaire observés lors de l'introduction de la protéine E2 dans les cellules transformées par un VPH, a été un arrêt de la croissance cellulaire dans la phase G₁ (Desaintes et al., 1997; Dowhanick et al., 1995; Goodwin and DiMaio, 2000; Goodwin et al., 1998; Thierry et al., 2004). Ce résultat découle de la répression de la transcription des oncogènes E6 et E7, par la liaison de E2 au niveau du LCR et de son interaction avec la machinerie de transcription, ce qui a pour conséquence de réactiver les voies de signalisation du suppresseur de tumeur p53 et de la protéine du rétinoblastome pRb (Bernard et al., 1989; Demeret et al., 1997; Desaintes et al., 1997; Dowhanick et al., 1995; Goodwin and DiMaio, 2000; Goodwin et al., 1998; Thierry and Yaniv, 1987). Une implication directe de E2 dans la régulation du cycle cellulaire a été observée en infectant des kératinocytes humains immortalisés ou non à l'aide d'un adénovirus recombinant exprimant la protéine E2 du VPH31. Ils ont remarqués que les cellules infectées avec l'adénovirus produisant E2, certaines étaient en arrêt en phase S et d'autres en G₂/M (Frattini et al., 1997). Une autre analyse utilisant la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme système d'étude a aussi décrit un arrêt en phase G₂/M dans les cellules exprimant la protéine E2 du VPH16 (Fournier et al., 1999). Par cytométrie

en flux, il a été démontré qu'un arrêt du cycle cellulaire en G2/M survenait lorsque la protéine E2 des VPH à haut risque, ou leur TAD, étaient exprimés dans des cellules transformées par le VPH (cellules HeLa) ou non (cellules Saos-2 et MRC5). Une analyse approfondie a montré que les cellules produisant E2 étaient plutôt retardées au cours de la prophase et que l'arrêt du cycle cellulaire se produisait lors de la métaphase où un niveau élevé de l'activité du complexe cycline B/Cdk1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de l'histone 3 étaient observés (Bellanger et al., 2005). De plus, ils ont noté l'existence d'une interaction entre Cdh1 et Cdc20, des activateurs de l'APC/C (complexe ubiquitine E3-ligase responsable de la transition métaphase/anaphase lors de la mitose), et la protéine E2 des VPH16 et 18. Plus précisément, E2 du VPH18 semble relocaliser Cdh1 dans les structures insolubles ce qui empêcherait Cdh1 de recruter les protéines ciblées pour la dégradation par l'APC/C et de retarder la sortie en mitose (Bellanger et al., 2005).

Dans cette même étude il a été observé que les protéines E2 du VPH16 et -18 pouvaient aussi induire un phénotype anormal dans les cellules en mitose. En effet, bien que la plupart des cellules exprimant la protéine E2 semblaient subir un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, d'autres par contre, progressaient dans le cycle. Ces dernières possédaient des caractéristiques telles qu'une ségrégation aberrante avec perte du matériel chromosomique lors de l'anaphase, plus de deux centrosomes ainsi que de la polyploïdisation. L'observation de ces phénotypes suggère que la protéine E2 des VPH à haut risque pourrait contribuer au potentiel oncogénique des papillomavirus. Dernièrement, une étude a montré que la protéine E2 du VPH8, un VPH associé au cancer de la peau, a la capacité d'induire la transformation cellulaire car son expression, sans la présence des autres protéines virales, a induit des tumeurs sur la peau d'une souris transgénique (Pfefferle et al., 2008). Ainsi il a été proposé que l'instabilité génomique induite par E2 dans les étapes précoces du cycle viral, serait la première étape de la progression vers le

cancer, avant l'expression des oncogènes E6 et E7 (Bellanger et al., 2005; Bellanger et al., 2011; Pfefferle et al., 2008).

1.3.5 Les partenaires d'interaction de la protéine E2

Le facteur de transcription E2 des papillomavirus est une protéine multifonctionnelle ayant des activités d'activation et de répression de la transcription et de ségrégation en interagissant avec certains facteurs cellulaires. De plus, E2 est impliqué dans le cycle viral en s'associant avec d'autres protéines virales afin de promouvoir une infection.

Comme nous l'avons vu précédemment, E2 s'associe à la protéine E1 des papillomavirus afin d'augmenter la liaison de l'hélicase à l'ADN de l'origine de réplication et initier la réplication du génome viral. Une analyse *in vitro* a montré une interaction entre E2 du VPH11 et la topoisomérase I une enzyme requise pour la relaxation de l'ADN lors de la réplication. Ainsi, les auteurs suggèrent que cette interaction permettrait de créer un environnement favorable à la réplication du génome virale (Clower et al., 2006b). D'autres protéines virales ont aussi la capacité de s'associer au facteur de transcription E2. Une co-expression des protéines E2 et E1^{E4} du VPH16 effectuée dans les cellules Cos-7 a montré une augmentation de la quantité de la protéine E1^{E4} en présence de E2. Aussi, l'expression de la protéine E1^{E4} prévient la dégradation de la protéine E2. Cette augmentation de la stabilité de E2 semble être associée à une relocalisation au niveau du cytoplasme suite à une interaction via le TAD de E2 et le domaine de dimérisation en C-terminal de E1^{E4}, suggérant une implication de la protéine E1^{E4} dans la régulation des activités de E2 au sein du cycle viral (Davy et al., 2009). La liaison directe entre les protéines E2 et E7 stabilise l'expression de l'oncogène et relocalise la protéine E7 dans les fractions insolubles de la cellule, possiblement au niveau de la chromatine (Gammoh et al., 2006; Gammoh et al., 2009b; Smal et al., 2009). Ainsi, cette interaction a un effet direct sur

les fonctions oncogéniques de la protéine E7 dont la stabilisation de la protéine pRb et la réduction du nombre de cellules ayant une quantité anormale de centrosomes (Gammoh et al., 2009b). Une autre étude a démontré une interaction directe *in vitro* et *in vivo* entre la protéine E2 du VPH16 et l'oncogène E6 des VPH16 et -18 (Grm et al., 2005). Cette interaction affecte les activités des deux protéines telles qu'un changement de la localisation cellulaire ainsi que la perte de la spécificité envers les substrats à motif PDZ par la protéine E6. L'activité transcriptionnelle de la protéine E2 est légèrement stimulée. Par contre, cette interaction a un impact sur la capacité de E2 à initier la réplication car il a été observé que le complexe E2-E6 inhibe la réplication de l'épisome viral (Grm et al., 2005). En plus du rôle de la régulation de la transcription des oncogènes, les associations entre E2 et E6/E7 mettent en lumière une autre conséquence de la perte du facteur de transcription lors de l'intégration de l'épisome dans le génome, et laissent présager que E2 a une responsabilité majeure dans la régulation du cycle viral. Une autre protéine des VPH avec laquelle E2 se lie est la protéine mineure de la capsid, L2. Cette interaction semble rediriger E2 vers les domaines PML et bien qu'aucun effet n'ait été observé au niveau de la réplication de l'ADN, l'activité de transcription de E2 est inhibée (Day et al., 1998; Okoye et al., 2005). Aussi, lorsque le virus atteint les étapes tardives de son cycle, il a été observé que l'activité transcriptionnelle de E2 est diminuée en faveur d'une augmentation de l'amplification de l'ADN afin de faciliter la production de nouveaux virions. De plus, comme L2 est connu pour recruter les composantes de la capsid au niveau des PML, et que E2 se lie spécifiquement au génome viral, nous pouvons imaginer que leur interaction permet de regrouper les éléments essentiels à la formation de virions.

Les fonctions de la protéine E2 des papillomavirus en tant qu'activateur et répresseur de la transcription sont le résultat d'interaction avec les sites consensus retrouvés dans le LCR ainsi qu'avec plusieurs facteurs cellulaire spécifiques. Certains font parti du groupe des histones acétyltransférases (HAT), qui permettent l'activation de la transcription

comme pCAF, p300/CBP, et AMF-1/Gps2 où leur interaction avec E2 a été définie *in vitro* et *in vivo* (Breiding et al., 1997; Lee et al., 2002a; Lee et al., 2000a; Muller et al., 2002; Peng et al., 2000). D'autres sont des composantes de la machinerie de transcription (TFIIB, TFIID (TAF1 et 7), TBP) (Benson et al., 1997; Centeno et al., 2008; Enzenauer et al., 1998; Rank and Lambert, 1995; Steger et al., 1995; Yao et al., 1998) ou bien des éléments de remodelage de la chromatine (hSNF5, Brahma (hBrm) et hNap-1) qui, de concert avec la protéine E2, peuvent augmenter le niveau de la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle des sites de liaison par E2 (Cha and Seo, 2011; Kumar et al., 2007; Rehtanz et al., 2004). D'autres études ont aussi démontré que la protéine E2 des VPH peut interagir avec des facteurs impliqués dans la régulation de la différenciation des kératinocytes tels C/EBP α et β , permettant de créer un environnement propice à l'infection virale (Hadaschik et al., 2003).

La régulation de l'expression génique nécessite aussi la coopération et l'association de E2 avec le facteur Sp1 qui reconnaît des sites spécifiques dans le LCR chez la plupart des papillomavirus (Li et al., 1991; Steger et al., 2002). Comme il a été mentionné, chez les papillomavirus infectant les muqueuses, la liaison par E2 aux sites 1 et 2 dans le LCR va générer une compétition avec les facteurs Sp1 et TBP au niveau du promoteur et une répression de la transcription des oncogènes sera observée (Dong et al., 1994). Par contre, l'interaction directe et synergique permet à la protéine Sp1 de recruter E2 au niveau de promoteur ne possédant pas de site de liaison par E2 (Li et al., 1991). Ainsi, Steger *et al.* ont démontré que la protéine E2 du VPH8 peut activer la transcription de l'inhibiteur de CDK, la protéine p21, en s'associant à Sp1 et au promoteur de p21 qui contient plusieurs sites de liaison par Sp1. Par contre, l'initiation de la transcription à partir de ce promoteur nécessite la région charnière de E2 du VPH8 tandis que pour des promoteurs contenant des sites de liaison par E2 des VPH18 et VPB1, il semble que le TAD est requis pour l'interaction avec Sp1 (Steger et al., 1995; Steger et al., 2002). Cette différence viendrait de

la nécessité de la présence d'un autre facteur interagissant avec la région charnière de E2 du VPH8 tel p300, afin de promouvoir la transcription du promoteur du gène de p21 (Steger et al., 2002; Xiao et al., 2000).

D'autres co-activateurs de la transcription s'associent au DBD de la protéine E2 du VPH18 comme le suppresseur de tumeur BRCA1 et la polymérase I poly(ADP-ribose) ou PARP (Kim et al., 2003a; Lee et al., 2002b). Lorsque des bris d'ADN surviennent, cette polymérase transfère la partie ADP-ribose à des protéines impliquées dans l'architecture de la chromatine et le métabolisme de l'ADN. Par contre, PARP semble avoir un effet positif sur la transcription au cours du cycle cellulaire normal, indépendamment des dommages à l'ADN. Par des essais *in vitro* et des co-immunoprécipitation, l'interaction entre E2 et PARP a été révélée. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (chIP) et de retard sur gel ont montré que PARP était recrutée par E2 au niveau de promoteurs contenant des sites de liaison par E2, et que la transcription du gène de la luciférase sous le contrôle de ces mêmes promoteurs, était augmentée en présence de PARP (Lee et al., 2002b).

D'autres protéines associées plutôt à la voie protéolytique dépendant des ubiquitines et du protéasome (UPS pour *ubiquitine-proteasome system*) ce sont révélées comme des partenaires de E2 et favorisant son activité transcriptionnelle. Dans ce groupe, nous retrouvons l'ubiquitine ligase Mdm2, la protéine Tax1BP1 et une protéine interagissant avec le récepteur nucléaire, NRIP (Chang et al., 2011; Gammoh et al., 2009a; Wang et al., 2009). Bellanger *et al.* ont, quant à eux, démontré que le niveau de la protéine E2 du VPH18 variait au cours du cycle cellulaire. Ils ont associé ce changement à l'interaction de E2 avec Skp2 du complexe ubiquitine-ligase SCF. De plus, ils ont montré que E2 était stabilisée en absence de Skp2, suggérant que SCF^{Skp2} est le complexe E3 ligase impliqué dans la dégradation de E2 (Bellanger et al., 2010). Dans le même ordre d'idée, Zheng *et al.* ont associé l'état de poly-ubiquitination de E2 et sa dégradation dépendamment de la phase

du cycle cellulaire, à un autre complexe E3 ligase, celui-ci contenant la culline 3. Ils ont aussi démontré l'existence d'une interaction entre E2 et la culline 3 et observent que cette association serait compromise en présence du C-terminal de Brd4 (Zheng et al., 2009).

Outre le fait que E2 réprime la transcription en s'associant aux sites 1 et 2 du LCR, le mécanisme de répression de l'expression des oncogènes ainsi que les interactions entre E2 et des facteurs cellulaires empêchant la transcription sont moins bien connus. Récemment, des cellules C33A exprimant la protéine E2 du VPH16 ou du VPB1 et dans lesquelles un vecteur portant le gène de la luciférase sous le contrôle du LCR du VPH18, ont été utilisées pour un criblage d'une banque de petits ARN interférant (siRNA). La réduction de la quantité de E2 permettait une dé-répression du LCR et en présence du facteur viral, une répression de la transcription était détectée. Ainsi, les auteurs ont pu déterminer quels gènes codant pour une protéine cellulaire pouvaient augmenter l'expression de la luciférase malgré la présence de E2 (Smith et al., 2010). De cette façon, ils ont pu identifier les protéines EP400, une composante des complexes histones-acétylase, SMCX connue pour être une dé-méthylase d'histone associée à la répression de la transcription et finalement, la protéine Brd4 qui avait déjà été associée à la répression transcriptionnelle des VPH (Smith et al., 2010; Wu et al., 2006). Les auteurs ont pu démontrer que les protéines SMCX et EP400 forment un complexe avec la protéine E2 et que Brd4, SMCX et EP400 ont un effet additif sur la répression de la transcription dépendante de la protéine E2 (Smith et al., 2010). Comme nous l'avons vu précédemment, l'implication de la protéine E2 dans l'apoptose a aussi révélé l'association entre E2 et le domaine effecteur porté par la caspase 8, c-FLIP ainsi qu'avec le suppresseur de tumeur p53. Cette dernière interaction semble aussi inhiber la réplication du génome ainsi que moduler l'activité transcriptionnelle de E2 (Brown et al., 2008; Massimi et al., 1999). Une autre étude avait révélée une nouvelle fonction de E2 du VPH5 soit un rôle possible dans la maturation des ARNm via

l'interaction entre la région charnière de E2 et ASF/SF2, SC35, U1-70 kD et U5-100 kD (voir la section 1.3.1.2, (Lai et al., 1999)).

La protéine E2 est aussi requise pour le maintien à long terme des génomes viraux dans les cellules répliquatives en s'associant aux chromosomes mitotiques. Pour plusieurs papillomavirus, la protéine qui permet de faire le pont entre E2 et les chromosomes mitotiques, est Brd4 (Abroi et al., 2004; Bastien and McBride, 2000; Ilves et al., 1999; Skiadopoulos and McBride, 1998; You et al., 2004). Brd4 est un membre de la famille des BET qui, chez les eucaryotes, contient deux bromo-domaines BDI et BDII (B) et un domaine extra terminal (ET) (Figure 1.22) (Florence and Faller, 2001).

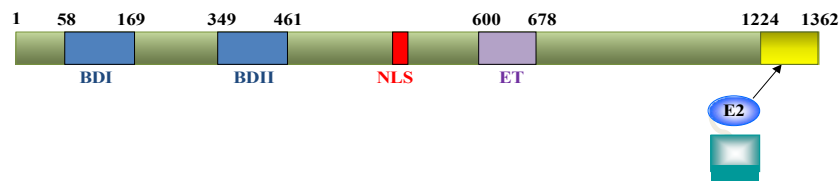


Figure 1.23. Représentation de l'isoforme long de Brd4.

Brd4 est une protéine cellulaire membre de la famille BET qui est caractérisée par la présence de deux bromo-domaines (BDI et BDII) et d'un domaine extra terminal (ET) permettant l'interaction avec d'autres protéines. Brd4 est une protéine nucléaire ayant une affinité pour les histones acétylées des nucléosomes. Le TAD de la protéine E2 de plusieurs types de VP lie Brd4 à son C-terminal.

Une caractéristique unique aux protéines à bromo-domaines de la famille BET est leur capacité de s'associer aux chromosomes en interphase et en mitose en liant les résidus lysines acétylées des histones H3 et H4. La reconnaissance de cette empreinte génétique par Brd4 servirait à assurer l'initiation de l'expression des gènes impliqués dans la phase G1 dans les cellules nouvellement divisées (Dey et al., 2003; Dey et al., 2009; Matangkasombut and Buratowski, 2003; Mochizuki et al., 2008). BDI et BDII vont être

aussi impliqués dans l'interaction avec des protéines autres que les histones afin de réguler la transcription, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Le domaine ET sert de module d'interaction protéine-protéine comme par exemple entre Brd4 et la protéine virale LANA-1 du virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi, (Ottinger et al., 2006; You et al., 2006). L'extrémité C-terminale de Brd4 est la région d'interaction avec le TAD d'un dimère de E2, et pour certains papillomavirus cette association va promouvoir la ségrégation de l'épisome viral (Cardenas-Mora et al., 2008). Par contre, comme il a été décrit antérieurement, le maintien de l'épisome par E2 n'est pas nécessairement lié à l'interaction avec Brd4 par tous les types de VPH (section 1.3.4.3). Effectivement, chez certain papillomavirus, E2 va s'associer directement aux chromosomes mitotiques au niveau des locus d'ADN ribosomiaux via la région charnière et le DBD (Sekhar et al., 2010). D'autres vont plutôt s'associer aux fuseaux mitotiques de la cellule en division (Van Tine et al., 2004; Yu et al., 2007) ou bien vont interagir avec d'autres facteurs cellulaires telles que la protéine TopBP1 (*topoisomerase II binding-protein 1*), ChlR1 (*chromosome loss-related protein 1*) ou MKLp2 (*mitotic kinesin-like protein 2*) (voir section 1.3.4.3 (Donaldson et al., 2007; Parish et al., 2006a; Yu et al., 2007)).

Plus récemment, plusieurs groupes ont déterminé que la protéine Brd4 interagissait avec le TAD de E2 au niveau des résidus R37 et I73 reconnus pour être nécessaires à l'activité transcriptionnelle de E2. Dû à ce fait, il a été établi que cette interaction est aussi requise pour promouvoir la régulation de la transcription par E2 (Abbate et al., 2006; Baxter et al., 2005; Ilves et al., 2006; McPhillips et al., 2006; Schweiger et al., 2006; Senechal et al., 2007; Wu and Chiang, 2007; Wu et al., 2006). Parallèlement, la protéine Brd4 possède un rôle d'importance dans la transcription des gènes cellulaires. En effet, Brd4 s'associe avec deux cofacteurs de la transcription soit le complexe *Mediator* et la kinase dimérique *positive transcription elongation factor b* (pTEFb), composée de Cdk9 et de la Cycline T1 (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). pTEFb facilite l'initiation de

l'élongation de la transcription en phosphorylant l'ARN polymérase II au niveau des sérines 2 et 5 située dans l'extrémité C-terminale de la sous-unité Rpb1. Ainsi, l'association entre Brd4 et pTEFb représente un complexe actif de la transcription par opposition au complexe inactif composé de pTEFb-HEXIM1/2 et le petit ARN nucléaire 7SK. Ces faits, et l'utilisation de mutants de E2 inactifs pour la transcription, ont permis d'établir que l'interaction entre E2 et Brd4 peut activer la transcription par E2 sans affecter l'activité de répliquative de la protéine virale. L'utilisation du C-terminal de Brd4, connu pour être la région d'interaction avec le TAD de E2, a permis de faire des études sur les activités de E2. En effet, ce peptide est en mesure de lier E2 tout en empêchant la protéine Brd4 endogène de s'associer au facteur viral. Ainsi, en présence d'un vecteur codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur régi par E2, ou même le LCR des papillomavirus, des équipes ont montré le pouvoir dominant-négatif du C-terminal de Brd4, et une réduction de l'activité de transcription était observée (Ilves et al., 2006; Lee and Chiang, 2009; McPhillips et al., 2006; Schweiger et al., 2006). Des résultats similaires ont été observés par l'utilisation de petits ARN interférants réduisant la quantité de la protéine Brd4 dans les cellules (Lee and Chiang, 2009; Schweiger et al., 2006). La présence de Brd4 en association avec la protéine E2 semble activer l'activité transcriptionnelle du facteur viral.

Le rôle de l'interaction E2-Brd4 dans la répression de la transcription virale reste controversé. En effet, Wu *et al.* ont démontré qu'en présence du TAD de E2, Brd4 promeut la répression de l'expression des gènes sous le contrôle du LCR. Ils suggèrent que la liaison de E2 à Brd4 déplace les facteurs de transcription cellulaire tels AP1, TBP, TFIID et la polymérase II, empêchant la transcription des gènes viraux (Wu et al., 2006). Par contre, une autre équipe n'a pas réussi à démontrer cette répression associée à l'interaction E2-Brd4 (Schweiger et al., 2006). Ce groupe a plutôt utilisé un petit ARN interférant pour réduire la quantité de Brd4 au sein de cellules C33A, contenant un vecteur exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle du LCR, et ont vu une augmentation de la

transcription (Smith et al., 2010). Une étude récente suggère que la répression des transcrits viraux serait associée à l'interaction entre E2 et Brd4 en montrant que E2 empêcherait pTEFb de s'associer au C-terminal de Brd4 (Yan et al., 2010). Toutefois, il a été démontré que l'activation de la transcription via Brd4 peut s'effectuer sans la participation de pTEFb mais via des facteurs interagissant au niveau du domaine ET (Rahman et al., 2011). Ainsi, le rôle exact de l'interaction entre E2 et Brd4 dans l'activité transcriptionnelle de E2 reste à être déterminé.

Comme nous pouvons le constater, il est difficile de séparer les fonctions de transactivation et d'attachement aux chromosomes/ségrégation qui sont associées au complexe E2-Brd4. En effet, les mêmes résidus soit R37 et I73 de la protéine E2 sont impliqués dans ces deux activités véhiculées par l'interaction avec Brd4. Dernièrement, des études de complémentation ont été effectuées à l'aide de domaines hétérologues viraux, et ont permis de démontrer que l'attachement à la chromatine n'est pas suffisant pour une partition efficace des génomes. Les chercheurs ont montré que l'activité transcriptionnelle de E2, ou du moins, le domaine fonctionnel d'interaction avec les complexes de transcription, est nécessaire pour la ségrégation des épisomes (Silla et al., 2010). Finalement, l'utilisation d'un peptide dominant négatif composé de la partie C-terminale de Brd4 liant le TAD de E2 au niveau des résidus R37 et I73, a permis d'établir que l'interaction entre E2 et Brd4, en plus d'affecter la transcription par E2, stabilisait le facteur de transcription en le protégeant de la dégradation par le protéasome (voir annexe 3 p.256 *Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of Bromodomain-Containing Protein 4*, Gagnon et al., 2009) (Lee and Chiang, 2009; Zheng et al., 2009). Comme nous l'avons vu, plusieurs évidences tendent à démontrer que des protéines associées à la voie de dégradation par le protéasome sont aussi impliquées dans l'augmentation de l'activité de transcription de E2 et en conséquence, la stabilisation de E2 par Brd4 aurait un impact majeur sur ces fonctions. L'interaction entre E2 et Brd4 semble

avoir des effets pléiotropiques, d'autres études sont nécessaires pour définir précisément les rôles de cette association.

1.3.6 Les modifications post-traductionnelles de la protéine E2

Plusieurs protéines régulatrices subissent des modifications post-traductionnelles occasionnées par des altérations chimiques et/ou par l'ajout de petites molécules. La protéine ainsi modifiée va adopter une structure ou bien des propriétés différentes qui vont moduler ses activités et ses interactions. La phosphorylation et l'ubiquitination sont les modifications post-traductionnelles découvertes chez la protéine E2 de certains papillomavirus, et leurs conséquences sur la réplication de l'ADN viral et la stabilité de la protéine ont été étudiées.

1.3.6.2 La phosphorylation

La phosphorylation est définie comme étant l'ajout d'un groupement phosphate sur les résidus sérines (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y) par une protéine kinase. Les protéines E2 du VPB1, CRPV, VPH11 et VPH16 sont phosphorylées, par contre, seuls les sites de phosphorylation de E2 de VPB1 ont été identifiés (Barbosa and Wettstein, 1988; Bream et al., 1993; Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989; Sanders et al., 1995). Cette protéine E2 possède 2 sites de phosphorylation majeurs au niveau des résidus S298 et S301 et un site mineur le S235, tous sont localisés dans la région charnière près du DBD (Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989). Deux autres sites de phosphorylation ont été définis au niveau des résidus S240 et S277 mais aucune fonction n'y est associée (Lehman et al., 1997). Les premières études ont démontré que la phosphorylation des sérines 235, 298 et 301 était impliquée dans la ségrégation de l'épisome et la transformation des cellules infectées sans affecter les activités de réplication et de transactivation de E2 (Lehman and Botchan, 1998; Lehman et al., 1997). Les S298 et S301 sont situées plus précisément dans une séquence PEST: une séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), serine (S) et

thréonine (T) associée aux protéines ciblées pour la dégradation (Rechsteiner and Rogers, 1996). Par association, une autre étude a montré que la phosphorylation au niveau de la S301, par la caséine kinase II, augmente la dégradation de E2 par la voie du protéasome (Penrose et al., 2004). En mutant le résidu S301 pour une alanine, ils ont observé un niveau plus élevé de la protéine après une inhibition de la traduction. Ils ont pu relier l'efficacité de la ségrégation de l'épisome à la stabilisation de la protéine E2 (Penrose and McBride, 2000). La phosphorylation au site S301 n'est pas une modification suffisante pour la reconnaissance par la voie de dégradation. Une autre étude de mutagenèse dans une séquence d'acides glutamiques (E303, E304 et E305) inclut dans la séquence PEST, a montré une dégradation protéique en absence de la phosphorylation (Penrose et al., 2004). Afin de mieux définir l'importance du motif PEST, un peptide couvrant les acides aminés 283 à 311 a été synthétisé et analysé par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire. Cette étude a démontré la présence d'une hélice- α entre les résidus 286 et 296 pouvant être modifiée par la phosphorylation de la sérine 301. Cette modification provoquerait un changement de la structure à ce niveau de E2 et induirait sa dégradation (Figure 1.23) (Garcia-Alai et al., 2006). Cette déstabilisation locale générée par la phosphorylation du motif PEST pourrait augmenter l'accessibilité de certains résidus lysines de E2 qui sont ciblés par l'ubiquitination, une modification post-traductionnelle associée à la dégradation par le protéasome.

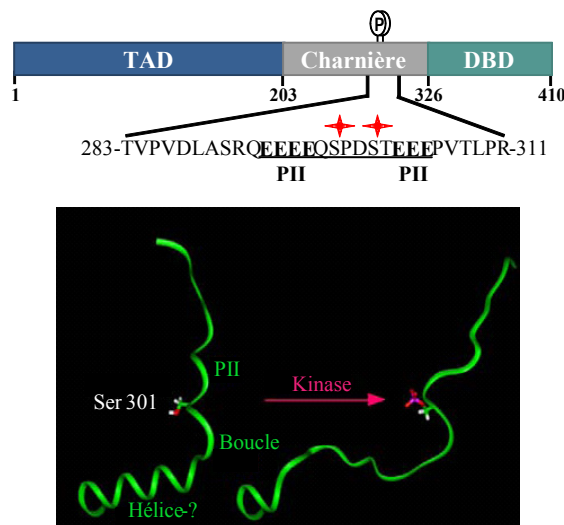


Figure 1.24. Effet de la phosphorylation de la sérine 301 de la protéine E2 du VPB1.

Localisation du motif PEST, des séquences riches en acides glutamiques (PII) ainsi que les résidus sérines 298 et 301 (★) pouvant être phosphorylés, retrouvés dans la région charnière de la protéine E2 du VPB1. Modélisation du peptide 283 à 311 de la région charnière montrant une déformation de l'hélice- α et de la séquence PII suite à la phosphorylation (rose) de l'acide aminé sérine 301 (Ser 301) par une kinase (CKII). Modèle structural adapté de Garcia-Alai *et al.*, (2006), (Garcia-Alai et al., 2006).

1.3.6.2 L'ubiquitination

Le système de dégradation dépendant du protéasome utilise une petite molécule de 76 acides aminés, nommée ubiquitine, afin de marquer une protéine pour la protéolyse (UPS). La protéine E2 de différents papillomavirus est reconnue pour être instable et dégradée par la protéasome (Bellanger et al., 2001; Gagnon et al., 2009; Penrose and McBride, 2000).

1.3.6.2.2 *Le système de dégradation dépendant du protéasome*

La dégradation des protéines chez les eucaryotes est régulée, entre autre, par la voie protéolytique dépendante du protéasome (UPS). Ce système est retrouvé dans le noyau et le cytoplasme et est dépendant de l'ATP. Le signal général de la dégradation par l'UPS est l'ajout d'ubiquitines sur la protéine ciblée qui, par la suite, est dirigée vers le complexe majeur de protéases cellulaires : le protéasome. L'ubiquitination est un signal moléculaire très versatile au sein d'une cellule selon le nombre d'ubiquitines et la chaîne formée. L'ubiquitination peut être monomérique (mono-ubiquitination : ajout d'une seule molécule d'ubiquitine) ou bien, former plusieurs types de chaîne d'ubiquitines (poly-ubiquitination). La mono-ubiquitination contrôle plusieurs fonctions au sein d'une cellule comme le transport de récepteur, la réparation de l'ADN et même la relâche de virion. De son côté, la poly-ubiquitination où les chaînes d'ubiquitines vont se former via une liaison covalente à leur lysine à la position 48, sont associées à la régulation de la stabilité d'une protéine. De plus, les ubiquitines peuvent être associées entre elles via d'autres lysines (K6, K11, K27, K29, K33 et K63) retrouvées à leur surface, formant ainsi une diversité de chaîne d'ubiquitines créant une gamme de signaux moléculaire dans la cellule. L'ubiquitination d'une protéine peut être aussi associée à d'autres rôles non-protéolytiques comme la régulation de la structure de la chromatine et de la transcription, la progression du cycle cellulaire, le métabolisme des acides nucléiques, l'autophagie et finalement, l'endocytose (Daulny and Tansey, 2009; Welchman et al., 2005).

Afin de marquer une protéine pour la protéolyse, une cascade enzymatique est enclenchée impliquant plusieurs étapes et enzymes distinctes, aboutissant à l'ubiquitination et la dégradation de la protéine cible. La première étape nécessite l'activation d'une ubiquitine libre par une enzyme activatrice nommée E1 (*ubiquitine-activating enzyme*, UAE). L'activation de l'ubiquitine est dépendante de l'ATP et implique la formation d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate, la libération de pyrophosphate, le transfert de

l'intermédiaire à un résidu cystéine porté par l'enzyme E1 et subséquemment, un relargage d'AMP. Par la suite, l'ubiquitine activée est transférée sur un autre résidu cystéine porté cette fois-ci par l'enzyme de conjugaison appelée E2. Cette dernière est responsable du transfert de l'ubiquitine directement sur la protéine cible ou bien sur une ou un nombre restreint de ligases E3. Il existe environ 50 enzymes E2 classés en quatre groupes qui vont déterminer la topologie des liens de la chaîne d'ubiquitines. Ces enzymes possèdent une caractéristique commune d'avoir un domaine catalytique conservé (Ubc) contenant un résidu cystéine actif. Ces protéines de conjugaison vont être classifiées selon l'existence d'une extension au noyau catalytique. Ainsi, certaines des E2 feront partie de la classe I si elles possèdent uniquement le domaine Ubc. Elles seront regroupées au sein des classes II, III et IV dépendamment si elles possèdent des extensions en N-terminale, C-terminale ou les deux du domaine Ubc (Winn et al., 2004). Ces séquences additionnelles caractérisent les différences fonctionnelles des E2 à savoir, leur localisation cellulaire, la stabilisation de l'interaction avec les enzymes E1 ou pour la modulation de l'activité de l'enzyme E3. Les enzymes de conjugaison E2 sont responsables du sort de la protéine ciblée dépendamment sur quelle lysine l'ubiquitine sera utilisée pour l'initiation de la chaîne ou bien, le nombre d'ubiquitines qui y sera ajouté. L'enzyme E2 va ensuite déplacer l'ubiquitine sur une ligase E3 qui elle-même, est liée à sa protéine-substrat et lui transférera l'ubiquitine sur un résidu lysine accepteur. La sélectivité du substrat par l'UPS repose surtout sur la spécificité de plusieurs centaines de ligases E3 codées par le génome humain qui sont responsables du recrutement des protéines cibles à être marquées. Ces enzymes sont classés en deux groupes distincts selon leur fonctionnement. Il y a les ligases E3 à domaine HECT qui contiennent un résidu cystéine permettant de transférer une molécule d'ubiquitine à la protéine cible. Ces E3 sont utilisés afin d'accepter une molécule d'ubiquitine d'une enzyme E2 et de promouvoir le transfert à un résidu lysine d'une protéine substrat. Les ligases E3 à domaine RING et U-box quant à elles, ne possèdent pas de cystéine à leur site actif et agissent en amenant le complexe E2-ubiquitine près de la protéine cible afin de promouvoir directement le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au substrat.

La marque générale pour la dégradation retrouvée sur la protéine ciblée, est une chaîne liant des molécules d'ubiquitines via le résidu lysine 48 (K48). Lors du relâchement du substrat de la protéine E3 ligase, le protéasome 26S reconnaît la chaîne de poly-ubiquitines et la protéine ainsi marquée est détruite. Des marques comme la mono-ubiquitination ou bien la poly-ubiquitination utilisant des résidus lysines accepteurs d'ubiquitine distincts, vont servir d'étiquetage pour des fonctions diverses autres que la protéolyse. Des enzymes de dé-ubiquitination (*deubiquitylating enzyme*, DUB), vont réguler les fonctions de ces diverses modifications en enlevant les ubiquitines liées à la protéine (Komander et al., 2009). Le protéasome 26S est un complexe protéique composé de 3 sous-unités, soit l'unité catalytique 20S et 2 sous-unités 19S formant la base et les couvercles du protéasome. L'unité catalytique 20S possède trois activités protéolytiques : trypsine, chymotrypsine et caspase. Ces activités sont situées à l'intérieur de la sous-unité 20S afin de protéger la cellule d'une dégradation non-spécifique. La dégradation des protéines nécessite l'utilisation d'ATP par des enzymes ATPases retrouvées dans les 2 sous-unités 19S du protéasome. Suite à la dégradation, le substrat est réduit à de courts peptides qui seront fractionnés en acides aminés par des peptidases et réutilisés par la cellule (Figure 1.24).

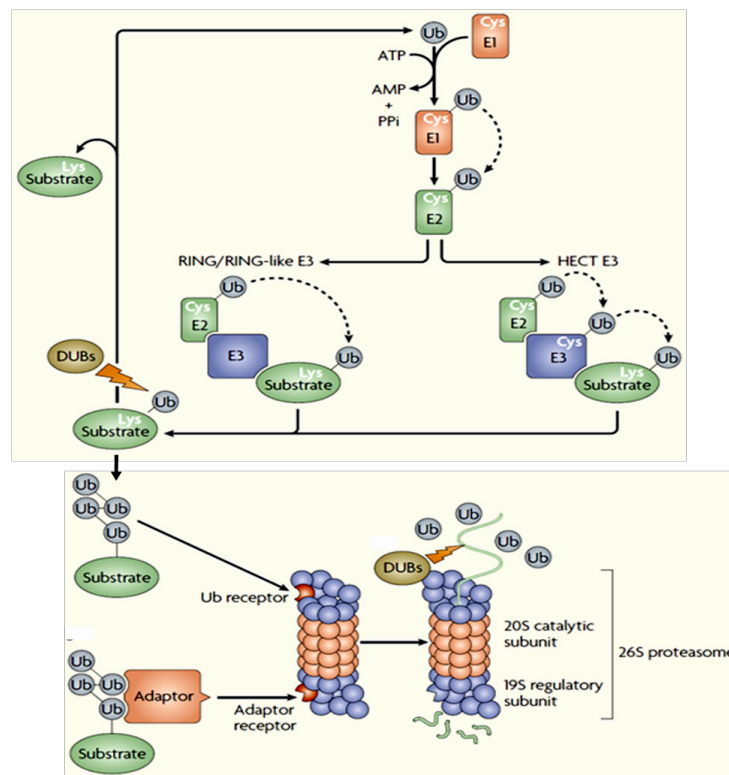


Figure 1.25. Système d'ubiquitination dépendant du protéasome (UPS).

L'UPS permet la dégradation, par le protéasome, d'une protéine marquée par l'ajout de molécules nommée ubiquitine. Pour se faire une cascade enzymatique regroupant des enzymes activatrices E1, de conjugaison E2 et des ligases E3 vont être sollicités afin de cibler et transférer des ubiquitines sur le substrat à dégrader. Les E3 ligases sont divisés en deux groupes distincts (à domaine HECT ou RING) selon leur fonctionnement. Des enzymes de dé-ubiquitination (DUB) peuvent intervenir pour enlever les molécules d'ubiquitines et réguler les activités du substrat. La protéine marquée peut aussi être dirigée pour sa dégradation vers le protéasome, composé de 2 sous-unités 19S et une sous-unité 20S possédant des activités protéolytiques. Le substrat est alors réduit à de courts peptides qui seront fractionnés en acides aminés et réutilisés par la cellule. Figure tirée de Ravid et Hochstrasser (2008) (Ravid and Hochstrasser, 2008).

1.3.6.2.2 Régulation de la stabilité de la protéine E2

Le facteur de transcription E2 des papillomavirus est reconnu pour son instabilité avec un temps de demi-vie oscillant entre 50 minutes (min) pour E2 des VPH16, -18, et

VPB1 et 125 min pour le VPH6 (Bellanger et al., 2001; Blachon et al., 2005; Gagnon et al., 2009; Penrose and McBride, 2000). Tout comme les autres facteurs de transcription, la protéine E2 possède des activités importantes et elle est utilisée pour différentes fonctions nécessaires au cycle viral, suggérant que la modulation de sa dégradation est cruciale au déroulement de l'infection. L'état de phosphorylation de E2 du VPB1 au niveau de la S301 semble être impliqué dans la régulation de la stabilité de la protéine, mais ne serait pas la seule modification responsable de cette instabilité. En effet, la protéine E2 portant la mutation S301A possède un temps de demi-vie de 160 min et donc une stabilité prolongée (Penrose and McBride, 2000). Aussi, la présence de formes poly-ubiquitinées de la protéine E2 chez VPB1, VPH11, -16, -18, et -31, ainsi que l'augmentation du temps de demi-vie de la protéine en présence d'inhibiteurs du protéasome, ont montré que E2 est dégradée par le système d'ubiquitination dépendant de la dégradation (Bellanger et al., 2001; Gagnon et al., 2009; Penrose and McBride, 2000; Zheng et al., 2009).

Comme les mécanismes régulant sa dégradation ne sont pas encore connus, plusieurs études ont été entamées afin de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de l'ubiquitination de la protéine E2. Certaines études ont montré des interactions entre des protéines associées à l'UPS et d'autres tentent de définir l'enzyme ligase responsable de l'ubiquitination de E2. Zheng *et al.* montre que l'enzyme ligase E3 impliquée dans l'ajout d'ubiquitine serait un complexe contenant la culline-3 (Zheng et al., 2009). En effet, en tenant en compte d'une part, que les complexes E3 ligases ayant une sous-unité culline sont impliqués dans l'ubiquitination de protéines dégradées selon la phase du cycle cellulaire, et qu'en plus, la phosphorylation préalable de leur substrat est souvent observé, Zheng *et al.* ont associé ces caractéristiques à la protéine E2 du VPB1 qui est reconnue pour être dégradée suite à une phosphorylation et selon la phase du cycle cellulaire. Ainsi, ils ont utilisé des formes tronquées des différentes cullines connues, exprimant uniquement leur N-terminal, dans des essais de stabilité de la protéine E2. Les complexes E3 ligase possédant

une sous-unité culline, sont composés d'au moins trois sous-unités soit, une culline, une sous-unité à doigt de zinc tel Rbx1 et une protéine reconnaissant et liant le substrat. La partie N-terminale de la culline est en mesure de se lier avec les protéines reconnaissant et liant le substrat tandis que le C-terminal va s'associer au noyau catalytique de la protéine à doigt de zinc. Ainsi, Zeng *et al.* ont utilisé des N-terminal des différentes cullines va générer la formation de complexes enzymatiquement inactifs tout en reconnaissant le substrat. Suite à un arrêt de la synthèse protéique et en présence de cullines dominantes-négatives, il a été observé que la culline 3 protège E2 du VPH16 et du VPB1 de la dégradation (Zheng et al., 2009). Par la suite, ils ont démontré une interaction entre ces protéines par co-immunoprécipitation et que cette association peut être rompue par l'ajout d'un peptide codant pour le C-terminal de Brd4. Ces résultats suggèrent que le complexe E3 ligase-culline 3 est responsable de l'ubiquitination des protéines E2 et que la protéine Brd4 semble avoir un rôle dans la stabilité du facteur de transcription viral.

D'autres ont observés que la quantité de E2 du VPH18 varie au cours du cycle cellulaire; E2 serait dégradée à la fin de la phase G1 et s'accumulerait de la phase G2 à la mi-G1. Sachant que la protéine Skp2 du complexe ubiquitine-ligase SCF (Skp1/Cullin1/*F-box*:Skp2) était dégradée en G0/G1, ils ont démontré, par co-immunoprécipitation, que la protéine Skp2 interagit avec le TAD de la protéine E2 du VPH18. De plus, ils ont montré que E2 était stabilisée en présence d'un petit ARN interférant contre la protéine Skp2, suggérant que SCF^{Skp2} est le complexe d'ubiquitine ligase impliqué dans la dégradation de E2 du VPH18 (Bellanger et al., 2010). Cette régulation de la dégradation aurait comme conséquence une augmentation de l'expression des oncogènes E6 et E7 observée dans la phase de transition G1/S impliqué dans l'instabilité chromosomique et la transformation cellulaire.

Sans être responsable de l'ubiquitination de E2, l'ubiquitine ligase Mdm2 est en mesure de lier la région comprenant les acides aminés 322 à 335 du DBD de la protéine E2 du VPH16. Cette interaction augmente l'activité transcriptionnelle de E2 sans toutefois affecter la stabilité du facteur viral (Gammoh et al., 2009a). De plus, par immunoprécipitation de la chromatine de cellules transfectées par un vecteur portant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur régité par E2, et une combinaison de plasmides exprimant les protéines E2 et Mdm2, il a été démontré que E2 recrute Mdm2 au promoteur viral et ceci permettrait d'activer la transcription (Gammoh et al., 2009a).

Il a aussi été déterminé que le TAD de E2 du VPH18 et -31 est responsable de la poly-ubiquitination et de la dégradation par la voie du protéasome. Ce domaine pourrait contenir une séquence de reconnaissance spécifique pour la protéolyse par le protéasome (Bellanger et al., 2001; Gagnon et al., 2009). Plusieurs facteurs de transcription comme E2F et p53 montrent une instabilité instaurée par leur TAD et régulée par la voie de dégradation dépendante du protéasome. Cette fine régulation par l'UPS est importante pour le contrôle de la transcription des gènes dont ces facteurs sont responsables (Muratani and Tansey, 2003). Aussi, il a été observé que l'interaction entre le TAD de la protéine E2 et le co-facteur de la transcription, Brd4, stabilise E2 et permet l'activation de la transcription (Gagnon et al., 2009; Zheng et al., 2009). La protéine *Tax1-binding-protein 1* (Tax1BP1), une autre protéine associée à l'UPS, a été identifiée par la technique de deux hybrides et confirmée par co-immunoprécipitation comme étant une partenaire de la protéine E2 des VPH16, -18 et VPB1. L'interaction entre Tax1BP1 et le TAD de E2 ainsi que la formation d'un complexe synergique avec le co-activateur p300, va augmenter le niveau de transcription des promoteurs contenant les sites de liaison par la protéine E2 (Wang et al., 2009). De plus, les auteurs ont remarqué que la présence de Tax1BP1 augmentait la quantité de E2 dans leur expérience et comme Tax1BP1 est une sous-unité essentielle au complexe d'enzyme de dé-ubiquitination A20, ils ont regardé si Tax1BP1 jouait un rôle

dans la stabilité de E2. À l'aide d'essais mesurant la demi-vie de E2 et en présence de l'inhibiteur et de Tax1BP1, Wang *et al.* ont observé que le C-terminal de Tax1BP1 protégeait E2 de la dégradation sans affecter son état d'ubiquitination tout en augmentant son activité de transcription (Wang et al., 2009). Récemment, Chang *et al.* ont découvert que la protéine NRIP (*nuclear receptor interaction protein*) lie le TAD de la protéine E2 du VPH16 et que cette association induit l'activation de la transcription tout en favorisant la stabilisation de la protéine E2 (Chang et al., 2011). Cette augmentation de la transcription coïncide avec la stabilisation de E2 provenant de l'interaction avec NRIP qui empêche la dégradation de E2 en bloquant la phosphorylation et l'ajout d'ubiquitines sur le facteur viral. Ces résultats suggèrent que plusieurs moyens existent pour réguler la stabilité ainsi que l'activité transcriptionnelle de la protéine E2.

1.4 Hypothèses des projets de recherche

Les hypothèses de recherche qui ont été les fondements de mes études doctorales se sont basées principalement sur les différentes facettes de la protéine E2 des papillomavirus modulant ses fonctions. Dans un premier temps, l'intérêt grandissant de l'interaction entre E2 et Brd4(L) au sein de la communauté scientifique, nous a amené à caractériser précisément la nature de l'association entre ces deux protéines. Tout d'abord, il faut se rappeler que l'association entre E2 et Brd4(L) avait été définie comme étant essentielle à la ségrégation de l'épisome. Par contre, plusieurs rôles attribués à la protéine cellulaire Brd4(L) étaient en lien avec la transcription cellulaire. De plus, il avait été démontré chez la protéine E2 de VPB1 que certains résidus impliqués dans l'activité transcriptionnelle de E2 sont aussi nécessaires à l'attachement des épisomes sur les chromosomes mitotiques par Brd4(L). Toutefois, la nature exacte de l'interaction E2-Brd4(L) n'avait pas été définie. Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que l'interaction entre E2 et Brd4 est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de E2 en plus d'avoir un rôle dans la ségrégation des épisomes (Senechal et al., 2007).

Le deuxième article est fondé sur la découverte d'une seconde surface de dimérisation au niveau du TAD de E2 par Sanders *et al.*, ainsi qu'un criblage d'une banque de mutants au sein du TAD de E2 du VPB1 que nous avons effectué (Annexe 2). Le but premier de ce criblage était d'évaluer la capacité de ces mutants à exécuter certaines fonctions associées à E2. Un groupe de mutant s'est démarqué dans l'inhibition de la réplication de l'ADN viral et ces derniers impliquaient entre autre les acides aminés R172 et D175. Un parallèle a été établi entre cette découverte et celle de Sanders *et al.*, et nous avons pu faire l'hypothèse que la surface intradimérique, faisant intervenir la formation d'un pont disulfure entre les C57 de deux monomères de E2 et une liaison ionique entre R172 et D175, était impliquée dans l'activité répllicative attribuée à E2. Cette étude a démontré que les résidus associés à la surface de dimérisation ont une certaine importance

dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral. Cette recherche a aussi permis la création d'un essai de réplication quantitatif spécifique au VPB1 pouvant être utilisé pour un criblage à haut-débit.

Finalement, l'étude de la stabilité de la protéine a été amorcée dans le but de déterminer une séquence de dégradation au sein de la protéine E2. Il était connu que la phosphorylation de E2 du virus du papillome bovin de type 1 au niveau de la S301 semble être impliquée dans la régulation de la stabilité de la protéine, mais ne serait pas la seule modification responsable de cette instabilité. Ainsi, la prémisse de base était de définir la séquence en acide aminés qui régule la disponibilité de la protéine E2. Dans un premier temps, nous savions que pour plusieurs facteurs de transcription, le domaine de transactivation, est la partie responsable de l'instabilité protéique. Ainsi, j'ai analysé une série de mutations logées dans le TAD de la protéine E2 afin de cerner une séquence de dégradation (Annexe 2). Malheureusement, aucune région du TAD n'a été associée spécifiquement à la dégradation. Par contre, ce résultat a généré une nouvelle question à savoir quel est le domaine de la protéine E2 du VPB1 responsable de sa dégradation? Dans cette nouvelle optique, j'ai pu définir qu'une partie de la région charnière de E2 est nécessaire à la dégradation et à la localisation nucléaire de la protéine.

Ces études ont permis de mieux caractériser la régulation des activités transcriptionnelle et répllicative ainsi que mettre en évidence un contrôle supplémentaire de la stabilité du facteur de transcription E2 des papillomavirus. Ces fonctions ont un impact majeur dans le cycle viral et ces connaissances seront mises à profit dans l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chapitre 2: Article no.1

PUBLIÉ DANS: VIROLOGY. 2007 FEB 5;358(1):10-7.

AMINO ACID SUBSTITUTIONS THAT SPECIFICALLY IMPAIR THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF PAPILLOMAVIRUS E2 AFFECT BINDING TO THE LONG ISOFORM OF BRD4

**Hélène Sénéchal^a, Guy G. Poirier^b, Benoit Coulombe^c, Laimonis A. Laimins^d and
Jacques Archambault^a**

^aLaboratory of Molecular Virology, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Pine
Avenue West, Montreal (Quebec), Canada H2W 1R7

^bHealth and Environment Unit and Eastern Quebec Proteomics Center, Faculty of
Medicine, Laval University Medical Research Center, 2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy,
Quebec, Canada G1V 4G2

^cLaboratory of Gene Transcription, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110 Pine
Avenue West, Montreal (Quebec), Canada H2W 1R7

^dDepartment of Microbiology-Immunology, The Feinberg School of Medicine,
Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

Received 27 May 2006;

revised 18 July 2006;

accepted 23 August 2006.

Available online 3 October 2006.

2.1 Contribution des auteurs à l'article

À l'exception de l'étude de spectrométrie de masse, j'ai réalisé toutes les expériences de cette recherche. De plus, j'ai construit les différents vecteurs d'expression et produit les différentes protéines. J'ai également contribué à l'écriture de l'article.

Dr Guy G. Poirier dirige le laboratoire de Protéomique du Québec et a fourni son expertise pour l'analyse par spectrométrie de masse des bandes protéiques spécifiques et majoritairement purifiées par *GST-pull down*.

Dr Benoit Coulombe a commenté l'article

Dr Laimonis A. Laimins a fourni les vecteurs d'expression pour la protéine E2 du VPH31 et il a commenté l'article.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet de recherche et a écrit l'article

2.2 Abstract

The E2 protein of papillomaviruses binds to specific sites in the viral genome to regulate its transcription, replication and segregation in mitosis. Amino acid substitutions in the transactivation domain (TAD) of E2, of Arg37 and Ile73, have been shown previously to impair the transcriptional activity of the protein but not its ability to support viral DNA replication. To understand the biochemical basis of this defect, we have used the TADs of a low-risk (HPV11) and a high-risk (HPV31) human papillomavirus (HPV) as affinity ligands to capture proteins from whole cell extracts that can associate with these domains. The major TAD-binding protein was identified by mass spectrometry and western blotting as the long isoform of Brd4. Binding to Brd4 was also demonstrated for the E2 TADs of other papillomaviruses including cutaneous and animal types. For HPV11, HPV31 and CRPV E2, we found that binding to Brd4 is significantly reduced by substitutions of Arg37 and Ile73. Since these amino acids are located near each other in the 3-dimensional structure of the TAD, we suggest that they define a conserved surface involved in binding Brd4 to regulate viral gene transcription.

Keywords: Papillomavirus; E2; Brd4; Bromodomain-containing protein 4; Transcription; Protein–protein interaction; Viral–host interaction

2.3 Introduction

Papillomaviruses are a family of small double-stranded DNA viruses that induce benign and malignant hyperproliferative lesions of the differentiating epithelium (reviewed in Zur Hausen and de Villiers, 1994; Lowy and Howley, 2001 and Hebner and Laimins, 2005). These viruses infect the basal cell layer where they maintain their double stranded

DNA genome as a circular episome in the nucleus of infected cells. Maintenance of the HPV episome in primary keratinocyte cultures requires four viral proteins: the two viral oncogenes, E6 and E7, the E1 replicative helicase and the E2 protein (Howley and Lowy, 2001) and (Longworth and Laimins, 2004). E2 is a multifunctional protein that binds to specific sites in the regulatory region of the viral genome to promote its replication, regulate its transcription and ensure its proper segregation to daughter cells at mitosis (reviewed in (Blachon and Demeret, 2003)). E2 is comprised of two functional domains, a N-terminal transactivation domain (TAD) and a C-terminal DNA-binding/dimerization domain separated by a hinge region (Figs. 1A and B). The TAD has been shown to be a protein interaction module that binds to the viral E1 helicase to promote replication of the genome and to cellular transcription factors to regulate viral gene transcription (reviewed in Blachon and Demeret, 2003 and C.M. Hebner and L.A. Laimins 2005). As a transcription factor, E2 has been shown to act either as an activator or a repressor, depending on the promoter context. Reporter gene assays have shown that E2 can activate transcription from a minimal promoter under the control of multimerized E2 binding sites (Kovelman et al., 1996). In contrast, in the context of the viral genome, E2 is primarily a repressor of viral transcription initiated in the LCR (Thierry and Yaniv, 1987; Bernard et al., 1989; Demeret et al., 1997 and Soeda et al., 2006)). As a segregation factor, E2 tethers the viral episome to mitotic chromatin (Lehman and Botchan, 1998; Skiadopoulos and McBride, 1998; Bastien and McBride, 2000 and Ilves et al., 1999)). Studies using the E2 protein from bovine papillomavirus (BPV1) have shown that the long isoform of the bromodomain-containing protein 4, Brd4(L), is the receptor to which E2 binds on mitotic chromosomes (You et al., 2004; You et al., 2005; McPhillips et al., 2005 and reviewed in McBride et al., 2004). However, a recent study by Oliveira et al. (2006) has suggested that there are important differences in the way that alpha-papillomavirus E2, like those of HPV11 and HPV31, bind to mitotic chromosomes. One group also suggested that HPV11 E2 associates primarily with the mitotic spindle and with centrosomes, rather than chromatin in mitosis (Van Tine et al., 2004).

Mutagenesis of the E2 TAD led to the identification of amino acid substitutions that genetically separate the transcription from the replication function of the protein. In particular, substitutions of arginine 37 for alanine and of isoleucine 73 for leucine or alanine have been shown to impair the ability of E2 to activate and repress transcription while having little or no effect on its ability to interact with E1 and support viral DNA replication (Abroi et al., 1996; Breiding et al., 1996; Brokaw et al., 1996; Ferguson and Botchan, 1996; Sakai et al., 1996; Grossel et al., 1996; Cooper et al., 1998 and Nishimura et al., 2000). Interestingly the conserved R37 and I73 are located close to each other at the surface of the TAD, in a region opposite to that involved in binding the E1 helicase (Fig. 1B). To understand the biochemical basis of this defect, we have used the TADs of a low-risk (HPV11) and a high-risk (HPV31) HPV type as affinity ligands to capture proteins from whole cell extracts that can associate with wild type but not transactivation-defective versions of these domains.

2.4 Results

2.4.1 Identification of cellular proteins that bind to the transactivation domain of E2

We used protein affinity chromatography (Formosa et al., 1991) as a method to identify, in a systematic fashion, cellular proteins that can bind to the E2 TAD of low- and high-risk HPV types. As affinity ligands, we used the TADs of HPV11 E2 (amino acids 1–209) and HPV31 E2 (amino acids 1–208), which we expressed and purified from bacteria as fusion proteins with glutathione-*S*-transferase (GST). These purified proteins are shown in Fig. 1C. First, we prepared a 40 µl affinity column by immobilizing the GST-E2 TAD of HPV11 on glutathione–sepharose at a concentration of 4 mg/ml. A similar column was prepared using GST, as a control. These columns were loaded with 30 mg of whole cell extract prepared from 293 or HeLa cells, washed sequentially with buffer containing 0.1 M

NaCl, and the remaining bound proteins eluted with 20 mM reduced glutathione. Analysis of the column eluates by SDS-PAGE and silver staining revealed one cellular protein that consistently and specifically associated with the GST-E2 TAD of HPV11 and not with GST or the glutathione–sepharose resin (Figs. 2A and B, arrow). Identification of this protein by tandem mass spectrometry (MS) revealed that it corresponds to the long isoform of the bromodomain-containing protein 4, Brd4(L) (tryptic peptides identified by MS are shown in Fig. 2E). To conclusively ascertain the identity of this protein, the column eluates were probed by western blotting with antibodies against Brd4(L). As can be seen in Figs. 2A and B, Brd4(L) was indeed detected in the eluates from the GST-E2 TAD column but not those from control columns. Similar experiments were then performed with the E2 TAD from HPV31. For this type also, the eluate from the column containing the GST-E2 TAD contained one major and specific band, which was identified as Brd4(L) by MS and western blotting (Figs. 2C and D). From these studies, we concluded that Brd4(L) is the major E2 TAD-binding proteins present in 293 and HeLa whole cell extracts. In additional experiments, we confirmed that the interaction of Brd4(L) with the E2 TAD of HPV11 and HPV31 is resistant to high salt concentrations (1M NaCl, data not shown), suggesting that it is primarily hydrophobic in nature.

2.4.2 Brd4(L) binds to the E2 TAD of different papillomaviruses

To investigate if the E2 proteins of other papillomaviruses also associate with Brd4(L), we performed affinity chromatography experiments with the TADs of several other viral types: one cutaneous type, HPV1, two other high-risk anogenital types, HPV16 and HPV18, and two prototypical animal types, BPV and cottontail rabbit papillomavirus (CRPV). The TADs of HPV11 and HPV31 were also used as positive controls. These TADs, purified as fusions with GST (Fig. 1C), were immobilized on glutathione–sepharose resin at two separate concentrations of 0.5 and 2.0 mg/ml. Affinity chromatography with 293 or HeLa cell extract was then performed essentially as described above, and the bound

proteins eluted with buffer containing reduced glutathione. Aliquots of the input whole cell extract and of the glutathione eluates were analyzed by western blotting with the anti-Brd4(L) antibody. As can be seen in Fig. 3A, all E2 TAD tested were capable of binding Brd4(L), indicating that this interaction is highly conserved among papillomaviruses. Recently, the transcription elongation factor P-TEFb, a kinase that phosphorylates the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II, was shown to associate with Brd4 (Jang et al., 2005 and Yang et al., 2005). We were unable to detect Cdk9, a component of P-TEFb, in our E2 TAD column eluates, perhaps because this interaction is too weak to be detected by affinity chromatography (data not shown).

To determine if binding to Brd4(L) was a characteristic specific to the E2 TAD or one shared with other transactivation domains, we performed affinity chromatography with the acidic activation domains of herpes simplex (HSV) VP16 and of the tumor suppressor protein p53. These proteins were purified from bacteria as fusions with GST (Fig. 3B), and immobilized on columns at concentrations of 2 and 4 mg/ml. As can be seen in Fig. 3C, the amount of Brd4(L) that was retained by the VP16 and p53 TAD was much lower than that retained by the HPV E2 TAD. These results argue that binding to Brd4(L) is not a general property of activation domains. They also provide further evidence that the interaction of E2 with Brd4(L) is specific.

2.4.3 Substitutions of R37 and I73 impair the binding of Brd4(L) to the E2 TAD of HPV11, HPV31 and CRPV

To examine if the association of Brd4(L) with the HPV11 and HPV31 E2 TAD is sensitive to amino acid substitutions affecting the transcriptional activity of the proteins, we performed affinity chromatography experiments with wild type and mutant TAD carrying substitutions at R37 and I73. For each TAD, a series of columns containing increasing

amounts of immobilized protein was used. Eluates were then probed by western blotting for the presence of Brd4(L). As can be seen in Fig. 4A, binding of Brd4(L) to wild type HPV11 and HPV31 E2 was dose responsive, as anticipated for a genuine binary interaction. Similar analysis performed with R37 and I73 mutant proteins clearly indicated that these proteins are defective in binding Brd4(L). Thus R37 and I73 are essential for the specific binding of Brd4(L) to the E2 TAD. Interestingly, both amino acids are located close to each other in the 3-dimensional structure of the E2 TAD (Fig. 1B), on a surface of the TAD opposite to that involved in binding to the E1 helicase (). The simplest interpretation of these findings is that R37 and I73 are part of a surface involved in binding Brd4(L). It is unlikely that these two substitutions affect the folding of the TAD since they do not affect viral DNA replication (see Introduction), which is also dependent on the integrity of the TAD.

We then carried out a similar series of affinity chromatography experiments with the E2 TAD of CRPV, albeit at lower concentrations of immobilized proteins because we repeatedly observed that it binds with increased affinity to Brd4(L) as compared to the other TADs tested. For CRPV E2, substitutions R37A and I73L, but not R37K, were previously shown to affect its ability to transactivate a reporter gene under the control of multiple E2 binding sites (Jeckel et al., 2002). Accordingly, we found that the E2 TAD containing R37A and I73L showed reduced binding to Brd4(L), whereas the transactivation competent R37K protein behaved like wild type. This correlation between transcriptional activity and Brd4(L)-binding further supports the notion that Brd4(L) is a mediator of E2's transcriptional function.

2.5 Discussion

2.5.1 Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of E2 affect binding to Brd4(L)

In this study, we have used protein affinity chromatography to identify, in a systematic fashion, proteins that bind to the E2 TAD of HPV11, a low-risk type, and HPV31, a high-risk, oncogenic type. In both cases, we identified the long isoform of Brd4, Brd4(L), as the major TAD-binding protein present in 293 and HeLa whole cell extracts. Although 293 cells are not transformed by HPV, they were used because they support all of the known activities of HPV11 E2, namely its capacity to support viral DNA replication (Chiang et al., 1992 and Kuo et al., 1994), regulate viral gene expression (Zou et al., 2000) and associate with the mitotic spindle and centrosomes (Van Tine et al., 2004 and Dao et al., 2006). Interestingly, we found that the interaction of Brd4(L) with E2 is sensitive to substitutions in the TAD of residues R37 and I73, which specifically impair its transcriptional activation and repression activities. Our results are in agreement with recent studies which also indicated that the binding of Brd4(L) to the E2 proteins of BPV and HPV16 is affected by substitutions of R37 and I73 (Baxter et al., 2005 and Schweiger et al., 2006) and that Brd4(L) is involved in E2-mediated transcriptional activity (Ilves et al., 2006 and Schweiger et al., 2006). Our results with other papillomavirus types thus provide further evidence that Brd4(L) is involved in the transcriptional activity of E2. The fact that R37 and I73 are adjacent to each other in the three dimensional structure of the TAD suggests that they define a surface of the TAD involved in binding Brd4(L). We note that this surface contains several hydrophobic residues, consistent with our finding that the E2–Brd4(L) interaction is primarily hydrophobic in nature. This surface lies opposite to that involved in interaction with the E1 helicase and involved in viral DNA replication (Abbate et al., 2004). It remains a formal possibility that Brd4(L) and E1 can form a ternary complex with E2, although the interaction with Brd4(L) does not appear to be required for viral DNA replication *per se*, based on the fact that substitutions such as I73L have little or no effect on viral DNA replication (see Introduction).

Based on the structure of the HPV16 E2 TAD, Antson et al. (2000) proposed the existence of a dimerization interface within the E2 TAD, comprised of the second and third α -helices, and involving, among others, residues Arg37 and Ile73. However, it is noteworthy that we observed quite a distinct monomer–monomer interaction interface in both of our published crystal structures of the HPV11 E2 TAD (free and in complex with a small-molecule inhibitor of the E1–E2 protein interaction) (Wang et al., 2004). In addition, our previous characterization of the quaternary structure of the HPV11 E2 TAD by size-exclusion chromatography and ultracentrifugation revealed that this domain is monomeric at concentrations up to approximately 20 μ M (Wang et al., 2004). Based on these findings and those reported in this study, we believe that the major role of Arg37 and Ile73, at least for HPV11 E2, is in forming a binding surface for Brd4(L) rather than dimerization of the TAD.

2.5.2 Role of the E2–Brd4(L) interaction in the viral life cycle and pathogenesis

An important reason why we chose to study the R37K and I73L substitutions in the context of HPV31 E2 is because these substitutions have been characterized previously in one of our laboratories (L.A.L) for their effect on maintenance of the HPV31 episome in primary keratinocyte cultures as well as on expression of the viral early and late genes upon differentiation in methylcellulose or in organotypic raft cultures (Stubenrauch et al., 1998). It is therefore informative to re-examine these results in light of the fact that R37A and I73L impair binding to Brd4(L). While both substitutions had little effect on transient viral DNA replication, they differed in their effect on maintenance of the episome in keratinocytes. Specifically, the copy number of the R37K mutant episome was greatly reduced while that of the I73L genome was closer to wild type (Stubenrauch et al., 1998). Consistent with its more severe phenotype, little amplification of the R37K episome was observed upon keratinocyte differentiation (Stubenrauch et al., 1998). In contrast, the level of amplification of the I73L mutant episome was only slightly reduced and expression of

the late genes was still detected, albeit at a reduced level compared to wild type (Stubenrauch et al., 1998). Considering our finding that I73L greatly reduces binding to Brd4(L) (Fig. 4A), these results would suggest that the E2–Brd4(L) interaction is neither essential for the replication and maintenance of the viral episome in keratinocytes nor for its amplification upon differentiation, although it may contribute to the overall efficiency of these events. An equally important question is whether the interaction of E2 with Brd4(L) contributes to pathogenesis. The effects of R37A, R37K and I73L substitutions in E2 have been characterized in the CRPV infection model and both were found to drastically reduce pathogenesis, as measured by induction of tumors (papillomas) following gene-gun inoculation of the viral genome into the skin of domestic rabbits (Jeckel et al., 2002). In this study, we have shown that CRPV E2 interacts with Brd4(L) and that this interaction is affected by R37A and I73L, but not R37K. These findings suggest that the interaction of E2 with Brd4(L) is essential for pathogenesis and thus warrants the search for small molecule inhibitors of the E2–Brd4(L) interaction as potential antiviral agents. However, the fact that R37K also reduces pathogenesis without affecting transcriptional activity (Jeckel et al., 2002) and binding to Brd4(L) (this study) suggests that this surface of the TAD may also be involved in additional yet undefined function of E2 essential for pathogenesis.

2.6 Materials and methods

Plasmid constructions and mutagenesis

Plasmids to express the E2 TADs as fusions with GST were constructed by inserting PCR fragments encoding these TADs into plasmid pGEX-2T (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences). The E2 TAD was defined by sequence alignment as residues 1–200 for HPV1, 1–208 for HPV11, 1–208 for HPV16, 1–213 for HPV18, 1–208 for HPV31, 1–211 for BPV1 and 1–211 for CRPV. Details on construction of these plasmids will be made available upon request. Mutagenesis was performed with the QuickChange Site-

Directed Mutagenesis kit (Stratagene). Plasmids used to express the activation domains of HSV VP16 (amino acids 412 to 490) and p53 (amino acids 1 to 73) as GST fusion proteins were a kind gift from Dr. Jim Omichinski (University of Montreal).

Protein expression and purification

Expression vectors for the various GST-E2 TADs were introduced into *E. coli* BL21 (Novagen). Bacterial cultures were grown in LB media supplemented with 2% ethanol at 25 °C to an optical density of 0.5–0.8 (at 595 nm) and then induced for 4 h by the addition of 0.5 mM IPTG. GST-fusion proteins were purified essentially as described previously (Titolo et al., 1999). Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bio-Rad protein assay) using BSA as a standard.

Protein affinity chromatography

40- μ l columns containing the various GST-E2 TAD, or GST, immobilized on glutathione–sepharose beads at a concentration of 4 mg/ml (or as otherwise indicated), were prepared in 200 μ l pipette tips and chromatography performed by gravity, essentially as described previously (Formosa et al., 1991). Columns were first equilibrated with 200 μ l of ACB buffer (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10% glycerol) containing 0.1 M NaCl and then loaded with 30 mg of 293 or HeLa whole cell extract that had been previously depleted on glutathione–sepharose. Whole cell extracts at a final protein concentration of 6–8 mg/ml were prepared as described previously (Sopta et al., 1985) and dialyzed against buffer comprised of 10 mM HEPES pH 7.9, 0.1 M NaCl, 0.1 M KoAc, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10% glycerol. After loading, the columns were washed with a 4 \times 100 μ l of ACB buffer containing 0.1 M NaCl. The bound proteins were eluted with 120 μ l of ACB buffer containing 0.1 M NaCl and 20 mM reduced glutathione.

Western blotting

Western blotting was performed with the enhanced chemiluminescence procedure (GE Healthcare). Purified rabbit polyclonal antibodies directed against amino acids 1300–1400 of the long isoform of human Brd4 were purchased from Abgent (AP8051b).

Protein identification by tandem mass spectrometry

The GST-E2 TAD column eluates were separated on 6% SDS-PAGE, stained with silver or Sypro Ruby (Bio-Rad) and gel slices were excised and digested with trypsin as previously described (Jeronimo et al., 2004). The resulting tryptic peptides were purified and identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with microcapillary reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to an LCQ DecaXP (ThermoFinnigan) or an LTQ (ThermoElectron) quadrupole ion trap mass spectrometer with a nanospray interface. Resulting peptide MS/MS spectra were interpreted using the MASCOT (Matrix Science) software and searched against proteins in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database or Uniref protein database (Bairoch et al., 2005). Many peptide sequences were confirmed by manual inspection of the spectrum.

2.7 Acknowledgments

We thank S. Bourassa and I. Kelly from the Eastern Quebec Proteomics Center for the identification of proteins by mass spectrometry. This work was supported by a grant from The Cancer Research Society Inc. J.A. is a senior scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.8 References

Abbate E.A., J.M. Berger and M.R. Botchan, The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2, *Genes Dev.* **18** (2004), pp. 1981–1996.

Abroi A., R. Kurg and M. Ustav, Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 6169–6179.

Antson A.A., J.E. Burns, O.V. Moroz, D.J. Scott, C.M. Sanders, I.B. Bronstein, G.G. Dodson, K.S. Wilson and N.J. Maitland, Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein, *Nature* **403** (2000), pp. 805–809.

Bairoch A., R. Apweiler, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi and L.S. Yeh, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* **33** (2005), pp. D154–D159.

Bastien N. and A.A. McBride, Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes, *Virology* **270** (2000), pp. 124–134.

Baxter M.K., M.G. McPhillips, K. Ozato and A.A. McBride, The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4, *J. Virol.* **79** (2005), pp. 4806–4818.

Bernard B.A., C. Bailly, M.C. Lenoir, M. Darmon, F. Thierry and M. Yaniv, The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes, *J. Virol.* **64** (1989), pp. 4317–4324.

Blachon S. and C. Demeret, The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic, *Biochimie* **85** (2003), pp. 813–819.

Breiding D.E., M.J. Gossel and E.J. Androphy, Genetic analysis of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activation domain, *Virology* **221** (1996), pp. 34–43.

Brokaw J.L., M. Blanco and A.A. McBride, Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 23–29.

Chiang C.M., G. Dong, T.R. Broker and L.T. Chow, Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins, *J. Virol.* **66** (1992), pp. 5224–5231.

Cooper C.S., S.N. Upmeyer and P.L. Winokur, Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions, *Virology* **241** (1998), pp. 312–322.

Dao L.D., A. Duffy, B.A. Van Tine, S.Y. Wu, C.M. Chiang, T.R. Broker and L.T. Chow, Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2

through mitosis while in association with the spindle apparatus, *J. Virol.* **80** (2006), pp. 4792–4800.

Demeret C., C. Desaintes, M. Yaniv and F. Thierry, Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes, *J. Virol.* **71** (1997), pp. 9343–9349.

Ferguson M.K. and M.R. Botchan, Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 4193–4199.

Formosa T., J. Barry, B.M. Alberts and J. Greenblatt, Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines, *Methods Enzymol.* **208** (1991), pp. 24–45.

Grossel M.J., F. Sverdrup, D.E. Breiding and E.J. Androphy, Transcriptional activation function is not required for stimulation of DNA replication by bovine papillomavirus type 1 E2, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 7264–7269.

Hebner C.M. and L.A. Laimins, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, *Rev. Med. Virol.* **16** (2005), pp. 83–97.

Howley P.M. and D.R. Lowy, Papillomaviruses and their replication. In: D.M. Knipe and P.M. Howley *et al.*, Editors, *Fields Virology* vol. **2**, Lippincott Raven, Philadelphia (2001), pp. 2197–2229.

Ilves I., S. Kivi and M. Ustav, Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites, *J. Virol.* **73** (1999), pp. 4404–4412.

Ilves I., K. Maemets, T. Silla, K. Janikson and M. Ustav, Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle, *J. Virol.* **80** (2006), pp. 3660–3665.

Jang M., K.K. Mochizuki, M. Zhou, H.S. Jeong, J.N. Brady and K. Ozato, The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription, *Mol. Cell* **19** (2005), pp. 523–534.

Jeckel S., E. Huber, F. Stubenrauch and T. Iftner, A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus E2 is essential for tumor induction in rabbits, *J. Virol.* **76** (2002), pp. 11209–11215.

Jeronimo C., M.F. Langelier, M. Zeghouf, M. Cojocar, D. Bergeron, D. Baali, D. Forget, S. Mnaimneh, A.P. Davierwala, J. Pootoolal, M. Chandy, V. Canadien, B.K. Beattie, D.P. Richards, J.L. Workman, T.R. Hughes, J. Greenblatt and B. Coulombe, RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits, *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004), pp. 7043–7058.

Kovelman R., G.K. Bilter, E. Glezer, A.Y. Tsou and M.S. Barbosa, Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 7549–7560.

Kuo S.R., J.S. Liu, T.R. Broker and L.T. Chow, Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), pp. 24058–24065.

Lehman C.W. and M.R. Botchan, Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (1998), pp. 4338–4343.

Longworth M.S. and L.A. Laimins, Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68** (2004), pp. 362–372.

Lowy D.R. and P.M. Howley, Papillomaviruses. In: D.M. Knipe and P.M. Howley *et al.*, Editors, *Fields Virology* **vol. 2**, Lippincott Raven, Philadelphia (2001), pp. 2231–2264.

McBride A.A., M.G. McPhillips and J.G. Oliveira, Brd4: tethering, segregation and beyond, *Trends Microbiol.* **12** (2004), pp. 527–529.

McPhillips M.G., K. Ozato and A.A. McBride, Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin, *J. Virol.* **79** (2005), pp. 8920–8932.

Nishimura A., T. Ono, A. Ishimoto, J.J. Dowhanick, M.A. Frizzell, P.M. Howley and H. Sakai, Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition, *J. Virol.* **74** (2000), pp. 3752–3760.

Oliveira J.G., L.A. Colf and A.A. McBride, Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (2006), pp. 1047–1052.

Sakai H., T. Yasugi, J.D. Benson, J.J. Dowhanick and P.M. Howley, Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions, *J. Virol.* **70** (1996), pp. 1602–1611.

Schweiger M.R., J. You and P.M. Howley, Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function, *J. Virol.* **80** (2006), pp. 4276–4285.

Soeda E., M.C. Ferran, C.C. Baker and A.A. McBride, Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein, *Virology* **351** (2006), pp. 29–41.

Skiadopoulos M.H. and A.A. McBride, Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin, *J. Virol.* **72** (1998), pp. 2079–2088.

Sopta M., R.W. Carthew and J. Greenblatt, Isolation of three proteins that bind to mammalian RNA polymerase II, *J. Biol. Chem.* **260** (1985), pp. 10353–10360.

Stubenrauch F., A.M. Colbert and L.A. Laimins, Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions, *J. Virol.* **72** (1998), pp. 8115–8123.

Thierry F. and M. Yaniv, The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region, *EMBO J.* **6** (1987), pp. 3391–3397.

Titolo S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P.W. White, A. Amin, M.G. Cordingley and J. Archambault, Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 helicase in E2-dependent binding to the origin, *J. Virol.* **73** (1999), pp. 5282–5293.

Van Tine B.A., L.D. Dao, S.Y. Wu, T.M. Sonbuchner, B.Y. Lin, N. Zou, C.M. Chiang, T.R. Broker and L.T. Chow, Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101** (2004), pp. 4030–4035.

Wang Y., R. Coulombe, D.R. Cameron, L. Thauvette, M.J. Massariol, L.M. Amon, D. Fink, S. Titolo, E. Welchner, C. Yoakim, J. Archambault and P.W. White, Crystal structure of the E2 transactivation domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor, *J. Biol. Chem.* **279** (2004), pp. 6976–6985.

Yang Z., J.H. Yir, R. Chen, N. He, M.K. Jang, K. Ozato and Q. Zhou, Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4, *Mol. Cell* **19** (2005), pp. 535–545.

You J., J.L. Croyle, A. Nishimura, K. Ozato and P.M. Howley, Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes, *Cell* **117** (2004), pp. 349–360.

You J., J.L. Croyle, M.R. Schweiger and P.M. Howley, Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells, *J. Virol.* **79** (2005), pp. 14956–14961.

Zou N., B.Y. Lin, F. Duan, K.Y. Lee, G. Jin, R. Guan, G. Yao, E.J. Lefkowitz, T.R. Broker and L.T. Chow, The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association, *J. Virol.* **74** (2000), pp. 3761–3770.

Zur Hausen H. and E.M. de Villiers, Human papillomaviruses, *Annu. Rev. Microbiol.* **48** (1994), pp. 427–447.

2.9 Figures Legend

Figure 2.1. Purified GST-E2 TAD proteins used in this study.

(A) Domain structure of the complete E2 protein. The transactivation domain (TAD) is linked by a hinge (H) to the C-terminal dimerization and DNA binding domain (DBD). (B) Ribbon (left) and surface (right) representations of the HPV11 E2 TAD Wang et al., 2004). Arg37 and Ile73 have been colored in red and yellow, respectively. (C) Purified GST-E2 TAD proteins used in this study. 3 μ g of each protein was separated on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The sizes (kDa) of the molecular weight markers are shown on the left.

Figure 2.2. Purification of Brd4(L) by affinity chromatography with the HPV11 and HPV31 E2 TAD.

(A to D) Affinity chromatography using the E2 TADs from HPV11 (A and B) and HPV31 (C and D). For each TAD, a silver stained, 6% SDS-PAGE is shown that reveals the presence of the long isoform of Brd4, Brd4(L) (black arrow), in the glutathione eluates of the GST-E2 TAD column (lane 3), but not in that of a GST control column (lane 4). Also shown are the eluates from additional control columns, either not loaded with whole cell extract (lanes 2 and 5) or containing no protein (glutathione–sepharose resin only, lane 1). GST-E2 TAD and GST were immobilized at a concentration of 4 mg/ml and loaded (+) or not (–) with whole cell extract prepared from 293 cells (A and C) or HeLa cells (B and D), as indicated. Note that small proteins have been purposely run out of the gel to better separate proteins of larger molecular weight. In other experiments, we determined that there was no obvious E2-binding protein of molecular weight smaller than 75 kDa (data not shown). The positions of molecular weight markers are shown on the left. The major non-specific band in lanes 1, 3 and 4 was identified by MS as myosin heavy polypeptide 9 (shown by an asterisk in lane 4). Shown below each gel is the result of a western blot using

a rabbit polyclonal antiserum directed against amino acids 1300–1400 of Brd4(L). (E) Brd4(L) peptides identified by mass spectrometry. Tryptic peptides identified by tandem MS are underlined in the amino acid sequence of Brd4(L).

Figure 2.3. Binding of Brd4(L) to other viral and cellular transactivation domains.

(A) Binding of Brd4(L) to the E2 TADs of other papillomaviruses. Affinity chromatography was performed with GST-E2 TAD proteins of HPV1, 11, 16, 18, 31, bovine papillomavirus (BPV) and cottontail rabbit papillomavirus (CRPV), or with GST as a control. Two series of affinity columns were prepared at concentrations of immobilized proteins of 0.5 mg/ml and 2.0 mg/ml, as indicated, and loaded with 293 or HeLa whole cell extract, as indicated. Each column was then washed with buffer containing 0.1 M NaCl and the bound proteins eluted with reduced glutathione. Shown in the figure are the results of western blots with anti-Brd4(L) antibodies to reveal the presence of this protein in the different column eluates. 150 µg of input of whole cell extract (input extract) was used as a positive control. (B) Purified TAD from HSV VP16 and human p53. 3 µg of each purified GST-fusion protein was separated on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. (C) Brd4(L) does not bind to the TADs of VP16 and p53. Affinity chromatography was performed with GST-VP16, GST-p53, GST-E2 TAD (HPV11) or with GST as a control. Proteins were immobilized at a concentration of 2 and 4 mg/ml, as indicated. Each column was loaded with 293 cell extract, washed with buffer containing 0.1 M NaCl and the bound proteins eluted with reduced glutathione. Aliquots of each column eluates were subject to western blotting with antibodies against Brd4(L). 100 µg of input of whole cell extract (input extract) was used as a positive control.

Figure 2.4. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of E2 reduce binding to Brd4(L).

(A) Affinity chromatography was performed with GST-E2 TAD proteins of HPV11 (wild type and R37K mutants) and HPV31 (wild type, R37K and I73L mutants), or with GST as a control. Affinity columns were prepared with increasing concentrations of immobilized protein, ranging from 0.25 to 4 mg/ml, and loaded (+) or not (with 293 whole cell extract, as indicated. Each column was then washed with buffer containing 0.1 M NaCl and the bound proteins eluted with reduced glutathione. Shown in the figure are the results of western blots with anti-Brd4(L) antibodies to reveal the presence of this protein in the different column eluates. 100 µg of input of whole cell extract (input extract) was used as a positive control. (B) Affinity chromatography with GST-E2 TAD proteins of CRPV (wild type, R37K, R37A and I73L mutants), or with GST as a control. Affinity chromatography was performed as described in (A) but at lower concentrations of immobilized protein, ranging from 0.015 to 0.125 mg/ml.

2.10 Figures

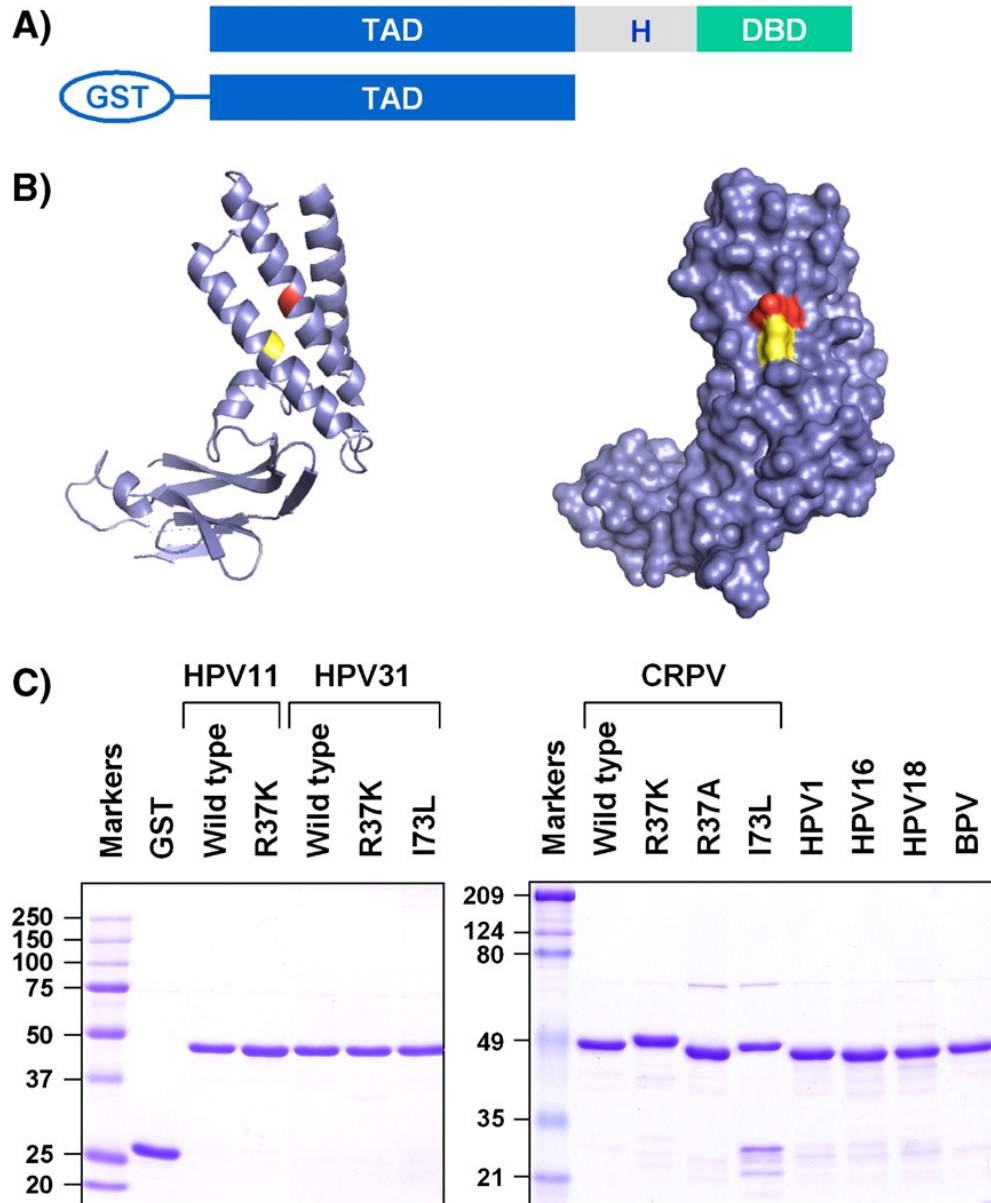


Figure 2.1. Purified GST-E2 TAD proteins used in this study.

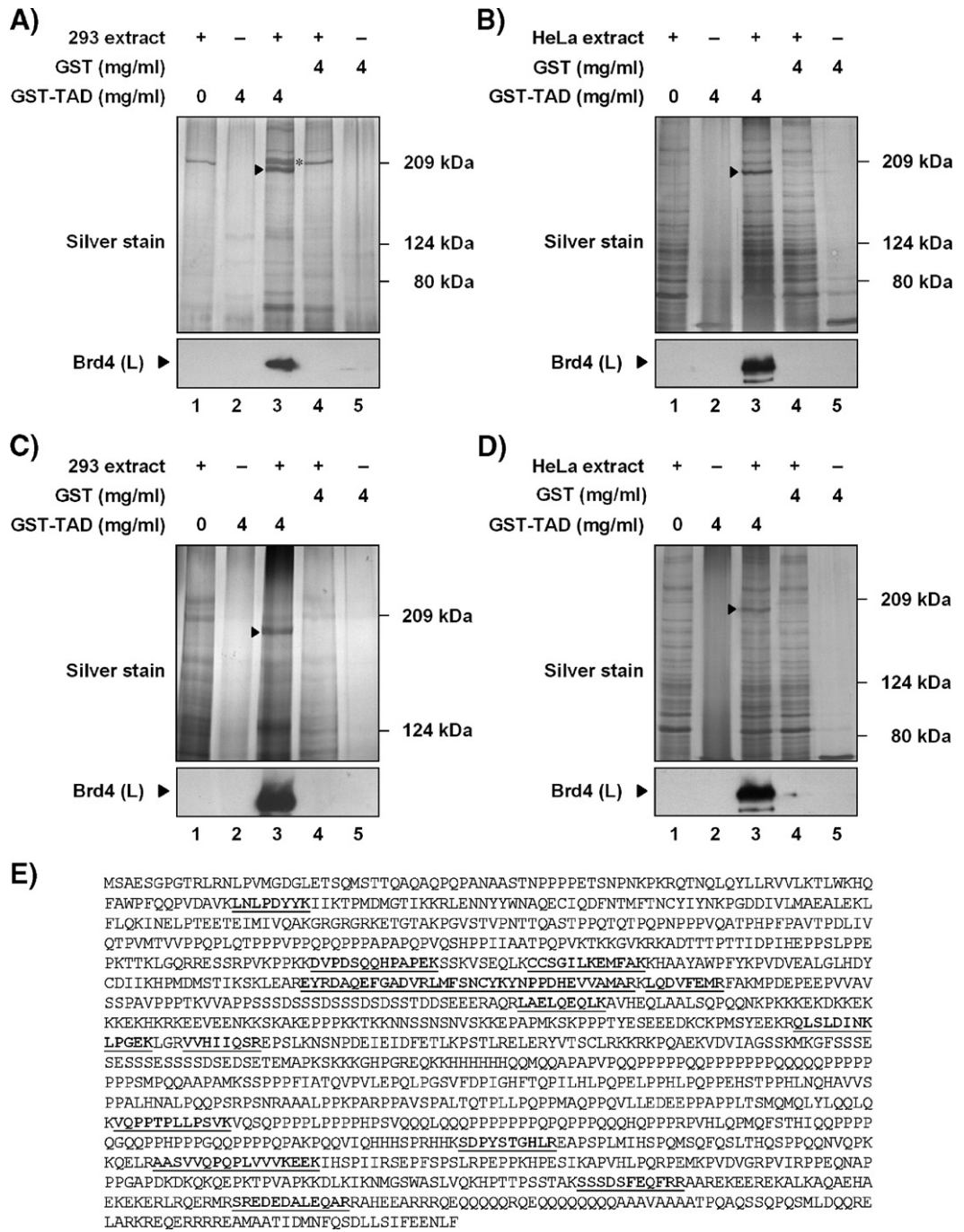


Figure 2.2. Purification of Brd4(L) by affinity chromatography with the HPV11 and HPV31 E2 TAD.

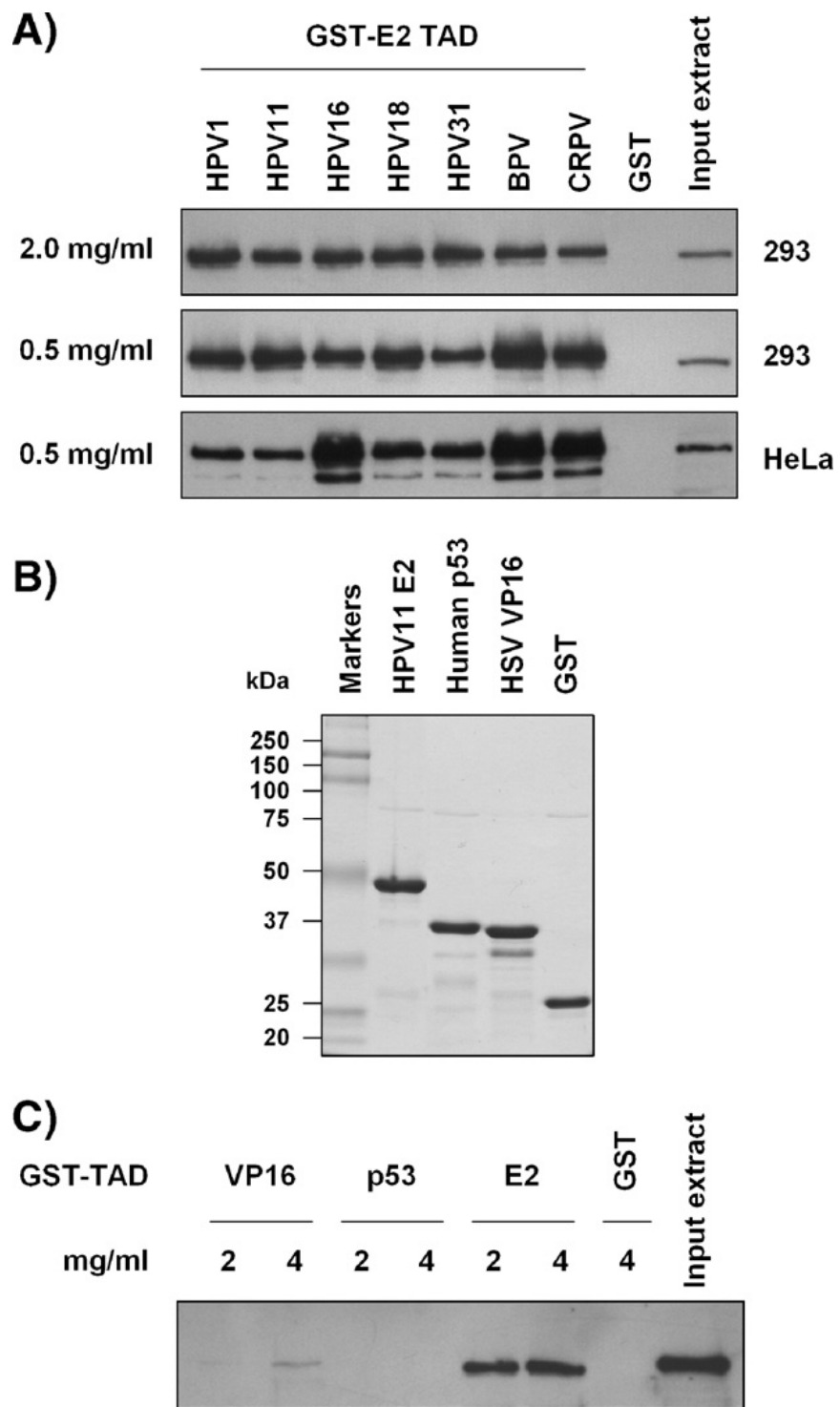


Figure 2.3. Binding of Brd4(L) to other viral and cellular transactivation domains.

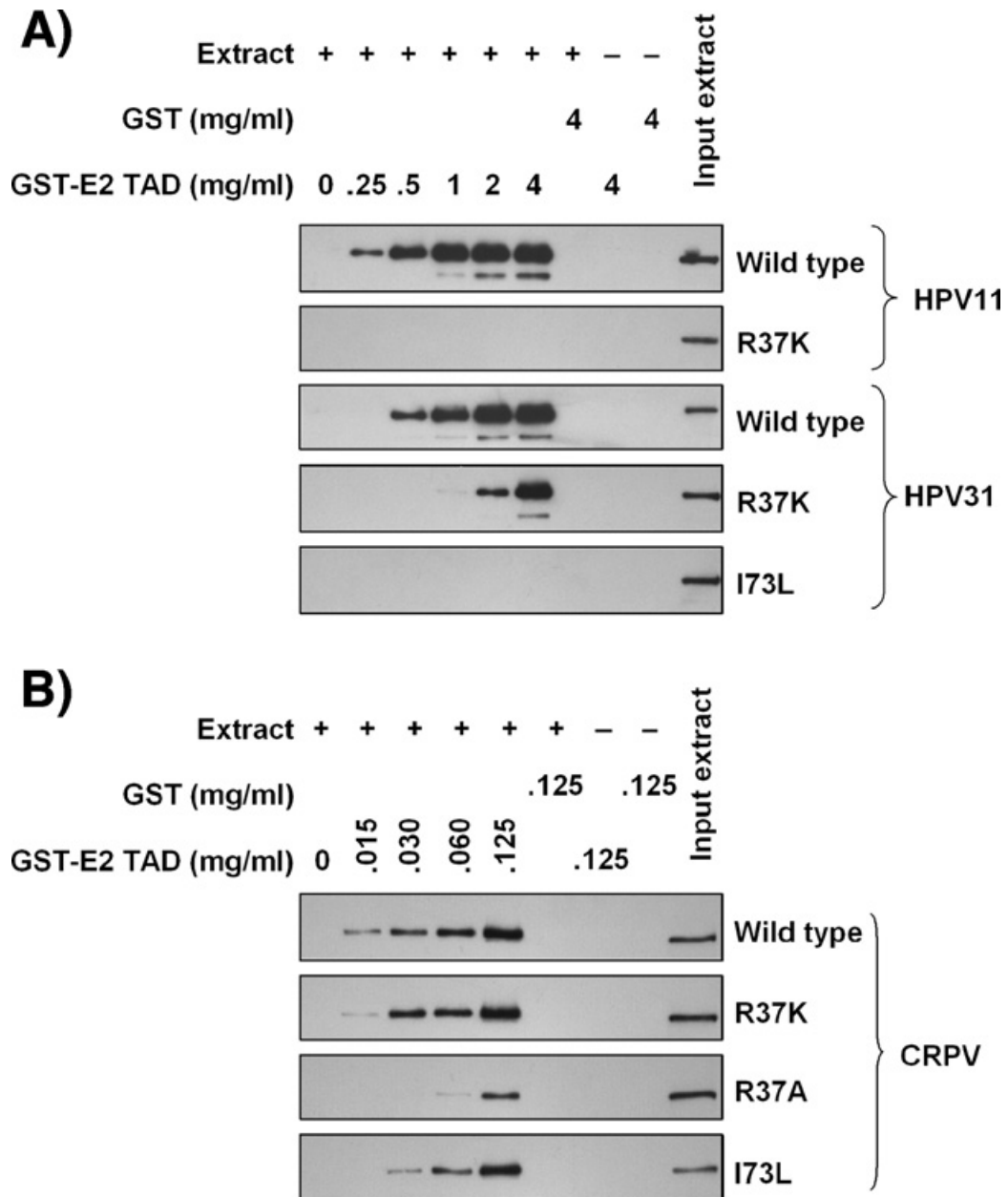


Figure 2.4. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of E2 reduce binding to Brd4(L).

Chapitre 3: Article no.2

SOU MIS DANS: VIROLOGY

GENETIC ANALYSIS OF THE E2 TRANSACTIVATION DOMAIN DIMERIZATION INTERFACE FROM BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 1

David Gagnon^{1£}, H el ene S en echal^{1£}, Claudia M. D'Abrahamo¹, Jennifer
Alvarez¹, Alison A. McBride² and Jacques Archambault^{1*}

¹ Molecular Virology Laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montr el (IRCM)
and Department of Biochemistry, Universit  de Montr el, Montreal, Quebec, Canada

² Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland

Running Title: Genetic analysis of the BPV1 E2 TAD dimer interface

£ Both authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Molecular Virology,
Institut de Recherches Cliniques de Montr el, 110 Pine Avenue West, Montreal
(Quebec), Canada, H2W 1R7. Tel: (514) 987-5739; Fax: (514) 987-5741;

Abstract: 150 words

Text: 4334 words

Running Title: Transactivation up-mutants of BPV E2

3.1 Contribution des auteurs à l'article

En tant que co-auteur avec Dr David Gagnon, nous avons partagé les expériences menant à cet article. J'ai participé à la construction et au criblage des différents mutants du TAD de E2 du VPB1 selon leur capacité à exécuter certaines fonctions de E2. J'ai effectué les analyses d'expression protéique par immunobuvardage de type Western ainsi que les études de localisation cellulaire. De plus, j'ai participé à la création de l'essai de réplication spécifique au VPB1. J'ai également contribué à l'écriture de l'article.

Dr David Gagnon a effectué les essais de transactivation et de réplication de l'ADN à l'aide des mutants impliqués dans l'interface de dimérisation. Il a également contribué à l'écriture de l'article. De plus, il a effectué les expériences nécessaires pour répondre aux commentaires des examinateurs.

Dre Claudia M. D'Abramo et Jennifer Alvarez ont construit certains vecteurs et re-testé certains mutant pour leur capacité à effectuer la fonction de transactivation.

Dre Alison A. McBride a fourni les vecteurs codant pour la banque de mutants du TAD de la protéine E2 du VPB1 et pour la protéine E1 du VPB1. Elle a commenté l'article.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet de recherche et a écrit l'article

3.2 Abstract

The bovine papillomavirus type 1 (BPV1) E2 protein binds as a dimer to the viral genome to promote its transcription, replication and maintenance in keratinocytes. Although BPV1 E2 dimerizes primarily through its DNA-binding domain, it was shown previously that its transactivation domain (TAD) can also dimerize in vitro through formation of a disulfide bond between cysteine 57 (C57) of adjacent monomers and of an ion pair between arginine 172 (R172) and aspartic acid 175 (D175). The function of this TAD dimerization interface in vivo remains unknown. Here, we report the effects of substituting C57, R172 and D175 by alanine on the transactivation activity of BPV E2 as well as on its ability to support viral DNA replication using a novel luciferase-based assay. Results for this mutational analysis suggest that the TAD dimerization interface is not essential for either process but may contribute to the DNA replication activity of BPV E2.

Keywords: BPV1; E2; transactivation; DNA replication; transactivation domain; dimer; dimerization; redox; high-throughput assay; protein interface

3.3 Introduction

Papillomaviruses are double-stranded DNA viruses that induce benign and malignant hyperproliferative lesions of the differentiating epithelium (Hebner and Laimins, 2006; Howley, 2001; zur Hausen, 1994). The life cycle of papillomaviruses is coupled to the cellular differentiation program that keratinocytes undergo within the epithelium (Doorbar, 2005; Howley, 2001; Longworth and Laimins, 2004). These viruses infect the basal cell layer where they maintain their double-stranded DNA genome as a circular episome in the nucleus of infected cells. Maintenance of the episome in these cells requires the activities of the viral E2 protein, a regulatory factor that binds to specific sites in the

long-control-region (LCR) of the viral genome to promote its replication, regulate its transcription and ensure its segregation to daughter cells in mitosis (Blachon and Demeret, 2003). As a transcription factor, E2 can either activate or repress transcription, depending on the promoter context (Bernard, 2002). E2 is comprised of two functional domains, an N-terminal transactivation domain (TAD) and a C-terminal DNA-binding domain (DBD) separated by a hinge region. The TAD is a protein interaction module that binds to the viral E1 helicase and to host proteins such as TopBP1 (Donaldson et al., 2012), and possibly also to RPA (Li and Botchan, 1993) and topoisomerase I (Clower et al., 2006) which were reported to interact with full-length E2, to promote replication of the viral genome. The E2 TAD also associates with cellular transcription factors, including the bromodomain containing protein 4 (Brd4), to regulate viral gene transcription (Abbate et al., 2004; Abbate et al., 2006; Benson and Howley, 1995; Sakai et al., 1996; Wu and Chiang, 2007). Brd4 was first identified as the cellular chromatin component that is bound by the bovine papillomavirus type 1 (BPV1) E2 to tether the viral episome to host chromosomes in order to prevent its loss during mitosis (You et al., 2004; You et al., 2005). Subsequent studies revealed that Brd4 is also needed for E2 to activate or repress transcription (Baxter et al., 2005; Gagnon et al., 2009; McPhillips et al., 2006; Schweiger et al., 2006; Senechal et al., 2007; Wu et al., 2006). Several crystal structures of the E2 TAD, either alone (free form) or in complex with the C-terminal helicase domain of E1, or with a Brd4 peptide, have been reported (Abbate et al., 2004; Abbate et al., 2006; Antson et al., 2000; Harris and Botchan, 1999; Sanders et al., 2007; Wang et al., 2004). These structures revealed that the E2 TAD has an L-shape comprised of three anti-parallel α -helices followed by a β -sheet region (Fig. 1) (Sanders et al., 2007). They also revealed that E1 and Brd4 bind on opposite faces of the TAD.

E2 binds to DNA as a dimer and is also dimeric in solution. Its main dimerization interface is located within the C-terminal DBD (Hegde, 2002). However, the arrangement

of the N-terminal TAD within the lattices of some of the crystal structures mentioned above suggested that this domain can also homodimerize, but through different surfaces depending on the papillomavirus type. For E2 from human papillomavirus type 16 (HPV16), dimerization of the TAD was found to involve two of the three α -helices that form part of the Brd4-binding surface (Antson et al., 2000). This TAD-TAD interface was shown to occur between different E2 dimers as it can promote DNA-looping between E2 dimers bound at distant sites in vitro (Antson et al., 2000; Hernandez-Ramon et al., 2008). A very different TAD dimerization interface was identified for BPV1 E2. Sanders et al. (Sanders et al., 2007) reported that the BPV1 E2 TAD can dimerize, in a redox-dependent manner, in part through the formation of a disulfide bond between cysteine 57 (C57) of two adjacent monomers. They also identified other interactions mediating dimer formation; namely a pair of hydrogen bonds between glutamine 12 (Q12) and arginine 68 (R68) and an ion pair between arginine 172 (R172) and aspartic acid 175 (D175) (Sanders et al., 2007). Biochemical studies provided evidence that this mode of dimerization occurs between TADs within the same E2 dimer, rather than between separate dimers. In vitro, the purified BPV1 E2 TAD was found to dimerize under non-reducing conditions, a phenomenon that could be abolished by substitution to alanine of either C57 or R172 and, to a lesser extent, of D175. The locations of C57, R172 and D175 within the crystal structure of the BPV1 E2 TAD are shown in Fig. 1. Despite the clear demonstration that dimerization of the TAD occurs in vitro under oxidizing conditions, it is unclear if it also occurs in vivo. Unfortunately, demonstrating the specific dimerization of the TAD in vivo is likely to be technically challenging given that full-length E2 dimerizes primarily via its C-terminal OBD. In this study, we have opted to investigate the function of the putative TAD dimerization interface in vivo by characterizing the effect of the C57A, R172A and R175A substitutions, either alone or in combination, on the transactivation and DNA replication activities of BPV1 E2 in vivo. Our results suggest that the TAD dimerization interface is not essential for either function of BPV1 E2 but may play a role in its DNA replication activity.

3.4 Results

3.4.1 Expression of BPV1 E2 mutant proteins with amino acid substitutions in the TAD dimerization interface.

As a first step towards determining the function of the TAD dimerization interface *in vivo*, we constructed plasmids expressing untagged BPV1 E2 from the CMV promoter, either the wild type protein or mutant derivatives bearing the C57A, R172A and D175A substitutions alone or in combination. In the remainder of this paper, we will refer to these three substitutions as CA, RA and DA, respectively. These vectors were transfected into C33A human cervical carcinoma cells and the expression of E2 assessed 24 hours later by Western blotting using the anti-BPV1 E2 antibody 1E4 (Kurg et al., 1999). Five different experiments were performed using separate DNA preparations for transfection. All five Western blots yielded similar results and were analyzed by densitometry to determine the average expression level of each mutant protein relative to that of wild type E2, which was set at 100% (Table 1). One of the blots is shown in Fig. 2A. All seven E2 mutant proteins were expressed at the anticipated molecular weight albeit some at lower levels than wild type E2 (Fig. 2A). The CA single and CA/RA/DA triple mutant proteins were the least expressed, at levels approximately 50-55% that of wild type E2 ($p < 0.0001$). The two double mutant proteins containing the CA substitution (CA/RA and CA/DA) also consistently displayed reduced expression, accumulating at levels approximately 80-85% that of wild type E2, although these differences did not reach statistical significance. The RA single mutant protein was the only one that was consistently expressed at slightly higher levels than wild type E2 ($\sim 125\%$, $p = 0.03$). The remaining mutant proteins accumulated at wild type levels. Collectively, these results indicate that substitutions in the TAD dimerization interface do not dramatically alter the expression of BPV1 E2, the levels of the protein being reduced at the most by half in the case of the CA and CA/RA/DA substitutions.

3.4.2 The integrity of the TAD dimerization interface is not required for the nuclear localization of BPV1 E2.

Wild type BPV1 E2 accumulates primarily in the nucleus of transfected cells. To test if the TAD dimerization interface is required for nuclear accumulation of E2, we compared the intracellular localization of the untagged CA/RA/DA triple mutant protein to that of wild type E2 by immunofluorescence in transfected C33A cells, using the 1E4 antibody. As expected, the signal intensity of the CA/RA/DA protein was weaker than that of wild type E2, confirming its lower expression. More importantly, the intracellular distribution of the mutant protein was similar to that of wild type E2; the protein being exclusively nuclear in approximately two-third of the cells and present in 140 both the nucleus and cytoplasm in the remaining third (Fig. 2B). Both the wild type and mutant E2 accumulated within discrete foci when in the nucleus, as previously reported (Baxter et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Penrose and McBride, 2000). The more punctate appearance of cells expressing the triple mutant E2 protein simply reflects its lower expression; indeed cells in which WT E2 was expressed a lower levels also appeared more punctate (data not shown). From these results, we conclude that residues C57, R172 and D175 are not required for the nuclear accumulation of BPV1 E2 and, by extension, that the integrity of the TAD dimerization interface is also not needed for this process.

3.4.3 Transcriptional transactivation activities of the BPV1 E2 mutant proteins.

Next, we tested the ability of the untagged E2 proteins to transactivate a firefly luciferase (Fluc) gene under the control of four E2-binding sites. C33A cells were transfected with increasing amounts of E2 expression vector and constant amounts of the Fluc reporter gene and of an internal control vector for normalization (pRL, expressing Renilla luciferase from the CMV promoter (Fradet-Turcotte et al., 2010)). The levels of luciferase activities were measured 24 hours post-transfection and the normalized values

used to calculate the fold-transactivation of the reporter gene are presented in Fig. 3A. Under our assay conditions, wild type BPV1 E2 could transactivate the reporter gene nearly ten-fold at the highest concentration of expression vector tested. All of the mutant proteins showed reduced level of transactivation but none were completely defective for this activity. As an approximation of the transcriptional activities of the different E2 proteins, we measured the area under the curve (AUC) generated for each protein. These AUC values, presented in Table 1 relative to the AUC determined for wild type E2 (set at 100%), allowed for the different E2 proteins to be compared. The transcriptional activities of the RA and DA single mutant proteins were not statistically different from that of wild type E2. The activity of the CA/RA protein was only slightly lower than wild type ($p < 0.03$). In contrast, the remaining four mutant proteins, CA, CA/DA, RA/DA and CA/RA/DA, were all significantly less potent at transactivating the reporter gene than wild type E2 ($p < 0.001$). The CA single and CA/RA/DA triple mutant proteins were the least active, displaying 50-55% of the activity of wild type E2 (Fig. 3A and Table 1), a result suggesting that C57 is important, albeit not essential, for the transcriptional activity of E2. Because these two proteins were the least expressed (Fig. 2A), we wondered if their reduced transactivation activity was a consequence of their lower steady-state levels. To test this hypothesis, we repeated the transactivation assay with the CA/RA/DA triple mutant protein but this time using higher amounts of E2-expression vector to saturate the reporter gene. As can be seen in Fig. 3B, titration of increasing amounts of wild type E2 resulted in high levels of transactivation that reached a plateau at approximately 23-fold. As for the CA/RA/DA triple mutant protein, it could transactivate the reporter gene essentially to the same level as wild type E2, indicating that it is not inherently defective for this activity. However, the amount of E2 expression vector required to achieve half-maximal transactivation of the reporter gene (EC_{50}) was approximately 2.5 fold higher for the triple mutant protein ($EC_{50}=12$ ng) than for wild type E2 ($EC_{50}=5$ ng). These results indicate that the triple mutant protein is not intrinsically defective for transactivation and suggest that its 2.5-fold lower activity observed at sub-saturating levels of expression vector (Fig. 3A) is mostly a reflection of its reduced steady state accumulation. From these results, we conclude that amino acids C57, R172 and D175 are not absolutely required for the intrinsic transactivation activity of E2. By

extension, we surmise that the integrity of the TAD dimerization interface is also not essential for this activity.

3.4.4 Development of a luciferase-based BPV1 DNA replication assay.

To compare the DNA replication activities of the different BPV1 E2 mutant proteins, we first established a quantitative, transient BPV1 DNA replication assay based on a luciferase readout, essentially as we reported previously for HPV31 (Fradet-Turcotte et al., 2010) (Fig. 4). The assay is based on a plasmid containing both the BPV1 origin of DNA replication and a CMV-Fluc reporter gene (pFLORI-BPV1, Fig. 4A), whose replication by E1 and E2 in C33A cells results in increased Fluc expression. A second plasmid expressing Rluc from the CMV promoter (pRL, lacking an origin, Fig. 4A) is used as an internal control, allowing the DNA replication results to be quantified as Fluc/Rluc ratios. To validate this assay, we confirmed that replication of the CMV-Fluc plasmid was dependent on the presence of the BPV1 origin and on expression of E1 and E2 (Fig. 4B). Two different origin fragments were tested, either a short one (nt 7891-31 in the BPV1 genome sequence, Genbank accession X02346.1) or a longer one (nt 7476-57) (Pirsoo et al., 1996)), with comparable results (Fig. 4B). Similarly, two different E1-expression vectors were compared, either pCG E1Eag 1235', which contains a mutation of the major splice site located within the E1 ORF, or a precursor plasmid lacking this mutation. It was previously shown that mutation of this splice site results in higher levels of DNA replication, presumably because of increased E1 expression (Ustav and Stenlund, 1991). Our results confirmed this finding, as shown by the observation that the splice site mutation increased DNA replication by approximately 5-fold (Fig. 4B). For the remainder of this study, the assay will be performed with the E1 expression vector containing the splice site mutation in combination with the firefly luciferase vector carrying the long origin. To further validate this novel assay, we verified that replication of the ori-plasmid could be inhibited by the known DNA replication inhibitors hydroxyurea ($EC_{50} = 470 \mu\text{M}$),

gemcitabine ($EC_{50} = 6$ nM) and aphidicolin ($EC_{50} = 164$ nM) (Fig. 5). From these results, we conclude that the levels of firefly luciferase measured in our assay increase as a function of ori-plasmid replication by E1 and E2.

3.4.5 DNA replication activities of the BPV1 E2 mutant proteins.

The luciferase assay presented above was then used to measure the DNA replication activities of the different E2 mutant proteins 72 hours following transfection in C33A cells. These studies revealed that all 7 mutant proteins were defective but not completely inactive in supporting transient DNA replication (Fig. 6A). To estimate the DNA replication activity of each mutant protein relative to that of wild type, we measured the area under the curve (AUC) generated for each E2 protein (Table 1), essentially as we did in Fig. 3 to assess their transcriptional activity. All E2 mutant proteins were found to have a statistically significant lower DNA replication activity than wild type E2, except for the RA protein. The CA/RA double and CA/RA/DA triple mutant proteins were the least active, displaying approximately 30-40% the activity of wild type E2. To determine if the lower activity of the CA/RA/DA triple mutant E2 was due to its lower expression level or to an intrinsic DNA replication defect, we repeated the DNA replication assay using higher and saturating amounts of E2 expression vector. Under these conditions, the maximal level of replication obtained with the triple mutant E2 remained at 45% that obtained with the wild type protein (Fig. 6B). These results suggest that the CA/RA/DA mutant E2 is intrinsically deficient for DNA replication. Collectively, the results presented above point to the TAD dimerization interface as being important, albeit not essential, for viral DNA replication. As in any mutational analysis, however, we cannot rule out that the CA, RA and DA substitutions also affect DNA replication by another yet-undefined mechanism distinct from interfering with dimerization of the TAD.

3.5 Discussion

The BPV1 E2 TAD dimerization interface was discovered and extensively characterized *in vitro* by Sanders et al. (2007). This study is the first to investigate the role of this TAD dimerization interface *in vivo*. To do so, we took advantage of the three amino acid substitutions, CA, RA and DA, previously shown by Sanders et al. to significantly reduce dimerization of the TAD *in vitro*. Our results, summarized in Table 1, indicate that the CA substitution, alone or in combination with the other substitutions, had generally the greatest effect on the expression, transcriptional activity and DNA replication activity of E2. This is in contrast to the RA and DA substitutions which, alone or together, were better tolerated; the largest effect being a 30% reduction in DNA replication activity imposed by the DA single and RA/DA double substitutions. The CA substitution should abolish the possibility of disulfide bond formation between adjacent TADs and thus prevent any form of redox-dependent regulation of this domain *in vivo*. Our finding that the CA single mutant E2 retains 50-60% of transactivation and DNA-replication activities suggests that formation of a disulfide bond between the two C57 of adjacent TADs is not essential for these functions of E2. These results are also consistent with those of Sanders et al. indicating that the CA substitution does not significantly impair the interaction of E2 with E1 *in vitro* (Sanders et al., 2007). The formation of the two salt bridges between R172 and D175 of adjacent TADs also appears to be non-essential for the transactivation and DNA replication activities of E2, as both the single (RA and DA) and double (RA/DA) mutant proteins were well expressed and retained significant levels of transactivation and DNA replication activity. Collectively, these results indicate that neither the C57-C57 disulfide bond nor the two R172-D175 salt bridges between adjacent E2 monomers are essential for the expression as well as transcription and DNA replication activities of E2 *in vivo*. As such, they suggest that dimerization of the TAD is not crucial for these activities, a notion that is in agreement with previous studies indicating that BPV1 E2 heterodimers containing

a single TAD are functional, albeit at reduced levels compared to full-length E2 homodimers (Kurg et al., 2006; Kurg et al., 2009; Kurg et al., 2010).

Although not strictly essential, the TAD dimerization interface may contribute to some extent to the functions of E2, as suggested by the phenotypes of the double (CA/RA and CA/DA) and triple (CA/RA/DA) mutant proteins in which formation of the C57 disulfide bond and R172-D175 salt bridges are prevented simultaneously. These E2 mutant proteins should in theory be the most impaired for TAD dimerization and, accordingly, displayed the most severe phenotypes in the DNA replication assay. They were also significantly compromised for transactivation, with the exception of the CA/RA double mutant which retained approximately 85% of the activity of wild type E2. Not surprisingly, the CA/RA/DA triple mutant E2 was the least active showing a 50-60% reduction in transactivation and DNA replication activity. Because it was the most defective, we chose to further characterize this triple mutant protein, relative to wild type E2, using full-dose response curves. The transactivation and DNA replication data could be fitted by non-linear regression to a classical sigmoid dose-response curve, with excellent goodness-of-fit values, thus validating the robustness of our assays for characterizing and comparing mutant proteins (Fig, 3B and 6B). These studies revealed that the 50% weaker transcriptional activity of the triple mutant E2 could be rescued by overexpression of the protein. This finding suggests that the triple mutant E2 is transcriptionally compromised primarily because of its reduced expression and not because it is intrinsically deficient for this activity. In stark contrast, overexpression of the triple mutant E2 could not rescue its DNA replication defect, the activity of the protein remaining approximately 45% that of wild type E2. This key result suggests that the triple mutant E2 is intrinsically deficient for some aspect of viral DNA replication. As such, it raises the possibility that the TAD dimerization interface, although not essential for BPV1 DNA replication, may be required structurally and/or functionally for this process.

Although the single, double or triple amino acid substitutions that we introduced in the TAD did not completely abolish the transactivation and DNA replication activities of E2, some could nevertheless have dramatic effects on the BPV1 life cycle. Indeed, it has been observed previously that many amino acid substitutions in E2 that only partially reduce its transactivation and/or DNA replication activity often impose a more severe phenotype in longer-term assays involving the maintenance and/or segregation of the viral episome in immortalized proliferating cells (Abroi et al., 2004; Brokaw, Blanco, and McBride, 1996). As an example relevant to this study, Kurg et al. (2006) observed that an E2 heterodimer carrying a single TAD is only partially defective in a transient transactivation assay but severely compromised in a BPV plasmid segregation assay performed over several cell divisions; the phenotype in each assay likely being caused by the weaker binding of the single TAD E2 to the cellular protein Brd4, a key mediator of E2's transcription and segregation activities. By analogy, it is possible that the CA single and CA/RA/DA triple mutant proteins characterized in this study, which display ~50% transactivation activity, would also be defective in a segregation assay. Additional studies will be required to test this possibility and, more generally, to determine the capacity of these mutant proteins to interact with factors such as Brd4 and the viral E1 helicase to promote transcription, replication and segregation of the BPV1 episome. In summary, the results from our mutational analysis indicate that the TAD dimerization interface is not strictly required for the transactivation and DNA replication activities of BPV1 E2 in transient assays, but also support the notion that the two TADs within an E2 dimer are not completely independent and must productively dimerize for full activity, in particular to facilitate replication of the viral episome in infected cells.

3.6 Materials and Methods

Plasmid constructions and mutagenesis.

The plasmid used to express untagged BPV1 E2 was constructed in two steps. First, a BamHI-XbaI digested PCR fragment encoding the E2 ORF was inserted between the

BamHI and XbaI sites of pRluc-3xFLAG (Gagnon et al., 2009). The following pairs of primers were used for amplification of E2: 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' and 5'-CCCTCTAGATCAGAAGTCCAAGCTGGCTGTAAAGCC-3'. In the second step, most of the pRluc-3xFLAG-E2 plasmid, except for the region encoding the Rluc-3xFlag tag, was amplified with the following pair of primers, 5'-CCCGAATTCATGGAGACAGCATGCGAACGTTTACATG-3' and 5'-CCCGAATTCGGTGGCTCTAGCGGATCTGAC-3', digested with EcoRI and re-circularized. The resulting plasmid, pBPV1E2, expresses untagged E2 from the CMV promoter. Mutations in the BPV E2 ORF were constructed using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details about their construction will be made available upon request.

Antibodies and Western blotting.

For Western blot analysis, proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes. BPV1 E2 was detected with the mouse monoclonal antibody 1E4 obtained from Santa Cruz Biotechnology (catalogue no. sc-57644) and used at a dilution of 1:500. β -tubulin, used as a loading control, was detected using a monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (catalogue no. T4026) at a dilution of 1:2000. Proteins were visualized using a horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse secondary antibody purchased from GE Healthcare (catalogue no. NA931, used at a 1:5000 dilution) and the chemiluminescent PLUS Western blotting detection reagents procedure from GE Healthcare. Blots were quantified using a ChemiDoc MP Imaging System and the Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad).

Cell culture and transfections.

Human cervical carcinoma C33A cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 I.U. of penicillin/ml, 50 µg of streptomycin/ml and 2mM of L-glutamine. Transfections were performed using the Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Confocal fluorescence microscopy.

C33A cells were grown on coverslips. For immunofluorescence, cells were fixed 24 hours post-transfection with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with the 1E4 antibody diluted 1:200 in PBS-2% milk for 1.5 h, followed by 1 hour of incubation with a 1:1000 dilution of Alexa Fluor 633-conjugated secondary antibody. Cells were washed with PBS between each step and then mounted using VectaShield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) and analyzed by using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss).

Transient transactivation assay.

Transactivation assays were performed in 96-wells plates in which C33A cells were plated 24 hours before transfection at a density of 25 000 cells. Transfection reactions contained increasing quantities of E2-expression plasmid, as indicated in the text, completed with the appropriate amount of pCI plasmid (Promega) in order to maintain constant the total amount of DNA in each well. Transfection reactions also contained 160 ng of pK4xE2BS reporter plasmid expressing firefly luciferase under the control of four E2 binding sites (kind gift from Laimonis A. Laimins, Northwestern University) and 0.5 ng of the pRL

control vector expressing Renilla luciferase. Dual-luciferase measurements were performed 24 hours post-transfection as described above.

Transient BPV1 DNA replication assay.

This assay was developed and performed essentially as described previously (Fradet-Turcotte et al., 2010) but using E1, E2 and the DNA replication origin from BPV1. Briefly, $\sim 20 \times 10^4$ C33A cells were transfected with four plasmids encoding, respectively, E1 (pCG E1Eag 1235⁻) (Ustav and Stenlund, 1991), E2 (pBPV1E2), the origin of DNA replication in cis of a firefly luciferase reporter gene (pFLORI-BPV1), and Renilla luciferase (pRL). Under standard conditions, 0.03 to 0.50 ng of E2-expression vector, in two-fold increments, were used along with constant amounts of the other plasmids (20 ng of pCG E1Eag 1235⁻, 2.5 ng of pFLORI-BPV1, and 0.5 ng of pRL). For all conditions, replication of the origin containing plasmid was quantified 72 hours post-transfection by measuring the levels of firefly and Renilla luciferase activities using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega). EC₅₀ values for hydroxyurea, gemcitabine and aphidicoline were calculated with the GraphPad Prism 5 software by fitting the data to the following equation: % DNA replication = Low + (100 - Low)/(1 + 10^{((LogEC50 - [I]) * n)}), in which Low represents the lowest percentage of DNA replication reached at saturating amounts of inhibitor, [I] represents the concentration of the inhibitor (M), and n represents the Hill coefficient.

Statistical analysis.

ANOVA with Dunnett's post-hoc analysis, as well as 400 calculations of AUC values, were performed using GraphPad Prism version 6.00.

3.7 Acknowledgements

We thank Gretchen Meinke for help in generating figure 1. This work was supported by grants from the Intramural Research Program of the NIAID, NIH, to AAM from the Cancer Research Society (CRS) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to JA. HS holds a studentship from the CIHR.

3.8 References

Abbate, E.A., Berger, J.M., Botchan, M.R., (2004). The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* **18**, 1981-1996.

Abbate, E.A., Voitenleitner, C., Botchan, M.R., (2006). Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* **24**, 877-889.

Abroi, A., Kurg, R., Ustav, M., (1996). Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* **70**, 6169-6179.

Antson, A.A., Burns, J.E., Moroz, O.V., Scott, D.J., Sanders, C.M., Bronstein, I.B., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Maitland, N.J., (2000). Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* **403**, 805-809.

Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K., McBride, A.A., (2005). The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* **79**, 4806-4818.

Benson, J.D., Howley, P.M., (1995). Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *J Virol* **69**, 4364-4372.

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

Blachon, S., Demeret, C., (2003). The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* **85**, 813-819.

Breiding, D.E., Gossel, M.J., Androphy, E.J., (1996). Genetic analysis of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activation domain. *Virology* **221**, 34-43.

Brokaw, J.L., Blanco, M., McBride, A.A., (1996). Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J Virol* **70**, 23-29.

Clower, R.V., Hu, Y., Melendy, T., (2006). Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology* **348**, 13-18.

Donaldson, M.M., Mackintosh, L.J., Bodily, J.M., Dornan, E.S., Laimins, L.A., Morgan, I.M., (2012). An Interaction between Human Papillomavirus 16 E2 and TopBP1 Is Required for Optimum Viral DNA Replication and Episomal Genome Establishment. *J Virol* **86**, 12806-12815.

Doorbar, J., (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S7-15.

Ferguson, M.K., Botchan, M.R., (1996). Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J Virol* **70**, 4193-4199.

Fradet-Turcotte, A., Morin, G., Lehoux, M., Bullock, P.A., Archambault, J., (2010). Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* **399**, 65-76.

Gagnon, D., Joubert, S., Senechal, H., Fradet-Turcotte, A., Torre, S., Archambault, J., (2009). Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol* **83**, 4127-4139.

Grossel, M.J., Sverdrup, F., Breiding, D.E., Androphy, E.J., (1996). Transcriptional activation function is not required for stimulation of DNA replication by bovine papillomavirus type 1 E2. *J Virol* **70**, 7264-7269.

Harris, S.F., Botchan, M.R., (1999). Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* **284**, 1673-1677.

Hebner, C.M., Laimins, L.A., (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* **16**, 83-97.

Hegde, R.S., (2002). The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 343-360.

Hernandez-Ramon, E.E., Burns, J.E., Zhang, W., Walker, H.F., Allen, S., Antson, A.A., Maitland, N.J., (2008). Dimerization of the human papillomavirus type 16 E2 N terminus results in DNA looping within the upstream regulatory region. *J Virol* **82**, 4853-4861.

Howley, P.M., and D.R. Lowy, (2001). Papillomaviruses, p. 2231-2264, *Fields virology*, vol. 2. In D.M. Knipe 4th ed. Lippincott Raven, Philadelphia, PA, pp. 2231-2264.

Kurg, R., Parik, J., Juronen, E., Sedman, T., Abroi, A., Liiv, I., Langel, U., Ustav, M., (1999). Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *J Virol* **73**, 4670-4677.

Kurg, R., Tekkel, H., Abroi, A., Ustav, M., (2006). Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. *J Virol* **80**, 11218-11225.

Kurg, R., Uusen, P., Sepp, 420 T., Sepp, M., Abroi, A., Ustav, M., (2009). Bovine papillomavirus type 1 E2 protein heterodimer is functional in papillomavirus DNA replication in vivo. *Virology* **386**, 353-359.

Kurg, R., Uusen, P., Vosa, L., Ustav, M., (2010). Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for long-term maintenance of virus genome. *Virology* **408**, 159-166.

Li, R., Botchan, M.R., (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* **73**, 1207-1221.

Longworth, M.S., Laimins, L.A., (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 362-372.

McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., Spindler, J.E., Mitra, R., McBride, A.A., (2006). Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* **80**, 9530-9543.

Oliveira, J.G., Colf, L.A., McBride, A.A., (2006). Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1047-1052.

Penrose, K.J., McBride, A.A., (2000). Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* **74**, 6031-6038.

Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., Ustav, M., (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* **15**, 1-11.

Sakai, H., Yasugi, T., Benson, J.D., Dowhanick, J.J., Howley, P.M., (1996). Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J Virol* **70**, 1602-1611.

Sanders, C.M., Sizov, D., Seavers, P.R., Ortiz-Lombardia, M., Antson, A.A., (2007). Transcription activator structure reveals redox control of a replication initiation reaction. *Nucleic Acids Res* **35**, 3504-3515.

Schweiger, M.R., You, J., Howley, P.M., (2006). Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**, 4276-4285.

Senechal, H., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., Archambault, J., (2007). Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* **358**, 10-17.

Ustav, M., Stenlund, A., (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* **10**, 449-457.

Wang, Y., Coulombe, R., Cameron, D.R., Thauvette, L., Massariol, M.J., Amon, L.M., Fink, D., Titolo, S., Welchner, E., Yoakim, C., Archambault, J., White, P.W., (2004).

Crystal structure of the E2 transactivation domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor. *J Biol Chem* **279**, 6976-6985.

Wu, S.Y., Chiang, C.M., (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* **282**, 13141-13145.

Wu, S.Y., Lee, A.Y., Hou, S.Y., Kemper, J.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chiang, C.M., (2006). Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* **20**, 2383-2396.

You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K., Howley, P.M., (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**, 349-360.

You, J., Schweiger, M.R., Howley, P.M., (2005). Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus transformed cells. *J Virol* **79**, 14956-14961.

zur Hausen, H., and E.M. de Villier, (1994). Human Papillomaviruses. *Annual review of microbiology* **48**, 427-447.

3.9 Figure Legends

Figure 3.1. Structure of the BPV1 E2 TAD dimer showing the location of amino acids mutated in this study.

(A) Surface and (B) ribbon diagram of the E2 TAD dimer (PDB accession code 2jeu). The two TAD monomers are colored in red and blue, respectively. (C) Location of C57, R172 and D175. C57 is visible only in the blue monomer and is colored in red. R172 and D175 are visible only in the red monomer and are colored in blue. Filled arrows point to residues on the visible face of each monomer while dashed arrows point to the analogous residues located on the hidden face of the opposite monomer. Images were generated with PyMol.

Figure 3.2. Expression and intracellular localization of BPV1 E2 mutant proteins.

(A) Representative Western blot analysis of C33A cells transiently expressing the indicated wild type (WT) or mutant E2. Untagged E2 proteins were detected with the 1E4 antibody. Half (1/2) and one quarter (1/4) of the amount of WT E2-containing extract were used as standards. β -tubulin was used as a loading control. The bar graph shows the expression levels of WT and mutant E2 proteins quantified from five independent Western blots, including the one presented in panel A. Standard deviations are indicated (B). The intracellular localization of untagged wild type or CA/RA/DA triple mutant E2 was determined in transiently expressing C33A cells by immunofluorescence confocal microscopy using the 1E4 antibody. Nuclei were stained with DAPI. The percentages of transfected cells showing accumulation of E2 either exclusively in the nucleus (N), or in both the nucleus and cytoplasm (NC), were derived from the analysis of 300 cells and are indicated on the left.

Figure 3.3. Transcriptional activities of wild type and mutant BPV1 E2.

Transcriptional activities of wild type (WT) and mutant E2 proteins obtained at increasing amounts of E2-expression vector. The dose-response curve obtained for WT E2 is repeated in each graph for comparison. Transcriptional activities were determined from C33A cells co-transfected with a firefly luciferase reporter gene under the control of four E2-binding sites and increasing amounts of E2-expression vector (from 0.03 to 0.50 ng in two-fold increments). A Renilla luciferase expression plasmid was used for normalization. The values are reported as “fold-transactivation” of the reporter gene calculated relative to the level measured in absence of E2 (-), which was set at 1. The transcription-defective BPV1 E2 R37A/I73A mutant protein was used as a control (Ctl) (Abroi, Kurg, and Ustav, 1996; Breiding, Gossel, and Androphy, 1996; Brokaw, Blanco, and McBride, 1996; Ferguson and Botchan, 1996; Gossel et al., 1996). For each of the indicated E2 protein, the dose-response curve that is presented was obtained from two independent experiments, each done in duplicates using a separate plasmid preparation (i.e. each dose response curve is the average of four determinations). (B) Same as in panel A but using higher amounts of E2 expression vector (from 0.016 to 150 ng in 2.5-fold increments). The data was fitted to a sigmoidal dose-response curve using the following equation: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ where Y=fold-transactivation value, Bottom=1, Top=maximal level of transactivation and X=amount of E2 expression plasmid (in grams). “Goodness-of-fit” values were $R^2=0.98$ for WT E2 and $R^2=0.97$ for the CA/RA/DA triple mutant protein.

Figure 3.4. Development of a luciferase-based BPV1 DNA replication assay.

(A) Schematic representation and names of the plasmids used in this assay. The location of the BPV1 origin of replication in pFLORI-BPV1 is indicated by a black box. Two different ori-fragments were used; a short and a long one, whose nucleotide boundaries within the BPV1 genome are indicated in italics above and below the black box. The nucleotide

boundaries of the E1 and E2 coding regions are also indicated. Plasmid pCG E1Eag 1235- used to express E1 was published previously (Ustav and Stenlund, 1991) and contains a fragment of the BPV1 genome, spanning nucleotides 619-4010, in which the major splice site at nucleotide 1235 was mutated (E1 SM in panel B) and the sequences between nucleotides 2776-3881 deleted (del). A version of this plasmid retaining the major splice site was also used (E1 WT in panel B) (B) DNA replication activities measured in C33A cells transfected with increasing amounts of expression vectors for E1 (either WT or SM) and E2 (each from 0.78 to 50 ng in two-fold increments) together with pFLORI-BPV1 containing the short or long origin, as indicated. Plasmid pCI-Fluc, lacking the ori (no ori), was used as a negative control. DNA replication activities are expressed as Fluc/Rluc ratios and were measured 72 hrs post-transfection.

Figure 3.5. Sensitivity of the luciferase-based BPV1 DNA replication assay to DNA replication inhibitors.

EC50 curves were generated using 12-concentrations of hydroxyurea, gemcitabine and aphidicoline. Each point is the average of duplicate values with standard deviations indicated. C33A cells were co-transfected with the ori, E1, E2 and control plasmids and treated for 24 hrs with each compound starting 4 hrs post-transfection.

Figure 3.6. DNA replication activities of wild type and mutant BPV1 E2.

(A) The DNA replication activities of wild type (WT) and mutant E2 proteins obtained at increasing amounts of E2-expression vector. The dose-response curve obtained for WT E2 is repeated in each graph for comparison. DNA replication activities were determined from C33A cells co-transfected with a plasmid that encodes the BPV1 origin and a firefly luciferase (Fluc) reporter gene (pFLORI-BPV1), together with an E1-expression plasmid (pCG E1Eag1235-) and increasing amounts of E2-expression vector (from 0.03 to 0.50 ng in two-fold increments).

A Renilla luciferase (Rluc) expression plasmid was used for normalization. The DNA-replication values are reported as Fluc/Rluc ratios. The partially replication-defective BPV1 E2 R47Q/K48Q/K49Q/R58Q/H61N mutant protein (D2 mutant in (Baxter et al., 2005)) was used as a control (Ctl). For each of the indicated E2 protein, the dose-response curve that is presented was obtained from two independent experiments, each done in duplicates using a separate plasmid preparation (i.e. each dose response curve is the average of four determinations). (B) Same as in panel A but using higher amounts of E2 expression vector (from 0.016 to 150 ng in 2.5-fold increments). The data was fitted to a sigmoidal dose-response curve using the following equation: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ where Y=DNA replication value, Bottom=DNA replication value obtained in absence of E2, Top=maximal level of DNA replication and X=amount of E2 expression plasmid (in grams). “Goodness-of-fit” values were $R_2=0.98$ for WT E2, $R_2=0.96$ for the CA/RA/DA triple mutant protein and $R_2=0.98$ for the control protein.

Table I. Summary of the expression and activities of BPV1 E2 mutant proteins

BPV1 E2	Expression		Transactivation		DNA Replication	
	% ^a	p-value ^b	AUC (%) ^c	p-value ^d	AUC (%) ^e	p-value ^d
WT	100		100 ± 12		100 ± 32	
CA	52 ± 10	<0.0001	54 ± 7	<0.0001	58 ± 3	<0.0001
RA	126 ± 18	0.03	96 ± 8	ns	91 ± 3	ns
DA	104 ± 21	ns	94 ± 7	ns	70 ± 3	0.005
CA/RA	80 ± 17	ns	84 ± 8	0.03	30 ± 1	<0.0001
CA/DA	86 ± 15	ns	71 ± 8	<0.0001	46 ± 4	<0.0001
RA/DA	102 ± 11	ns	64 ± 6	<0.0001	67 ± 4	0.002
CA/RA/DA	53 ± 9	<0.0001	51 ± 5	<0.0001	38 ± 2	<0.0001

^a from Fig. 2B

^b variance relative to WT E2 assessed by one-way ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc analysis

^c from Fig. 3A

^d variance relative to WT E2 assessed by two-way ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc analysis

^e from Fig. 6A

AUC = area under the curve

ns = statistically not significant

3.10 Figures

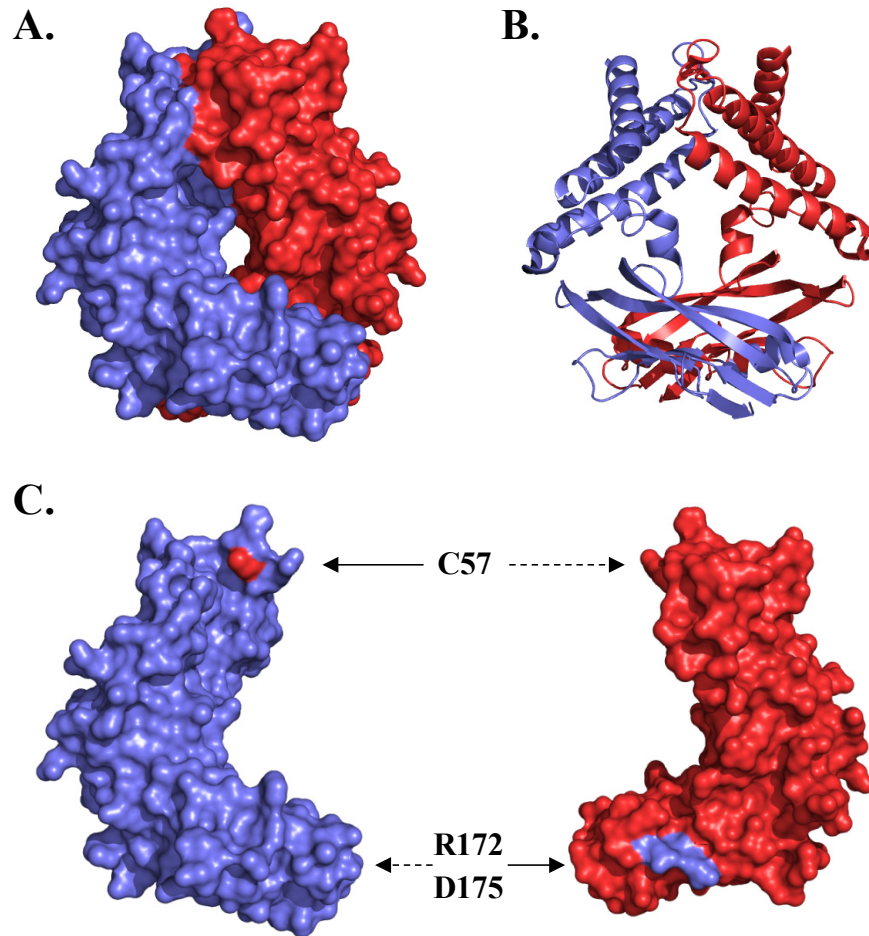


Figure 3.1. Structure of the BPV1 E2 TAD dimer showing the location of amino acids mutated in this study.

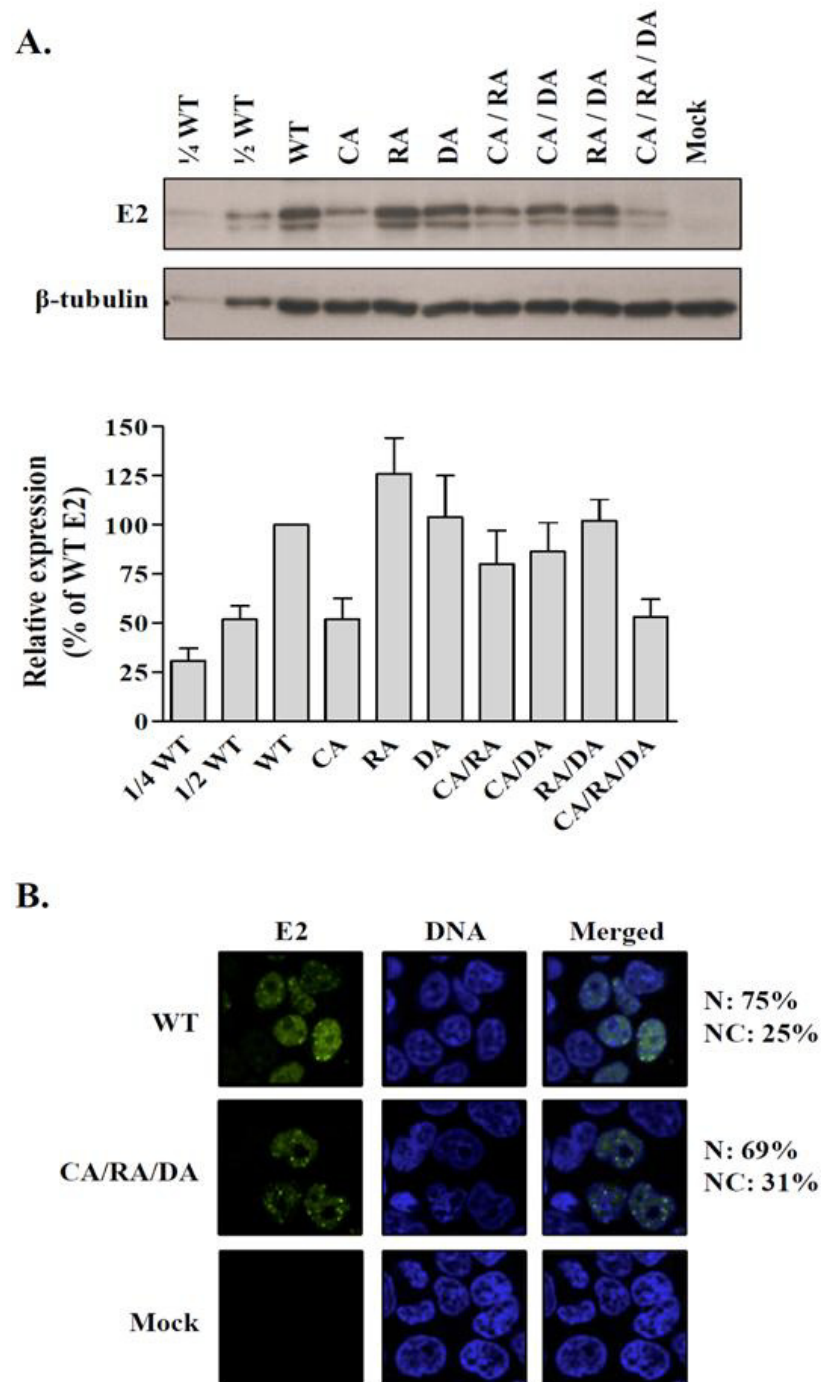


Figure 3.2. Expression and intracellular localization of BPV1 E2 mutant proteins.

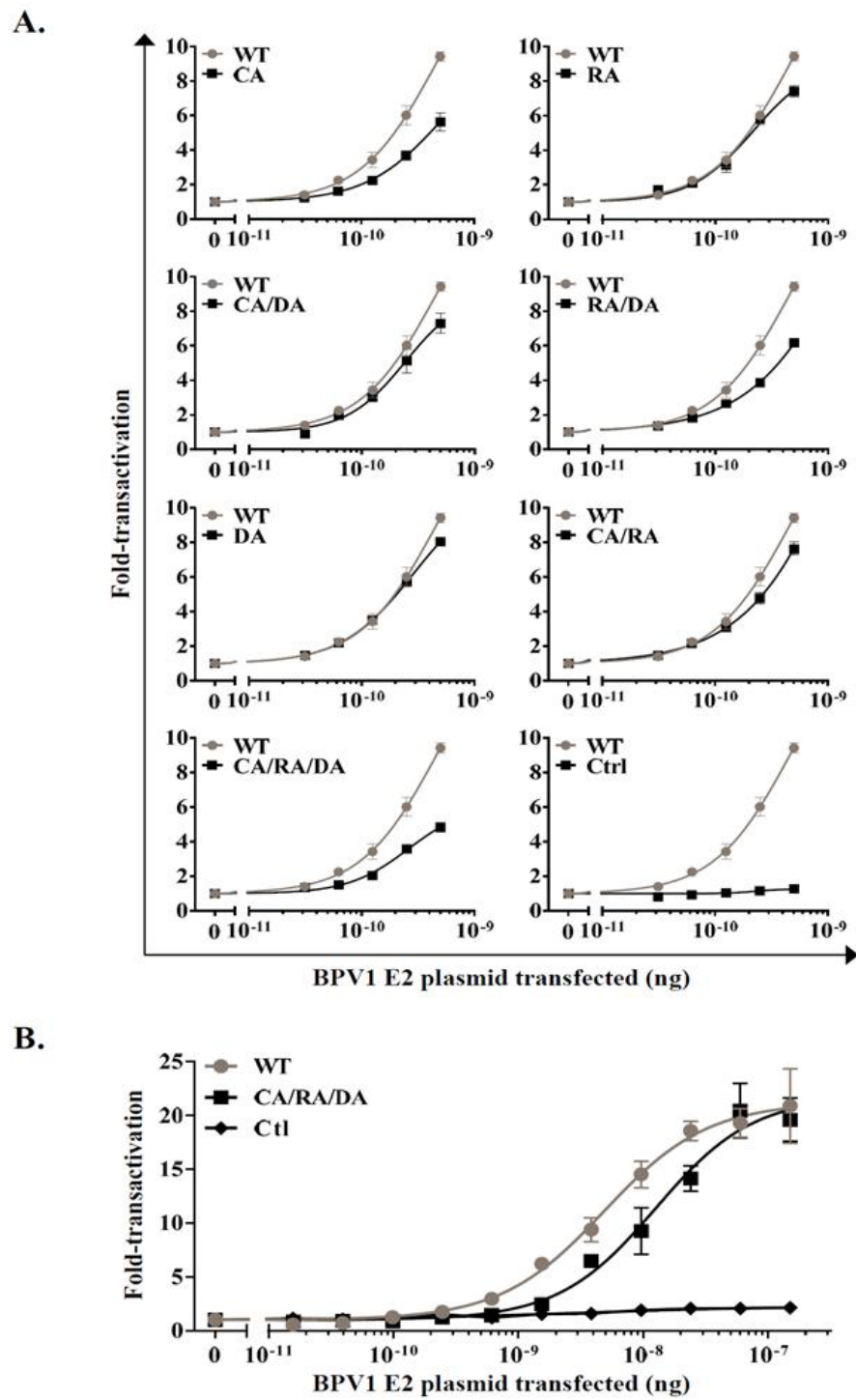
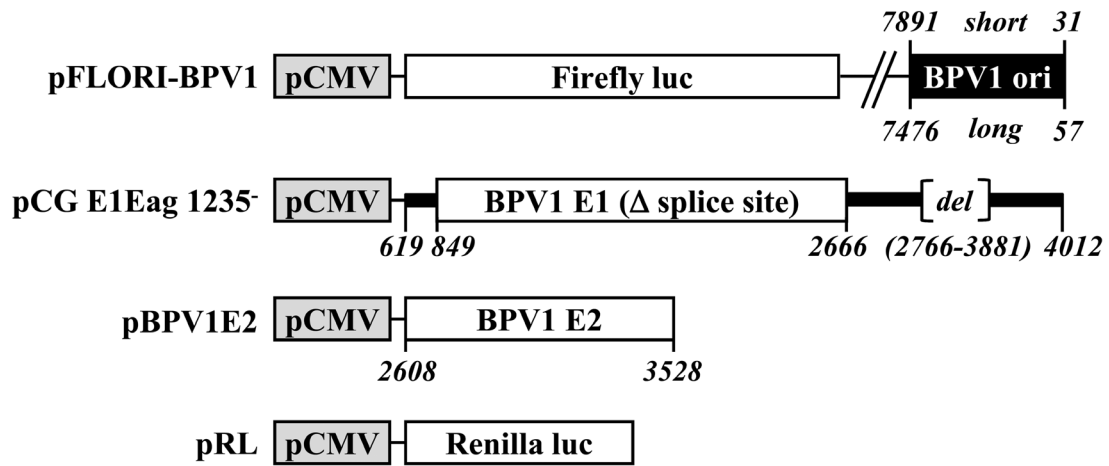


Figure 3.3. Transcriptional activities of wild type and mutant BPV1 E2.

A.



B.

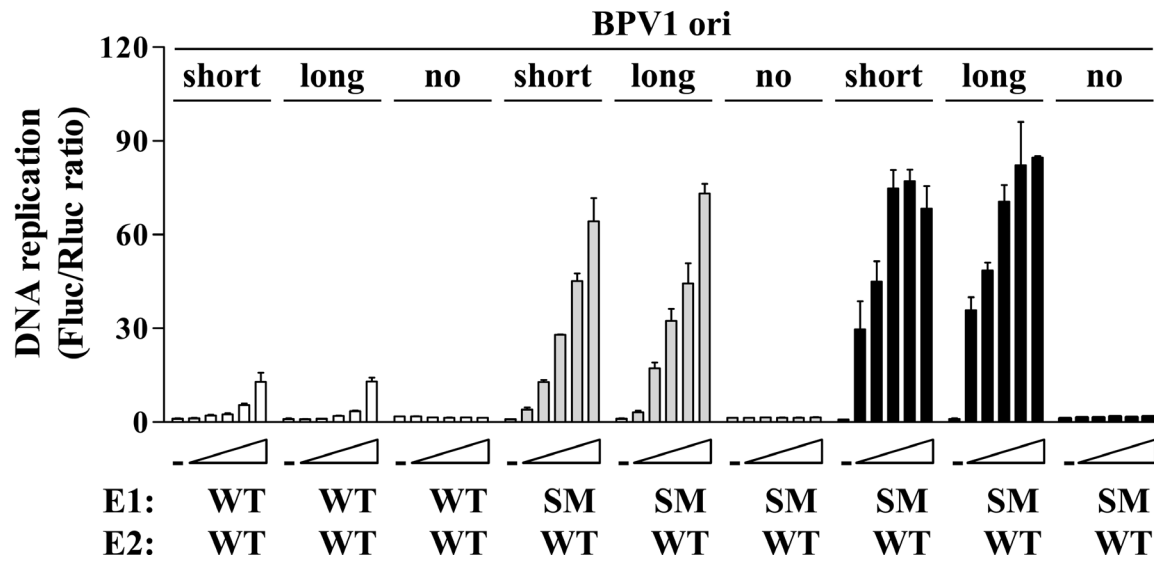


Figure 3.4. Development of a luciferase-based BPV1 DNA replication assay.

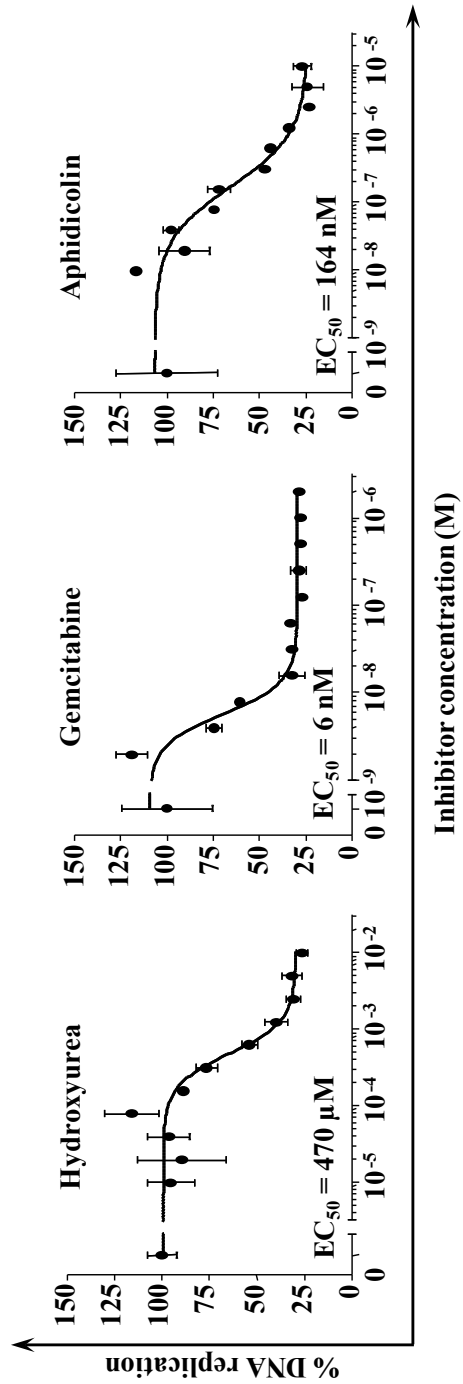


Figure 3.5. Sensitivity of the luciferase-based BPV1 DNA replication assay to DNA replication inhibitors.

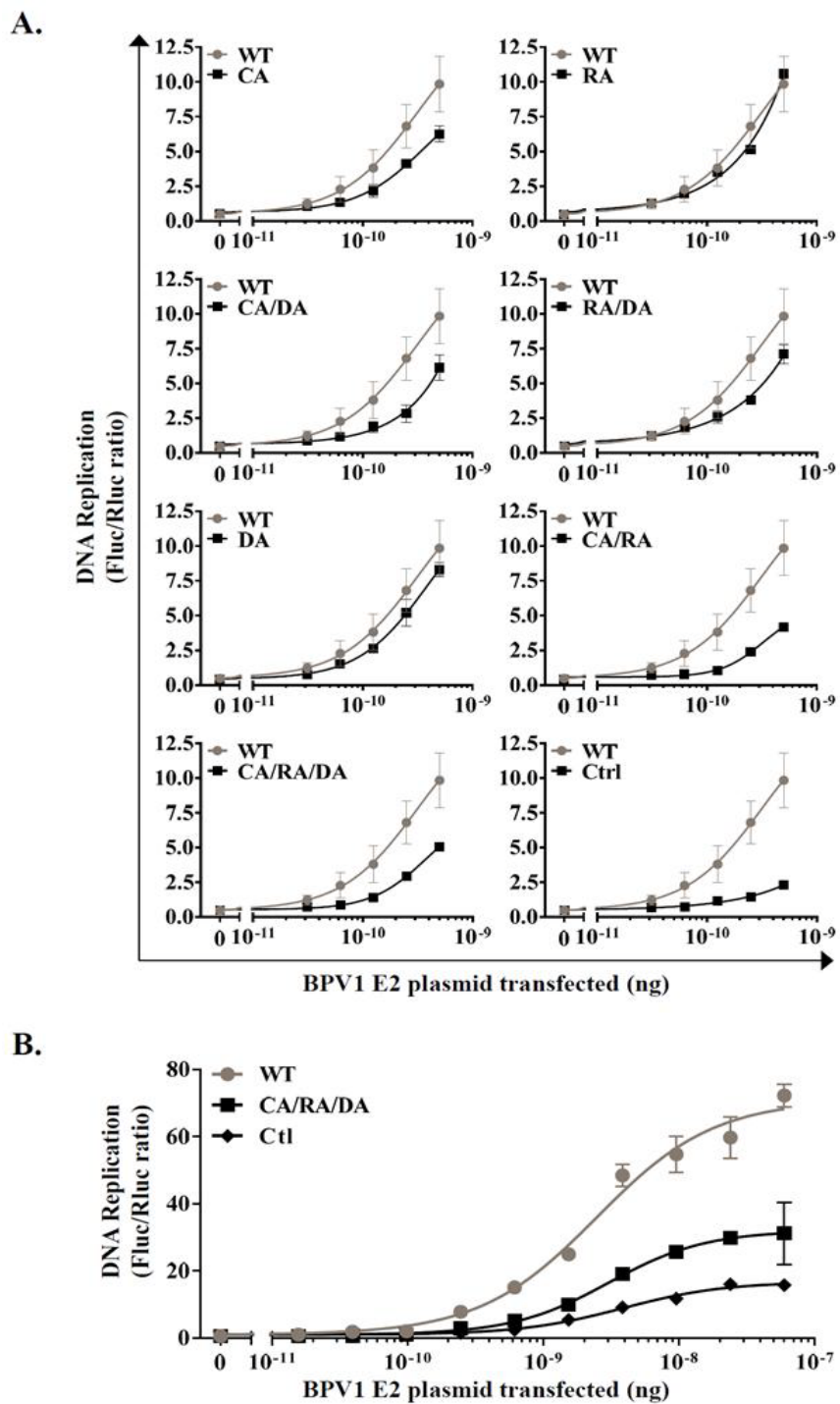


Figure 3.6. DNA replication activities of wild type and mutant BPV1 E2.

Chapitre 4: Article no.3

MANUSCRIPT

IDENTIFICATION OF A REGION OF THE BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 1 E2 PROTEIN CRITICAL FOR THE REGULATION OF ITS DEGRADATION

Hélène Sénéchal¹ and Jacques Archambault^{1,*}

¹ Molecular Virology Laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM)
and Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running Title: Stability of BPV E2

* To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Avenue West, Montreal (Quebec), Canada, H2W 1R7. Tel: (514) 987-5739; Fax: (514) 987-5741;

Abstract: 209 words

Text: 5649

4.1 Contribution des auteurs à l'article

J'ai participé à la construction de tous les vecteurs permettant de faire un criblage des différents mutants du TAD de E2 du VPB1 dans le but d'étudier leur dégradation à l'aide de l'essai de stabilité. J'ai effectué les essais de fonctionnalité ainsi que les analyses d'expression protéique par immunobuvardage de type Western et les études de localisation cellulaire. J'ai conçu et rédigé l'article.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet de recherche ainsi que l'écriture du texte.

4.2 Abstract

The Papillomavirus E2 gene product is a multifunctional protein involved in the regulation of the transcription of viral proteins as well as in the replication, maintenance and segregation of the viral genome. The E2 protein is polyubiquitinated and degraded by the ubiquitin/proteasome pathway. The level of E2 degradation has been shown to regulate its activities and a phospho-serine residue at position 301 of the hinge region of BPV1 E2 protein, has been presented to be required for its efficient turnover. Interestingly, studies have demonstrated that the phosphorylation of S301 is not sufficient to promote the degradation of BPV1 E2, implying that another region or post-translational modification of E2 contributes to its turnover. To elucidate how the level of E2 is regulated during viral life cycle we took advantage of using a quantitative dual luciferase assay to examine the expression and degradation levels of BPV1 E2. In this study, we have identified a region of the hinge domain of E2, encompassing amino acids 258 to 277, that is important for the degradation of the protein by the proteasome. Furthermore, we provide evidence that the rapid turnover of the protein is related to its cellular localization and could also be associated to post-translational modifications of residues conserved in the fibropapillomaviruses family.

Keywords: Papillomavirus, E2, hinge domain, degradation, proteasome, nuclear localization, nuclear localization signal, modifications post-traductional, quantitative luciferase assay.

4.3 Introduction

Papillomaviridae is a family of small double-stranded DNA viruses known as papillomaviruses (PV), which infect a variety of vertebrates. These viruses are restricted to their host and have a specific tropism for epithelial cells where they cause benign lesions such as papillomas or warts, by inducing hyperproliferation of cells (Hebner and Laimins, 2006; Howley, 2001). A subset of human papillomavirus types are associated with the development of malignant lesions or carcinomas and are the causal agent of cervical cancer (Howley, 2001; zur Hausen, 1994). Papillomaviruses primarily infect undifferentiated proliferating cells of the basal layer of squamous epithelia or mucous membrane. The differentiation steps of the host keratinocytes generated an environment suitable to induce the amplification of the genome and the production of new virions in the uppermost layers of the epithelium (Doorbar, 2005; Longworth and Laimins, 2004).

Bovine Papillomavirus type 1 (BPV1) has been accepted as a reference for the study of all papillomaviruses due to its capacity to replicate its DNA and maintain its genome in stably nuclear multicopy plasmid in transformed rodent cells (Dvoretzky et al., 1980; Howley, 2001; Law et al., 1981). BPV1 is a member of the δ papillomavirus genus, commonly referred as fibropapillomavirus. This type of virus infects both the epithelium and the underlying derma fibroblast of the skin, giving rise to fibropapilloma and fibroblastic tumors (Nasir and Campo, 2008). The viral genome of BPV1 is found as an 8 kb circular DNA composed of a non-coding region called the Long Control Region (LCR), which contains the origin of replication and several elements required for genome maintenance and for the regulation of the viral genes transcription (Bernard, 2002). The two coding regions of the genome consist of the late genes L1 and L2 which encode structural components of the viral capsid, and the early genes products referred as the non-structural proteins, essential for the viral life cycle. In this group are encoded E6, E7 and E5, which are oncoproteins of BPV1 responsible for cell transformation and immortalization. Additionally, the early gene E1 encodes for the viral DNA helicase which

is recruited by the early E2 gene product that binds with high affinity to sites contained in the viral origin of replication (Bonne-Andrea et al., 1997; Sedman and Stenlund, 1995; Stenlund, 2003). The E1-E2 interaction and the viral origin promote the assembly of the helicase E1 into a double-hexameric complex competent to unwind viral DNA and promote the viral replication by recruiting host replication machinery (Blitz and Laimins, 1991; Lusky et al., 1994; Schuck and Stenlund, 2005).

The E2 gene product is a multifunctional protein involved in several functions including the regulation of transcription of viral genes, viral DNA replication as well as genome maintenance and segregation (Bellanger et al., 2011). According to the cellular environment, E2 protein activates or represses transcription by binding to specific sites described as a palindromic consensus sequences ACC(N6)GGT that are found in the LCR, and by interacting with components of the transcriptional machinery (Benson et al., 1997; Bernard, 2002). In addition, E2 supports maintenance and segregation of viral genome during mitosis by tethering the episome through the association of E2 with the E2-binding sites and its interaction with chromatin-interacting cellular components like Brd4 and ChlR1 (Parish et al., 2006; You et al., 2004; You et al., 2005). The full length BPV1 E2 defined as E2-TA, is composed of 410 amino acids and consists of two functional domains. The N-terminal amino acids 1 to 203 of E2 and the C-terminal 101 amino acids, encode a transcriptional activation domain (TAD) and a DNA-binding domain (DBD), respectively, and are linked together by a central flexible and poorly conserved hinge region. In addition to the full length E2 protein, BPV1 genome encodes two shorter forms: the E2-TR and E8^ΔE2 spliced proteins. Both proteins have a conserved DNA-binding domain but lack the transactivation domain. Accordingly, these truncated forms of E2 have been considered as transcriptional repressors through competition with the full length E2-TA for the E2 binding sites by forming heterodimers with the E2-TA (Kurg et al., 2006; Lim et al., 1998). To perform these different functions, E2 has to be located in the nucleus and previous studies have identified E2 protein nuclear localization signal (NLS) for human and bovine

papillomavirus (Blachon et al., 2005; Klucevsek et al., 2007; Skiadopoulos and McBride, 1996; Zou et al., 2000). Those signals have been defined as rich in basic residues which typically interact with importin α adaptor molecule in conjunction with the importin β transport carrier.

Several studies demonstrated that E2 has normally a rapid turnover having a half-life between 45 to 125 minutes depending on the virus type (Bellanger et al., 2001; Blachon et al., 2005; Gagnon et al., 2009; Hubbert et al., 1988; Penrose and McBride, 2000; Taylor et al., 2003). Interestingly, its interaction with diverse host proteins as Brd4, Tax1BP1 and NRIP or other viral proteins such as E1^{E4} increase its stability (Chang et al., 2011; Davy et al., 2009; Gagnon et al., 2009; Wang et al., 2009; Zheng et al., 2009). The E2 protein of BPV1, HPV11, -16, -18 and -31 have been shown to be polyubiquitinated and degraded by the ubiquitin/proteasome pathway (Bellanger et al., 2001; Bellanger et al., 2010; Gagnon et al., 2009; Penrose and McBride, 2000; Taylor et al., 2003; Zheng et al., 2009). For HPV11, -18 and -31, the E2 TAD domain is responsible for its degradation, while for BPV1 E2, the hinge region is associated to regulate its stability. In fact, it has been shown that the substitution of the serine 301 (S301) located in the hinge domain to an alanine, extends the half-life of BPV E2 from 50 to 160 minutes (McBride et al., 1989; Penrose and McBride, 2000). However, other studies have demonstrated that the phosphorylation of S301 is not sufficient to promote the degradation of BPV1 E2 (Lehman and Botchan, 1998; Lehman et al., 1997; Penrose et al., 2004). The serine 301 is located within a putative PEST sequence often associated with protein degradation (Rechsteiner and Rogers, 1996). PEST sequences are rich in proline, glutamic acid, aspartic acid, serine and threonine. Penrose et al. hypothesized that the phosphorylation of S301 by the casein kinase II modifies an α -helix between residues 286 and 296 contained in the hinge region (Garcia-Alai et al., 2006; McBride and Howley, 1991; Penrose et al., 2004). This modification would generate a local structure distortion and promote the degradation of the protein, possibly by exposing

important residues recognized by the ubiquitin/proteasome machinery (Garcia-Alai et al., 2006).

Despite a common effort to decipher the signals and the events that regulate the degradation process of BPV1 E2 by the proteasome, no clear answers were provided. As we are interested to elucidate how level of E2 is controlled during viral life cycle, we wanted to determine if E2 comprised a degron sequence. Thus, we took the advantage of a quantitative dual luciferase assay to examine the expression and degradation of BPV1 E2. In this study, we show that in addition to the previously region of the hinge that affects its degradation, the region encompassing amino acid 259 to 277, is also important for the degradation of the protein by the proteasome machinery. Finally, we provide evidence that the rapid turnover of the protein is related to its nuclear localization.

4.4 Materials and Methods

Plasmid construction and mutagenesis

Plasmids expressing E2 protein of BPV type 1 (BPV1) as a fusion with *Renilla* luciferase (Rluc) linked to 3xFLAG epitope were constructed by inserting *Bam*HI-*Xba*I digested PCR fragment encoding E2 between the *Bam*HI and *Xba*I sites of the Rluc-3xFLAG plasmid with a cytosine preceding the *Xba*I site to prevent *dam* methylation (Gagnon et al., 2009). BPV1 E2 WT, F3 (R37A, I73A) and D2 mutants (R47Q, K48Q, K49Q, R58Q, H61N) were obtained after amplification of pTZE2kz plasmids encoding BPV1 E2 proteins with primers used for the full length protein, a generous gift from Alison A. McBride (NIAID) and described elsewhere (Baxter et al., 2005). The PCR fragments coding for BPV1 E2 lacking the ATG start codon, were generated by using primers designed to contain *Bam*HI and *Xba*I restriction sites. Plasmids expressing HPV16 E2, BPV1 E2 full length, domains and truncations as a fusion with Rluc3F were constructed as described above with the primers depicted in table 1. Plasmids coding for Rluc3F-HPV11 E2, Rluc3F-HPV31 E2

and pCI-firefly luciferase (Fluc) have been described previously (Gagnon et al., 2009). The mutations generated in the BPV1 E2 coding sequence used in the present study were made using QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details about their construction will be available upon request.

Cell culture, transfection and whole cell extract preparation

Human cervical carcinoma C33A cells were grown in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 I.U. of penicillin/ml, 50 µg of streptomycin/ml and 2 mM of L-glutamine supplied by Wisent Bioproducts. Transfections were performed using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's recommendations (catalogue no. 11668-019, Invitrogen). Whole cell extracts were prepared 24 h post-transfection by adding hot 5X Laemmli sample buffer directly to the cells and incubated for 10 min. at room temperature. The sample was then diluted to 2.5X by adding the same volume of PBS before loading on SDS-PAGE.

Luciferase-based transactivation assay

For the luciferase-based transactivation assay, C33A cells were plated 24 h prior to transfection in 96-well plates (catalogue no. 3917, Corning) at a density of 25 000 cells/well. Transfection mixes included increasing amounts of Rluc3F-E2 plasmid as specified in the text, and 250 ng of pK4xE2BS reporter plasmid containing the Fluc coding region located downstream of four E2 binding sites (kind gift from Laimonis A. Laimins, Northwestern University, Chicago). The total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 250.5 ng with the pUC19 plasmid. Fluc and Rluc activities were measured using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega) and GloMax™ 96-well luminometer (Promega). Briefly, 24 h post-transfection, the culture medium was replaced with 50 µL of

fresh media followed by the addition of 50 μ L of Dual-Glo luciferase reagent. The plate was then placed on an agitator for 20 minutes before measuring the luminescence. The reading for the Rluc activity was performed as described above except that 50 μ L of Renilla Stop-and-Glo was added to each well.

Luciferase-based BPV1 DNA replication assay

The BPV1 DNA replication assay was conducted essentially as reported previously for HPV31 (Fradet-Turcotte et al., 2010). We constructed a plasmid containing both the BPV1 origin of replication and the firefly luciferase gene under the control of the CMV promoter, pFLORI-BPV1, as previously described (Piiirsoo et al., 1996). Briefly, C33A cells were plated in white flat-bottom 96-well plates at a density of 25 000 cells/well and were transfected 24 h later with a mixture of three vectors: 2.5 ng of the origin-containing plasmid (pFLORI-BPV1), BPV1 E1 expressing vector (20 ng) (Ustav and Stenlund, 1991) and an increasing amount of Rluc3F-E2 plasmid as specified in the text. The total quantity of plasmid DNA was adjusted to 25 ng for each experiment with pCI vector as carrier DNA. The transient BPV1 DNA replication was visualized 72 h post-transfection by an increasing Fluc expression and E2 protein accumulation was measured by Rluc activity using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega).

Antibodies and western blotting

Purified mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody and monoclonal anti- β -tubulin antibody (catalogue no. F1804 and T4026 respectively, Sigma-Aldrich) were used at a dilution of 1:2000 for western blot analysis. For western blotting, a SDS-PAGE was performed, proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membranes and detected using horseradish peroxidase- linked sheep anti-mouse antibody purchased from GE Healthcare (catalogue no. NA931, 1:5000 dilution for western blotting). Results were

visualized according to the chemiluminescent PLUS western blotting detection kit (GE Healthcare, catalogue no. RPN2132).

Pulse-chase assay

Cycloheximide chase assays were started 24 h post-transfection by replacing the cell culture medium in each well with 50 μ L of fresh DMEM complete media containing cycloheximide at concentration of 100 μ g/mL. Cells were incubated at 37°C for the indicated time periods before proceeding to the luciferase readings. When indicated, 5 μ M of lactacystin (Cayman Chemical, catalogue no. 70980) was added 4 h post-transfection for 16 h incubation during the cycloheximide chase to inhibit proteasome activities. When mentioned, the normalization was performed according to the manufacturer's instructions (Dual-Glo luciferase assay system, Promega).

Confocal immunofluorescence microscopy

Approximately 8×10^5 C33A cells were grown on coverslips and transfected with 500 ng of Rluc3F E2-containing expression vector, as indicated in the text. Briefly, 5 h post-transfection, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min at 4°C and then blocked with 10% BSA (Bioshop) diluted in PBS (PBS/BSA 10%) at 4°C overnight. Cells were incubated with the anti-FLAG M2 antibody (Sigma-Aldrich, catalogue no. F1804) at dilution of 1:200 or with the mouse monoclonal anti-BPV1 E2 B201 antibody (provided by Elliot Androphy) at dilution of 1:10 for 2 h at 37°C, followed by three washes in PBS/BSA 10%. Cells were then incubated with Alexa Fluor 633-conjugated anti-mouse antibody (Invitrogen) at a dilution of 1:500 for 1 h at room temperature and washed once in PBS/BSA 10%. DNA staining was then performed using a solution of DAPI (1 μ g/mL) (Sigma Aldrich) slides were washed twice, and cells were mounted using VectaShield mounting medium (Vector Laboratories). Images were

acquired with a LSM710 confocal laser scanning coupled to an inverted Observer.Z1 stand (Zeiss, Toronto, Canada) and analyzed using ZEN 2009 Light Edition microscopy software (Zeiss).

4.5 Results

4.5.1 Use of a Renilla luciferase fusion protein to study the degradation of Bovine Papillomavirus Type 1 E2

We previously showed for HPV11 and HPV31 E2 proteins that their fusion to Renilla luciferase (Rluc) can be used to measure accurately their expression and degradation in transient transfected cells (Gagnon et al., 2009). A similar approach is used here to study the proteasomal degradation of Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) E2 protein (Figure 1A). Therefore, we first verified if a fusion of Renilla luciferase at the N-terminus of BPV1 E2 leads to a functional protein capable of activating transcription and promoting BPV1 DNA replication. To monitor E2 transcriptional activity, we used the pK4xE2BS reporter plasmid containing the firefly luciferase (Fluc) gene positioned downstream of the four E2 binding. The transactivation activity of E2, depicted by the Fluc axis in figure 1B (top panel), shows that Rluc3F-BPV1 E2 protein is able to activate the transcription of the Fluc reporter in a gradient-dependent fashion. Neither the Rluc3F epitope per se is able to trigger the transcription of the reporter vector nor the transactivation-defective Rluc3F-BPV1 E2 mutant harbouring amino acids substitution of arginine 37 and isoleucin 73 to alanines (Abroi et al., 1996; Breiding et al., 1996; Brokaw et al., 1996; Ferguson and Botchan, 1996).

Secondly, a BPV1 DNA replication assay was performed to evaluate the functionality of the Rluc3F-BPV1 E2 protein. This assay was done essentially as we reported previously for HPV31 (Fradet-Turcotte et al., 2010). We constructed a plasmid containing both the BPV1 origin of replication, as previously defined (Piiirsoo et al., 1996), and the Fluc gene under the control of the CMV promoter (pFLORI-BPV1). Cervical carcinoma C33A cells were transfected with three vectors: the origin-containing plasmid (pFLORI-BPV1), BPV1 E1 expressing vector (Ustav and Stenlund, 1991) and Rluc3F-E2 plasmid. The transient BPV1 replication was visualized by an increasing amount of Fluc

expression. About 14-fold increase of Fluc signal was observed compare to no E2 condition at the highest amount of Rluc3F-BPV1 E2 as depicted in figure 1C (top panel). This replication is dependent of the presence of the BPV1 origin of replication and of the expression of Rluc3F-BPV1 E2 protein. As pointed out for the transactivation assay, the Rluc3F portion alone was not sufficient to support transient DNA replication assay (figure 1C top panel). The already characterized BPV1 E2 D2 mutant (R47Q/K48Q/K49Q/R58Q/H61N, (Baxter et al., 2005)), which has a reduced DNA replication activity, was used as a negative control. The benefit of using the RLuc3F epitope fused to BPV1 E2 protein is that we can accurately determine E2 protein expression using the Rluc activity. (Figure 1B and C bottom panels). The expression of the mutant proteins used as negative controls in both assays (E2 R37A/I73A and D2) was reduced compared to the wild type and this explain in part their lower functional activity. However, even for an equal amount of protein, the transactivation and replication activities of the wild type protein is higher compared to the negative control proteins. BPV1 E2 R37A/I73A and D2 are defective for transactivation and for BPV1 DNA replication, respectively. Therefore, we can conclude that fusion of Rluc at the N-terminus of BPV1 E2 does not abrogate the transactivation and DNA replication activities of E2.

Knowing that the Rluc3F-BPV1 E2 fusion is functional, we used it to perform a protein synthesis block chase assay with cycloheximide to study the stability of BPV E2. The degradation of Rluc3F-BPV E2 was compared to that of E2 from HPV11, -16 and -31 in C33A cells 24 hours post-transfection using the dual luciferase assay. As can be seen in figure 2A, BPV1 E2 is an unstable protein and the Rluc3F-E2 fusion protein from BPV1 has a half-life comparable to that of the other types as previously described (Blachon et al., 2005; Gagnon et al., 2009; Hubbert et al., 1988; Penrose and McBride, 2000). We also verified that the degradation of Rluc3F-BPV1 E2 was regulated through the ubiquitin-proteasome system by repeating the protein synthesis block assay, but in the presence of 5 μ M of the proteasome inhibitor lactacystin, which inhibits the peptidase activities of the

proteasome. As can be seen in figure 2B, the addition of lactacystin lengthens the half-life of all E2 proteins including that from BPV1, indicating that E2 is indeed degraded by the proteasome, and that our Renilla luciferase fusion protein approach can be used to precisely measure the degradation of BPV1 E2.

4.5.2 Identification of BPV1 E2 domains responsible for its instability

To determine which domains of BPV E2 are responsible for its degradation by the proteasome, we constructed a series of Rluc fusion proteins linked to different fragments of E2 containing either the transactivation domain (TAD), the hinge, the DNA binding domain (DBD) or any combination of the above (Figure 3A). As observed in figure 3B, these different fusion proteins were expressed at the expected molecular weight as determined by western blotting. They were also expressed to different levels: the DBD being the poorest expressed protein, whereas the hinge was produced at higher levels. Moreover, similar results were obtained by luciferase assays as can be seen in figure 3C: the fusion containing the hinge region alone gave rise to the highest level of luciferase activity, whereas the one containing the DBD showed the lowest expression. Next, we performed cycloheximide chase assay on these different fusion proteins, either in absence or presence of lactacystin. As shown in figure 4, full length E2 was the most unstable protein. Constructs spanning the TAD and the hinge or the hinge and the DBD, were also unstable albeit having a longer half-life than that of the wild type E2. In contrast, fusion proteins containing the TAD, the hinge or the DBD, were stable and not affected by inhibition of the proteasome. Collectively, these results suggest that the hinge is important for BPV1 E2 instability but only when it is in conjunction with the TAD or the DBD although, as noted above, none of these domains by themselves are unstable.

4.5.3 Serines 298 and 301 within the hinge region are not required for E2 degradation

It has previously been reported that phosphorylation within the hinge of BPV1 E2 facilitates its degradation by the proteasome. In particular, phosphorylation by casein kinase II (CKII) on serine 301 (S301) has been shown to be important for E2 instability and its substitution for alanine was shown to increase E2 half-life (Penrose et al., 2004; Penrose and McBride, 2000). Another major phosphorylation site in BPV E2 hinge region was mapped to serine 298 (S298) (McBride et al., 1989). This residue is comprised in a consensus site (S/TP) for phosphorylation by cyclin-dependent kinases and could also be phosphorylated by CKII if S301 is phosphorylated first, therefore, supplying a negative charge for CKII recognition. Although this serine residue and the following two amino acids, namely PD, are conserved among the fibropapillomaviruses, S298 phosphorylation is still not associated to a functional role in E2 (Lehman and Botchan, 1998; Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989; Penrose and McBride, 2000). To test if these residues are important for E2 stability, we mutated individually both serine 298 and 301 to alanine within the context of the full length BPV E2 protein and tested the stability of resulting mutant protein in our experimental system. As can be seen in figure 5A, both fusion proteins were expressed at the correct molecular weight and at comparable levels as the wild type E2 as determined by western blotting. In luciferase assays, the two mutated protein were found to be expressed slightly less than the wild type E2 by about two fold (figure 5B). We then tested their stability in cycloheximide chase assay in the presence or absence of lactacystin. As shown in figure 5C, both mutant proteins were as unstable as wild type E2 indicating that under our assay conditions, neither phosphorylation of S298 nor S301 is required for E2 degradation. To confirm these results, we also performed a cycloheximide chase assay by western blot analysis. These results confirmed that the two mutant proteins were slightly less expressed than the wild type E2 but had the same instability as wild type E2 (figure 5D). We also have substituted S301 for an aspartate as a phosphomimetic and found that this mutant protein is unstable as the wild type protein (data not shown). Collectively, these result indicated that phosphorylation of residues S298

and S301 within the hinge region of E2 is not necessary for degradation of BPV E2 in C33A cells.

4.5.4 A region encompassing amino acid 259 to 277 is associated with the stability of BPV1 E2

Having determined that the hinge region is important for the degradation of E2 together with either the TAD or the DBD, we set out to identify which portion of the hinge was responsible for this effect. To do this, we constructed a series of deletion mutants of this region which exclude gradually potential phospho-serine residues located in this section. Therefore, we created four additional deletions within the hinge, but in the context of the TAD-hinge construct, namely 1-239, 1-258, 1-277 and 1-300 as depicted in figure 6A. All four constructs were expressed at the correct molecular weight and were produced to a level comparable to that of the wild type E2 (Figure 6B). We then tested the stability of these four additional truncations in cycloheximide chase assays in the presence and absence of lactacystin. As can be seen in figure 6C, the two fragments ending at amino acids 300 and 277, were unstable, similar to wild type E2. In contrast, the E2 fragments comprising of residues 1 to 258 and 1 to 239 were stable. These results indicate that the sequence located between amino acids 259 and 277 is implied in the regulation of the degradation of BPV1 E2 protein.

4.5.5 The degradation of BPV1 E2 is related to its nuclear localization

One clue as to the mechanism by which the 259 to 277 interval could mediate E2 degradation came when we examined the intracellular localization of these different constructs by immunofluorescence in transfected C33A cells. We investigate the possibility that deletion of the C-terminal part of the hinge could affect the nuclear accumulation of E2 and therefore, indirectly influence its degradation. To do this, we examined the intracellular

localization of the different E2 constructs by immunofluorescence in transfected C33A. As observed for the full length E2 protein, the TAD-hinge and the BPV1 constructs spanning the first 277 to 300 amino acids of E2 were also localized in the nucleus (figure 7). Surprisingly, the construct encompassing the first 258 residues which is stable was found equally distributed between the nucleus and the cytoplasm, similarly to what was found for the constructs encoding the 1-239 fragment or the TAD. Thus, these results demonstrate that the increased stability of the 1-258 and shorter constructs arise from the fact that they can accumulate in the cytoplasm and suggest that E2 is primarily degraded or targeted for degradation in the nucleus.

4.6 Discussion

E2 protein plays several roles in the Papillomavirus life cycle namely the regulation of viral genes transcription, the replication of the episome and the segregation of the viral genome in daughter cells (Bellanger et al., 2011). A tight regulation of E2 is essential to the establishment of the infection. One approach to regulate the activity of BPV1 E2 is through the regulation of the protein level by controlling its degradation. In the present study, we took advantage of a luciferase assay developed in our laboratory to quantify the expression and the degradation of BPV1 E2 protein (Gagnon et al., 2009). We confirmed that the fusion of Rluc3F at the N-terminal of BPV1 E2 enabled the protein to activate the transcription of the Fluc reporter and to participate to the replication of a BPV1 ori-containing vector (figure 1). Therefore, we used the quantitative luciferase assay to compare the stability of different E2 proteins from HPV11, -16, -31 and BPV1 in C33A cells using a cycloheximide-chase experiment. All these four E2 are unstable and behave similarly having a half-life around 90 minutes as previously mentioned (figure 2A) (Blachon et al., 2005; Gagnon et al., 2009; Hubbert et al., 1988; Penrose and McBride, 2000). To confirm that the turnover of BPV1 E2 fused to the Rluc3F still process by this degradation machinery, we used the inhibitor lactacystin, which targets the peptidase activity of the 20S proteasome subunit, during cycloheximide chase assay. We noted an increase of stability in presence of lactacystin for the different Rluc3F-E2 fusion proteins, as expected for protein targeted to the proteasome (figure 2B). This result also confirms that we can use our luciferase assay to study the degradation of BPV1 E2 protein.

Recent studies demonstrated the proteolytic and non-proteolytic roles of the ubiquitin-proteasome system in regulating transcription and also suggested that TAD region may contains a specific degron sequence that directs transcription factors to degradation (reviewed in Bhat and Greer, 2011; Muratani and Tansey, 2003). Moreover, previous results showed that the TAD domains of HPV11, -18 and -31 E2 are associated with protein degradation (Bellanger et al., 2001; Gagnon et al., 2009). Unlike these

papillomaviruses types, BPV1 E2 hinge region was shown by another group to be important for the regulation of its stability (Penrose and McBride, 2000). Based on these evidences, we used a series of truncations fused to Rluc3F to find specifically which domain of BPV1 E2 is associated with its instability (figure 3A). We first noticed a difference in the protein expression level where the hinge domain was more expressed than other regions of BPV E2. Inversely, we observed that the DBD has a lower level of expression (figure 3B and C). This can be explained by the fact that the transcriptional regulation by the E2 factor can occur without specific DNA binding sequence (Haugen et al., 1988). Thus, the DBD domain alone could repress the transcription from the CMV promoter driving the Rluc3F-DBD fusion or the firefly luciferase protein used here as an internal control. To determine which of these domains are associated to the turnover of BPV1 E2 protein, we used a cycloheximide chase assay in presence or absence of lactacystin. Surprisingly, we found that the TAD, the hinge and the DBD domains of BPV1 E2 are stable and unaffected by the proteasome inhibitor (figure 4). Unexpectedly, the combinations of the TAD with the hinge or of the hinge with the DBD are unstable. The instability of these fusion proteins is reduced in the presence of the proteasome inhibitor suggesting that those constructs are still degraded by the proteasome similarly to that of the BPV1 E2 full length protein. These results suggest that the stability of BPV1 E2 is not governed exclusively by a single domain, as found previously with other papillomavirus E2 proteins. A complicated structure signature, in which the hinge region is involved, seems essential to promote BPV1 E2 degradation.

The hinge domain of BPV1 E2 is considered to be a flexible region having a PEST degradation motif (residues 290-310) containing phosphorylation sites at serine 298 and serine 301, accounting for much of the phosphorylation of E2 protein (McBride et al., 1989; McBride and Howley, 1991; Penrose and McBride, 2000; Rogers et al., 1986). Previous studies demonstrated that substitution of S301 to an alanine extends the half-life of BPV E2 but the protein was still degraded at a moderate rate (Penrose et al., 2004;

Penrose and McBride, 2000). It was then depicted that E2 phosphorylation at S301 and degradation are separable events. Introduction of the substitutions to alanines of glutamic acid 303, 304 and 305, showed a decreased phosphorylation state of E2 but an increasing instability of the protein (Garcia-Alai et al., 2006; Penrose et al., 2004). Considering the importance of the hinge region for the E2 degradation in the context of TAD-hinge and hinge-DBD fusions, we tested if the stability of BPV E2 is associated to S298 and S301 phosphorylation sites in our system. Despite similar expression levels, the substitution mutants, namely S298A and S301A, into the context of the full length protein, are as unstable as the BPV1 E2 wild type protein. This discrepancy may be explained by the fact that we used different system as the E2 fused to the Renilla and tested into C33A cell line instead of using untagged E2 protein in CV-1 kidneys monkey cell line in which the degradation mediate by the phosphorylation was observed. However, we confirmed that the fusion protein conserved its functional activities and moreover, previous observations reveal that none biochemical activity was detected on E2 when S301 or S298 was phosphorylated (Lehman et al., 1997). Therefore, the results indicated that the phosphorylation at these serines is not a prerequisite for E2 functional activities modulation or its degradation in our system (figure 5). Other studies have suggested that the hinge region is important but not sufficient for the degradation of E2. Subsequently we investigated which section of this domain is required to promote the instability of E2 (Penrose et al., 2004). The TAD-hinge construction was preferred to create new C-terminal deletions, to avoid the problematic of the CMV promoter repression through BPV1 E2 DBD found in the hinge-DBD combination. It is established that post-translational modification, as phosphorylation, can create a local protein distortion which is often an initial event to engage degradation pathway and allowing subsequent contact with ubiquitin-proteasome system (Ravid and Hochstrasser, 2008). Thus, we created the truncation amino acid 1 to 300, -277, -258 and -239 to gradually exclude residues know to be phosphorylated or may be subjected to a modification. The degradation assay demonstrates that the sequence covering amino acids 259 to 277 has a drastic effect on

BPV1 E2 and account for the major part of the turnover of BPV1 E2 protein mediated by the proteasome machinery (figure 6).

Davy *et al.* described an interaction between E2 and PV viral cytoplasmic protein E1^{E4} which increases the stability of E2 and relocalizes it to the cytoplasm (Davy *et al.*, 2009). Our preliminary data demonstrates that the stable truncations 1-239 and the TAD accumulated in the cytoplasm, suggesting that E2 degradation regulation is depicted by its cellular localization (figure 7). Thus, having restricted the degradation motif between amino acids 259 to 277 we looked at the distribution of BPV1 E2 1-258 and 1-277 constructions in C33A cells by immunofluorescence. The degraded 1-277 is mostly found in the nucleus and the stable 1-258 construct is uniformly distributed throughout the cell as the shorter stable forms, indicating that the cellular localization may direct the degradation of BPV1 E2 protein. To date, three classes of nuclear-cytoplasmic transport signals have been identified: the classical basic amino acid NLS monopartite or bipartite sequences recognized by importin α/β (Lange *et al.*, 2007). The second class is a hydrophobic leucine-rich export signal recognized by the transport receptor chromosome maintenance protein 1 (CRM1/exportin 1) which binds and exports proteins and RNA in the nucleus (Kutay and Guttinger, 2005). Finally, the third class of NLS signal, namely PY-NLS, is karyopherin- β 2 dependent and is composed of an N-terminal hydrophobic or basic motif and a C-terminal RX₂₋₅PY motif (Lee *et al.*, 2006). Surprisingly, sequence alignment of the hinge region encompassing amino acids 259 to 277 of E2 proteins from six fibropapillomaviruses revealed that some residues are conserved and could be important for the localization of the protein. In fact, the fibropapillomavirus conserved amino acids sequence RXXPY is found in the truncation 1-277, which is mostly located in the nucleus but absent in the pan-cellular 1-258 construction (figure 8). This sequence may represent the C-terminal part of the PY-NLS and analysis of the N-terminal part of this section shows that BPV1 E2 had a high content of hydrophobic or basic residues which is the other feature associated to PY-NLS. Other studies have to be performed to confirm the presence of this non-classical NLS in the

context of the full length BPV1 E2 but it will be interesting to status if the nuclear localization of E2 increased it degradation by the proteasome.

Despite its stability, the 1-258 truncation is found throughout the cell indicating that its distribution is not solely responsible for its turnover and other signals may occur to target E2 to the proteasome. Investigation of the region including amino acid 259 to 277 of BPV1 E2 protein revealed the presence of several serine residues at positions 259, 268, 271, 275 to 277, which could be phosphorylation sites. Among them, the S277 were already identified by mass spectrometry as BPV1 E2 phosphorylation sites but was not associated with viral transformation and replication processes (Lehman et al., 1997). This serine and the S276 are located within a common kinase motif (RXXS or RXS) that is recognized by various cellular kinases including protein kinase A (PKA). Recently, a study demonstrated that the serine within the chromosome binding region of HPV8 E2 protein located in the hinge region, is phosphorylated by PKA during the S phase (Sekhar and McBride, 2012). This modification regulates the chromosome binding function and increases the half-life of this betapapillomavirus E2 protein. However, this site is not conserved in this exact position in BPV1 E2 protein while the presence of this kinase consensus site may be important for the regulation of E2 level. Thus, post-translational modifications can take place and be a direct signal to target E2 to the proteasome, or regulate protein-protein interaction leading to the degradation of E2.

In this study, we showed that a restricted region located between amino acids 259 and 277 of BPV1 E2 is crucial to direct the protein degradation by the ubiquitin-proteasome system. This region contains conserved residues which could be essential to BPV1 E2 localization and/or degradation and diverse strategies have to be considered in the context of the full length E2 to investigate if the nuclear localization is responsible for E2 degradation. Further studies are also required to determine whether specific residues are important for E2 localization or if this region is involved in determining protein stability. A

cascade or a unique post-translational amino acid modification, a protein structure conformational change, a gain or loss of protein-protein interactions could be the initial event(s) which will instigate the degradation of BPV1 E2 protein and trigger its regulation during the viral life cycle.

4.7 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Cancer Research Society (CRS) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). H.S. holds a studentship from the CIHR.

4.8 References

Abroi, A., Kurg, R., Ustav, M., 1996. Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* 70, 6169-6179.

Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K., McBride, A.A., 2005. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* 79, 4806-4818.

Bellanger, S., Demeret, C., Goyat, S., Thierry, F., 2001. Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol* 75, 7244-7251.

Bellanger, S., Tan, C.L., Nei, W., He, P.P., Thierry, F., 2010. The human papillomavirus type 18 E2 protein is a cell cycle-dependent target of the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *J Virol* 84, 437-444.

Bellanger, S., Tan, C.L., Xue, Y.Z., Teissier, S., Thierry, F., 2011. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res* 1, 373-389.

Benson, J.D., Lawande, R., Howley, P.M., 1997. Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol* 71, 8041-8047.

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

Bhat, K.P., Greer, S.F., 2011. Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1809, 150-155.

Blachon, S., Bellanger, S., Demeret, C., Thierry, F., 2005. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* 280, 36088-36098.

Blitz, I.L., Laimins, L.A., 1991. The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *J Virol* 65, 649-656.

Bonne-Andrea, C., Tillier, F., McShan, G.D., Wilson, V.G., Clertant, P., 1997. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol* 71, 6805-6815.

Breiding, D.E., Grossel, M.J., Androphy, E.J., 1996. Genetic analysis of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activation domain. *Virology* 221, 34-43.

Brokaw, J.L., Blanco, M., McBride, A.A., 1996. Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J Virol* 70, 23-29.

Chang, S.W., Tsao, Y.P., Lin, C.Y., Chen, S.L., 2011. NRIP, a novel calmodulin binding protein, activates calcineurin to dephosphorylate human papillomavirus E2 protein. *J Virol* 85, 6750-6763.

Davy, C., McIntosh, P., Jackson, D.J., Sorathia, R., Miell, M., Wang, Q., Khan, J., Soneji, Y., Doorbar, J., 2009. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1--E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology* 394, 266-275.

Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S7-15.

Dvoretzky, I., Shober, R., Chattopadhyay, S.K., Lowy, D.R., 1980. A quantitative in vitro focus assay for bovine papilloma virus. *Virology* 103, 369-375.

Ferguson, M.K., Botchan, M.R., 1996. Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J Virol* 70, 4193-4199.

Fradet-Turcotte, A., Morin, G., Lehoux, M., Bullock, P.A., Archambault, J., 2010. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* 399, 65-76.

Gagnon, D., Joubert, S., Senechal, H., Fradet-Turcotte, A., Torre, S., Archambault, J., 2009. Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol* 83, 4127-4139.

Garcia-Alai, M.M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D.E., McBride, A.A., Paci, M., Cicero, D.O., de Prat-Gay, G., 2006. Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure* 14, 309-319.

Haugen, T.H., Turek, L.P., Mercurio, F.M., Cripe, T.P., Olson, B.J., Anderson, R.D., Seidl, D., Karin, M., Schiller, J., 1988. Sequence-specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus-1 E2 trans-activator require an N-terminal amphipathic helix-containing E2 domain. *EMBO J* 7, 4245-4253.

Hebner, C.M., Laimins, L.A., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16, 83-97.

Howley, P.M., and D.R. Lowy, 2001. Papillomaviruses, p. 2231-2264, *Fields virology*, vol. 2. In D.M. Knipe 4th ed. Lippincott Raven, Philadelphia, PA, pp. 2231-2264.

Hubbert, N.L., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Androphy, E.J., 1988. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5864-5868.

Klucsevsek, K., Wertz, M., Lucchi, J., Leszczynski, A., Moroianu, J., 2007. Characterization of the nuclear localization signal of high risk HPV16 E2 protein. *Virology* 360, 191-198.

Kurg, R., Tekkel, H., Abroi, A., Ustav, M., 2006. Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. *J Virol* 80, 11218-11225.

Kutay, U., Guttinger, S., 2005. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in cell biology* 15, 121-124.

Lambert, P.F., Howley, P.M., 1988. Bovine papillomavirus type 1 E1 replication-defective mutants are altered in their transcriptional regulation. *J Virol* 62, 4009-4015.

Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H., 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.

Law, M.F., Lowy, D.R., Dvoretzky, I., Howley, P.M., 1981. Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2727-2731.

Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., Chook, Y.M., 2006. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543-558.

Lehman, C.W., Botchan, M.R., 1998. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4338-4343.

Lehman, C.W., King, D.S., Botchan, M.R., 1997. A papillomavirus E2 phosphorylation mutant exhibits normal transient replication and transcription but is defective in transformation and plasmid retention. *J Virol* 71, 3652-3665.

Lim, D.A., Gossen, M., Lehman, C.W., Botchan, M.R., 1998. Competition for DNA binding sites between the short and long forms of E2 dimers underlies repression in bovine papillomavirus type 1 DNA replication control. *J Virol* 72, 1931-1940.

Longworth, M.S., Laimins, L.A., 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 362-372.

Lusky, M., Hurwitz, J., Seo, Y.S., 1994. The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8895-8899.

McBride, A.A., Bolen, J.B., Howley, P.M., 1989. Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 63, 5076-5085.

McBride, A.A., Howley, P.M., 1991. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* 65, 6528-6534.

Muratani, M., Tansey, W.P., 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.

Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary dermatology* 19, 243-254.

Parish, J.L., Bean, A.M., Park, R.B., Androphy, E.J., 2006. ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell* 24, 867-876.

Penrose, K.J., Garcia-Alai, M., de Prat-Gay, G., McBride, A.A., 2004. Casein Kinase II phosphorylation-induced conformational switch triggers degradation of the papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 279, 22430-22439.

Penrose, K.J., McBride, A.A., 2000. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 74, 6031-6038.

Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., Ustav, M., 1996. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 15, 1-11.

Ravid, T., Hochstrasser, M., 2008. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 679-690.

Rechsteiner, M., Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.

Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M., 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.

Schiller, J.T., Kleiner, E., Androphy, E.J., Lowy, D.R., Pfister, H., 1989. Identification of bovine papillomavirus E1 mutants with increased transforming and transcriptional activity. *J Virol* 63, 1775-1782.

Schuck, S., Stenlund, A., 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell* 20, 377-389.

Sedman, J., Stenlund, A., 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* 14, 6218-6228.

Sekhar, V., McBride, A.A., 2012. Phosphorylation regulates binding of the human papillomavirus type 8 E2 protein to host chromosomes. *J Virol* 86, 10047-10058.

Skiadopoulos, M.H., McBride, A.A., 1996. The bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator and repressor proteins use different nuclear localization signals. *J Virol* 70, 1117-1124.

Stenlund, A., 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J* 22, 954-963.

Sun, S., Thorner, L., Lentz, M., MacPherson, P., Botchan, M., 1990. Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 64, 5093-5105.

Taylor, E.R., Boner, W., Dorman, E.S., Corr, E.M., Morgan, I.M., 2003. UVB irradiation reduces the half-life and transactivation potential of the human papillomavirus 16 E2 protein. *Oncogene* 22, 4469-4477.

Ustav, M., Stenlund, A., 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 10, 449-457.

Wang, W.S., Lee, M.S., Tseng, C.E., Liao, I.H., Huang, S.P., Lin, R.I., Li, C., 2009. Interaction between human papillomavirus type 5 E2 and polo-like kinase 1. *J Med Virol* 81, 536-544.

Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., 2008. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7, 1598-1608.

You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K., Howley, P.M., 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117, 349-360.

You, J., Schweiger, M.R., Howley, P.M., 2005. Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 79, 14956-14961.

Zheng, G., Schweiger, M.R., Martinez-Noel, G., Zheng, L., Smith, J.A., Harper, J.W., Howley, P.M., 2009. Brd4 regulation of papillomavirus protein E2 stability. *J Virol* 83, 8683-8692.

Zou, N., Lin, B.Y., Duan, F., Lee, K.Y., Jin, G., Guan, R., Yao, G., Lefkowitz, E.J., Broker, T.R., Chow, L.T., 2000. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 74, 3761-3770.

zur Hausen, H., and E.M. de Villier, 1994. Human Papillomaviruses. *Annual review of microbiology* 48, 427-447.

4.9 Figure Legend

Figure 4.1. Functional activities of Bovine papillomavirus type 1 E2 protein fused to the RLuc3F.

(A) Schematic representation of the fusion used in this study showing the localization of the Renilla luciferase (Rluc), 3x-FLAG epitope (3F) and E2 coding region (left). C33A cells were transfected with DNA plasmid expressing RLuc3F-BPV1 E2 WT and 1/20th of RLuc3F coding vector. Protein expressions were analyzed 24 h post-transfection by western blotting using anti-FLAG M2 antibody and anti-tubulin antibody was used as loading control (right). (B) Transient transcriptional activities of RLuc3F-BPV1 E2 protein. C33A cells were co-transfected with a constant amount of a Fluc reporter gene responsive to four E2-binding sites (250 ng) and an increasing amount (0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 and 0.5 ng) of RLuc3F reporter expressing RLuc3F-BPV1 E2 wild type (WT), a transcriptional defective mutant containing the substitution R37A and I73A used as a negative control and the RLuc3F epitope. The transcriptional activity is depicted as Fluc activity (Fluc units, top panel). The level of RLuc activity (RLuc units) was measured for each co-transfection experiment described in B and shows the intensity of BPV1 E2 protein expression. The analysis was performed 24 hours post-transfection with the Dual-Glo luciferase Assay (Promega). These results correspond to the average of an experiment done in duplicate with error bars represented as standard deviation and are a typical example of at least 3 experiments. (C) BPV1 replication assay using RLuc3F-BPV-1 E2 protein. Cells were transfected with a cocktail of three plasmids: the BPV1 origin-containing , plasmid with a firefly luciferase (FLuc) reporter in cis, a constant amount of BPV1 E1 splice mutant (Lambert and Howley, 1988; Schiller et al., 1989; Sun et al., 1990) expression vector and a gradient of RLuc3F-BPV1 E2 protein WT (0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 and 0.5 ng) or a replication defective mutant (D2) containing the substitution R47Q, K48Q, K49Q, R58Q, H61N or the RLuc3F epitope. Cells transfected without E2 (E2 -) or BPV1 origin (Ori-) expression plasmids were used as negative control. The replication activity is depicted as

Fluc activity (Fluc units, top panel). The level of Rluc activity (Rluc units) was measured for each co-transfection experiment described in B and shows the intensity of BPV1 E2 protein expression. The analysis was performed 48 hours post-transfection with the Dual-Glo luciferase Assay (Promega). These results correspond to the average of an experiment done in duplicate with error bars represented as standard deviation and are a typical example of at least 3 experiments.

Figure 4.2. Stability of *Papillomavirus* E2 proteins as a fusion with *Renilla* luciferase measured using luciferase activity.

(A) Stabilities of Rluc3F alone and Rluc3F-E2 from HPV11, -16, -31, BPV1 measured 24 h post-transfection in C33A cells. (B) Luciferase chase assay showing the stabilities of Rluc3F-E2 from HPV11, -16, -31, BPV1 and Rluc3F control protein treated with 5 μ M of lactacystin. (A and B) The luciferase activity was measure at 0, 45, 90, 180 and 300 min. after a block of protein synthesis with 100 μ g/mL of cycloheximide. Rluc activity was normalized to Fluc activity and the results are shown as a percent (%) of luciferase activity relative to the time point 0 min. The analysis was performed 24 h post-transfection with the Dual-Glo luciferase Assay (Promega).

Figure 4.3. Protein expression of *Bovine Papillomavirus* E2 domains as a fusion with *Renilla* luciferase.

(A) Representation of the different domains of BPV1 E2 protein. The full length protein encompasses three domains which are the transactivation domain (TAD, aa 2 to 203), a flexible region called the hinge (aa 204 to 326) and the DNA binding domain (DBD, aa 327 to 410). Different BPV1 E2 domain combinations have been constructed (TAD, TAD-hinge, hinge, hinge-DBD and DBD) and fused to Rluc3F epitope. (B) Rluc3F-E2 domains proteins expression levels. C33A were transfected with the same amount of DNA plasmid

expressing Rluc3F fused to BPV1 E2 wild type (WT) or BPV1 E2 domains (TAD, TAD-hinge, hinge, hinge-DBD and DBD) and 1/20th of DNA for the Rluc3F control vector. Protein expressions were analysed 24 h post-transfection by western blotting using anti-FLAG M2 antibody and anti-tubulin antibody was used as loading control. A protein ladder at the left of the gel shows the mass (in kilodaltons kDa). (C) Rluc3F-BPV1 E2 domains expression levels. Expression of Rluc activity from a transient transfection in C33A cells of an increasing amount (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 ng) of plasmids expressing Rluc3F-E2 domains from BPV1. Data are represented as Rluc activity (Rluc units) and obtained using the Dual-Glo luciferase Assay 24 h post-transfection. All the results correspond to the average of an experiment done in duplicate with an error bar shown as standard deviation. These data are a representative of at least 2 experiments.

Figure 4.4. Effect of proteasome inhibition on stability of BPV1 E2 domains.

Stability of Rluc3F-E2 domains (TAD, TAD-hinge, hinge, hinge-DBD, DBD) from BPV1 in C33A cells co-transfected with Fluc vector as an internal control in presence (●) or absence (○) of 5 μ M of lactacystin to inhibit proteasome activity. Measurement of the luciferase activity associated to each Rluc3F-E2 constructions determine 24 h post-transfection at time points 0, 45, 90, 180 and 300 min. after a block of protein synthesis with 100 μ g/mL of cycloheximide. The results are the average of three independent experiments each done in triplicate with an error bar shown as standard deviation.

Figure 4.5. Protein expression of BPV1 E2 major phosphorylation site mutants.

(A) Rluc3F-BPV1 E2 protein expression levels. The major phosphorylated serine residues are located at position 298 and 301 into the hinge region and were substituted to an alanine in the context of the BPV1 E2 full length fused to Rluc3F epitope. C33A cells were transfected with the same amount of DNA plasmid expressing Rluc3F-E2 WT, S298A and

S301A or 1/20th of Rluc3F coding vector. Protein expressions were analyzed 24 h post-transfection by western blotting using anti-FLAG M2 antibody and anti-tubulin antibody was used as loading control. (B) Protein expressions of Rluc3F-E2 WT, S298A and S301A were analysed by measuring *Renilla* luciferase activity (Rluc units) from a transient co-transfection in C33A cells of an Rluc3F-E2 expressing vectors gradient (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 ng). Results were obtained using the Dual-Glo luciferase Assay 24 h post-transfection allowing the quantification of Rluc (Rluc units). (C) Stability of Rluc3F-E2 WT and major phosphorylation mutants (S298A, S301A) from BPV1 in C33A cells co-transfected with Fluc vector as an internal control in presence (●) or not (○) of 5 μ M of lactacystin. Measurement of the luciferase activity associated to each Rluc3F-E2 constructions was determined 24 h post-transfection at time points 0, 45, 90, 180 and 300 min. after a block of protein synthesis. The results shown in B and C panels correspond to the average of an experiment done in triplicate with an error bar shown as standard deviation and are a representative of at least 2 experiments. (D) C33A cells were transfected with the same amount of DNA plasmid expressing Rluc3F fused to E2 WT, S298A and S301A or 1/10th of Rluc3F coding vector. Protein expressions were analyzed 24 h post-transfection by western blotting using anti-FLAG M2 antibody at time points 0, 45, 90 and 180 min. after a treatment with 100 μ g/mL of cycloheximide.

Figure 4.6. Effect of proteasome inhibition on *Bovine Papillomavirus* type 1 E2 C-terminal truncations stability.

(A) Representation of the different truncations of BPV1 E2 protein. The full length protein has two nuclear localization signal (in grey), two major phosphoserines at positions 298 and 301, one minor phosphorylation residue (S240) previously identified (Lehman et al., 1997) and a consensus site for a phosphorylation on the threonine at position 278. BPV1 E2 truncations have been constructed by deleting the C-terminal of the protein to exclude gradually identified and potential phosphorylation modification site residues. (B) Rluc3F-

E2 truncation proteins expression levels. C33A were transfected with the same amount of DNA plasmid expressing Rluc3F fused to BPV1 E2 wild type (WT) or BPV1 E2 truncations (aa 1-300, 1-277, 1-258 and 1-239) and 1/20th of DNA for the Rluc3F control vector. Protein expressions were analysed 24 h post-transfection by western blotting using anti-FLAG M2 antibody and anti-tubulin antibody was used as loading control. (C) Stability of Rluc3F-E2 WT, 1-300, 1-277, 1-258 and 1-239 truncations were analyzed by co-transfecting C33A cells with the same amount of DNA plasmid expressing Rluc3F fusions and Fluc coding vector as an internal control, in presence (■) or absence (□) of 5 μ M of lactacystin. Protein expressions were analyzed 24 h post-transfection at time points 0, 45, 90, 180 and 300 min. after a treatment with 100 μ g/mL of cycloheximide. The results correspond to the average of two experiments done in triplicate with an error bar shown as standard deviation.

Figure 4.7. Localization of BPV-1 E2 proteins in C33A cells.

Intracellular localization of BPV1 E2 full length, TAD, TAD-hinge and different C-terminal truncations was determined by transfecting Rluc3F fusion expressing vector into C33A. 24 h post-transfection, cells were fixed, mounted and visualized at 63X by confocal immunofluorescence microscopy using an anti-FLAG antibody and detected with an anti-mouse ALEXA Fluor 633 antibody (left panels). DNA was stained with DAPI (central panels).

Figure 4.8. Fibropapillomavirus E2 hinge region associates with the stability of the protein. Amino acid sequence alignment of the hinge region related to the stability of E2 of different fibropapillomavirus namely Bovine papillomavirus (BPV type 1, -2 and -5), European Elk papillomavirus (EEPV), Red Deer papillomavirus (RDPV) and Deer papillomavirus (DPV). The region associates with the degradation of the BPV1 E2 protein,

encompassing amino acids 259 to 277 is illustrated in bold. Identical residues are highlighted in black and the BPV1 E2 hydrophobic and basic residues at the N-terminal of the RX₂PY motif are pointed with a arrow above the sequences. Potential kinase-specific phosphorylation site (grey) and the predictive kinases generated by *GPS 2.0* (Xue et al., 2008) are depicted at the top left of the sequences.

Table I. Primers used in this study.

Note to Table 1:

^a All BPV E2 proteins were fused to *Renilla* luciferase linked to 3x-FLAG epitope as depicted in figure 1a.

4.10 Figures

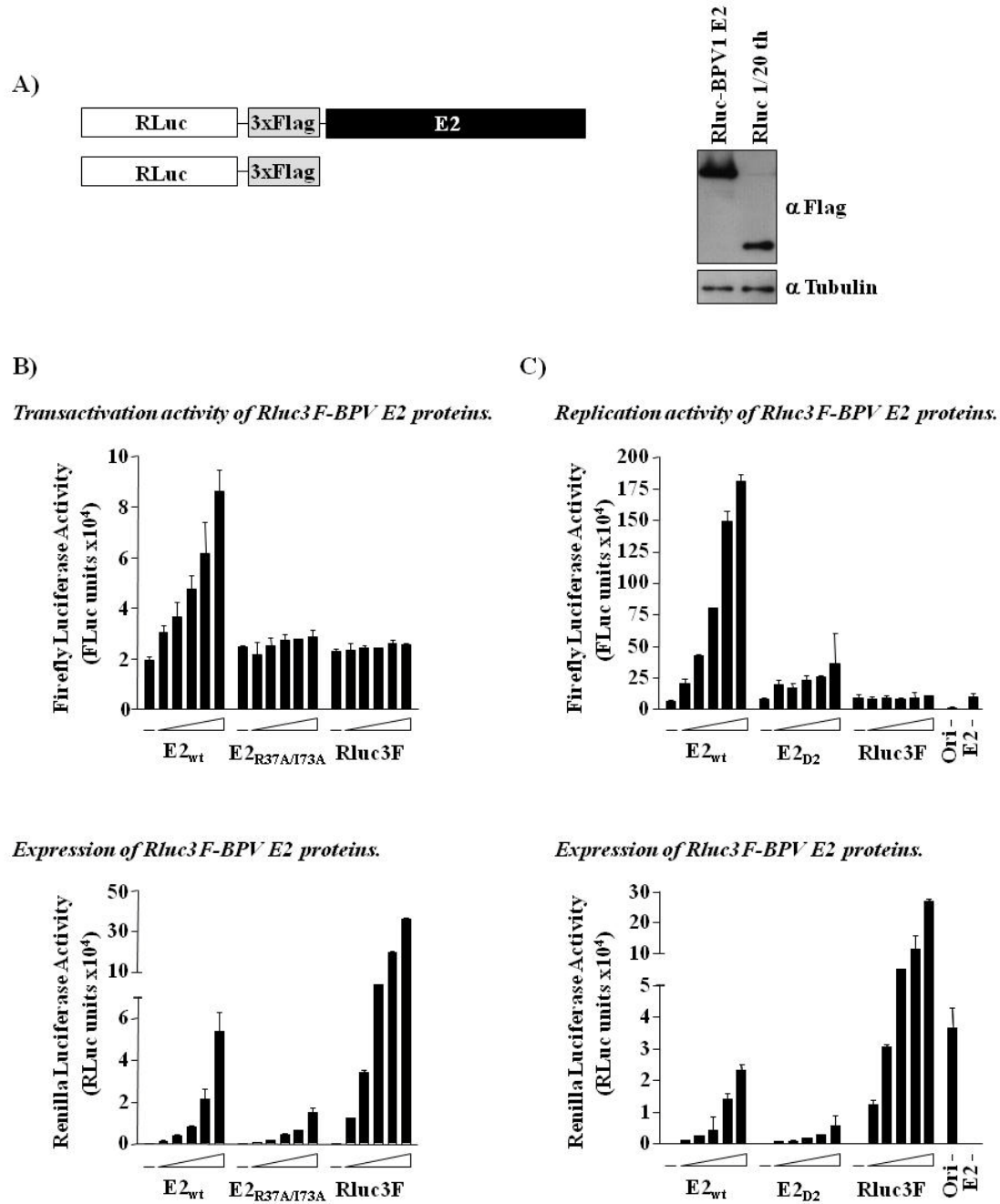


Figure 4.1. Functional activities of Bovine papillomavirus type 1 E2 protein fused to the RLuc3F.

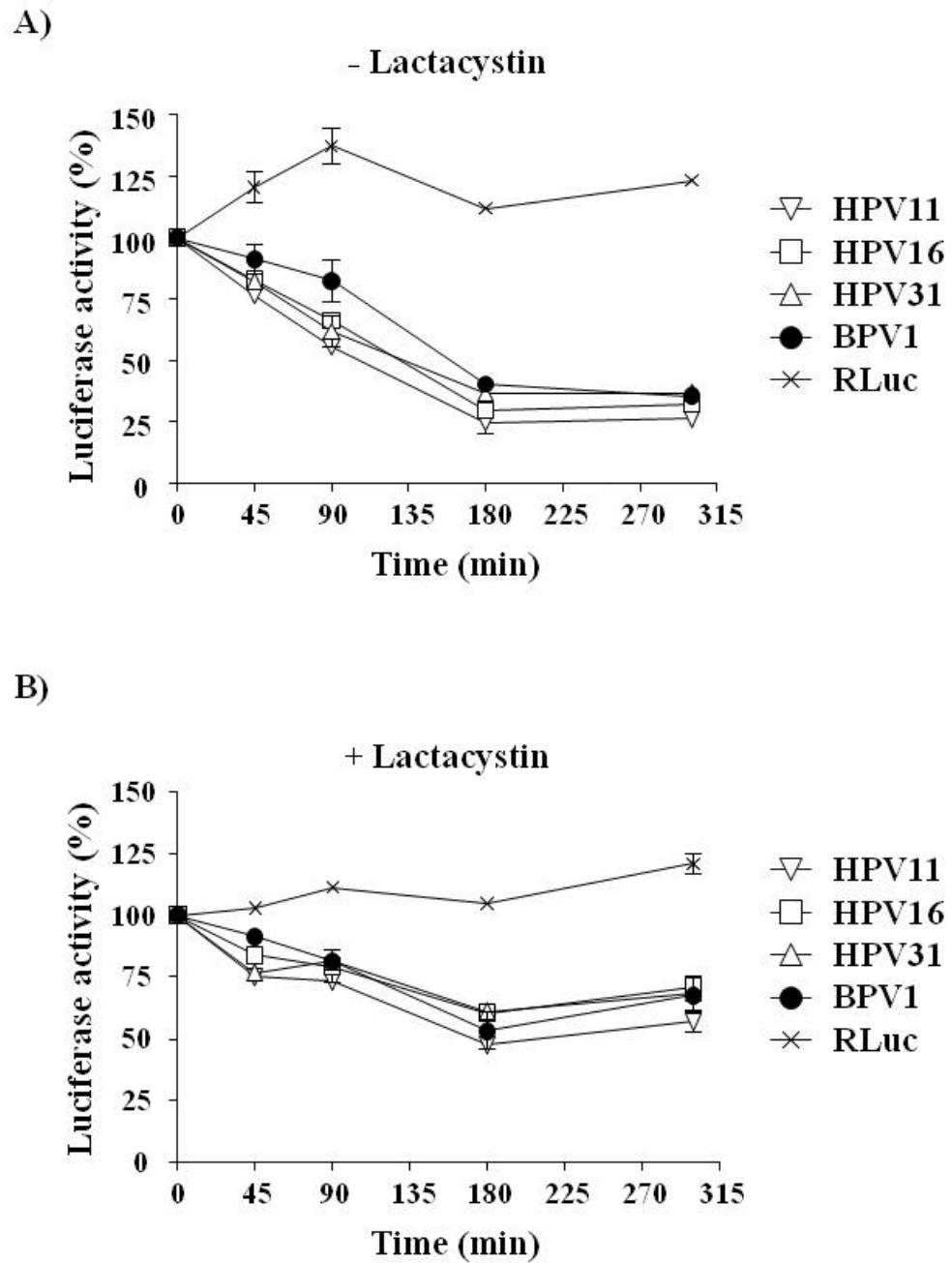


Figure 4.2. Stability of Papillomavirus E2 proteins as a fusion with Renilla luciferase measured using luciferase activity.

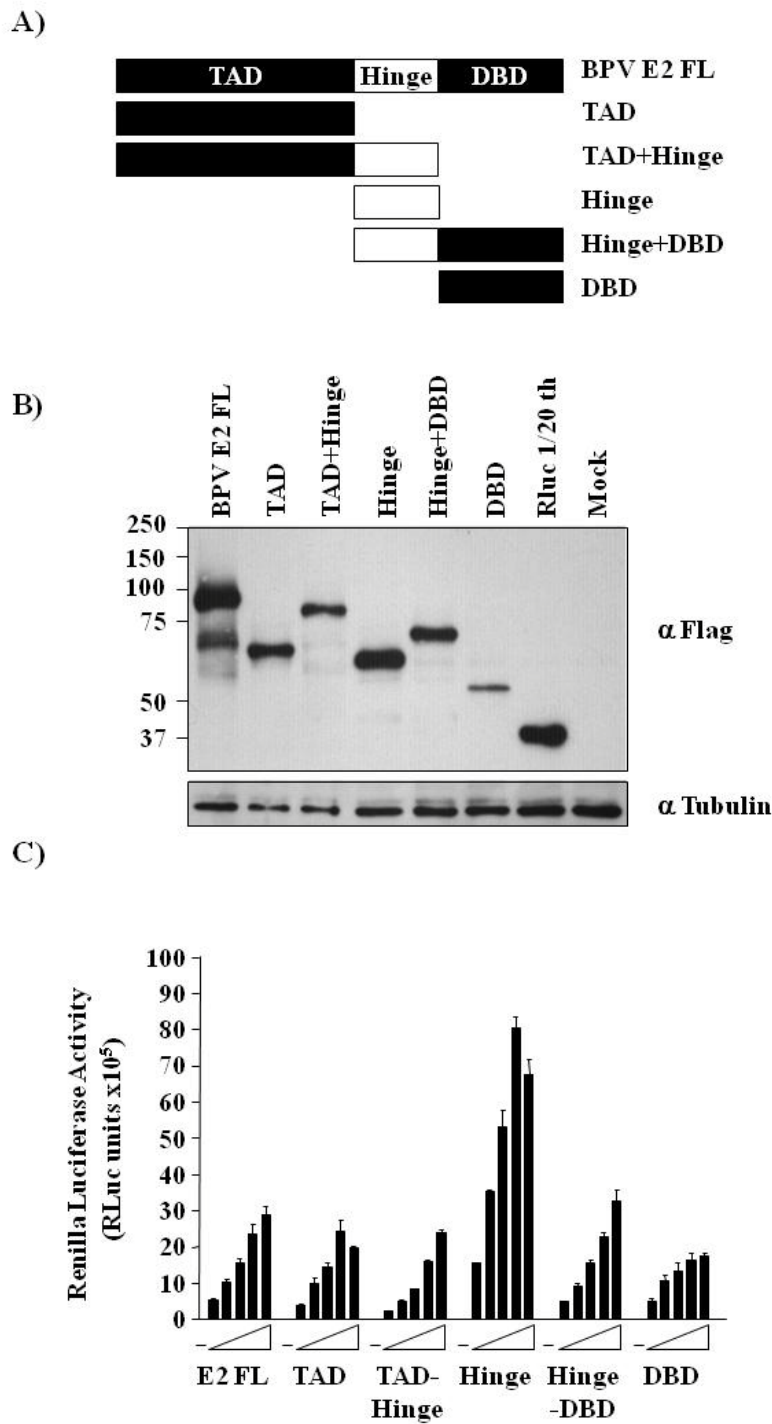


Figure 4.3. Protein expression of Bovine Papillomavirus E2 domains as a fusion with Renilla luciferase.

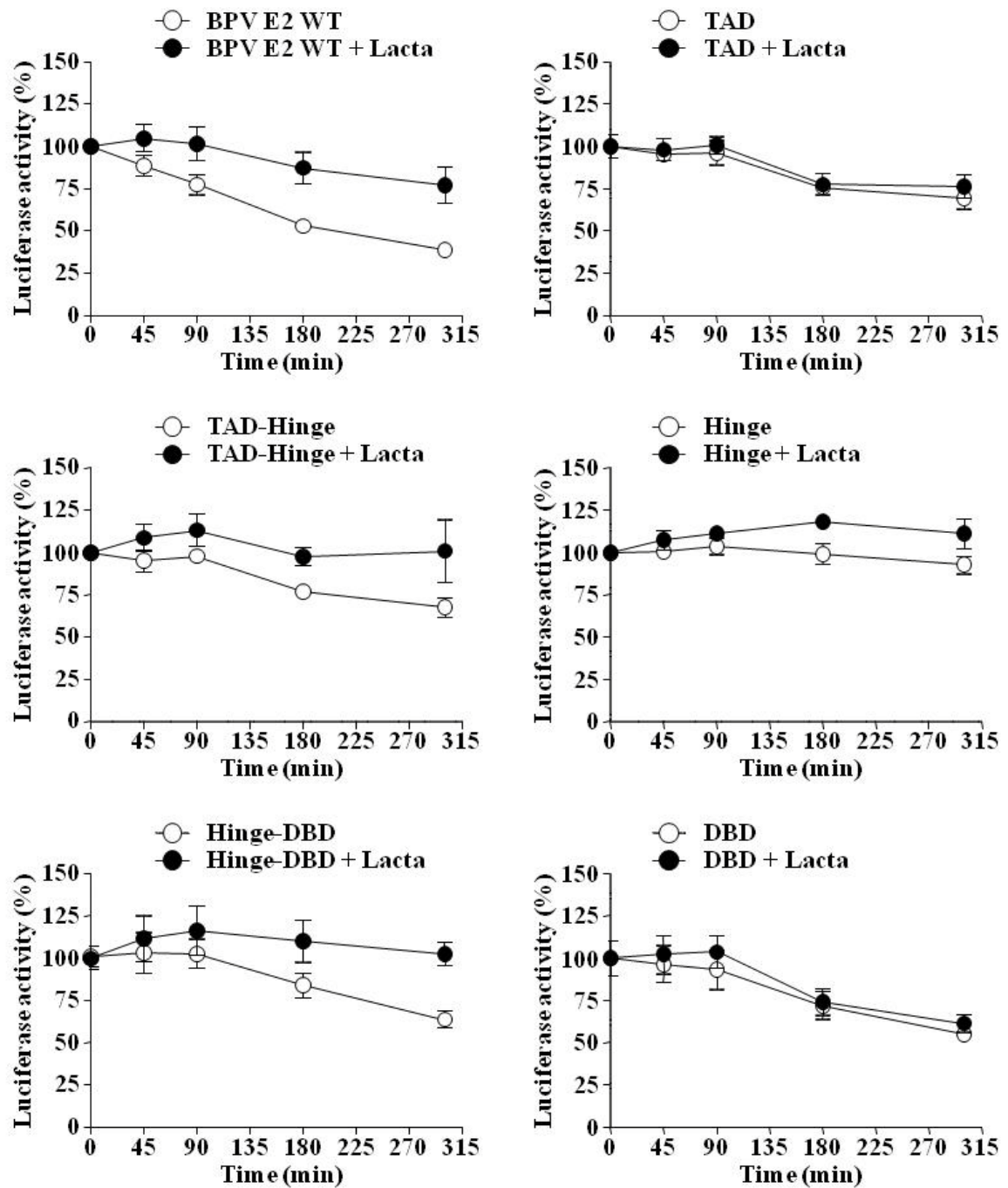


Figure 4.4. Effect of proteasome inhibition on stability of BPV1 E2 domains.

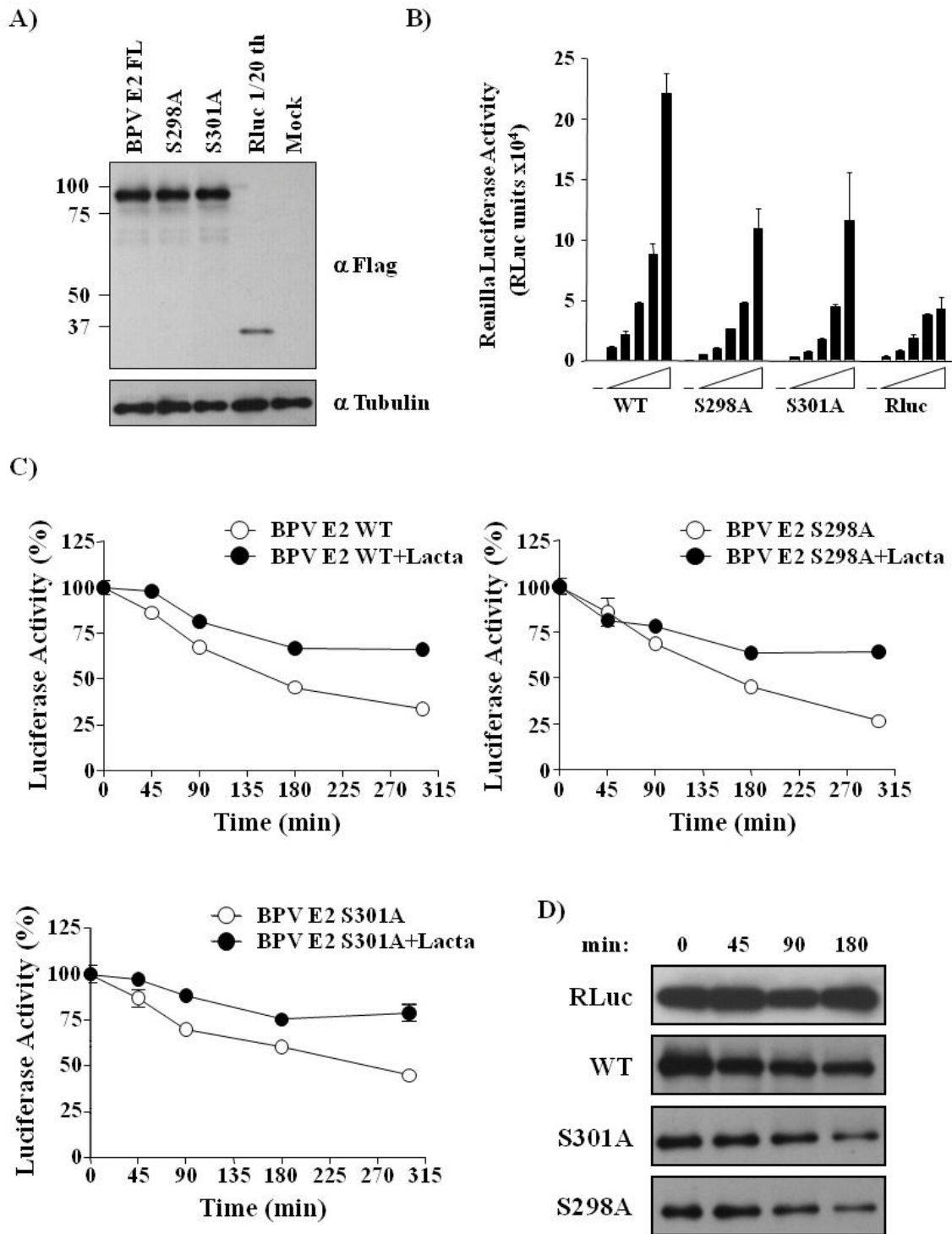


Figure 4.5. Protein expression of BPV1 E2 major phosphorylation site mutants.

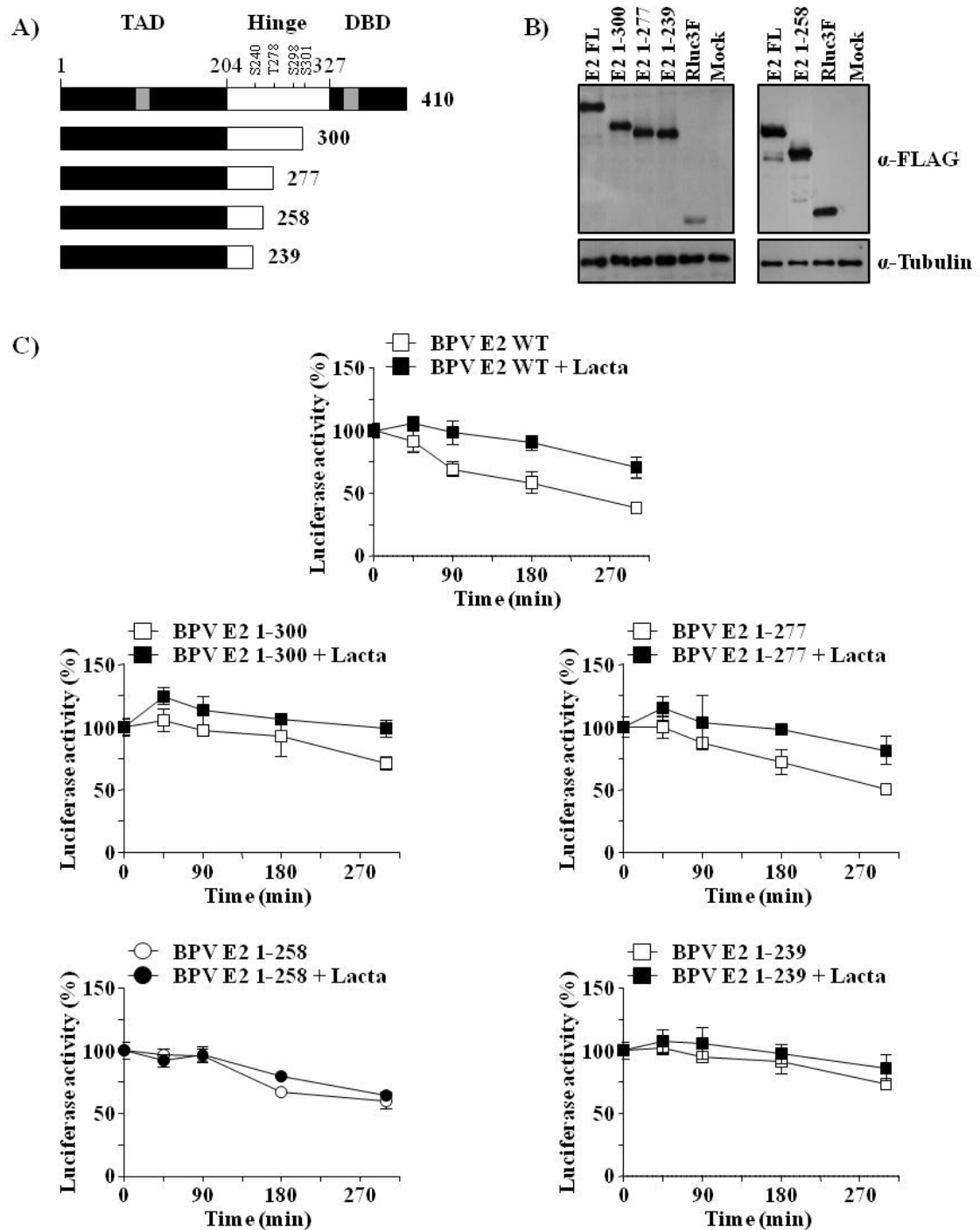


Figure 4.6. Effect of proteasome inhibition on Bovine Papillomavirus type 1 E2 C-terminal truncations stability.

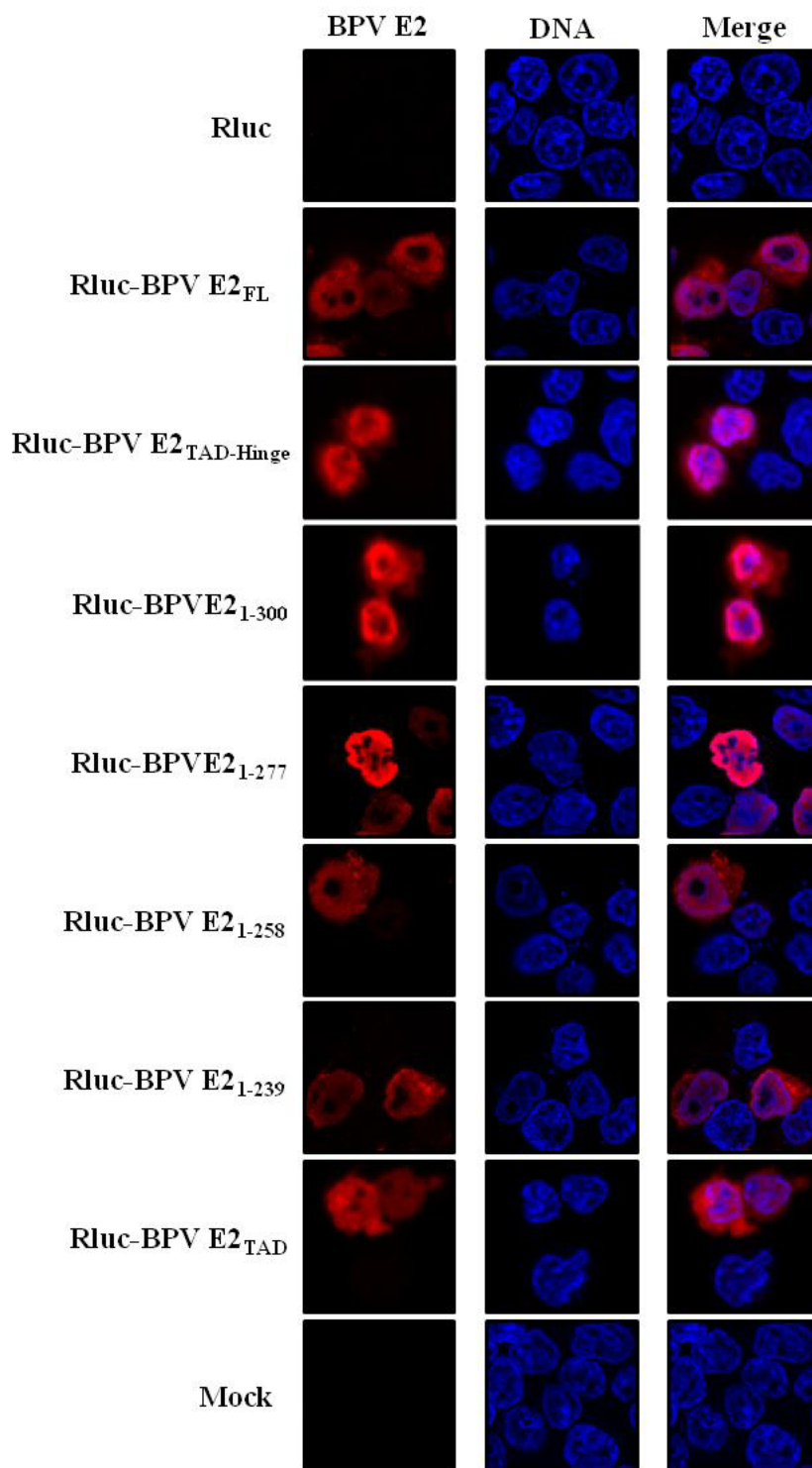


Figure 4.7. Localization of BPV-1 E2 proteins in C33A cells.

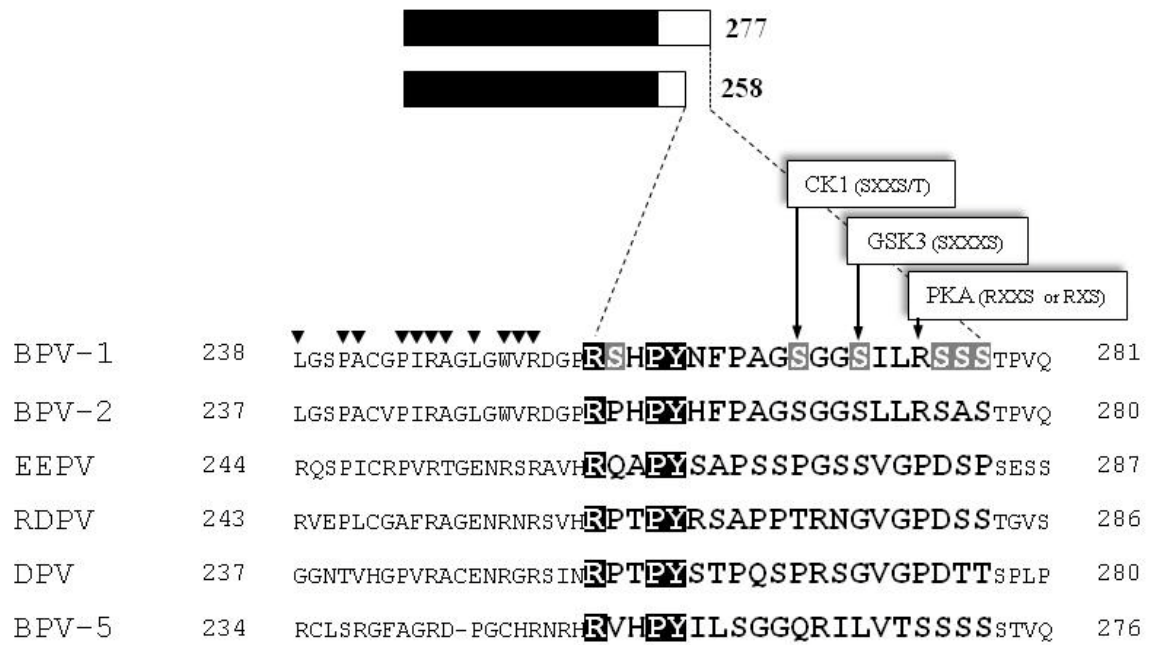


Figure 4.8. Fibropapillomavirus E2 hinge region associates with the stability of the protein.

Table I. Primers used in this study.

BPV E2	Domain/Substitution^a	Primers
Full lenght (FL)	-	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGAAGTCCAAGCTGGCTGTAAAGCC-3'
TAD	1-203	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAAGAAGAGGTGGATGAGACACCAGC-3'
TAD-Hinge	1-326	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-GGGTCTAGATCATGACCCTCCTGCCTTAAACAGGTGG-3'
Hinge	204-326	Fw 5'-GGGTGGATCCGATTTTAGAGATCGCCCAGACGG-3' Rv 5'-GGGTCTAGATCATGACCCTCCTGCCTTAAACAGGTGG-3'
Hinge-DBD	204-410	Fw 5'-GGGTGGATCCGATTTTAGAGATCGCCCAGACGG-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAAGAAGAGGTGGATGAGACACCAGC-3'
DBD	327-410	Fw 5'-GGGTGGATCCTGCTTTGCTCTAATTTAGGAAGTGC-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAAGAAGAGGTGGATGAGACACCAGC-3'
C-Truncation	1-300	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGTCGGGCGACTGCTCCTC-3'
C-Truncation	1-277	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGGAGGAAGAGCGGAGAATAG-3'
C-Truncation	1-258	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGCGAGGACCGTCCC-3'
C-Truncation	1-249	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGCCTGCTCTGATGGGAC-3'
C-Truncation	1-239	Fw 5'-CCATTGGATCCGAGACAGCATGCGAACGTTTACATGT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATCAGCCGAGCAAAGAAGAGACAGGC-3'
HPV16 E2	1-365	Fw 5'-CCCGGATCCGAGACTCTTTGGCAACGTTTAAAT-3' Rv 5'-CCCTCTAGATATAGACATAAATCCAGTAGACAG-3'

Chapitre 5: Discussion

La protéine régulatrice E2 des papillomavirus est un élément clé dans l'établissement d'une infection chez l'hôte pouvant mener au développement d'un cancer. Initialement définie comme le facteur de transcription régulant l'expression des oncogènes viraux, E2 a aussi été caractérisée pour ses rôles au niveau de l'initiation de la réplication du génome viral, la ségrégation de l'épisome, l'induction de l'apoptose et son implication dans le cycle cellulaire. Les différentes fonctions de E2 ne font que réitérer son importance au sein du cycle viral. Ainsi, cette thèse présente des études dévoilant des facettes de la régulation des activités transcriptionnelle et répllicative de la protéine E2 en plus de mettre en évidence une région protéique responsable du contrôle de la dégradation de E2 dans les cellules hôtes. Tout d'abord, nous avons identifié l'isoforme long de la protéine cellulaire Brd4 comme partenaire d'interaction avec la protéine E2 de divers type de papillomavirus. Cette étude s'est inscrite parmi celles qui proposaient une régulation de l'activité transcriptionnelle de E2 via son interaction avec Brd4(L). Par la suite, nous avons caractérisé *in vivo* certaines régions du domaine de transactivation de la protéine E2 impliquées dans la formation d'une interface dimérique entre deux monomères de la protéine, par l'entremise d'un pont disulfure. Quoique non-essentielle aux activités de la protéine, nous avons démontré que l'intégrité de la structure dimérique facilite la réplication de l'épisome du papillomavirus bovin. Finalement, nous avons étudié la régulation de la disponibilité de la protéine E2 afin qu'elle puisse contribuer au moment opportun, au cycle viral. Ainsi, nous avons circonscrit dans le domaine charnière une région qui est requise pour induire la dégradation de la protéine. Cette région est composée d'acides aminés conservés au sein des fibropapillomavirus pouvant subir diverses modifications post-traductionnelles et ainsi, moduler la présence de E2 au sein de la cellule infectée. Les trois articles mettent en lumière des méthodes contrôlant les activités et la disponibilité de la protéine E2 selon ses partenaires, l'intégrité de sa structure quaternaire et sa stabilité au sein d'une cellule.

5.1 Domaine de transactivation : lieu de la régulation

5.1.1 Interaction entre E2 et les protéines cellulaires

Comme il a été mentionné précédemment, la liaison à l'ADN par E2 via son DBD induit l'activation ou la répression de la transcription en plus d'initier la réplication du génome viral. L'association E2-ADN uniquement ne peut pas contrôler toutes les activités associées à la protéine virale. Ainsi, la plupart des rôles attribués à E2 sont possibles, entre autre, par l'entremise d'interaction entre le TAD de E2 et les protéines cellulaires et virales.

Le premier article présenté dans cette thèse démontre que la fusion entre la protéine glutathione-S-transférase (GST) et le TAD de E2 comme ligand en présence d'extrait cellulaire préparé à partir de culture des cellules 293 et HeLa, a permis d'étudier les protéines cellulaires associées au TAD de la protéine E2 des papillomavirus de type 11 et 31. Suite à une analyse par spectrométrie de masse des échantillons renfermant les bandes protéiques uniques aux essais avec GST-E2 TAD, la protéine cellulaire Brd4(L) fût représentée de façon majoritaire et donc associée à cette partie de E2. De plus, cette étude a révélé que la protéine E2 des papillomavirus infectant la peau (VPH1), les muqueuses (VPH16, et -18) et même, certains animaux (VPB et CRPV) interagit avec Brd4(L), indiquant que cette association est conservée au sein de ces virus. Aussi, cette surface d'interaction implique entre autre, les acides aminés R37 et I73 situés à proximité au niveau des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, respectivement. Ces résidus ont préalablement été identifiés comme étant importants pour l'activité transcriptionnelle de la protéine E2. Les substitutions de l'arginine 37 en alanine et de l'isoleucine 73 en leucine ou en alanine abolissent la capacité de E2 de réprimer ou d'activer la transcription sans affecter son interaction avec l'hélicase E1, permettant la réplication de l'ADN viral. À l'origine, la protéine Brd4(L) a été décrite comme un facteur important pour la mémoire épigénétique car elle était associée à la chromatine tout au long de la mitose, au niveau des lysines acétylées des histones. Cette

association à la chromatine, son interaction avec le complexe *Mediator* et sa participation indirecte à l'activation de la transcription en recrutant et en formant un complexe avec pTEFb ont permis d'établir que la protéine Brd4(L) joue un rôle vital dans la transcription cellulaire. Ainsi, les caractéristiques connues de Brd4(L) et son association à une surface de E2 importante pour l'activité transcriptionnelle, nous ont permis de proposer que l'interaction entre E2 et Brd4(L) est nécessaire à la transcription des gènes des papillomavirus. Cette hypothèse supportait d'autres publications parues à cette même période évoquant un nouveau rôle à l'interaction E2-Brd4 qui initialement, avait été définie comme essentielle à la ségrégation du génome viral lors de la mitose, en particulier pour la ségrégation du génome de VPB1. L'utilisation du mutant de transactivation I73L de la protéine E2 du VPH31 dans nos essais d'interaction avec Brd4(L) nous laissait déjà croire que Brd4(L) n'était pas la protéine intermédiaire pour la ségrégation. En effet, malgré son incapacité à promouvoir la transcription et à lier Brd4(L), ce mutant permet l'initiation de la réplication et le maintien de l'épisome dans les kératinocytes primaires en culture (Stubenrauch et al., 1998a). L'hypothèse que le complexe E2-Brd4(L) soit requis pour la ségrégation du génome viral doit maintenant être nuancée car plusieurs groupes ont découvert que l'association entre E2 de différents types de papillomavirus et les chromosomes mitotiques, n'est pas nécessairement véhiculée par la protéine cellulaire Brd4(L). D'autres partenaires d'interaction tels que TopBP1, ChlR1 et Mlkp2, ont été proposés pour ce rôle. De plus, la protéine E2 du VPH31 portant les substitutions au niveau de R37 et I73 se retrouve tout de même associée aux chromosomes mitotiques, supportant l'idée que la ségrégation de l'épisome de certains types de papillomavirus n'implique pas une interaction avec Brd4(L). Une explication possible de ces divergences pourrait être attribuable à la différence d'affinité observée entre Brd4(L) et les protéines E2 des papillomavirus. Entre autre, les protéines E2 des types cutanés présentent une affinité réduite pour la protéine Brd4(L) comparativement à certains types animaux comme CRPV ou VPB1 (Sekhar et al., 2010; Senechal et al., 2007). Aussi, certains types de papillomavirus contiennent plus de 4 sites de liaison par dans leur génome et la protéine E2

possède variation d'affinité pour ces sites. Ainsi, nous pouvons supposer que la liaison à certains sites favoriserait la ségrégation de l'ADN viral. Par exemple, l'épisome du VPB1 contient 17 sites de liaison à E2 tandis que la majorité des autres papillomavirus en possèdent 4. Si les 17 sites sont occupés par la protéine E2 et que cette dernière est associée à Brd4(L), le nombre d'occasions d'observer la formation d'un complexe épisome-E2-Brd4(L)-chromosome mitotique que s'il y a que 4 sites. Ainsi, il est possible que 4 sites ne suffisent pas au maintien de l'épisome lors de la mitose et que l'interaction avec d'autres facteurs soit requise pour une partition équitable de l'ADN viral dans les cellules filles. Nous pouvons aussi supposer que certains sites soient essentiels à la ségrégation du génome et que dépendamment des modifications qu'aurait subi l'ADN ou même la protéine E2 elle-même, certains complexes E2-ADN supporteraient une interaction avec des protéines cellulaires plutôt que d'autres. Une tendance semble être commune pour tous les papillomavirus : la protéine E2 sert de pont en s'associant d'une part au génome viral et d'autre part, à un élément de l'hôte permettant d'être associée aux chromosomes mitotiques pour promouvoir la ségrégation.

Récemment, une étude a démontré que la protéine Brd4(L) était plutôt une kinase atypique, capable de phosphoryler directement la sérine 2 de l'heptapeptide répété (YSPTSPS) retrouvé dans le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II et ce, en absence du complexe kinasique pTEFb (Devaiah et al., 2012). Il est reconnu que plusieurs résidus du C-terminal de l'ARN polymérase II sont phosphorylés par diverses kinases et que ces modifications modulent une variété d'évènements dont le recrutement de facteurs d'épissage, pour la pose de la coiffe, l'initiation de la transcription et l'élongation du transcrit. La phosphorylation de la sérine 2, entre autre, permet d'enclencher l'initiation de la transcription. Cette découverte vient appuyer le rôle direct de Brd4(L) dans l'initiation de la transcription des gènes cellulaires en modulant l'activité de l'ARN polymérase II. Cette nouvelle fonction de Brd4(L) corrobore l'hypothèse que l'interaction entre E2 et Brd4(L)

promeut la transcription. De plus, la protéine E2 s'associe aussi à des composantes du complexe de pré-initiation de la transcription tels TFIIB et TFIID (TAF1, TAF7 et TBP) (Benson et al., 1997; Centeno et al., 2008; Enzenauer et al., 1998; Rank and Lambert, 1995; Steger et al., 1995; Yao et al., 1998). Ainsi, en liant ses sites de reconnaissance retrouvés dans la région de contrôle de l'épisode viral via son DBD, E2 servirait de lien afin d'approcher la machinerie de transcription au niveau du promoteur viral. E2 aurait un rôle d'usurpateur d'un élément clé, la protéine Brd4(L), qui favoriserait l'initiation de la transcription des gènes du papillomavirus.

Ce rôle de kinase atypique attribué à Brd4(L) pourrait aussi être associé à la phosphorylation de la protéine E2 expliquant ainsi les activités pléiotropiques attribuées au complexe E2-Brd4(L). Rappelons que différentes équipes ont déterminé que le complexe E2-Brd4(L) permettait la ségrégation de l'épisode viral, promouvait l'activation et la répression de la transcription. De plus, l'interaction E2-Brd4 semble protéger E2 contre sa dégradation par le protéasome tel que suggéré par notre observation où la surexpression du C-terminal de Brd4 stabilise E2 (voir l'annexe 3 (Gagnon et al., 2009) . Cette diversité fonctionnelle du complexe E2-Brd4(L) s'expliquerait, entre autre, par une régulation de la phosphorylation de la protéine E2 par Brd4(L). En effet, les protéines E2 du VPB1, CRPV, VPH11 et VPH16 sont des phospho-protéines et parallèlement ces mêmes protéines interagissent avec Brd4(L) (Barbosa and Wettstein, 1988; Bream et al., 1993; Lehman et al., 1997; McBride et al., 1989; McPhillips et al., 2006; Sanders et al., 1995; Senechal et al., 2007; You et al., 2004). De façon indirecte, la caséine kinase II a été suggérée comme l'enzyme phosphorylant E2 du VPB1 car la destruction du site consensus de la CKII (S/T X X D/E) retrouvé dans la séquence protéique de E2, réduisait le niveau de phosphorylation de la protéine (Penrose et al., 2004). Par contre, aucune étude n'a établi spécifiquement quelle kinase est responsable de la phosphorylation de E2. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer, dans un premier temps, si Brd4(L) est la kinase phosphorylant la protéine E2, à l'aide d'ARN interférant réduisant l'expression de Brd4(L), du peptide compétiteur de

l'interaction E2-Brd4(L) ainsi que d'inhibiteurs affectant l'activité kinasique de Brd4(L), tels que l'apigénine et le DRB (Devaiah et al., 2012; Devaiah and Singer, 2012). Par la suite, des analyses fonctionnelles pourront être entamées afin d'établir s'il existe une modulation des activités de E2 selon son état de phosphorylation et ainsi confirmer les différents rôles attribués au complexe E2-Brd4(L). D'autre part, la protéine Brd4(L) est en mesure de s'auto-phosphoryler et représente aussi un substrat pour certaines kinases telles que CDK9 et CDK7 qui, en phosphorylant Brd4(L), activent et inhibent respectivement son activité kinasique (Devaiah and Singer, 2012). L'étude de la modulation de la phosphorylation de Brd4(L) sur les diverses activités de E2 nous permettrait de comprendre les différents rôles attribués au complexe E2-Brd4(L) et ainsi, définir un niveau supplémentaire de la régulation des fonctions de E2.

5.1.2 Intégrité de la structure de E2

Des contacts avec certaines régions du domaine de transactivation vont promouvoir les activités spécifiques de E2. À titre d'exemple, la surface comprenant les résidus R37 et I73 est le siège de la régulation de la transcription et de l'interaction avec les chromosomes mitotiques et/ou Brd4(L). Sur la face opposée à cette extrémité N-terminale du TAD, nous retrouvons la région d'interaction avec l'hélicase E1 permettant son recrutement au niveau de l'origine de réplication et donc d'initier la réplication de l'ADN viral.

En 2007, Sanders *et al.* démontraient l'existence d'une interface de dimérisation au sein du TAD de la protéine E2 du VPB1 à l'aide d'une structure cristallographique du TAD de E2 du VPB1 ainsi qu'à l'aide d'essais *in vitro*. Le contact TAD-TAD chez E2 du VPB1 créé suite à l'homodimérisation du DBD, engage une surface protéique de E2 impliquée dans la liaison avec l'hélicase E1. En plus d'utiliser la glutamine 12, les arginines 58, 172 et l'asparagine 175, cette surface de dimérisation semble être stabilisée par la création d'un

pont disulfure entre les cystéines 57 des deux TAD. Ils ont proposé que lorsqu'un lien disulfure est établi entre les C57, le contact avec E1 est affecté. Ils ont de plus, démontré que la cystéine 57 était plus sensible à l'oxydation que la C340 régulant la liaison de E2 à l'ADN, proposant ainsi, que l'état d'oxydo-réduction de la protéine régulerait le contact avec E1 et donc l'initiation de la réplication du génome des papillomavirus, sans affecter la liaison à l'ADN par E2.

Ayant accès à une banque de mutants du TAD de E2 du VBP1 dont certains possédaient quelques mutations impliquées dans l'interface de dimérisation de E2, nous avons entamé la caractérisation de ces protéines dans un contexte *in vivo* pour les activités transcriptionnelles et répliquatives de la protéine E2 du VPB1 (Annexe 2). Cette analyse avait pour but de déterminer la fonction de l'interface de dimérisation et possiblement de révéler l'existence d'une régulation des activités de E2 dépendantes de sa structure quaternaire. Tout d'abord, nous avons construit les mutants intervenant dans la surface de dimérisation et caractérisés *in vitro* par Sanders *et al.* (C57A, R172A et D175A) ainsi que toutes les possibilités provenant de leur combinaison. L'utilisation des protéines portant les substitutions abolissant la création de l'interface de dimérisation nous permettait d'évaluer directement le rôle de cette surface sans avoir recours à des agents réducteurs dans nos essais *in vivo*. Nous avons pu détecter l'expression de ces protéines par des analyses d'immuno-buvardage de type Western et leur localisation cellulaire par microscopie. Nous avons remarqué que les mutants portant la substitution C57A étaient moins bien exprimés, mais ces mutations n'affectaient pas la distribution cellulaire des protéines. Par la suite, nous avons évalué la capacité de ces mutants à activer la transcription d'un gène rapporteur régulé par quatre sites de liaison spécifiques à E2. Nous avons pu déterminer que, malgré une plus faible expression protéique, les mutants de l'interface de dimérisation étaient en mesure d'activer la transcription au même niveau que la protéine sauvage. Ce résultat confirme aussi que les protéines mutantes sont toujours en mesure de lier les sites de

reconnaissance de E2. Enfin, selon l'article de Sanders *et al.*, l'interaction TAD-TAD véhiculée par la surface de dimérisation, inhiberait l'activité répliquative en limitant la liaison de E2 à E1. Ainsi, les protéines de E2 mutantes pour la formation de cette surface ont été évaluées dans leur capacité à promouvoir la réplication de l'ADN viral. Pour ce faire, nous avons adapté l'essai de réplication transitoire spécifique au VPH31 développé dans notre laboratoire, afin d'étudier la capacité des protéines E1 et E2 du VPB1 de permettre la réplication de l'ADN à partir de l'origine de ce même virus. La présence des mutations empêchant l'intra-dimérisation du TAD, a permis l'initiation de la réplication de l'ADN viral mais contrairement à ce qui avait été proposé par Sanders *et al.*, les protéines contenant la substitution C57A, présentaient un niveau de réplication beaucoup plus faible que celui observé avec la protéine sauvage. L'altération de l'activité de réplication de ces mutants n'était pas liée à une diminution de l'expression protéique comme il avait été démontré pour la fonction de transactivation. La surexpression du triple mutant (CA/RA/DA) ne parvient pas à égaler l'activité répliquative atteignant au maximum un niveau de 50 % de celui de la protéine sauvage. Ainsi, l'intégrité structurale du TAD de la protéine E2 va favoriser l'initiation de la réplication de l'ADN. Ces données démontrent que l'interface de dimérisation n'est pas essentielle aux activités transcriptionnelle et répliquative de E2 du VPB1 et que l'interaction intra-dimérique stabilisée par la cystéine 57 facilite la réplication du génome viral dans les cellules.

Notre étude illustre une certaine importance de l'intégrité du TAD dans les activités de E2 et plus particulièrement dans l'initiation de la réplication. Afin de réconcilier les conclusions de ces deux études, plusieurs aspects de l'interaction E1-E2 au sein de la réplication du génome viral doivent être analysés. Tout d'abord, il faut se rappeler que la liaison entre l'hélicase E1 et l'ADN est peu spécifique et que son association avec E2, liant spécifiquement ses sites de reconnaissance au niveau de l'origine de réplication, devient primordiale afin de pallier à cette lacune. La diminution de la réplication que nous

observons dans les essais *in vivo* peut être attribuable à une réduction de l'affinité entre les protéines E2 mutantes et l'hélicase E1, ce qui inhiberait le recrutement de E1 à l'origine de réplication virale et donc la réplication du génome viral. Pour leur part, Sanders *et al.* ont confirmé l'interaction directe entre E1 et E2 produites *in vitro* par un essai de « *GST pull-down* » et de façon indirecte par la formation d'un complexe de pré-initiation de la réplication. Les résultats découlant de cet essai montre qu'effectivement un complexe de pré-initiation est formé à l'aide des protéines E2 C57A et E1 ainsi que l'origine de réplication. Par contre, Sanders *et al.* ont noté une diminution de la formation de ce complexe si l'on compare ces données avec ceux obtenus avec la protéine de type sauvage en conditions réductrices. Ainsi, nous pouvons suspecter que la mutation C57A portée par E2 réduit le contact avec la protéine E1 sans l'abolir complètement et, par le fait même, permet l'initiation de la réplication. Selon une étude cristallographique antérieure du complexe E1/E2 du VPH18, une vaste région incluant une vingtaine d'acides aminés de E2 sont impliqués dans l'interaction avec E1. Ces résidus sont répartis principalement dans les trois hélices α de l'extrémité N-terminal du TAD de E2. Il est alors raisonnable de suggérer que malgré la présence de trois mutations au niveau de la surface de contact avec E1, il persiste une interaction entre E1 et E2 *in vivo* favorisant un certain niveau de réplication de l'ADN.

En plus d'empêcher une liaison non-spécifique à l'ADN, l'association de E2 à E1 inhibe l'activité ATPase de l'hélicase en réduisant l'affinité de E1 pour l'ATP. Ceci a pour conséquence d'empêcher E1 d'oligomériser et de former un double hexamère actif qui est en mesure de dérouler l'ADN. En effet, la partie C-terminale du TAD de E2 qui est composée de feuillets β , occupe l'espace permettant la liaison des autres monomères de E1. Puisque l'association à l'ADN et l'oligomérisation de E1 sont essentielles à la formation d'un double hexamère actif, la protéine E2 doit libérer l'espace qu'elle encombre. Il a été proposé que l'association entre E1 et l'ADN est induite par la liaison et l'hydrolyse de

l'ATP dans le domaine C-terminal de E1 et que ceci provoquerait un changement de conformation de E1 qui diminuerait son affinité pour E2 (Abbate et al., 2004; Lusky et al., 1994; Sanders and Stenlund, 1998; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001). Puisque nous observons une diminution de la réplication de l'ADN avec les protéines E2 mutantes pour l'interface de dimérisation, nous pouvons croire que ces mutations génèrent un changement de la conformation protéique. Entre autre, la modification C57A semble favoriser une association avec E1 en formant un complexe de pré-initiation, mais pourrait empêcher E2 d'être facilement larguée, ce qui ralentirait l'initiation de la réplication et la progression de E1 sur l'ADN.

Une autre possibilité expliquant les divergences entre les deux études, serait que les mutations favorisent la phosphorylation de la protéine E2 du VPB1 soit par le recrutement de kinases ou bien en inhibant l'action de phosphatase. Des études effectuées avec les protéines du VPB1, ont démontré que l'interaction avec E1 est favorisée lorsque des formes hypophosphorylées de E2 sont utilisées (Lehman et al., 1997; Voitenleitner and Botchan, 2002). Les acides aminés phosphorylés connus se retrouvent dans la région charnière de E2 du VPB1 (S235, S240, S277, S298, S301). Ainsi, l'interface de dimérisation pourrait servir de plate-forme d'interaction avec des kinases ou bien des protéines recrutant des kinases et ainsi contribué à la phosphorylation de E2. Cette possibilité expliquerait l'obtention d'un taux plus faible de la réplication de l'ADN avec la protéine mutante dans l'interface de dimérisation comparativement avec la protéine de type sauvage. De plus, Sanders *et al.* ont utilisé des protéines produites dans un système bactérien qui ne permet pas de recréer exactement les protéines convoitées car les bactéries n'ont pas ou ne reproduisent pas les modifications post-traductionnelles retrouvées sur les protéines cellulaires. Ainsi, il y a très peu de chance que la protéine E2 soit phosphorylée et ainsi une forme hypophosphorylée est favorisée laissant entrevoir une meilleure capacité à répliquer l'ADN. Déchiffrer le processus exact qui inhibe la réplication de l'ADN viral sans affecter la transcription

lorsque l'intégrité du TAD est perturbée, nous aiderait à comprendre les détails de l'implication de E2 dans la réplication du génome viral et au sein de l'interaction E1-E2.

Une analyse plus technique du deuxième article de cette thèse expose une différence d'expression des protéines portant la mutation C57A qui n'a pas été étudiée dans cette publication. Cette disparité ne vient pas d'une localisation cellulaire différente car les études de microscopie ont révélé une expression principalement nucléaire des protéines mutantes tout comme la protéine de type sauvage. Il serait donc intéressant d'évaluer la stabilité du messenger ainsi que de la forme protéique de ces mutants afin de mieux comprendre ce phénomène avant d'entreprendre des études d'interaction entre E1-E2. Mentionnons que des études de stabilité ont été effectuées dans le cadre d'un criblage de la banque de mutant du TAD de E2, et certains de ces mutants possédaient les substitutions R172A et D175A mais pas la C57A, et nous avons obtenu le même taux de dégradation qu'observé avec la protéine sauvage (figure 5.1). Nous pouvons supposer que l'interaction entre deux TAD aurait une fonction de protection contre la dégradation et que le lien disulfure établi par les C57 serait principalement responsable d'une régulation de la quantité de E2 dans la cellule. Des analyses de protéolyse enzymatique ont déjà montré que E2 est protégée de la dégradation par la trypsine et la chymotrypsine lorsqu'elle est sous la forme dimérique (Corina et al., 1993). Ainsi, nous pouvons supposer que les mutants de l'interface dimérique rendent accessible une surface qui dirige E2 vers la dégradation. Par contre, l'analyse de l'expression et de la stabilité des transcrits serait nécessaire afin d'exclure la possibilité qu'une diminution des ARN messagers survient menant à une réduction de la présence des protéines.

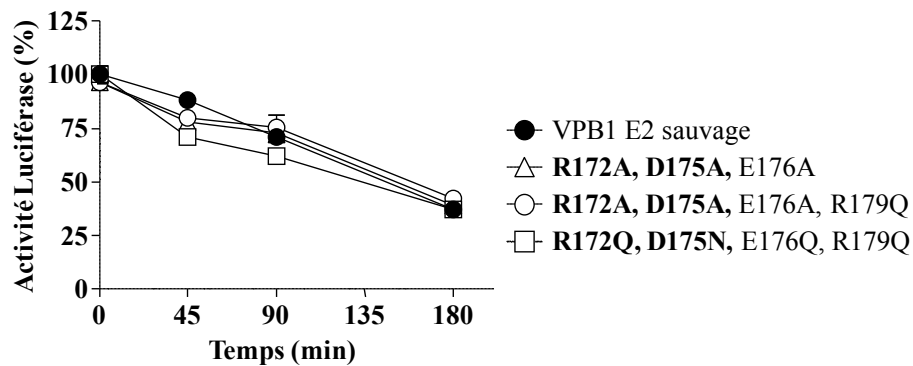


Figure 5.1. Les résidus R172 et D175 ne sont pas responsables de la dégradation de la protéine E2 du VPB1.

Essai de stabilité effectué sur une période de 300 minutes comparant la dégradation de la protéine E2 sauvage à celles portant certaines substitutions impliquées dans l'interface dimérique (R172A/Q et D175A/N) lors d'un bloc de la traduction avec la cycloheximide. Les plasmides codant pour les protéines E2 fusionnées à la luciférase du genre *Renilla* ont été co-transfectés avec un vecteur codant pour la luciférase de la luciole (firefly luciferase) servant de contrôle de transfection et de viabilité. L'analyse a été effectuée 24 heures après la co-transfection à l'aide de l'essai de Promega *Dual-Glo luciferase assay*.

Malgré l'étude convaincante de la découverte d'une surface de dimérisation chez E2 de VPB1 menée *in vitro* par Sanders *et al.*, son existence *in vivo* reste à être démontrée et devient nécessaire pour la poursuite de l'étude ainsi que pour la compréhension de la régulation des activités de ce facteur de transcription. Toutefois, il faut considérer l'état dimérique de la protéine E2 véhiculé par son DBD qui semble être requis afin de générer un second contact au niveau du TAD. En effet, la purification du mutant abolissant la dimérisation du DBD (W360G) à partir d'extrait cellulaire suivi d'une filtration sur gel, a démontré que la protéine E2 W360G est principalement monomérique tandis que la protéine de type sauvage était retrouvée sous les formes monomérique et dimérique (Cardenas-Mora *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 1992). L'étude de Cardenas-Mora *et al.* montre toutefois qu'une fraction de la protéine E2 W360G est dimérique. Nous pourrions tenter d'utiliser la protéine E2 portant la mutation W360G et par une étude de fractionnement, la

comparer à la protéine portant les mutations C57A, R172A, D175A et W360G. L'observation d'une perte de la proportion dimérique nous indiquerait que le triple mutant abolit une interface d'interaction TAD-TAD. Aussi, nous pourrions utiliser le fait que la protéine Brd4(L) s'associe plutôt à la version dimérique du TAD de E2 en produisant une version tronquée de la protéine E2 au niveau du DBD. Par la suite, une analyse de co-localisation des protéines Brd4(L) et E2 sur les chromosomes mitotiques, nous aiderait à comparer le pourcentage d'association entre les protéines E2 tronquées du type sauvage et portant les mutations C57A, R172A et D175A à Brd4(L). Ainsi, de façon indirecte, l'évaluation de la formation intra-dimérique via le TAD pourrait être effectuée.

D'un autre côté, nous pouvons supposer l'existence d'une interaction entre les protéines E2 mutantes et Brd4, car nous savons que l'activité transcriptionnelle de E2 est associée à l'interaction avec Brd4 et que l'essai de transactivation utilisé dans l'article démontre que le facteur des papillomavirus est fonctionnel. Par contre, nous ne connaissons pas l'efficacité de cette interaction à long terme. Une étude a révélé qu'un hétérodimère de E2 contenant un seul TAD conserve son activité transcriptionnelle mais perd sa capacité à maintenir l'épisome au cours des divisions cellulaires (Kurg et al., 2009; Kurg et al., 2010). De plus, une analyse publiée en 2004 a caractérisé certains résidus chargés, possiblement exposés à la surface du TAD de E2 du VPB1 et parmi lesquels nous retrouvons le double mutant D143A/**R172C**. Ce dernier était en mesure de répliquer l'ADN à partir de l'origine de répllication viral mais ne permettait plus l'attachement de E2 à la chromatine ni à la région de contrôle du VPB1, produisant une perte du partitionnement du génome viral lors de la division cellulaire. Parallèlement, le mutant portant uniquement la substitution D143A préservait les activités transcriptionnelle, répllicative et de ségrégation (Abroi et al., 2004). La protéine E2 portant la mutation R172C seule n'a pas été caractérisée, mais nous pouvons lui attribuer une certaine importance dans la ségrégation de l'épisome. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'implication des acides aminés C57, R172 et D175 à l'aide

d'un essai de ségrégation qui nécessite l'observation du maintien du génome viral au cours de plusieurs divisions cellulaires. Nous savons que l'interaction directe entre E2 et Brd4(L) est véhiculée par les acides aminés R37 et I73 mais que l'état dimérique de E2 favorise aussi cette association. Alors, si le triple mutant interagit moins bien avec Brd4(L), nous pourrions suggérer que les résidus impliqués dans l'interface dimérique contrôlent la ségrégation du génome de VPB1.

De façon plus globale, l'importance des résidus C57, R172 et D175 de la protéine E2 pourrait être aussi évaluée à l'aide d'un système récapitulant le cycle viral du VPB1. Comme le cycle viral est intimement lié à la différenciation des kératinocytes, un système a été développé en utilisant un montage permettant la croissance des cellules à l'interface de l'air et du liquide, favorisant la différenciation cellulaire (culture organotypique de type radeau : *organotypic raft culture*) (McBride et al., 2000). Ce système est composé de cultures organotypiques établies avec des kératinocytes bovinsensemencés sur des radeaux de collagène contenant des fibroblastes transformés avec VPB1. Ces radeaux doivent par la suite être greffés sur une souris immuno-supprimée afin de reproduire des lésions similaires à des fibropapillomas et ainsi, créer un environnement propice à la production de virions infectieux. Ainsi, l'introduction du génome de VPB1 contenant les mutations dans le gène de E2 aiderait l'étude sur l'implication des acides aminés associés à l'interface de dimérisation au cours du cycle viral.

Plusieurs études supportent l'hypothèse que l'oscillation périodique de l'environnement redox retrouvé dans une cellule, régule la progression du cycle cellulaire : de la phase quiescence (G0), à la prolifération (G1, S, G2, et M) (revue dans Sarsour et al. 2009). Une phase oxydative est établie au cours de la phase G0/G1 et graduellement, une phase réductrice est observée atteignant un maximum à la mitose. La régulation de l'interface dimérique de VPB1 E2 selon l'état d'oxydo-réduction intracellulaire corrèle

avec le fait qu'en phase S, les éléments nécessaires à la réplication de l'ADN y sont retrouvés en plus grande quantité. Dans un deuxième temps, la quantité de E2 est à son apogée dans cette même phase du cycle. Ainsi, l'environnement pro-oxydatif retrouvé en phase S favorise du même coup la réplication du génome viral. Néanmoins, un alignement des séquences en acides aminés de E2 provenant de divers papillomavirus montre que VPB1, -2 et -5 possèdent une cystéine à cet endroit dans la protéine (Annexe 1). Il est fort probable que seuls ces types de papillomavirus possèdent une surface de dimérisation régulée par la formation d'un pont disulfure. Par contre, il n'est pas exclu qu'une régulation dépendante de l'état d'oxydo-réduction existe chez les autres papillomavirus. Ces changements peuvent influencer la fonction des protéines E2 soit directement, par la présence de cystéines disponibles à la surface des protéines ou indirectement, en influençant les fonctions de certains partenaires tels que des kinases et des phosphatases pour lesquelles la présence d'un ion métallique dans leur site catalytique est sensible à un environnement redox (Sarsour et al., 2009).

5.2 Stabilité de E2

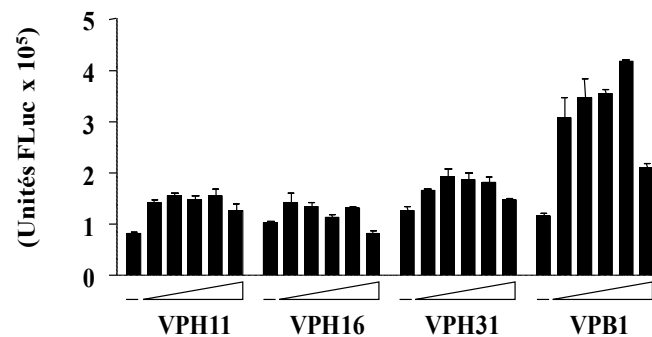
Différentes stratégies peuvent être employées afin de réguler la disponibilité de la protéine E2 au sein de la cellule infectée afin de promouvoir le cycle viral. La production et la dégradation de la protéine sont deux éléments clés favorisant le contrôle du niveau de E2. Il est connu que la protéine E2 autorégule sa production en s'associant à ses sites de reconnaissance situés dans le promoteur des gènes viraux contrôlant l'expression des transcrits des protéines précoces dont E2 fait partie. Il a été aussi démontré que ce facteur des papillomavirus est dégradé par la machinerie du protéasome. Par contre, les signaux et/ou la région protéique dictant la reconnaissance par le système de dégradation restent inconnus.

L'optique du troisième article présenté dans cette thèse avait pour cible de définir les caractéristiques de la protéine E2 du VPB1 associées à sa dégradation. À l'aide d'un

système à double détection comprenant entre autre la fusion entre E2 du VPB1 et la protéine luciférase du genre *Renilla*, nous avons étudié la stabilité du facteur viral. En premier lieu, nous avons défini que la région charnière associée soit au domaine de transactivation ou à celui de liaison à l'ADN, était responsable de l'instabilité de la protéine. Une étude antérieure avait démontré que la sérine 301 localisée dans ce domaine était responsable de la dégradation de E2, par contre, cette sérine ne pouvait à elle seule être associée à l'instabilité de la protéine. Toutefois, nos essais de stabilité ont révélé un taux de dégradation similaire entre la protéine sauvage et la protéine portant la mutation S301A. Cette divergence peut venir des systèmes utilisés où Penrose *et al.* ont opté pour l'établissement de lignées cellulaires CV-1 (cellules provenant de reins de singe) exprimant de façon stable la protéine E2 du VPB1 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'aide du sulfate de cadmium (CdSO₄). Ce système permet la production de la protéine à un niveau adéquat pour la détection tout en évitant les problèmes de solubilité et de localisation souvent rencontrés en surexprimant E2 du VPB1. De notre côté, nous avons utilisé des quantités très faibles de vecteurs exprimant E2 et vérifié que la localisation ainsi que les fonctions de la protéine étaient conservées dans les cellules d'un carcinome du col de l'utérus humain, les C33A. Il est important de mentionner que cette protéine est connue pour interagir avec différents promoteurs trouvés dans les plasmides, tel que le promoteur CMV. Cette interaction peut mener à l'activation ou à une inhibition artificielle de la transcription selon la quantité de protéine ou le domaine de E2 étudié. À titre d'exemple, la figure 5.2 montre que seule la protéine E2 du VPB1 est en mesure d'activer jusqu'à 4 fois la transcription d'un gène rapporteur (luciférase de la luciole) sous le contrôle du promoteur CMV (pCMV) contrairement aux autres protéines E2 où une activation maximale de 1.8 fois est observée. Il faut aussi noter que le pCMV régit aussi la production des différentes protéines fusionnées à la luciférase du genre *Renilla*. Afin de minimiser l'impact de ce problème, nous avons utilisé de faible quantité de vecteur exprimant E2 dans les essais impliquant des plasmides où le pCMV contrôlait l'expression des gènes. Les différences des résultats avec la protéine S301A pourraient être alors expliquées par l'utilisation de

deux lignées cellulaire différentes soit CV-1 versus C33A. Il aurait été intéressant de comparer le niveau de phosphorylation de la protéine E2 sauvage à celle portant la substitution S301A du VPB1 dans ces deux types cellulaires afin de nous assurer qu'elles subissent de façon équivalente les mêmes modifications.

A) Activation de la transcription du promoteur CMV par des protéines Rluc3F-E2



B) Expression des protéines Rluc3F-E2.

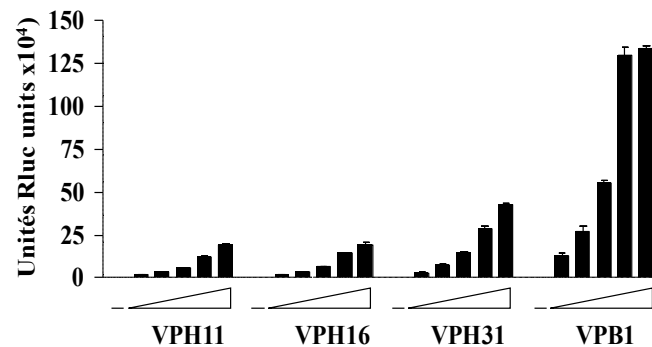


Figure 5.2. Effet de la protéine E2 du VPB1 sur l'activation de la transcription d'un gène régulé par le promoteur CMV.

(A) Activité transcriptionnelle régulée par le pCMV. Expression de la luciférase de la luciole (Fluc) obtenue suite à une co-transfection dans les cellules C33A d'un plasmide codant pour ce gène sous la régulation du promoteur CMV en présence d'une augmentation croissante (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25 et 50 ng) de vecteurs exprimant les protéines E2 du VPH11, -16, -31 et de VPB1 fusionnées à la luciférase du genre *Renilla* (Rluc).

Les valeurs sont exprimées en unités Fluc représentant l'activité de la luciférase de la luciole. (B) Expression des protéines Rluc3F-E2. Activité de la luciférase du genre *Renilla* obtenue suite à la co-transfection décrite en A où la luciférase est fusionnée aux protéines E2. Les valeurs sont exprimées en activité de la luciférase de la *Renilla* (Rluc). (A et B) L'analyse a été effectuée 24 heures après la co-transfection à l'aide de l'essai de Promega *Dual-Glo luciferase assay*.

D'autres sites de phosphorylation existent dans la région charnière de la protéine E2 du VPB1 tels que les résidus S240 et S277 par contre, aucune fonction n'y est rattachée (Lehman et al., 1997). La phosphosérine 240 est suivie d'une proline dans la séquence en acides aminés de E2, formant un motif (phospho-SP) reconnu par l'isomérase Pin1. Pin1 catalyse l'isomérisation des liaisons peptidiques entourant une proline en induisant un changement conformationnel de *cis* à *trans* des liaisons prolyle de ses substrats (Yaffe et al., 1997). Cette modification est souvent associée à la régulation de la stabilité d'une protéine phosphorylée (Liou et al., 2011). Au cours de cette étude, l'implication de la S240 sur la stabilité de E2 a alors été analysée. Ainsi, nous avons testé si la forme non-phosphorylable (S240A) générerait une protéine plus stable que le type sauvage. Malheureusement, ce mutant présente le même taux de dégradation que la protéine E2 sans substitution, excluant un rôle de la phosphosérine 240 dans la dégradation de la protéine E2 du VPB1 (figure 5.3).

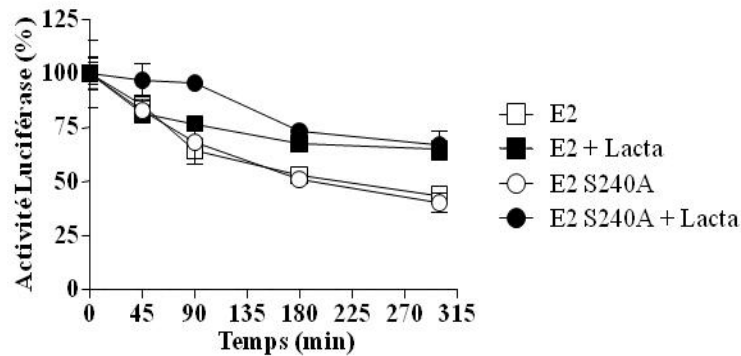


Figure 5.3. La phosphosérine 240 n'est pas associée à la dégradation de la protéine E2 du VPB1.

Essai de stabilité effectué sur une période de 300 minutes comparant la dégradation de la protéine E2 sauvage (□) à celle portant la substitution S240A (○) lors d'un bloc de la traduction avec la cycloheximide. Le même essai a été effectué en présence de l'inhibiteur du protéasome, la lactacystine (lacta), afin de confirmer que la protéine sauvage (■) ainsi que la S240A (●) étaient toutes deux dégradées par le protéasome. Les plasmides codant pour les protéines E2 fusionnées à la luciférase du genre *Renilla* ont été co-transfectés avec un vecteur codant pour la luciférase de la luciole (firefly luciferase) servant de contrôle de transfection et de viabilité. L'analyse a été effectuée 24 heures après la co-transfection à l'aide de l'essai de Promega *Dual-Glo luciferase assay*.

Nous avons alors poursuivi notre analyse en utilisant différentes versions tronquées en C-terminal de E2 afin de définir la séquence protéique responsable de sa dégradation. Cette étude systématique a révélé que la région comprenant les acides aminés 259 à 277 de E2 du VPB1 dicte la dégradation de la protéine. Antérieurement, il avait été démontré que la localisation cellulaire de la protéine E2 influençait sa stabilité. Nous avons donc évalué où se situait au niveau intracellulaire les différentes troncations. Ces analyses montrent que les constructions possédant les premiers 277 résidus et plus, sont localisées principalement au noyau tandis que celles de moins de 258 acides aminés sont uniformément réparties dans la cellule. De plus, une analyse de la séquence comprenant les résidus 259 à 277 des protéines E2 du groupe des fibropapillomavirus, révèle la présence d'un motif conservé

d'un signal de localisation nucléaire (PY-NLS). À la lumière de ces résultats, nous pouvons proposer que la localisation dans le noyau de la protéine E2 ait un impact sur sa stabilité.

Afin d'étudier cette hypothèse, des analyses doivent confirmer la présence de ce signal d'import nucléaire inconnu jusqu'à présent chez VPB1 E2. Il est important de rappeler qu'en plus de la protéine E2 pleine longueur (E2-TA), le génome de VPB1 code pour au moins deux isoformes tronqués au niveau du N-terminal soit E2-TR et E8^ΔE2 (Choe et al., 1989; Hubbert et al., 1988; Lambert et al., 1989; Lambert et al., 1987). E2-TR est composé de la région charnière et du domaine de liaison à l'ADN (aa 162-410) tandis que E8^ΔE2 est le résultat de l'épissage des 10 premiers acides aminés de E8 en fusion avec le DBD de E2. Jusqu'à tout récemment, ces formes étaient considérées comme les répresseurs de E2-TA soit en formant des hétérodimères avec la protéine E2-TA ou bien en compétitionnant l'homodimère de E2 pour ses sites de liaison à l'ADN. Aussi, la présence de deux signaux de localisation nucléaire (NLS) a été démontrée au niveau des acides aminés 106 à 116 et dans le domaine de liaison à l'ADN (résidus 339 à 352) (Skiadopoulos and McBride, 1996). Ces deux NLS semblent servir à contrôler la localisation des différentes protéines E2 de VPB1. Par contre, l'existence de d'autres éléments intervenant dans la distribution de E2 a été proposée, car autant le NLS du TAD que celui du DBD ne permettent pas une localisation complètement nucléaire de la protéine (Skiadopoulos and McBride, 1996). De plus, l'acétylation par p300 et CBP des lysines 111 et 112 retrouvées dans le NLS du TAD, influence la distribution nucléaire de E2 (Quinlan et al., 2013). En effet, une accumulation cytoplasmique de la protéine E2 du VPB1 portant les substitutions K111A/R et K112A/R a été observée de même que la protéine sauvage en absence des protéines p300 et CBP (Abroi et al., 1996; Quinlan et al., 2013). Pour ces études aussi, une exclusion incomplète du noyau était notée avec ces protéines mutantes, suggérant que l'importation nucléaire n'était pas totalement liée à ces modifications. Parallèlement, une étude démontrait que E2-TR était un activateur de la transcription capable d'interagir

coopérativement avec des facteurs cellulaires tels que Sp1 et AP-1 afin de moduler l'expression des gènes viraux (Lace et al., 2012). Certes, le niveau d'activation de la transcription d'un gène rapporteur par E2-TR n'est que de 3 à 5 fois comparativement à 100 fois par la protéine E2-TA, il reste néanmoins que cette protéine peut intervenir au cours de l'infection virale par VPB1. Ainsi, nous pouvons croire que chaque forme de E2 possède un rôle précis dans la régulation de la transcription des gènes au cours du cycle viral et leur distribution cellulaire et temporelle aura un impact sur l'établissement et la persistance de l'infection virale. Si l'importation nucléaire de la protéine E2-TA influence son taux de dégradation et parallèlement, ses activités, alors, l'étude plus approfondie de sa distribution subcellulaire nous aiderait à mieux cibler les faiblesses du cycle viral.

À l'aide, de mutations affectant spécifiquement les résidus trouvés dans la région 259-277 de VPB1 E2 et qui sont aussi conservés au sein des fibropapillomavirus (**RX₂PY**), des analyses par microscopie viendront appuyer ou non la présence d'un troisième signal d'import nucléaire. Il est important de noter que le motif PY-NLS est reconnu par la karyophérine β 2 et que son affinité à la protéine cargo peut être modifiée suite à la méthylation de l'arginine contenue dans la séquence RX₂PY (Dormann et al., 2012; Fronz et al., 2011). Cette seconde étape de contrôle permettrait de produire E2 (et ses isoformes) et de conserver un certain pool de cette protéine au niveau du cytoplasme. Ainsi, lorsque les activités nucléaires de E2 seront requises, une dé-méthylation de l'arginine du motif RX₂PY favoriserait l'importation nucléaire de E2 par la karyophérine β 2. De plus, gardons à l'esprit que ce signal à lui seul risque de ne pas être suffisant pour emmener E2 au noyau. La présence des trois NLS fonctionnels, ayant ou non les modifications post-traductionnelles nécessaires permet cette importation nucléaire. Donc, les analyses subséquentes devront tenir compte des autres séquences d'importations retrouvées chez VPB1 afin d'entreprendre des études sur l'association entre la distribution et l'instabilité de la protéine E2.

Parallèlement, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent aussi s'effectuer dans cette région et pourront avoir un effet direct ou indirect sur la dégradation de la protéine E2. Comme il a été discuté dans le troisième article, la séquence comprenant les résidus 259 à 277 contient des motifs pouvant être reconnus et modifiés par des kinases comme PKA. Nous pouvons aussi remarquer la présence d'une arginine hautement conservée au sein des fibropapillomavirus, qui peut subir une méthylation et régir la disponibilité de la protéine. À titre d'exemple, nous pouvons mentionner le cas du coactivateur 3 du récepteur stéroïdien (SRC-3) qui, lorsque méthylé au niveau d'une arginine par CARM1 (une arginine méthyltransférase), devient instable et est rapidement dégradé par le protéasome (Naeem et al., 2007). L'hydroxylation de la proline du motif conservé pourrait être aussi responsable de la modulation de la dégradation de E2 comme c'est le cas avec HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*). HIF-1 est un facteur de transcription qui active les gènes requis pour s'adapter à un environnement pauvre en oxygène. Concrètement, en état d'hypoxie, la sous-unité α de HIF-1 est hydroxylée à la proline 564. Cette forme protéique est reconnue par la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (pVHL) et est ubiquitinée par le complexe ubiquitine-ligase *elongin BC/Cul2/pVHL*, et dégradée par le protéasome. Dans le cas de HIF-1, aucune séquence en acide aminé n'est associée à l'hydroxylation de la proline, mais une tyrosine est retrouvée à la position 565. Une proline suivie d'une tyrosine est aussi remarquée dans le motif hautement conservé de la protéine E2 des fibropapillomavirus et associé à la dégradation chez VPB1. Ainsi, différentes modifications post-traductionnelles peuvent survenir au sein de la séquence regroupant les résidus 259 à 277 de E2 du VPB1 et être responsables de la dégradation de la protéine. Aussi, il serait intéressant d'investiguer si cette région est suffisante pour déstabiliser une protéine stable et être utilisée comme séquence dégron. Cette région regroupant les acides aminés 259 à 277 peut être aussi le lieu d'une interaction avec d'autres protéines ciblant E2 directement pour la dégradation.

Les résultats présentés dans ce troisième manuscrit nous permettent de proposer que la régulation de la dégradation de la protéine E2 du VPB1 est dictée par sa localisation cellulaire. Plusieurs champs d'études sont à explorer et des analyses à l'aide de la protéine E2 portant des substitutions dans le motif hautement conservé RX_2PY devront nous aider à mieux caractériser l'importance de ces résidus.

Chapitre 6 : Conclusion

Les études en cours sur le papillomavirus ont pour but de comprendre les différentes étapes du cycle viral ainsi que les stratégies qu'utilise le virus pour infecter, établir et maintenir son épisode dans une cellule afin de produire de nouveaux virions infectieux ou bien, d'être responsable du développement d'un cancer. Par contre, l'association entre la biologie moléculaire des papillomavirus et la pathogenèse est grandement affectée par le manque de modèle de laboratoire reproduisant le cycle viral complet. De plus, le caractère de spécificité de l'hôte des papillomavirus a limité grandement les recherches sur ces virus infectant l'Homme. Malgré l'utilisation de certains modèles animaux ayant permis de mieux comprendre la biologie du virus, sa relation avec l'hôte, la carcinogenèse, la réponse immunitaire et de développer les premiers vaccins, aucun système récapitulant les différentes étapes de l'infection par les papillomavirus humain, de l'entrée virale à la production de virions infectieux, n'est disponible. Ainsi, l'étude de la régulation des fonctions des protéines virales et en particulier celles de la protéine E2, a été effectuée principalement dans la lignée cellulaire C33A qui sont des cellules épithéliales d'un carcinome du col de l'utérus. Aussi, l'utilisation de protéines recombinantes produites *in vitro* permet d'initier des recherches menant à la compréhension des activités des protéines.

Cette thèse de doctorat dévoile diverses méthodes utilisées par E2, la protéine régulatrice des papillomavirus, qui lui confère le pouvoir de contrôler certaines de ses fonctions. Les études présentées réitèrent que le domaine de transactivation est le lieu d'interaction avec la protéine Brd4(L) essentielle à l'activation de la transcription virale et en plus, l'intégrité de la surface de dimérisation du TAD contribue à l'activité répliquative de la protéine. Finalement, un lien a été établi entre la localisation cellulaire de la protéine E2 et son taux de dégradation, nous permettant de croire qu'une régulation spatiale influence sa disponibilité générant ainsi un contrôle supplémentaire à l'exécution de ces fonctions.

Le premier article a mis en évidence l'importance des résidus de E2 associés à l'activité transcriptionnelle et impliqués dans l'interaction avec la protéine cellulaire Brd4(L). Par contre, cette interaction peut influencer différemment les fonctions de E2 selon le type de papillomavirus. Étant donné qu'une activité kinasique a été nouvellement attribuée à la protéine Brd4(L), il serait nécessaire de re-visiter son interaction avec E2 afin d'établir si cette capacité de phosphoryler certaines protéines, telle que l'ARN polymérase II et potentiellement E2 elle-même, a une implication dans les diverses fonctions de E2. Aussi, nous pouvons proposer d'évaluer l'effet de l'interaction entre E2 et Brd4(L) selon l'association de E2 à certains de ses sites de liaison retrouvés dans l'épisome. Possiblement qu'il existe une relation entre les différentes activités attribuées au complexe épisome-E2-Brd4(L) et la liaison de E2 à ses sites sur l'ADN viral. Nous pouvons proposer que dépendamment du nombre de sites liés et/ou de leur emplacement, une fonction de E2 serait favorisée. Jusqu'à présent, un peptide codant pour le C-terminal de Brd4(L) bloquant l'interaction E2-Brd4(L), pourrait faire office d'une molécule thérapeutique mais une caractérisation plus poussée amènerait de nouvelles tactiques pour contrer les fonctions de E2.

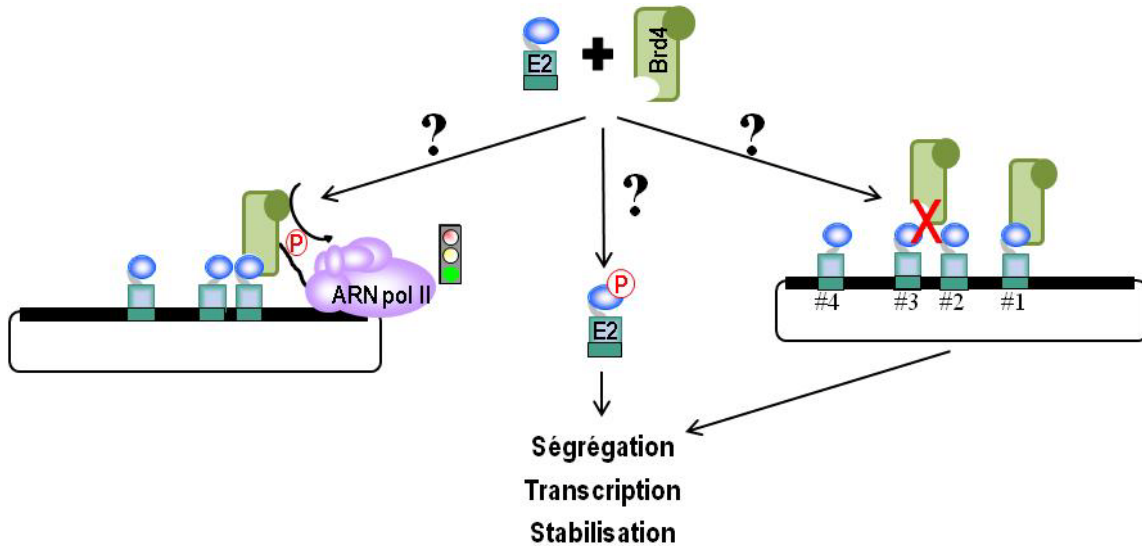


Figure 6.1 Régulation des fonctions de E2 selon la nature de son interaction avec Brd4(L).

Modèle proposant diverses avenues d'interaction entre E2 et Brd4(L) où l'activité kinasique de Brd4(L) devra être prise en compte. La capacité de Brd4(L) de phosphoryler l'ARN pol II ainsi que son association à E2 favorise-t-elle directement la modulation de la transcription virale? Est-ce que E2 est directement phosphorylée par Brd4(L)? Y a-t-il une relation à établir entre la quantité et/ou la localisation des sites de liaison liés par E2 sur l'épisome et la nature des différentes activités attribuées au complexe E2-Brd4?

Une étape supplémentaire de régulation de l'activité répliquative de la protéine E2 a été suggérée par la présence d'une interface de dimérisation au sein du TAD de E2. Cette interface peut être le lieu de modifications post-traductionnelles, ou bien, être contrôlée par la formation d'un pont disulfure modulant l'interaction avec l'hélicase E1. Ainsi, nous pouvons penser que l'état d'oxydo-réduction de E2 va permettre de réguler son implication dans la formation d'un complexe avec l'hélicase E1 favorisant l'initiation de la répllication du génome viral. Les développements futurs en lien avec cette recherche devront démontrer la présence *in vivo* de cette surface de dimérisation du TAD de E2 caractérisée par la formation d'un pont disulfure entre les deux TAD de E2. Le changement pro-oxydant

observé au cours du cycle cellulaire serait favorable à la formation de l'interface dimérique et coïncide avec la présence, en plus grande quantité, de E2 ainsi que d'éléments cellulaires impliqués dans la réplication de l'ADN. Parallèlement, il est connu que l'état hypophosphorylé de E2 favorise le contact avec l'hélicase créant ainsi un nouveau palier de régulation au sein de la réplication de l'ADN virale. De plus, il est reconnu que la protéine E2 doit être expulsée de l'origine de réplication afin de laisser libre cours à la formation du complexe hexamérique fonctionnel de E1. En conséquence, l'analyse approfondie de l'interaction entre E1 et E2 est requise afin de comprendre l'implication directe ou indirecte des résidus C57, R172 et D175 dans l'initiation de la réplication de l'ADN des papillomavirus.

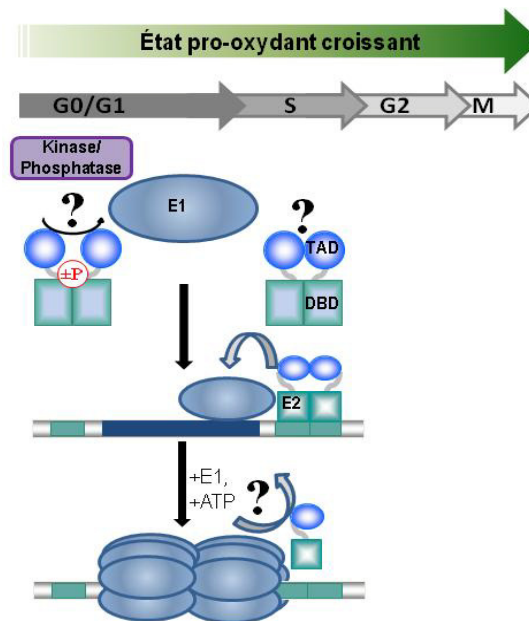


Figure 6.2. Implication des résidus de l'interface dimérique de E2 dans la réplication de l'ADN viral de VPB1.

Ce modèle propose trois alternatives à l'implication des résidus C57, R172 et D175 localisés dans l'interface dimérique et ayant un rôle dans la réplication de l'ADN des papillomavirus. Ces résidus peuvent être un lieu servant de plate-forme d'interaction avec des kinases et/ou phosphatases qui pourront, selon le cas,

phosphoryler ou dé-phosphoryler la protéine E2 et ainsi moduler l'interaction E1-E2. Ils peuvent être aussi responsables de la formation d'une association intra-dimérique entre deux TAD de E2 selon un environnement oxydant et favoriser l'interaction avec E1. Ces trois acides aminés peuvent participer au relargage de E2 et ainsi permettre la formation du complexe fonctionnel hexamérique de E1.

En dernier lieu, nous avons délimité une région de la protéine E2 associée à sa dégradation. Ce domaine comprend le motif RX_2PY hautement conservé au sein des fibropapillomavirus et possède la signature d'un signal de localisation nucléaire (NLS). Ainsi, nous avons pu établir une corrélation entre la localisation cellulaire de la protéine E2 et son niveau de dégradation par la machinerie dépendante du protéasome. L'existence de ce NLS pourrait permettre à E2 et à ses isoformes de faciliter leur entrée au noyau pour exécuter leurs fonctions et par la suite, être rapidement dégradées et d'éviter ainsi que cette protéine régulatrice affecte d'autres activités requises pour le bon déroulement du cycle cellulaire et viral. D'autre part, la région comprenant les résidus 259 à 277 de E2 peut aussi être le lieu d'interventions post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'hydroxylation ou la méthylation, qui seraient responsables directement ou indirectement, de la dégradation de la protéine E2. L'analyse de la séquence ciblant E2 à la dégradation nous révélera une autre étape de régulation que subit la protéine régulatrice des papillomavirus.

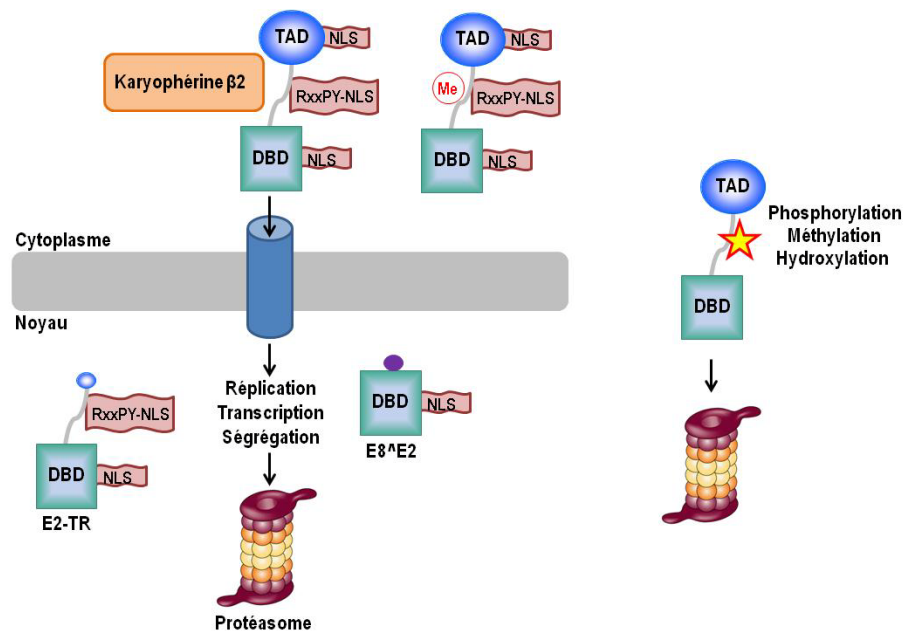


Figure 6.3. Relation entre la localisation et la dégradation de la protéine E2 de VPB1 dictée par les résidus 259 à 277 de la région charnière.

Les résidus 259 à 277 comportent un motif hautement conservé chez les fibropapillomavirus ayant la signature d'un PY-NLS reconnu par la karyophérine β2. Dans le cytoplasme, E2 et ses isoformes seraient stablement produites et maintenues afin d'être disponibles pour l'exécution de leurs fonctions au cours du cycle viral. De plus, certains résidus de cette séquence peuvent subir des modifications post-traductionnelles et ainsi contrôler directement ou indirectement la dégradation de la protéine E2.

Finalement, nous pouvons nous demander la pertinence de l'existence des différents paliers de régulation des fonctions de E2. Il faut se rappeler que plus de 100 types de papillomavirus existent et possèdent divers tropismes soit selon l'hôte et/ou le tissu infecté. De plus, ces virus présents depuis des siècles ne codent que pour 8 à 10 protéines et réussissent à infecter l'hôte et même dans certains cas, à causer des lésions cancéreuses. Ainsi, nous pouvons supposer qu'une façon de s'adapter à tous ces environnements différents, est de contrôler précisément la protéine régulatrice virale et ainsi favoriser la progression du cycle viral tout en échappant aux mécanismes de défenses cellulaires. De

plus, l'initiation de la réplication de l'ADN viral, la transcription et le maintien de l'épisome lors de la division cellulaire sont des fonctions clés dans l'établissement de l'infection. Nos connaissances sur les contrôles des intervenants majeurs comme la protéine E2, dans ces étapes du cycle viral, nous permettra d'identifier des cibles prometteuses menant au développement de nouvelles stratégies curatives. Même si la protéine E2 n'est plus produite dans certains cas de cancers dû à l'intégration de l'épisome dans le génome de la cellule infectée, il n'en demeure pas moins que ce phénomène n'est pas observé dans tous les cas de cancer. Aussi, l'infection par des VPH à faible risque oncogénique, responsables de l'apparition de condylomes et où la production de la protéine E2 est observée, est d'intérêt de santé publique. Des traitements ciblant spécifiquement la régulation des activités de la protéine E2 et/ou sa stabilité, diminueront l'établissement de l'infection à un stade précoce du cycle viral et favoriseront la guérison des personnes atteintes. Ainsi, notre compréhension des contrôles des activités de la protéine régulatrice E2 nous permettrons de cibler les étapes initiales et importantes de l'infection par les papillomavirus.

Annexe 1 : Alignements des séquences protéiques des E2

```

BPV1      ----METACERLHVAQETQMQLIEKSSDKLQDHIILYWTAVRTEENTLLYAARKKGVTVLGH
BPV2      ----METACERLHVAQETQMQLIEKASDKLQDHIILYWTAVRTEENTLLYAARKKGVTVLGH
BPV5      ----MAAAERLSAAQETQMTLLEKPSFDLKDHIISYYGALRTENTIFYAARKKGLTSLGH
EEPV      --MKMSAASDHLAAQETQMQCIEKDSRLIQDHACYWGAVRREKLLLYAARTKGLKTTIGC
DPV       ----MSAAKEQLLAAQETQMTLIEKSDSTDLKDHI DSWGVPVREHGLLYAARHKGLIWLGL
RDPV      --MKMSAASEHLLAAQETQMTLIEKSDSTSLRDHETYWGAVRREHGLLYAARKKGLTRLGCL
HPV1      -----MNLIEQDSKLIEDQIKQWNLIRQEQVLFHFARKNGVMRIGL
HPV2      ----METLANRLDACQETLLELYEKDSNKLEDQIKHWAQVRLLENVMLFKARECGMTRVGC
HPV5      ----MENLSERFNALQDQLMNIYEAAEQTLQAQIKHWQTLRKEPVLVLYAREKGVTRLGY
HPV8      ----MENLSERFNVLQDQLMNIYEAAEQTLQAQIAHWLLLRKEAVLLYFARQKGLTRIGY
CRPV      ----MEALSQRLLDSIQEELISLYEKESTSLSESQLOHWNLLRKEQVLLHFCKKGLTRIGY
HPV11     ----MEAIAKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCI RLESVLLHKAKQMGLSHIGL
HPV16     ----METLCQRLNVCQDKILTHYENDSTDLRDHIDYWKHMRL ECAIYYKAREMGFKHINH
HPV18     MQTPKETLSERLSALQDKIIDHYENDSKDIDSQIQYWQLIRWENAIFFAAREHGIQTLNH
HPV31     ----METLSQRLNVCQDKILEHYENDSKRLCDHIDYWKHIRLECVL MYKAREMGHHSINH

```

```

BPV1      CRVPHSVVCQERAKQAIEQMQLSLOELSKTEFGDEPWSLLDTSWDRYMSEPKRCFKKGARV
BPV2      CRVPHSVVCQERAKQAIEQMQLSLOELSKTEFGNEPWCLLDTSWDRYMSEPKRCFKKGARV
BPV5      CPVPTLATAAANAKAAIEQMQLLLKDLLRSPFAKNDWSLNDVSHERYKAPPSDTLKRKPRI
EEPV      VPVPPCSVTAEQAKQAICMQLIVEELLHSPWAKEPWSLTDLSWERYQAAPKGCCLKKGARV
DPV       NPVPPCSVKCLEARQAIEQMQLLGNLSLKEPWCNEPWSLCDLSWGRYQAPPAETLKKGARL
RDPV      VPVPPCSVSAEKAKQAICMQLITRELINSQWANEPWSLCDLSWDRYQANPKGCCLKKGARV
HPV1      QAVPSLASSQEKAKTAIEVMVLHLESLKDSPTYGTEDWSLQDTSRELFAPPAGTFKKS GST
HPV2      TAVPALTVSKAKACQAIEVQLALQTLMQSAYSTEAWTLRDTCLEMWDAPPKCKWKKKGQS
HPV5      QPVVPKAVSETKAKEAIAMVLQLESLOTSDFAHEPWTLVDTSIETFRSAPEGHFKKGPLP
HPV8      QPVVPLAVSEAKAKQAIGIMLQLOSLQKSEFADEPWTLVDTSIETYKNAPENHFKKGATP
CRPV      TPVPSLLTSQECAKQAIEVMVLYIESLLRSPYSDEPWTLQDTSRERFESPPQKTFKKNP AI
HPV11     QVVVPLTVSETKGHNAIEQMHLLESLAKTQYGVPEPWTLQDTSYEMWLTPEKRCFKKGNT
HPV16     QVVVPLAVSKNKALQAIEQLTLETTIYNSQYSNEKWTLQDVSLEVYLTAPTGC IKKHGYT
HPV18     QVVVPAYNISKSKAHKATELQMALQGLAQSAKYTEDWTLQDTC EELWNTEPTHCFKKGQOT
HPV31     QVVVPAHSVSKAKALQAIEQLQMMLETLNNT EYKNEDWTMQOTSLELYLTAPTGCCLKKHGYT

```

```

BPV1      VEVEFDGNASNTNWYTVVYSNLYMRT--EDGWQLAKAGADGTGLYYCTMAGAGRIYYSRFG
BPV2      VEVEFDGNASNTNWYTVVYSKLYMRT--EDGWQLAKAGADGTGLYYCTMAGAGRIYYSRFG
BPV5      VEVEFDKDPQNKTWYTLWDEVVYCT--VDGWTLTTS GADATGIFVNM--QGSRQYYELFG
EEPV      VEVEYDGNSSNKTWYTAWSTVYVRGTEEEGWETAVCAADGQGIYYCAGM--SSKVYFETFE
DPV       VEVEYDGSSTNKTWYTAWNSLYLRKPDEEGWETATGGADADGLFYTTMS--GTRVYVELFE
RDPV      VEVEYDGNSTNKTWYTTWTVVLTRKTEEEGW EAATGGADEKGLYYTTMHGDKRVYFETFD
HPV1      LEVTYDNNPDNQTRHTIWNHVYQNG--DDVWRKVSSGVDAGVYYLEHD--GYKNYYVLF A
HPV2      VLVKFDGSSDRDMIYTSWGFYVQDITITDSWHKVPGQVDELGLYYVHD--GVRVNYVDFG
HPV5      VEVIYDNDPDNANLYTMWYVYYMDA--DDKWHKARS GVNHIGIYYLQG--TFKNYYVLF A
HPV8      VEVIYDKQPDNANVYTMWKHIYYTDA--DDKWHKTTSGVNQTGIYYMQG--SFRHYVVF A
CRPV      VEVIYDGRGNNNEYTLWGFIFIGNA--DGEVWKTESGVDYRGIYYVDSE--GNYVYYVDF S
HPV11     VEVKFDGDCEDNVMEYVWVTHIYL--QDND SVWKVTSSVDAKGIYYTCG--QFKTYVVFEN
HPV16     VEVEFDGDI CNMTHYTNWTHIYL--CEEASVTVVEGQVDYVGLYYVHE--GIRTYFVQFK
HPV18     VQVYFDGNKDNMCTYVAWDSVYYM--TDAGTWDKTATCVSHRGLYYVKE--GYNTFYIEFK
HPV31     VEVEFDGDVHNTMHTYTNWKF IYL--CIDGQCTVVEGQVNC KGIYYVHE--GHITYFVNF T

```

BPV1 DEAAARESTTGHYSVRDQDRVYAGVS-ST----SSDFR-DRPDGVWVAS-----
 BPV2 EEAAARESTTGHYSVRDQDRVYAGVS-ST----SSDFR-DRPDGVS-AS-----
 BPV5 EDAAQREGTSGTWEVIDQNQRHFHPP-SS-----RA-DTTDGLPGLQ-----
 EEPV TDARRWSRTGHWIVRDNDVIYHSTF-GA-PPHSRNR-DCIEGFWSDA-----
 DPV RDAARYSTTGTWIVRDNDRTYHSHS-AP-----SHSR-ETIEGLWNSG-----
 RDPV IDASRWSTRTGNWIVRDNDRVFHSNS-GA-AP-SRNR-EPIEGIWTS-----
 HPV1 EEASKYSTTGTQAVNYRGKRFNTVMSSSTSSPRAAGAP-AVHSDYPTLSE---SDTAQQST
 HPV2 TESLTYGVTGTWEVHVAGTVIHHTSASVSSSTQASASDDEPLSPIRTAV-----
 HPV5 DDAKRYGATGWEVVKVNETVVFAPVTSSTPPGSPGGQ-ADTNTTPATPTTSTTAVDSTSR
 HPV8 DDARRYSATGWEVVKINKDTVFAPVTSSTPPGSPGGQ-ADTDTAAKTPTTSADST--SRQ
 CRPV TDAGREAAANGHYDVVFQNMRLSSSVTSSPQLVSAPE-DT-----VPE-----
 HPV11 KEAAQKYGSTNHWEVVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIA-EPTTYTP-----
 HPV16 DDAEKYSKNKVWEVHAGGQVILCPTSVFSSNE-VSSP-EIIRQHLLA-N-----
 HPV18 SECEKYGNTGTWEVHFGNNVIDCNDSMCSTSDDTVSATQLVKQLQHTP-----
 HPV31 EEAKKYGTGKKWEVHAGGQVIVFPESVFSSE-LSFA-GIVTKLPTAN-----

BPV1 -----EGPEGDPAG--KEAEPAPVSSLLGSPACGPIRAGLGWVRDGF**RSHPY**NF
 BPV2 -----EGPEGDPAG--KEAEPAPVSSLLGSPACVPIRAGLGWVRDGFPRPHYHF
 BPV5 -----EEPRGGDGPTCSGPAPAIPDPSRCLS-RGFAGRDPGCHRNHRVHPYIL
 EEPV -----GERRGSRGS--DTTDRALPYPAARQSPICRPVRTGENRSRAVHRQAPYSA
 DPV -----GREERG-RPT--NSPDRAVLHTPPGGNTVHGPVVRACENRGRSINRPTPYST
 RDPV -----GR-RETRGS--DTPDRALPHSPSRVEPLCGAFRAGENRNRSVHRPTPYRS
 HPV1 SIDYTELPGQ-----GETSQ-----VR-QRQQKTPVRRRPPYGR----
 HPV2 -----SPVP-----APVAA-----SAESTGAGRAAPPTQ-----
 HPV5 QLTTSKQPQQTETRGRRYG--RRPSSK-----SRRSQTQRRSRSRHRSRSRSR
 HPV8 QRSAPKQPQQTETKGRRYG--RRPSSR-----TRP-QKEQRRSRSRHRTRSRSR
 CRPV -----E-----APDSA-----VPAAQKKTGPKTTRTLGR----
 HPV11 -----AQ-----TTAPT-----VSACTTEDGVSA-----
 HPV16 -----HPAA-----THTKA-----V-ALGT----EE-----
 HPV18 -----SPY-----SST-----V-SVGTAKTYGQ-----
 HPV31 -----NTTT-----SNSKT-----C-ALGTSEGVRR-----

BPV1 PAG-----SGGSIL----RSSSTPVQGT
 BPV2 PAG-----SGGSLL----RSASTPVQGP
 BPV5 SGG-----QRILVT----SSSSSTVQGP
 EEPV PSS-----PGSSVG----PDSPESSRQ
 DPV PQS-----PRSGVG----PDTTSPLPSP
 RDPV APP-----TRNGVG----PDSSTGVSCP
 HPV1 -----RRSRSPRG--
 HPV2 ALC-----SAQA----PTSP-----
 HPV5 SRSKSQTH'TRST'TRSRST'SLTKTRAL'TRSRSRGRSPT'TCRRGGGRSPRRRSRSPSTSS
 HPV8 SLSRVRAVGST'TVSRSRSSSLTKAVRPRSRSRGRATAT'SRRRAGRGS'PRRRRST'SRSP
 CRPV -----RRSRSPGVQR
 HPV11 -----P-----
 HPV16 -----T-----
 HPV18 -----T-----
 HPV31 -----A-----

BPV1 VPVD-----L-----ASRQEE-
 BPV2 VPVD-----L-----APRQEEE
 BPV5 LSSG-----SS-----QHSQSRG
 EEPV VPLV-----L-----LPGPSDP
 DPV VPQN-----PR-----CVSLPDG-----FGRGEED
 RDPV LPVV-----L-----APRL-QE
 HPV1 -----GGR-----REGESTPSRTP-----GS-----
 HPV2 -----PAKRQRVIVGQQHP
 HPV5 SC-TTQRSQRARAESSTTRGARGSRGSRGSRGRRRRGRSSSSSSPAHKRSRGGSAKL
 HPV8 STNTFKRSQ-----RGGRRRGRGRGSRGRR-ERSSTSPPTTKRSRGESSRL
 CRPV RP-AKQRKQAAP-----DEADS-----AAGDIRP-----
 HPV11 -----P--RKRAR-GPSTN
 HPV16 -----QTTIQRPRSEPD TG
 HPV18 -----SAATRPGHCGLAEK
 HPV31 -----TTSTKRPRTEPEHR

BPV1 E-----EQSPDSTEEEPVTLPRRTT---NDGFHLL-KAGGSCFALISGTANQVKCYRFR
 BPV2 E-----NQSPDSTEEEPVTVPRHTS--DADGFHLL-KAGQSCFALISGSANQVKCYRFR
 BPV5 R-----PPSPDSTETERARTPVNSDRQRAGEFDLL-KGGCRPCCLIEGNGNKVKCLRFR
 EEPV A-----PPSPDSTDVIAE----GDK--EPEFSLSKPGGQPCLILISGNGNQAKCYRFR
 DPV N-----PPSPDQHDVIPN----PQP--KEPRFSLFGSSGGLPCLLISGTGNQVKCYSFR
 RDPV G-----PPSPDSTDVIPK----GSD--TTPRFSLLTKTGGQPCLILISGNGNQTKCFRFR
 HPV1 -----VPSARDVGSIH---TPQKGHSSRLRRLLEAWDPPVVCVKGANQLKCLRYR
 HPV2 RPDSTRT-VGEGEVECYNK--RSISDSNRTPRWGHGDTDSVPVIHLRGDANCLKCFRYR
 HPV5 R-----GVSPGEVGGSL---RSVSSKHTGRLGRLLLEARDPPVIIVKGAANTLKNVRNR
 HPV8 R-----GVSPSEVGRSV---QSVSAKHTGRLGRLLDEAIDPPVILVRGEANTLKCFRNR
 CRPV -----PAPEDVGRRTTTVGRTPPGRNRRLRELITEASDPPVICLKGGHNLKCLRYR
 HPV11 N---TLCVANIRSVDS TIN--NIVTDNYNKHQRRNCHSAATPIVQLQGDNSNCLKCFRYR
 HPV16 NPCHTTKLLHRDSVDSAPI----LTAFNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKGDANTLKCLRYR
 HPV18 QHCGPVNPLLG-----AATPTGNKRRKLCSGNTTPIIHLKGDRLSLKCLRYR
 HPV31 NTHHPNKLLRGDSVDSVNC--GVISAAACTNQTRAVSCPATTPIIHLKGDANILKCLRYR

BPV1 VKKNHRHRYENC TTTWFTVADNGAERQGQAQILITFGSPSQRQDFLKHVPLPPGMNISGF
 BPV2 VKKNHRHRYENC TTTSFVADNGAERQGQAQILITFGSPGQRQDFLKHVPLPPGMNISGF
 BPV5 LKKS HRS-FLDITTTFWATGDEGSDRQNGTILITFTD TTQRDLFLGSVSIPEGELSVRRI
 EEPV CKRYFREHYQHITTTTWWTVGERGSERHG DACVLVTFKDS SQRGVFLKRVPLPPGMRAQAL
 DPV VKRWRHDKYHHCTTTTWWAVGEQG SERPGDATVIIVTFKDSQSRSMFLQQVPLPPGMSAHGV
 RDPV CKKHFRHRYEHVTTTWWTVGERGSERQGDACILVTFKNSCQRQDFLKTVPPLPPGMAQGI
 HPV1 LKASTQVDFDSISTTWHWTDRKNTERIGSARMLVKFIDEAQREKFLERVALPRSVSVFLG
 HPV2 VQKHKDVLVYARV SSTTWHWAGGN-GDK--TAFVTLWYTSVEQRTEFLTRVSI PKGLIALPG
 HPV5 AKIKYMGLFRSFSTTWSWVAGDGT ERLGRPRMLISFSSYTQRDFDEAVRYPKGVDKAYG
 HPV8 ARVRYRGLFKYFSTTWSWVAGDSTERLGRSRMLILFTSAGQRKDFDETVKYPKGVDTSYG
 CRPV LKSKHSSLFDCISTTWSWVDTTSTCR LGSGRMLIKFADSEQRDKFLSRVPLPSTTVQVFLG
 HPV11 LNDKYKHLFELASSTTWHWASPEAPHK--NAIVTLTYISSEEQRQDFLNSVKIPPTIRHKVG
 HPV16 FK-KHCTLYTAVSSTTWHWTGHNVKHK--SAIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTI TVSTG
 HPV18 LR-KHSDHYRDISSTTWHWTGAG-NEK--TGILTVTYHSETQRTKFLNTVAIPDSVQILVG
 HPV31 LS-KYKQLYEQV SSTTWHWTCTDGKHK--NAIVTLTYISTSQRDDFLNTVKIPNTVSVSTG

BPV1	TASLDF-
BPV2	TASLDF-
BPV5	TISTD--
EEPV	TMIADF-
DPV	TMTVDF-
RDPV	TMHLDY-
HPV1	QFNGS--
HPV2	YMSAFV-
HPV5	NLDSL--
HPV8	NLDSL--
CRPV	NFYGL--
HPV11	FMSLHLL
HPV16	FMSI---
HPV18	YMTM---
HPV31	YMTI---

Alignement des séquences en acides aminés des protéines E2 de divers papillomavirus

Les abréviations sont définies comme suit : BPV : *Bovine papillomavirus type 1, -2 et -5*, EEPV : *European Elk papillomavirus*, DPV : *Deer papillomavirus*, RDPV : *Reindeer papillomavirus*, CRPV : *Cotton Rabbit papillomavirus*, HPV : *Human papillomavirus type 1, -2, -5, -8, -11, -16, -18 et -31*. Les acides aminés impliqués dans l'activité transcriptionnelle et dans l'interaction avec Brd4(L) sont surlignés en bleu (R37 et I73). Les acides aminés associés à l'interface dimérique de la protéine E2 du VPB1 (C57, R172 et D175) sont surlignés en vert foncé et ceux formant un signal de localisation nucléaire de type PY (RSHPY) sont marqués en fushia. Les résidus conservés au sein des papillomavirus sont surlignés en noir, ceux ayant une conservation de propriétés fortement similaire sont en gris foncé et finalement les acides aminés ayant une conservation de propriétés similaire sont représentés en gris pâle. Cet alignement a été réalisé à l'aide du programme Clustal Omega retrouvé sur le site EMBL-EBI (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011).

Annexe 2 : Mutants de la protéine E2 du VPB1 étudiés

Substitution des Acides Aminés ^a	Région du TAD ^b	Nom ^b	Référence
E2A, E6A, E13A, E20A	A	A1	Baxter et al. 2005
E2Q, E6Q, E13Q, E20Q	A	A2	Baxter et al. 2005
E2A, E6A, E13A, E20A, A46V	A		McBride, non-publié
D28N	B	B1	Baxter et al. 2005
D24N, K25Q, D28N	B	B2	Baxter et al. 2005
D24A, K25A, D28A	B	B3	Baxter et al. 2005
Q12N	C		Cette étude
Q15N	C		Cette étude
R68A	C	C1	Baxter et al. 2005
E39A	C	C2	Baxter et al. 2005
E39A, R68A	C	C3	Baxter et al. 2005
Q12A, Q15A, E39A	C	C4	Baxter et al. 2005
Q12A, Q15A, E39A, R68A	C	C5	Baxter et al. 2005
R68Q	C	C6	Baxter et al. 2005
E39Q	C	C7	Baxter et al. 2005
E39Q, R68Q	C	C8	Baxter et al. 2005
Q12N, R68Q	C	C9	Baxter et al. 2005
Q12N, Q15N, E39Q	C	C10	Baxter et al. 2005
Q12N, Q15N, E39Q, R68Q	C	C11	Baxter et al. 2005
Q12A, Q15G, E39A, R68A	C		McBride, non-publié
R47A, K48A, K49A, R58A, H61A	D	D1	Baxter et al. 2005
R47Q, K48Q, K49Q, R58Q, H61N	D	D2	Baxter et al. 2005
R47Q, K48Q, K49E	D		McBride, non-publié
R37A	F	F1	Baxter et al. 2005
I73A	F	F2	Baxter et al. 2005
R37A, I73A	F	F3	Baxter et al. 2005
R37A, K70A, E74A, Q76A, Q80A	F	F4	Baxter et al. 2005
R37A, K70A, I73A, E74A, Q76A, Q80A	F	F5	Baxter et al. 2005
R37Q, K70Q, E74Q, Q76A, Q80A	F	F6	Baxter et al. 2005
R37A, I73A, M75R	F		McBride, non-publié
M75R	F		Cette étude
D89A, E90A	G	G1	Baxter et al. 2005

E86A, D89A, E90A	G	G2	Baxter et al. 2005
E86Q, D89N, E90Q	G	G3	Baxter et al. 2005
R172A, D175A, E176A	H	H1	Baxter et al. 2005
R172A, D175A, E176A, R179Q	H	H2	Baxter et al. 2005
R172Q, D175N, E176Q, R179Q	H	H3	Baxter et al. 2005
R189A, D190A, D192A, R193A	I	I1	Baxter et al. 2005
R189Q, D190N, D192N, R193Q	I	I2	Baxter et al. 2005
C57A	Dimérisation		Cette étude
R172A	Dimérisation		Cette étude
D175A	Dimérisation		Cette étude
C57A, R172A	Dimérisation		Cette étude
C57A, D175A	Dimérisation		Cette étude
R172A, D175A	Dimérisation		Cette étude
C57A, R172A, D175A	Dimérisation		Cette étude
S301A	Phosphorylation		Cette étude
S301D	Phosphorylation		Cette étude
S298A	Phosphorylation		Cette étude
1-203 (TAD)	C-Troncation		Cette étude
1-326 (TAD-Hinge)	C-Troncation		Cette étude
204-326 (Hinge)	C-Troncation		Cette étude
326-410 (Hinge-DBD)	C-Troncation		Cette étude
327-410 (DBD)	C-Troncation		Cette étude
1-300	C-Troncation		Cette étude
1-277	C-Troncation		Cette étude
1-258	C-Troncation		Cette étude
1-239	C-Troncation		Cette étude

Tableau 3. Mutants de la protéine E2 du VPB1 étudiés

^a: Nomenclature des substitutions des acides aminés où le premier résidu indique l'original suivi de la position dans la séquence protéique de E2 du VPB1 et finalement la substitution avec un acide aminé différent.

^b: Les lettres indiquent la région du TAD selon la description retrouvée dans Baxter *et al.*, 2005 (Baxter et al., 2005). Ces mutants ont été utilisés dans le cadre d'un criblage pour leur capacité à exécuter certaines fonctions associées à protéine E2. *Dimérisation* indique les mutants utilisés dans la seconde étude de cette thèse. *Phosphorylation* spécifie les mutants de phosphorylation et *C-Troncation* indique les constructions analysées dans le cadre du troisième manuscrit.

Annexe 3 : Article no.4

PUBLIÉ DANS: JOURNAL OF VIROLOGY. 2009 MAY (83), PAGES 4127-29

PROTEASOMAL DEGRADATION OF THE PAPILLOMAVIRUS E2 PROTEIN IS
INHIBITED BY OVEREXPRESSION OF BROMODOMAIN-CONTAINING PROTEIN 4

David Gagnon, Simon Joubert, Hélène Sénéchal, Amélie Fradet-Turcotte,

Sabrina Torre, and Jacques Archambault*

Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal,
and Department of Biochemistry,

University of Montréal, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada

Received 1 December 2008

Accepted 3 February 2009

Published ahead of print on 11 February 2009.

ABSTRACT

The E2 protein of human papillomavirus (HPV) binds to specific sites in the viral genome to regulate its transcription, replication, and maintenance in infected cells. Like most regulatory proteins, E2 is rapidly turned over. A high-throughput assay was developed to quantify the expression and stability of E2 in vivo, based on its fusion to Renilla luciferase (RLuc). The steady-state levels of RLuc-E2 were quantified by measuring the amounts of associated luciferase activity, and its degradation was measured by monitoring the decrease in enzymatic activity occurring after a block of translation with cycloheximide. Using this assay, the E2 proteins from a low-risk (HPV11) and a high-risk (HPV31) human papillomavirus (HPV) type were found to have short half-lives of 60 min in C33A cervical carcinoma cells and to be ubiquitinated and degraded by the proteasome. Analysis of mutant proteins showed that the instability of E2 is independent of its DNA binding and transcriptional activities but is encoded within its transactivation domain, the region that binds to the cellular chromatin factor bromodomain-containing protein 4 (Brd4) to regulate viral gene transcription. Overexpression of Brd4, or of its C-terminal E2-interaction domain, was found to increase the steady-state levels and stability of wild-type E2 but not of E2 mutants defective for binding Brd4. These results indicate that the stability of E2 is increased upon complex formation with Brd4 and highlight the value of the luciferase assay for the study of E2 degradation.

INTRODUCTION

Papillomaviruses are a family of small double-stranded DNA viruses that induce benign and malignant hyperproliferative lesions of the differentiating epithelium (24, 25, 49). Approximately 25 types of human papillomavirus (HPV) infect the anogenital region. The oncogenic or “high-risk” types, such as HPV16, -18, and -31, are found in the majority

of cervical and anal cancers and their precursor lesions (7, 25, 49). They are also present in a subset of head-and-neck cancers (22, 42). The low-risk types, including HPV6 and -11, cause benign genital warts (condylomas) (29) and laryngeal papillomatosis (6), a rare but debilitating infection acquired by infants during birth from an infected mother.

The life cycle of HPV is coupled to the cellular differentiation program that keratinocytes undergo in the epithelium (17,25, 32). These viruses infect the basal cell layer, where they maintain their double-stranded DNA genome as a circular episome in the nucleus of infected cells. Maintenance of the HPV episome in primary keratinocyte cultures requires four viral proteins: the two oncogenes, E6 and E7, the E1 replicative helicase, and the multifunctional E2 protein (25, 32). E2 binds to specific sites in the regulatory region of the viral genome to promote its replication, regulate its transcription, and ensure its proper segregation to daughter cells at mitosis (11). E2 is comprised of two functional domains, an N-terminal transactivation domain (TAD) and a C-terminal DNA-binding/dimerization domain separated by a hinge region. The TAD is a protein interaction module that binds through one surface to the viral E1 helicase to promote replication of the genome and, through the opposite surface, to cellular transcription factors, including bromodomain-containing protein 4 (Brd4), to regulate viral gene transcription (1, 2, 43). In the context of papillomaviruses, Brd4 was first identified as the cellular chromatin component that is bound by E2 to tether the viral episome to host chromosomes in order to facilitate its segregation to daughter cells during mitosis (47, 48). In addition to mediating the function of E2 as a segregation factor, Brd4 is also needed for E2 to activate or repress transcription (8, 33, 40, 41, 44). Brd4 is a member of the BET family of proteins whose members contain two tandem bromodomains (BD1 and BD2) and an extraterminal domain (20). Brd4 binds to the E2 TAD through its C-terminal domain (2, 47) and to acetylated chromatin via its two bromodomains (16, 30). Brd4 was also identified as a positive regulator of P-TEFb, a kinase that stimulates transcriptional elongation by RNA polymerase II (26, 46). Recent evidence also indicates that Brd4 plays a role in cell cycle

progression by promoting transcription of growth-associated genes in G1 and allowing progression into S phase (35, 45). Accordingly, cells in which Brd4 expression is downregulated by shRNA arrest in G1 and undergo apoptosis (35, 45).

Mutagenesis of the E2 TAD has led to the identification of amino acid substitutions that genetically separate the transcription from the replication function of the protein. Substitutions of arginine 37 for alanine (R37A) and of isoleucine 73 for leucine or alanine (I73L or I73A) have been shown to abrogate the ability of E2 to activate or repress transcription while having little effect on its ability to support viral DNA replication (3, 12, 13, 15, 19, 23, 37, 39). Later studies showed that substitutions of R37 and I73 affect the binding of E2 to Brd4 (8, 40, 41). Satisfyingly, a crystal structure of the E2 TAD in complex with a Brd4 peptide showed that R37 and I73 form part of the Brd4-binding surface (2).

The E2 proteins from both bovine papillomavirus (BPV) and HPV18 E2 have been shown to be polyubiquitinated *in vivo* and *in vitro*, respectively, and degraded by the proteasome (9, 38). Using pulse-chase analysis, the half-life of BPV E2 was measured to be 50 min (38). Comparable results were obtained for the E2 proteins from different HPV types fused to green fluorescent protein (GFP). Specifically, the half-lives of GFP-E2 were determined to be 50 min for HPV18 and HPV16, 125 min for HPV6, and 75 min for HPV11 in HeLa cells (9, 10). However, little is known about the cellular factors involved in the rapid turnover of E2.

The study of E2 degradation would be greatly facilitated by assays that could rapidly determine the stability of the protein in a quantitative manner. We report here the development of a luciferase assay to monitor the expression and degradation of the human papillomavirus E2 protein in cells. Using this quantitative assay, we provide evidence that degradation of E2 is modulated by complex formation with Brd4.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions and mutagenesis.

Plasmids to express the E2 protein of HPV11 and HPV31, as fusions with *Renilla* luciferase (RLuc), were constructed by inserting XhoI-BamHI digested PCR fragments encoding E2 between the XhoI and BamHI sites of plasmid pRluc-C2 (Perkin-Elmer). Primers used for amplification were designed such as to encode XhoI and BamHI restriction sites. The following pairs of primers were used: HPV11 E2, 5'-AAACTCGAGATGGAAGCAATAGCCAAGCGTTTAG-3' and 5'-TTTTGGATCCTTACAATAAATGTAATGACATAAACCCACCTT-3'; and HPV31 E2, 5'-AAACTCGAGACTCTTCTCAACGTTTAAATGT-3' and 5'-TTTTGGATCCCTAAATAGTCATATATCCTGTTGACAC-3'. A linker encoding a 3xFlag epitope was then inserted at the XhoI site by annealing of the following five oligonucleotides and ligation (oligonucleotides O1 and O5 were 5' phosphorylated): O1, 5'-TCGACGGCGACTACAAGGACCACGATGGCGA-3'; O2, 5'-CTACAAGGACCATGACATCGATTATAAGGACGATGACG-3'; O3, 5'-ATAAGAGCGGCGGCGGAGGGAGCC-3'; O4, 5'-GATGTCATGGTCCTTGTAGTCGCCATCGTGGTCCTTGTAGTCGCCG-3'; and O5, 5'-TCGAGGCTCCCTCCGCCGCGCTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATC-3'). The 3xFlag epitope was also incorporated in the control RLuc expression plasmid. In this case, the 3xFlag linker was created by annealing five oligonucleotides O1, O2, and O4 (described above), as well as O6 (5'-ATAAGAGCGGCGGCGGAGGGAGCG-3') and phosphorylated O7 (5'-GATCCGCTCCCTCCGCCGCGCTCTTATCGTCATCGTCCTTATAATC-3') and inserted between the XhoI and BamHI sites of pRluc-C2. The firefly luciferase (FLuc) coding plasmid was constructed by inserting the FLuc coding region present in the pGL3-Basic plasmid (Promega) between the XhoI and XbaI restriction sites of the pCI plasmid (Promega). Truncations of HPV31 E2 fused to RLuc were created as follows. First, the adenine residue preceding the XbaI site of the Rluc-3xFlag plasmid

described above was mutated to cytosine to prevent dam methylation and allow cleavage by XbaI. Different subfragments of HPV31 E2 were then inserted into this plasmid between the BamHI and XbaI sites. The following pairs of primers were used for PCR: complete HPV31 E2, 5'-TATATGGATCCGAGACTCTTTCTCAACGTTTAAATGTG-3' and 5'-TATATTCTAGATTAAATAGTCATATATCCTGTTGACACTGATAC-3'); TAD (amino acids [aa] 1 to 208), 5'-TATATGGATCCGAGACTCTTTCTCAACGTTTAAATGTG-3' and 5'-ATATTTCTAGATTAAAGCAAAGGATATTCGTCAGTCTGCTAAATA-3'; Hinge (aa 198 to 293), 5'-TAATTGGATCCTCTGTATTTAGCAGTGACGAAATATCCT-3' and 5'-TTTAATCTAGATTATGTAGTTGCAGGACAAGTACTGACAGC-3'; DBD (aa 266 to 372), 5'-ATATAGGATCCTCCGTGGACAGTGTCAACTGTGG-3' and 5'-TATATTCTAGATTAAATAGTCATATATCCTGTTGACACTGATAC-3'; TAD-Hinge (aa 1 to 293), 5'-TATATGGATCCGAGACTCTTTCTCAACGTTTAAATGTG-3' and 5'-TTTAATCTAGATTATGTAGTTGCAGGACAAGTACTGACAGC-3'; and Hinge-DBD (aa 198 to 372), 5'-TAATTGGATCCTCTGTATTTAGCAGTGACGAAATATCCT-3' and 5'-TATATTCTAGATTAAATAGTCATATATCCTGTTGACACTGATAC-3'. These different plasmids encode fusion proteins in which the 3xFlag epitope is separated from the Rluc sequence by nine residues (GDLRRALDG) and the E2 fragment is separated from the 3xFlag epitope by eight residues (SGGGSGS). Codon optimized HPV31 E2 was purchased from GenScript Corp. and inserted, using BamHI/HindIII cloning, into pCMV1a (Stratagene), which introduces a 3xFlag sequence at the N terminus of E2. The Brd4-C construct was created by amplifying the portion of human Brd4 encoding aa 1224 to 1362 by PCR from the pOTB7 vector (ATCC 6714018, GenBank no. BC008354) using the primers

5'-

GCGGGATCCGCCACCATGGCACCGAAGAAGAAAAGGAAGGTGTTTCGAGCAGT
TCCGCCGCG-3' and 5'-

TTACTGCAGAAGCTTTCAGAAAAGATTTTCTTCAAATATT-3' and inserted between the BamHI and PstI restriction sites of the pCR3.1 expression plasmid. Using this strategy, the amino acid sequence MAPKKKRKV, containing the simian virus 40 (SV40) nuclear

localization signal, was inserted at the N-terminal of Brd4-C. The Flag-tagged full-length (aa 1 to 1362) and N-terminal (aa 1 to 1223) human Brd4 constructs were kind gifts from Cheng-Ming Chiang (University of Texas Southwestern Medical Center). All plasmids were verified by DNA sequencing. Further details on construction of these plasmids are available upon request.

Antibodies, Western blotting, and immunoprecipitations.

Purified mouse anti-Flag M2 antibody was obtained from Sigma (F1804, 1:2,000 dilution for Western blotting). Rabbit anti-Brd4 antibody was obtained from Abgent (AP8051a, 1:2,000 dilution). Rabbit anti-ubiquitin antibody (FL-76, sc-9133, 1:500 dilution) and rabbit anti-HA antibody (Y-11, sc-805, 1:1,250 dilution) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Western blotting was performed after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and the transfer of proteins onto polyvinylidene difluoride membranes; results were visualized according to an enhanced chemiluminescence procedure (GE Healthcare). For immunoprecipitations, C33A cells were transfected into six-well plates, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and solubilized in 400 μ l of cold lysis buffer (50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 350 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 50 mM NaF, protease inhibitors, containing 20 μ M MG132 and 10 mM *N*-ethylmaleimide). Lysates were transferred to Eppendorf tubes and rotated for 45 min at 4°C before centrifugation at 20,000 X *g* for 15 min. Cleared lysates were then incubated for 3 h with 20 μ l of protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) that had been previously loaded with 2.5 μ g of anti-Flag M2 antibody. Beads were washed four times with 1 ml of wash buffer (50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 350 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50 mM NaF, and protease inhibitors and containing 20 μ M MG132 and 10 mM *N*-ethylmaleimide) and once more with PBS, before 40 μ l of 5 X Laemmli sample buffer was added and the samples were boiled for 10 min to elute the proteins.

Cell culture and transfections.

C33A cells or its Brd4 knockdown derivative (cell line 1-13 from Wu et al. (44), kindly provided by Cheng-Ming Chiang, University of Texas Southwestern Medical Center) were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 IU of penicillin/ml, 50 µg of streptomycin/ml, and 2 mM L-glutamine. Transfections were performed using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen).

Luciferase assays.

Expression vectors for the RLuc-E2 fusion proteins or RLuc control were transfected together with the FLuc normalization plasmid into C33A cells. Cells were either transfected directly in white 96-well plates or transferred to 96-well plates after transfection in 100-mm dishes. FLuc and RLuc activities were measured by using the Dual-Glo luciferase system (Promega) and a GloMax 96-well luminometer (Promega) and normalized according to the instructions from the manufacturer. To measure the levels of luciferase at the steady-state, the cell culture medium in each well was replaced with 75 µl of fresh DMEM before the addition of 75 µl of the FLuc substrate. Plates were then placed on a plate shaker at room temperature for 20 min before the luminescence was read. A 75 µl portion of the substrate for RLuc was then added to each well, and the plate was agitated and read as described above. Cycloheximide chase assays were started 24 or 48 h posttransfection by replacing the cell culture medium in each well with 75 µl of DMEM containing 100 µg of cycloheximide/ml. Cells were then incubated at 37°C for the indicated time points before the addition of 75 µl of the FLuc substrate and further processing of the samples as described above.

Confocal fluorescence microscopy.

C33A cells were grown on coverslips. For immunofluorescence, cells were fixed 24 h posttransfection with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with anti-Flag M2 antibody diluted 1:500 in PBS–2% milk for 1.5 h, followed by 1 h of incubation with a 1:1,000 dilution of Alexa Fluor 633-conjugated secondary antibody. Cells were washed with PBS between each step and then mounted using VectaShield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired by using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) and analyzed by using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss).

Transactivation assays.

C33A cells (50,000 per well) were transfected in white 96-well format with either 15 ng of 3xFlag-HPV31E2 coding plasmid or 10 ng of RLuc-E2 plasmids, as indicated in the text, along with 185 ng of pK4xE2BS reporter plasmid, which contains the FLuc coding region located downstream of four E2 binding sites (kindly provided by Lou Laimins, Northwestern University). Where indicated, the control reporter plasmid pCMV-FLuc, which expresses FLuc from the cytomegalovirus (CMV) promoter, was transfected at 20 ng per well. In transfections performed with 3xFlag-HPV31E2, a plasmid expressing RLuc was used as a normalization control. To test the effect of proteasome inhibitors on E2-transactivation, cells were treated at 48 h posttransfection with increasing concentrations of MG132 or lactacystin for 6.5 h (all wells were adjusted to 0.5% dimethyl sulfoxide as a vehicle) before the FLuc and RLuc activities were measured by using a Dual-Glo luciferase system (Promega) as described above.

Downregulation of Brd4 by RNA interference.

Twenty-one-nucleotide short hairpin RNAs (shRNAs) were expressed from the pLKO.1-Puro plasmid and purchased from Open Biosystems. The targeting sequences for the Brd4 and control shRNA were 5'-CCTGGAGATGACATAGTCTTA-3' and 5'-GCTATGAGAATAACGGTAACA-3', respectively. C33A cells transfected with these shRNA vectors were selected for 3 days (60 to 72 h) in culture medium containing 2 μ g of puromycin/ml prior to further analysis.

RESULTS

Expression of HPV11 and HPV31 E2 fused to RLuc. The E2 protein of papillomavirus is expressed at low levels, and previous studies indicated that it is rapidly ubiquitinated and degraded by the proteasome (9, 10, 38). To easily quantify the levels of HPV E2 proteins in cells without the need for overexpression we made constructs expressing HPV11 or HPV31 E2 fused at their N terminus to RLuc. To facilitate the detection of low amounts of these fusion proteins by Western blotting, a 38-aa linker encoding a 3xFlag epitope was incorporated between the E2 and luciferase coding regions (Fig. 1A). We chose to fuse RLuc and the 3xFlag epitope at the N terminus rather than the C terminus of E2 because it was previously demonstrated that GFP, which is approximately the same size as RLuc, can be fused at the N terminus of E2 without affecting its function (10). We then tested whether the RLuc-E2 fusion proteins were appropriately expressed in C33A human cervical carcinoma cells by anti-Flag immunoblot analysis of cells transfected with increasing amounts of each plasmid (Fig. 1B and C). The two RLuc-E2 fusion proteins were readily detectable at the expected molecular mass of 80 kDa and were expressed at lower levels than RLuc alone. Transfection of \sim 10-fold more RLuc-E2 expression plasmid than RLuc-plasmid was needed to obtain comparable signals in Western blots (Fig. 1B and C). E2 is known to accumulate primarily in the cell nucleus, although it can shuttle between the nucleus and cytoplasm (10). We confirmed that the RLuc-E2 fusion proteins were also localized in the nucleus of transfected C33A cells by

confocal immunofluorescence microscopy using an anti-Flag antibody (Fig. 1D). In contrast, RLuc was present in both the nucleus and cytoplasm (Fig. 1D). Together, these results demonstrate that RLuc-E2 fusion proteins are produced at the expected size and are properly localized in the nucleus. Finally, to ascertain that the fusion of RLuc at the N terminus of E2 did not affect its activity and, in particular, the proper folding of the TAD, we verified that RLuc-E2 from HPV31 was still capable of transactivating an E2-responsive reporter gene and, in separate experiments, that it retained the ability to interact with E1 (see Fig. S1 in the supplemental material) and to support transient DNA replication (data not shown).

Expression and stability of RLuc-E2 fusion proteins measured using luciferase assays.

We then tested whether expression of RLuc-E2 fusion proteins could be detected in C33A cells by measuring the amount of associated luciferase activity at 24 h posttransfection. We took advantage of a commercially available dual luciferase assay that allows the measurement of both RLuc and FLuc activities in the same cells. In this experiment and all subsequent ones, an FLuc expression plasmid was included as an internal control to correct for potential variations such as differences in transfection efficiency. Thus, all of the luciferase activity results presented here have been normalized. Furthermore, in this assay and all subsequent ones, each data point represents the average of two to three luciferase activity measurements obtained from separate transfections. Using this protocol, we first measured the luciferase activity in cells transfected with increasing amounts of RLuc or RLuc-E2 expression plasmid and found that the correlation between enzyme activity and the amount of transfected plasmid DNA was strictly linear (Fig. 2A). Consistent with the data in Fig. 1B and C, we observed that both RLuc-E2 fusion proteins gave rise to lower amounts of luciferase activity than the control RLuc alone (Fig. 2A). Based on the enzymatic activity, RLuc-11E2 and RLuc-31E2 were 64- and 42-fold less expressed, respectively, than RLuc alone. This is consistent with E2 being rapidly

targeted for degradation compared to RLuc, which has a reported half-life of ~14 h (31). Importantly, the luciferase assay could readily detect low levels of RLuc-E2 expression, with at least a fivefold-greater sensitivity than Western blotting against the 3xFlag epitope.

We next determined whether the half-lives of RLuc-E2 fusion proteins could be determined by measuring the levels of luciferase activity at different time points after a block of de novo protein synthesis with cycloheximide. Under these conditions, the luciferase activity of E2 fusion proteins diminished rapidly to ca. 40% after 3 h compared to the control RLuc and then remained stable (Fig. 2B). From these data, the half-lives of RLuc-E2 proteins from both HPV11 and HPV31 were measured to be ~60 min. This value is consistent with previous studies that measured half-lives of 75 min for HPV11 and 50 min for both HPV16 and HPV18 E2 using a conventional protocol (9, 10). As an additional control, we verified that the stability of both fusion proteins was independent of the amount of expression vector transfected (see Fig. S2 in the supplemental material), indicating that the degradation machinery is not saturated under our assay conditions. Collectively, these results demonstrate the usefulness of RLuc fusion proteins to quantitatively assess the expression and stability of E2 from different HPV types.

RLuc-E2 fusion proteins are degraded by the proteasome.

Based on previous reports that BPV and HPV18 E2 are degraded by the proteasome (9, 38), we anticipated that our HPV11 and HPV31 RLuc-E2 fusion proteins would also be degraded by this pathway. To verify this assumption, we first tested whether the steady-state accumulation of RLuc-E2 could be increased by the proteasome inhibitor lactacystin. At 24 h posttransfection, C33A cells were incubated for 5 h with increasing concentrations of lactacystin and the level of each fusion protein assessed by immunoblot analysis with an anti-Flag antibody. Under these conditions, lactacystin led to a dose-dependent increase in

the levels of RLuc-E2 but had little effect on the levels of RLuc alone (Fig. 3A). This increase in RLuc-E2 accumulation was accompanied by the appearance of high-molecular-weight species, which likely correspond to polyubiquitinated forms of the proteins (Fig. 3A and data below). Similar results were obtained with MG132, another commonly used proteasome inhibitor (data not shown). Importantly, lactacystin also increased the levels of luciferase activity associated with RLuc-E2 fusions, in a dose-dependent fashion (Fig. 3B), but again had little effect on the activity of RLuc alone. The luciferase activities of RLuc-E2 from HPV11 and HPV31 were increased by as much as 70 and 50%, respectively (Fig. 3B). Finally, we showed that lactacystin could prevent the degradation of both RLuc-E2 proteins in a cycloheximide chase assay (Fig. 3C). Collectively, these results indicate that RLuc-E2 fusion proteins are degraded by the proteasome, like wild-type (untagged) E2.

RLuc-E2 fusion proteins are polyubiquitinated in vivo.

The finding that RLuc-E2 proteins are degraded by the proteasome led us to investigate their modification by the ubiquitin pathway. To determine whether RLuc-E2 fusion proteins are polyubiquitinated in vivo, we examined their expression by anti-Flag immunoblot in transiently transfected C33A cells treated or not with 25 μ M MG132 for 3 h to inhibit the proteasome. As can be seen in Fig. 4A, high-molecular-weight forms of RLuc-E2, likely corresponding to polyubiquitinated forms, were readily observable in cells treated with MG132. To provide more direct evidence that RLuc-E2 fusions are polyubiquitinated, they were immunoprecipitated from the different cell lysates by using an anti-Flag antibody and analyzed by Western blotting against ubiquitin or E2 (anti-Flag) as a control (Fig. 4B). As anticipated, high-molecular-weight forms of E2 were readily detected with the anti-ubiquitin antibody in the immunoprecipitates from cells treated with MG132. These results indicate that RLuc-E2 proteins are efficiently polyubiquitinated in vivo, a modification which likely underlies their rapid proteasomal degradation.

Mapping the domain of E2 that promotes its proteasomal degradation.

To determine which domain of E2 is responsible for its degradation, we constructed a set of deletion mutants of HPV31 E2 fused to RLuc. RLuc fusions containing the TAD, hinge, or DNA-binding domain (DBD) alone were made. Fusions containing the TAD plus hinge and the hinge plus DBD were also constructed (Fig. 5A). The stability of these different constructs was then assessed in transfected C33A cells by using a cycloheximide chase assay (Fig. 5B). These studies revealed that the two fusions containing, respectively, the TAD and the TAD-hinge regions were the least stable. In contrast, those comprised of the DBD or hinge-DBD were the most stable. These results pointed to the TAD as being a critical determinant of E2's instability. To substantiate these results, we analyzed the levels of the different RLuc fusion proteins by Western blotting in transfected C33A cells treated or not with two different concentrations of lactacystin (12.5 and 50 μ M) (Fig. 5C). Fusion proteins containing the TAD (i.e., fusions comprised of the TAD, TAD-hinge, or the complete E2) accumulated as high-molecular-weight species in cells treated with lactacystin, suggesting that they were efficiently polyubiquitinated. In contrast, those lacking the TAD (i.e., fusions comprised of the hinge, DBD, or DBD-hinge) showed little evidence of polyubiquitination. Collectively, these results suggest that the TAD is the primary domain of E2 that promotes its polyubiquitination and proteasomal degradation.

The steady-state levels and stability of RLuc-E2 are increased by overexpression of the Brd4 C-terminal domain.

E2 interacts with the viral E1 helicase to promote replication of the HPV genome and with Brd4 to regulate viral gene transcription (11, 43). Both E1 and Brd4 bind to the TAD of E2, on opposite surfaces (1, 2). Since the TAD is the primary domain of E2 responsible for its degradation, it was of interest to test whether overexpression of these factors could affect the stability of E2. We first tested whether cotransfection of an expression vector for a codon-optimized HPV31 E1 had any effect on the levels of RLuc-31E2, but we did not observe any significant effect (data not shown). We then tested whether overexpression of

Brd4 could affect the levels of RLuc-E2 using two different Brd4 expression plasmids. One plasmid encoded the full-length Brd4 (aa 1 to 1362) tagged with a Flag epitope. The other encoded only the C-terminal domain of Brd4 (Brd4-C, aa 1224 to 1362) fused to the SV40 NLS to promote its nuclear accumulation. This latter construct retains the E2-interaction domain of Brd4 and was shown previously to inhibit the transcriptional activity of E2 in a dominant-negative manner (40). Increasing amounts of both Brd4 expression vectors (8, 20, 50, and 125 ng of plasmid DNA) were transfected into 5×10^4 C33A cells, together with the plasmid encoding RLuc-11E2 (40 ng) or RLuc-31E2 (25 ng). As can be seen in Fig. 6A and B, expression of full-length Brd4 increased the levels of RLuc-E2 from both HPV11 and HPV31 by ca. 40% at the highest amount of Brd4 plasmid tested. The effect of Brd4-C was even more substantial, doubling the levels of both RLuc-E2 proteins at the highest amount of Brd4-C transfected (Fig. 6A and B). To determine whether this stimulatory effect of Brd4-C was due to its interaction with RLuc-E2, we tested its effect on mutant RLuc-E2 proteins carrying specific amino acid substitutions in the TAD, at arginine 37 (R37A) and isoleucine 73 (I73A or I73L), which abrogate binding to Brd4. The effect of Brd4-C on these mutant proteins was greatly reduced compared to its effect on wild-type RLuc-E2 (Fig. 6A and B). Based on these results, we infer that Brd4-C increases the steady-state levels of HPV11 and HPV31 RLuc-E2 by directly binding to them. To determine whether Brd4-C was increasing the levels of HPV11 and HPV31 RLuc-E2 by reducing their degradation, we measured their stability in a cycloheximide chase assay in the presence or absence of Brd4-C. These studies revealed that Brd4-C was indeed capable of slowing down the degradation of both RLuc-E2 proteins (Fig. 6C). In fact, the increase in stability brought about by Brd4-C was comparable to that obtained with lactacystin (Fig. 3C). In contrast and as expected, Brd4-C did not stabilize the R37K and I73A RLuc-11E2 proteins as well as the wild-type protein (Fig. 6D). A weak stabilization of the R37K mutant protein was observed (Fig. 6D), a finding consistent with this substitution having a lesser effect on Brd4-binding than the I73A substitution (41). From these results, we conclude that E2 is protected from proteasomal degradation when bound to Brd4-C.

The steady-state levels and stability of RLuc-E2 are also increased by overexpression of full-length Brd4.

When we determined the degree of overexpression of full-length Brd4 and of Brd4-C by Western blotting, we quickly realized that full-length Brd4 was produced at much lower levels than Brd4-C (see Fig. 3 in the supplemental material). This result suggested that the weaker stabilizing effect of full-length Brd4 on RLuc-E2 levels observed in Fig. 6A and B was likely due to its lower expression. To directly address this possibility, we tested whether transfection of higher amounts of Brd4 plasmid would increase the levels of RLuc-E2. We kept the same transfection conditions as described above but this time using 200 and 400 ng of Brd4 expression plasmid. Because these are large quantities of DNA relative to the number of cells being transfected, we were concerned about possible nonspecific effect on cellular physiology and/or viability and therefore included as controls the I73 mutants RLuc-E2 and RLuc alone. As shown in Fig. 7A, high amounts of Brd4 increased the steady-state levels of wild-type E2 from both HPV11 and HPV31. This effect was robust as the levels of both RLuc-E2 were increased by 2.5-fold at the highest concentration of Brd4 expression plasmid tested. In contrast, high amounts of Brd4 had a much weaker, although not negligible, effect on the two I73 mutant proteins and on RLuc alone (Fig. 7A). Thus, full-length Brd4 can increase the levels of both RLuc-E2 proteins primarily by interacting with them. Accordingly, we found in cycloheximide chase assays that full-length Brd4 could protect HPV11 and HPV31 RLuc-E2 from degradation (Fig. 7B and 7C), albeit not as efficiently as Brd4-C (Fig. 6C). It is likely that the weaker stabilizing effect of full-length Brd4 on RLuc-E2, compared to that of Brd4-C, is due to its lower levels of expression. However, we cannot rule out that other mechanisms are also taking place. Regardless, the stabilizing effect of full-length Brd4 was dependent on its interaction with RLuc-E2, since it was abolished by the I73A/L substitutions in the TAD (Fig. 7B and C). Thus, both full-length Brd4 and Brd4-C protect E2 from degradation by directly interacting with it.

Effect of a dominant-negative Brd4 on expression of RLuc-E2.

The results presented above indicate that Brd4 increases the stability of E2 primarily by directly binding to it. However, the findings that Brd4 could also increase the expression of the two I73 mutant RLuc-E2 (Fig. 7A), albeit to a lesser extent than that of the wild-type proteins, suggests that Brd4 may also act in part by a mechanism unrelated to complex formation. To further investigate this possibility, we made use of a Brd4 protein that lacks the E2-binding domain, which we refer to as Brd4-N (aa 1 to 1223). We found in reporter gene assays that Brd4-N has a dominant-negative effect on E2 transactivation. Specifically, we found that Brd4-N inhibited, in a dose-dependent manner, the transactivation by HPV31 E2 of a reporter gene under the control of four E2-binding sites (Fig. 8A, top panel). In parallel, we also tested the effect of Brd4-C (middle panel) and full-length Brd4 (lower panel) and found that they could inhibit and potentiate E2 transactivation, respectively, as reported previously (40). Thus, both Brd4-N and Brd4-C act in a dominant-negative manner. Because Brd4-N does not bind E2, we surmise that it exerts its dominant-negative effect by interfering with the function of endogenous Brd4. We speculate that Brd4-N could interfere with endogenous Brd4 by directly interacting with it, if Brd4 is a homodimer as suggested previously (43), or by competing for binding to cellular factors such as acetylated nucleosomes since Brd4-N retains both bromodomains. Importantly, we tested the effect of this dominant-negative Brd4 construct on the expression levels of wild-type and mutant RLuc-E2 proteins from both HPV11 and HPV31. As shown in Fig. 8B, Brd4-N was found to increase the amount of wild-type RLuc-E2 by ca. 50% at the highest amount tested, despite being defective for binding to E2. Not surprisingly, it had a similar effect on the I73 mutant proteins. This stimulatory effect of Brd4-N appeared to be specific to E2, either wild type or mutant, since it had a negligible effect on RLuc alone (Fig. 8B). Thus, overexpression of Brd4-N increases the levels of RLuc-E2 by a mechanism that is unrelated to complex formation between both proteins and which is likely related to its dominant-negative effect on endogenous Brd4.

The stability of RLuc-E2 is not affected by downregulation of endogenous Brd4.

The results presented in Fig. 6 and 7 showed that, in the absence of Brd4 overexpression, mutant E2 proteins that are defective for Brd4-binding are as stable as wildtype E2. These results suggested that the stability of E2 is not significantly influenced by endogenous Brd4, perhaps because only a minority of E2 is in complex with Brd4 and productively engaged in transcription within an asynchronous cell population. To investigate further the role of endogenous Brd4, we set out to measure the stability of RLuc-E2 in C33A cells in which Brd4 expression would be downregulated with a shRNA. First, we tested the efficiency of several commercially available shRNA against Brd4. In Fig. 9A, we show by Western blotting that the most potent Brd4 shRNA that we identified could reduce the levels of cotransfected Flag-tagged Brd4 by ca. 90%, whereas a control shRNA had little to no effect. Importantly, we then showed in reporter gene assays that this potent Brd4 shRNA, but not the control shRNA, could inhibit E2 transactivation (Fig. 9B). This effect was specific to E2-mediated transcription since the same Brd4 shRNA had little to no effect on transcription from the CMV promoter (data not shown). From these experiments, we conclude that our Brd4 shRNA is both functional and specific. We then performed cycloheximide chase assays to measure the stability of RLuc-E2 from HPV11 and HPV31 in cells transfected with the Brd4 shRNA or the control shRNA. No significant difference in the stability of the two RLuc-E2 proteins was observed between control and Brd4-knockdown cells (Fig. 9C and D). Thus, depletion of endogenous Brd4 does not have a significant impact on the stability E2 from HPV11 and HPV31. In complementary studies, we also measured the stability of RLuc-E2 from HPV11 and HPV31 in a previously described C33A cell line that stably express a shRNA against Brd4 (cell line 1-13 described in Wu et al. [44], kindly provided by Cheng-Ming Chiang). We found that this cell line supports lower levels of E2 transactivation (see Fig. S4A in the supplemental material), a finding consistent with a reduction in Brd4 levels. RLuc-E2 from both HPV11 and HPV31 were found to be slightly more stable in C33A knockdown cells than in normal C33A cells (see Fig. S4B and C in the supplemental material). However, this was also the case for the

Brd4-binding defective mutants (see Fig. S4B and C in the supplemental material). Thus, the slight stabilization of RLuc-E2 observed in Brd4 knockdown cells is unrelated to an interaction with Brd4. These results provide additional evidence that depletion of endogenous Brd4 does not have a dramatic effect on the stability E2 from HPV11 and HPV31. Satisfyingly, all of the results obtained in Brd4 knockdown experiments, either by transient transfection of shRNA or using the stable cell line, are consistent with those indicating that Brd4-binding mutant E2 have a similar stability as wild-type E2. Collectively, these results indicate that endogenous Brd4 is not a major determinant of E2's stability. As we argue in the Discussion, this conclusion does not necessarily contradict the notion that Brd4-binding protects E2 from degradation, since it may simply reflect the fact that only a small proportion of E2 proteins are bound to endogenous Brd4 in cells at any given time.

Inhibition of the proteasome reduces E2 transactivation.

The studies presented above have revealed a role for Brd4 in protecting E2 from proteasomal degradation. Since Brd4 also mediates the transcriptional activity of E2 (8, 33, 40, 41, 44), it was of interest to determine whether the proteasome was involved in E2 transactivation. To address this question, we tested the effect of two proteasome inhibitors, lactacystin and MG132, on the expression of an E2-responsive luciferase reporter gene in transfected C33A cells. Cells were transfected with an expression vector for HPV31 E2 together with the reporter gene under the control of four E2 binding sites and were then treated 48 h posttransfection, with a gradient of inhibitors for 6.5 h. As can be seen in Fig. 10A, expression of the reporter gene was increased 4.5-fold by wild-type HPV31 E2 but not by a transactivation defective mutant carrying the R37K and I73L substitutions in the TAD. In the presence of increasing concentrations of lactacystin or MG132, we observed a dose-dependent reduction in E2 transactivation, a finding consistent with a role for the proteasome in this process. To verify that the effect of the proteasome inhibitors was not due to a general reduction in RNA polymerase II transcription, we tested their effect on an

unrelated luciferase reporter gene driven by the CMV promoter (Fig. 10B). In this case, neither lactacystin nor MG132 had any inhibitory effect, even at the highest concentrations tested. Rather, they both increased luciferase expression by 40 to 50% at specific concentrations. Thus, the inhibitory effect of lactacystin and MG132 on E2-transactivation is not due to a general shutdown of RNA polymerase II transcription. Collectively, these results support a role for the proteasome in E2 transactivation.

DISCUSSION

Development of a quantitative luciferase assay to study E2 degradation.

For the present study, we developed a novel assay to quantify the proteasomal degradation of papillomavirus E2, based on its fusion to RLuc. This assay is both quantitative and very sensitive. In a side-by-side comparison (Fig. 1 and 2), we found that the luciferase assay is at least fivefold more sensitive than Western blotting against the 3xFlag epitope for E2 detection. This allows for the stability of E2 to be monitored under conditions of low protein expression, an important point when trying to ensure that the ubiquitin-proteasome machinery is not saturated by overexpression of the protein of interest. The luciferase assay also allows for the rapid and easy determination of the half-life of E2 with a higher throughput than traditional methods such as pulse-labeling and immunoprecipitation or Western blotting. Importantly, the assay includes an internal FLuc control for normalization purposes, an essential control when investigating the effect of overexpression or downregulation of a transcription factor such as Brd4, which affects the expression of many genes. Indeed, we have noticed that overexpression of Brd4 or Brd4-N stimulates expression from the CMV promoter, which was used in the present study to drive the expression of RLuc-E2 fusion proteins and also of the FLuc normalization control. To quantify this effect, we plotted from our existing data set the effect of Brd4, Brd4-N, and Brd4-C on the expression of the control FLuc driven from the CMV promoter. The luciferase values (see Fig. S5 in the supplemental material) clearly show that Brd4 and

Brd4-N increase expression from the CMV promoter in a dose-dependent manner, whereas Brd4-C has much less of an effect. At the highest amount of Brd4 and Brd4-N tested (see Fig. S5 in the supplemental material), the levels of FLuc were almost doubled and tripled, respectively. It is unclear whether Brd4 and Brd4-N have a direct effect on transcription initiated at the CMV promoter or an indirect one on other aspects of gene expression. However, since Brd4 is required for the expression of many cellular genes, it is not surprising that it can also affect expression from the CMV promoter. Importantly, because our experiments involved normalization of the data by calculating the ratios of RLuc to FLuc activities (both expressed from the CMV promoter), we have been able to focus specifically on the effect of Brd4 on the stability of E2, independent of its effect on the CMV promoter. In summary, the use of RLuc fusions has proven extremely valuable for the study of E2 degradation not only because it is quantitative and high throughput but also because it permits the inclusion of an internal control that takes into account general effects of Brd4 on gene expression.

E2 is degraded by the proteasome via its TAD.

Using the luciferase assay, we determined that HPV11 and HPV31 E2 are degraded by the proteasome, both with a half-life of ~60 min. This value is in agreement with previous studies that measured a half-life of 75 min for HPV11 and of 50 min for both HPV16 and 18 E2 (9, 10). Although HPV11 and HPV31 E2 have comparable half-lives, we repeatedly observed that HPV11 E2 was slightly less stable than HPV31 E2 (Fig. 2B). Accordingly, inhibition of the proteasome with lactacystin increased the steady-state levels of HPV11 E2 slightly more than those of HPV31 E2 by 20% (Fig. 3B). Using a series of truncation mutants of HPV31 E2, we identified the TAD as the primary domain of E2 responsible for its proteasomal degradation. The TAD had previously been implicated in the degradation of HPV18 E2 (9). Interestingly, a growing body of evidence indicates that TADs often contain specific sequences, known as degrons, which signal their proteolysis (36). The results presented here support the notion that the E2 TAD also contains a degron. The finding that

deletion of the C-terminal DBD of E2 did not significantly stabilize the protein (Fig. 5) indicates that the instability of E2 is not dependent on its ability to dimerize and bind DNA. Hence, we conclude that the instability of E2 is encoded within its TAD and that E2 does not need to be bound to DNA or productively engaged in transcription in order to be degraded by the proteasome.

E2 is protected from degradation when bound to Brd4.

The finding that the TAD contains a degron prompted us to investigate whether overexpression of the viral E1 helicase or of Brd4, which bind to opposite faces of the TAD, would affect the stability of E2. These studies revealed that overexpression of the Brd4 C-terminal domain (Brd4-C), the portion that binds to E2, protects it from degradation. Overexpression of full-length Brd4 was also found to stabilize E2, albeit not as efficiently as Brd4-C, perhaps because it is expressed at lower levels. The use of mutant E2 defective for Brd4-binding (R37 and I73) has been particularly useful for dissecting the effects of Brd4 that are due to its interaction with E2 from those that are indirect and related to a general inhibition of transcription and/or cell cycle progression. The finding that overproduction of Brd4 and Brd4-C protects wild-type E2 but not mutant E2 from degradation strongly suggests that E2 is more stable when bound to Brd4. By extension, these data also point to the Brd4-binding surface of the TAD as being involved in E2 degradation.

Interestingly, we found that the R37 and I73 mutants were as stable as wild-type E2 in the absence of Brd4 overexpression. This suggested either that the interaction of E2 with endogenous Brd4 does not affect the stability of E2 or, alternatively, that it does but that the majority of E2 in cells is not in complex with Brd4 (i.e., is in a free form) and therefore not protected from degradation. At this moment, we cannot formally rule out any one of these two possibilities, although we favor the latter one for the following reasons. The finding that overexpression of Brd4 stimulates E2 transactivation in reporter gene assays (Fig. 8A) (40) suggests that Brd4 is limiting and that its overexpression drives the assembly of a

greater number of E2-Brd4 complexes capable of activating transcription. If E2 was already all bound to Brd4, it would be difficult to imagine how Brd4 overexpression could increase E2 transactivation. A similar argument can be made for why Brd4 overexpression protects E2 from degradation. Specifically, we have obtained evidence that Brd4 overproduction protects wild-type E2 but not Brd4-binding mutants, suggesting that this protective effect is indeed due to an increase in complex formation between E2 and Brd4. Again, if all of E2 was already bound to endogenous Brd4, this stabilizing effect of Brd4 would be difficult to explain. Finally, we have found that immunoprecipitation of HPV31 E2 from stable cell lines does not result in the copurification of stoichiometric amounts of Brd4, suggesting that not all E2 molecules are in complex with endogenous Brd4 (data not shown). For all of the aforementioned reasons, we favor the notions that the majority of E2 is not in complex with Brd4 in asynchronous cells and that Brd4 overproduction stimulates E2 transactivation and protects E2 from proteasomal degradation by driving the assembly of additional E2-Brd4 complexes.

We also investigated the role of endogenous Brd4 on the stability of E2 using a dominant-negative Brd4 construct (Brd4-N) and, in separate experiments, by downregulation of Brd4 with a shRNA. We found that Brd4-N inhibits E2 transactivation despite the fact that it lacks the E2-binding domain (Fig. 8A). This suggests that Brd4-N brings about its inhibitory effect by interfering with the function of endogenous Brd4. We found that overexpression of Brd4-N increased the steady-state levels of RLuc-E2 but also those of the R37 and I73 E2 mutants (Fig. 8B). From these results, we conclude that dominant-negative inhibition of endogenous Brd4 by Brd4-N does not stabilize E2 through an effect on complex formation between both proteins. To investigate more directly the role on endogenous Brd4 on the stability of E2, we depleted it by using RNA interference. The data presented in Fig. 9 clearly show that depletion of Brd4 did not affect the half-life of RLuc-E2 from HPV11 and HPV31. Comparable results were obtained when we measured the stability of RLuc-E2 from HPV11 and HPV31 in a cell line that stably expresses an shRNA (44). We surmise that this cell line still expresses some, albeit lower-than-normal, levels of

Brd4 since it is essential for cell cycle progression. Accordingly, we have observed that the levels of E2 transactivation are reduced by ca. 50% in this cell line compared to normal C33A (see Fig. S4 in the supplemental material). We found that RLuc-E2 from both HPV11 and HPV31 were slightly more stable in these C33A knockdown cells than in normal C33A (see Fig. S4 in the supplemental material). However, this was also the case for the Brd4-binding defective E2 mutants (see Fig. S4 in the supplemental material). Thus, the slight stabilization of RLuc-E2 observed in Brd4 knockdown cells is likely independent of Brd4 interaction

Collectively, our results indicate that neither depletion of endogenous Brd4 by shRNA nor its inhibition using a dominant-negative Brd4 construct has a major impact on the stability of HPV11 and HPV31 E2 that could be attributed to a reduction in E2-Brd4 complex formation. These findings are in perfect agreement with the finding that Brd4-binding mutants of E2 have a stability comparable to that of wild-type E2. We have argued above that the majority of E2 is not in complex with Brd4 in asynchronous cells and, consequently, surmise that the intrinsic instability of E2 that we have characterized in the present study is that of “free” E2 that is not productively engaged in transcription. However, we have also started to address the role of E2 degradation during transcription by testing the effect of proteasome inhibitors on E2 transactivation. These studies are discussed in the below.

E2 transactivation requires the catalytic activity of the proteasome.

There is accumulating evidence that the proteasome is involved in transcription through both its proteolytic and nonproteolytic activities (14, 27, 34). Using a reporter gene assay, we found that the proteasome inhibitors lactacystin and MG132 reduced, in a dose-dependent manner, the expression of an E2-driven reporter gene (Fig. 10A) but not that of a control reporter expressed from the CMV promoter. A similar observation was reported recently for HPV16 E2 (21). These findings indicate that the proteolytic activity of the proteasome is required for E2 transactivation, perhaps in part because E2 needs to be

degraded in order for transcription to proceed. What might be the role of E2 degradation in transcription? Although we do not have a definitive answer to this question, we can suggest a few possibilities. For some transcriptional activators, it has been postulated that proteasomal degradation serves as a mechanism to limit their activity and ensure that they remain functional only when needed (14, 27, 34). By analogy, proteasomal degradation of E2 may serve as a mechanism to prevent its stable interaction and activity at the viral LCR until it can productively interact with Brd4. More recent models have emphasized the role of monoubiquitination and polyubiquitination in stimulating and inactivating, respectively, certain transcription factors (4, 5, 14, 18, 27, 28, 34). In these models, monoubiquitination has been akin to a “licensing event” allowing activators to become active while at the same time marking them for subsequent proteasomal degradation as the ubiquitin chain is extended to beyond four ubiquitin moieties. Thus, it will be important in the future to address whether E2 is activated by monoubiquitination and, if so, whether this modification has any effect on its interaction with Brd4.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cheng-Ming Chiang (Simmons Comprehensive Cancer Center, Dallas, TX) for providing the Brd4 knockdown cell line and Brd4 expression plasmids and Lou Laimins (Northwestern University, Chicago, IL) for the gift of the 4xE2 binding site reporter gene. We also thank Maria Lymberopoulos for the construction of the Brd4-C expression plasmid. This study was supported by grants from the Cancer Research Society and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). H.S. and A.F.-T. hold studentships from the CIHR and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), respectively. J.A. is a senior scholar from the FRSQ.

REFERENCES

1. **Abbate, E. A., J. M. Berger, and M. R. Botchan.** 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* **18**:1981-96.
2. **Abbate, E. A., C. Voitenleitner, and M. R. Botchan.** 2006. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* **24**:877-89.
3. **Abroi, A., R. Kurg, and M. Ustav.** 1996. Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* **70**:6169-79.
4. **Archer, C. T., L. Burdine, B. Liu, A. Ferdous, S. A. Johnston, and T. Kodadek.** 2008. Physical and functional interactions of monoubiquitylated transactivators with the proteasome. *J Biol Chem* **283**:21789-98.
5. **Archer, C. T., A. Delahodde, F. Gonzalez, S. A. Johnston, and T. Kodadek.** 2008. Activation domain-dependent monoubiquitylation of Gal4 protein is essential for promoter binding in vivo. *J Biol Chem* **283**:12614-23.
6. **Auborn, K. J.** 2002. Therapy for recurrent respiratory papillomatosis. *Antivir Ther* **7**:1-9
7. **Baseman, J. G., and L. A. Koutsky.** 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S16-24.
8. **Baxter, M. K., M. G. McPhillips, K. Ozato, and A. A. McBride.** 2005. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* **79**:4806-18.
9. **Bellanger, S., C. Demeret, S. Goyat, and F. Thierry.** 2001. Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol* **75**:7244-51.
10. **Blachon, S., S. Bellanger, C. Demeret, and F. Thierry.** 2005. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* **280**:36088-98.

11. **Blachon, S., and C. Demeret.** 2003. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* **85**:813-9.
12. **Breiding, D. E., M. J. Grossel, and E. J. Androphy.** 1996. Genetic analysis of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activation domain. *Virology* **221**:34-43.
13. **Brokaw, J. L., M. Blanco, and A. A. McBride.** 1996. Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J Virol* **70**:23-9.
14. **Collins, G. A., and W. P. Tansey.** 2006. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* **16**:197-202.
15. **Cooper, C. S., S. N. Upmeyer, and P. L. Winokur.** 1998. Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions. *Virology* **241**:312-22
16. **Dey, A., F. Chitsaz, A. Abbasi, T. Misteli, and K. Ozato.** 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8758-63.
17. **Doorbar, J.** 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S7-15.
18. **Ferdous, A., D. Sikder, T. Gillette, K. Nalley, T. Kodadek, and S. A. Johnston.** 2007. The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Dev* **21**:112-23.
19. **Ferguson, M. K., and M. R. Botchan.** 1996. Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J Virol* **70**:4193-9.
20. **Florence, B., and D. V. Faller.** 2001. You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* **6**:D1008-18.
21. **Gammoh, N., D. Gardiol, P. Massimi, and L. Banks.** 2008. The Mdm2 Ubiquitin Ligase Enhances HPV E2 Transcriptional Activation. *J Virol*.
22. **Gillison, M. L.** 2004. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* **31**:744-54.

23. **Grossel, M. J., F. Sverdrup, D. E. Breiding, and E. J. Androphy.** 1996. Transcriptional activation function is not required for stimulation of DNA replication by bovine papillomavirus type 1 E2. *J Virol* **70**:7264-9.
24. **Hebner, C. M., and L. A. Laimins.** 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* **16**:83-97.
25. **Howley, P. M., and D. R. Lowy.** 2001. Papillomaviruses, p. 2231-2264. *In* D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Raven, Philadelphia.
26. **Jang, M. K., K. Mochizuki, M. Zhou, H. S. Jeong, J. N. Brady, and K. Ozato.** 2005. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**:523-34.
27. **Kodadek, T., D. Sikder, and K. Nalley.** 2006. Keeping transcriptional activators under control. *Cell* **127**:261-4.
28. **Kurosu, T., and B. M. Peterlin.** 2004. VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Curr Biol* **14**:1112-6.
29. **Lacey, C. J.** 2005. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S82-90.
30. **Liu, Y., X. Wang, J. Zhang, H. Huang, B. Ding, J. Wu, and Y. Shi.** 2008. Structural basis and binding properties of the second bromodomain of Brd4 with acetylated histone tails. *Biochemistry* **47**:6403-17.
31. **Loening, A. M., A. M. Wu, and S. S. Gambhir.** 2007. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* **4**:641-3.
32. **Longworth, M. S., and L. A. Laimins.** 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:362-72.
33. **McPhillips, M. G., J. G. Oliveira, J. E. Spindler, R. Mitra, and A. A. McBride.** 2006. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* **80**:9530-43.

34. **Mittenberg, A. G., T. N. Moiseeva, and N. A. Barlev.** 2008. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. *Front Biosci* **13**:7184-92.
35. **Mochizuki, K., A. Nishiyama, M. K. Jang, A. Dey, A. Ghosh, T. Tamura, H. Natsume, H. Yao, and K. Ozato.** 2008. The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase. *J Biol Chem* **283**:9040-8.
36. **Muratani, M., and W. P. Tansey.** 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:192-201.
37. **Nishimura, A., T. Ono, A. Ishimoto, J. J. Dowhanick, M. A. Frizzell, P. M. Howley, and H. Sakai.** 2000. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* **74**:3752-60.
38. **Penrose, K. J., and A. A. McBride.** 2000. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* **74**:6031-8.
39. **Sakai, H., T. Yasugi, J. D. Benson, J. J. Dowhanick, and P. M. Howley.** 1996. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J Virol* **70**:1602-11.
40. **Schweiger, M. R., J. You, and P. M. Howley.** 2006. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**:4276-85.
41. **Senechal, H., G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault.** 2007. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* **358**:10-7.
42. **Syrjanen, S.** 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**:S59-66.
43. **Wu, S. Y., and C. M. Chiang.** 2007. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* **282**:13141-5.

44. **Wu, S. Y., A. Y. Lee, S. Y. Hou, J. K. Kemper, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and C. M. Chiang.** 2006. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* **20**:2383-96.
45. **Yang, Z., N. He, and Q. Zhou.** 2008. Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **28**:967-76.
46. **Yang, Z., J. H. Yik, R. Chen, N. He, M. K. Jang, K. Ozato, and Q. Zhou.** 2005. Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* **19**:535-45.
47. **You, J., J. L. Croyle, A. Nishimura, K. Ozato, and P. M. Howley.** 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**:349-60.
48. **You, J., M. R. Schweiger, and P. M. Howley.** 2005. Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirustransformed cells. *J Virol* **79**:14956-61.
49. **zur Hausen, H., and E. M. de Villiers.** 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* **48**:427-47.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Expression of HPV11 and HPV31 E2 as fusions with Renilla luciferase. A) Schematic representation of the fusion proteins used in this study and showing the location of the Renilla luciferase (RLuc), 3xFlag epitope and E2 coding regions. B) and C) Western blotting analysis of C33A cells transfected with the indicated amounts (in ng) of RLuc-E2 or RLuc expression plasmid. RLuc fusion proteins were detected using an anti-Flag antibody. Western blotting against tubulin was performed as a loading control. Position and size of molecular weights (in kilodaltons) are indicated to the left of each gel. D) Intracellular localization of RLuc fusion proteins in transfected C33A cells as determined by confocal immunofluorescence microscopy using an anti-Flag antibody (top panels). The

same images overlaid with phase contrast pictures to visualize cells are also presented (bottom panels).

Fig. 2. Expression and stability of RLuc-E2 fusion proteins measured using luciferase activity. A) Luciferase activity measured in C33A cells transfected with increasing amounts of RLuc-E2 vectors or RLuc control vector. For each measurement, the levels of Renilla luciferase activity were normalized to those of firefly luciferase expressed from a co-transfected plasmid. B) Stability of RLuc proteins were determined 48 hours post-transfection by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with 100 μ g/ml cycloheximide.

Fig. 3. Effect of lactacystin on the stability of RLuc-E2. A) Western blot analysis of C33A cells transfected with a fixed amount of expression vectors for RLuc-E2 from HPV11 and HPV31, or RLuc alone, and treated with the indicated concentrations of the proteasome inhibitor lactacystin for 5 hours. Proteins were detected using an anti-Flag antibody. B) Luciferase activity measured from C33A cells transfected and treated with lactacystin. C) Stability of RLuc-E2 or RLuc alone measured 24 hours post-transfection in cells treated or not with 50 μ M lactacystin for 1 hour. Luciferase activity was determined at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide.

Fig. 4. Polyubiquitination of RLuc-E2 in vivo. A) Western blot analysis of C33A cells transfected with the indicated RLuc-E2 expression vector and then treated (+) or not (-) with 25 μ M MG132 for 3 hours. Cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against the Flag epitope or tubulin as a loading control. The position of RLuc-E2 fusion proteins and of molecular weight markers are indicated on the right and left side of the blot, respectively. B) Western blot analysis of RLuc-E2 immunoprecipitates. RLuc-E2 proteins were immunoprecipitated from the cell lysates shown above and analyzed by western blotting against ubiquitin and RLuc-E2 (anti-Flag). Mock transfected cell lysates

were used as a control. An unrelated control antibody (Ctl. Ab) against the large T antigen of SV40 was used to demonstrate the specificity of the immunoprecipitation step.

Fig. 5. Mapping the domain of HPV31 E2 responsible for its degradation. A) Diagram of the HPV31 E2 (31E2) protein showing the location of the transactivation domain (TAD), hinge region and DNA-binding domain (DBD). The different regions of E2 that were fused to RLuc are shown below. B) Stability of the indicated RLuc fusion proteins was determined 48 hours post-transfection by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide. C) Western blotting analysis of C33A cells transfected with the indicated RLuc fusion expression vector and then treated or not with two concentrations of lactacystin (12.5 and 50 μ M). Cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against the Flag epitope and tubulin as a loading control. The position of polyubiquitinated forms of RLuc fusion proteins and of molecular weight markers are indicated on the right and left side of the blot, respectively.

Fig. 6. Effect of Brd4-C on the steady-state levels and stability of RLuc-E2. A) and B) Luciferase activity measured in cells transfected with RLuc-11E2 (panel A) or RLuc-31E2 (panel B) together with increasing amounts of a second plasmid encoding either the full-length Brd4 or Brd4-C. The amount of luciferase activity measured in cell expressing RLuc-E2 in absence of any Brd4 construct (-) was set at 100%. C) Stability of RLuc-E2 proteins from HPV11 and HPV31 in C33A cells co-transfected or not with a Brd4-C expression vector, as indicated. RLuc-E2 stability was determined 24 hours posttransfection by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide. D) Same as in panel C but using the indicated RLuc-11 E2 mutant proteins.

Fig. 7. Effect of full-length Brd4 on the steady-state levels of RLuc-E2. A) Luciferase activity was measured from C33A cells transfected with the indicated wild type or mutant RLuc-E2 expression plasmid together with two different amounts of a plasmid encoding full-length Brd4 as described in the text. The amount of luciferase activity measured in cells expressing RLuc-E2 in absence of any Brd4 construct (-) was set at 100%. B) and C) Stability of wild type and mutant RLuc-E2 proteins from HPV11 (panel B) and HPV31 (panel C) in C33A cells co-transfected or not with Brd4, as indicated. RLuc-E2 stability was determined 24 hours post-transfection by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide.

Fig. 8. Effect of Brd4-N on E2 transactivation and RLuc-E2 expression. A) E2 transactivation assays. Levels of luciferase activity in C33A cells transfected with a 3xFlag-HPV31 E2 expression vector and a firefly luciferase reporter gene driven by four E2-binding sites together with increasing amounts (0, 25, 50, 100, 200 ng) of Brd4-N (top panel), Brd4-C (middle panel) or full-length Brd4 (bottom panel). Luciferase activity values are presented as fold induction above that measured in cells transfected with only the reporter gene (No E2), which was set at 1. All data has been normalized using an internal Renilla luciferase reporter gene. B) RLuc-E2 expression levels. Levels of luciferase activity measured in cells transfected with the indicated wild type or mutant RLuc-E2 from HPV11 or HPV31 and increasing amounts of a second plasmid encoding Brd4-N. The amount of luciferase activity measured in cells expressing RLuc-E2 in absence of any Brd4 construct (-) was set at 100%.

Fig. 9. Effect of Brd4 depletion on the stability of RLuc-E2 proteins. A) Western blot analysis showing the downregulation of Flag-tagged Brd4 (F-Brd4) by RNA interference. C33A cells were transfected with an expression vector for Flag-Brd4 and increasing amounts (1x, 2x and 4x) of a second plasmid expressing a Brd4 shRNA or a control (Ctl.)

shRNA. Flag-Brd4 was detected 24 hours post-transfection using an anti-Flag antibody. Tubulin was used as a loading control. B) Inhibition of E2-transactivation by the Brd4 shRNA. The graph shows the levels of luciferase activity in C33A cells transfected with a 3xFlag-HPV31 E2 expression vector and a firefly luciferase reporter gene driven by four E2-binding sites, together with increasing amounts of Brd4 shRNA or control shRNA. Luciferase activity values are presented as fold induction above that measured in cells transfected with only the reporter gene (No E2), which was set at 1. All data has been normalized using an internal Renilla luciferase reporter gene. A transcriptionally inactive E2 mutant (I73L) was used as a control. Transfected cells were selected in puromycin-containing medium for three days prior to analysis. C) and D) Stability of RLuc-11E2 (panel C) and RLuc-31E2 (panel D) in C33A cells transfected with the Brd4 shRNA or control shRNA. Transfected cells were selected in puromycin-containing medium for three days prior to analysis. The stability of RLuc-E2 was then determined by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide.

Fig. 10. Effect of proteasome inhibitors on E2 transactivation. A) Levels of luciferase activity in C33A cells transfected with a 3xFlag-HPV31 E2 expression vector and a firefly luciferase reporter gene driven by four E2-binding sites. The levels of luciferase activity in cells transfected with only the reporter gene (No E2) was set at 100%. All data has been normalized using an internal Renilla luciferase reporter gene. In this assay, wild type E2 but not the R37K/I73L double mutant activated expression of the reporter gene by 4.5-fold. Cells transfected with wild type E2 and the reporter gene were treated with the indicated concentrations of lactacystin and MG132. B) Levels of luciferase activity in C33A cells transfected with a firefly luciferase reporter gene driven by the CMV promoter in cells were treated or not with the indicated concentrations of proteasome inhibitors.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Fig. 1. Ability of RLuc-E2 fusion proteins to activate transcription and to interact with E1. A) Ability of wild type and mutant RLuc-31E2 proteins to transactivate a firefly luciferase reporter gene under the control of four E2 binding sites (4xE2BS). The left panel shows the amount of reporter gene expression (reported in arbitrary units [AU] of firefly luciferase activity) measured from C33A cells transfected with the indicated RLuc-31E2 expression vector or mock transfected as a control. Wild type RLuc-31E2 could stimulate expression of the reporter gene by about threefold under the conditions tested, whereas the two transactivation defective E2 mutants (R37K and I73L) had a much reduced activity. As a control, we confirmed that all three RLuc-E2 fusion proteins were expressed at similar levels, in the same transfected cells, by measuring the amount of associated Renilla luciferase activity (reported in arbitrary units of Renilla luciferase activity in the right panel). B) The ability of RLuc-31E2 to interact with E1 was tested using a novel *in vivo* assay based on the observation that E2 can relocalize a mutant E1 carrying a defective NLS from the cytoplasm to the nucleus. As observed by confocal fluorescence microscopy, a fusion of E1 to EYFP was predominantly nuclear in C33A cells (left column), whereas one with a mutant NLS (K86G, R87G) remained cytoplasmic (second column from the left). However, when expressed together with RLuc-E2, the EYFP-E1 NLS mutant protein accumulated in the nucleus, presumably through its interaction with E2. In support of this, EYFP-E1 NLS remained cytoplasmic when co-expressed with mutant RLuc-E2 proteins bearing amino acid substitutions in the TAD that abolish binding to E1 (Y19G or E39A) or with RLuc alone. From these results, we infer that E2 retains the ability to bind to E1 when fused to RLuc. In these experiments, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and the DNA stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes).

Supplementary Fig. 2. The stability of RLuc-E2 is independent of its steady-state levels.

A) Steady-state levels of luciferase activity in C33A cells transfected with increasing amounts (ng) of expression vectors for RLuc-E2 from HPV11 and HPV31. B) and C) The stability of RLuc-E2 from HPV11 (panel B) and HPV31 (panel C) was determined from cells transfected with increasing amounts of expression vector by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide.

Supplementary Fig. 3. Expression of full-length Brd4 and Brd4-C in transfected C33A cells.

Western blot analysis of C33A cells transfected or not (-) with increasing amounts of expression plasmids for Brd4 and Brd4-C and performed with an antibody raised against the C-terminal domain of Brd4. Western blotting against tubulin was used as a loading control. The positions of Brd4 and Brd4-C are indicated by arrows.

Supplementary Fig. 4. Stability of RLuc-E2 proteins in a Brd4 knockdown cell line.

A) E2 transactivation was measured in C33A and Brd4 knockdown cells (KD) cells by transfection of the indicated wild type or mutant 3xFlag-E2 expression vector and a firefly luciferase reporter gene driven by four E2-binding sites. The levels of reporter gene expression (i.e. luciferase activity) are given relative to those detected in cells transfected with the reporter gene only (No E2), which were set arbitrarily at 1. B) Stability of RLuc-11E2 in C33A (upper panel) and Brd4 KD cells (lower panel). The stability of RLuc-11E2, or the indicated mutant proteins, was determined 24 hours posttransfection by measuring the levels of luciferase activity remaining at different time points (min) following a block of protein synthesis with cycloheximide. C) Same as panel B) but using RLuc-E2 from HPV31 rather than HPV11.

Supplementary Fig. 5. Effect of Brd4 on expression of firefly luciferase from the CMV promoter. Firefly luciferase activity measured in C33A cells transfected with a

firefly luciferase reporter gene expressed from the CMV promoter (pCMV-Firefly Luc) and with increasing amounts (0, 8, 20, 50, 100 and 200 ng) of a second plasmid encoding Brd4, Brd4-N or Brd4-C, as indicated. Luciferase values were measured 24 hours post-transfection. Each value (i.e. bar) is the average derived from 8-22 independent transfections. The data has not been normalized to reveal the effect of Brd4, Brd4-N and Brd4-C on the CMV promoter.

FIGURES

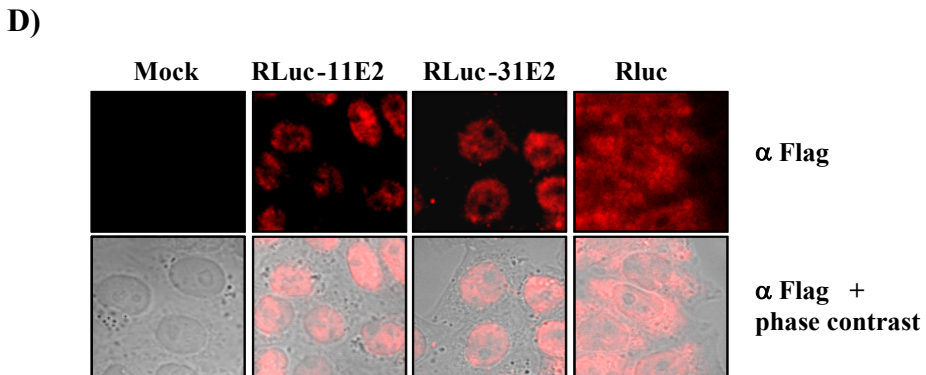
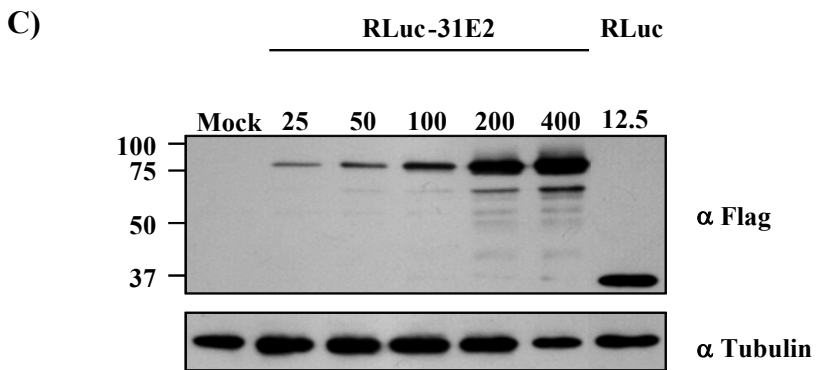
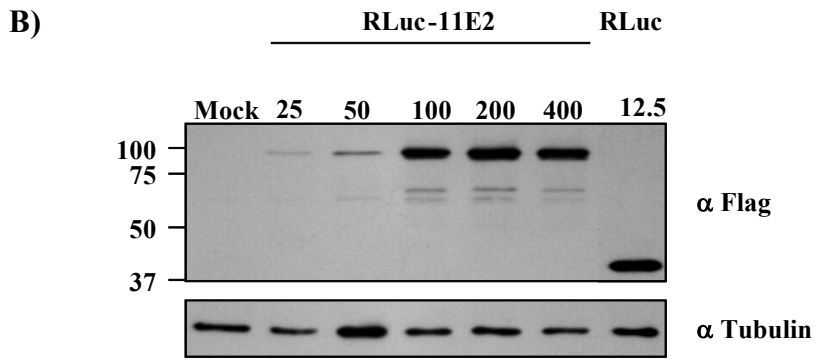


Figure 1

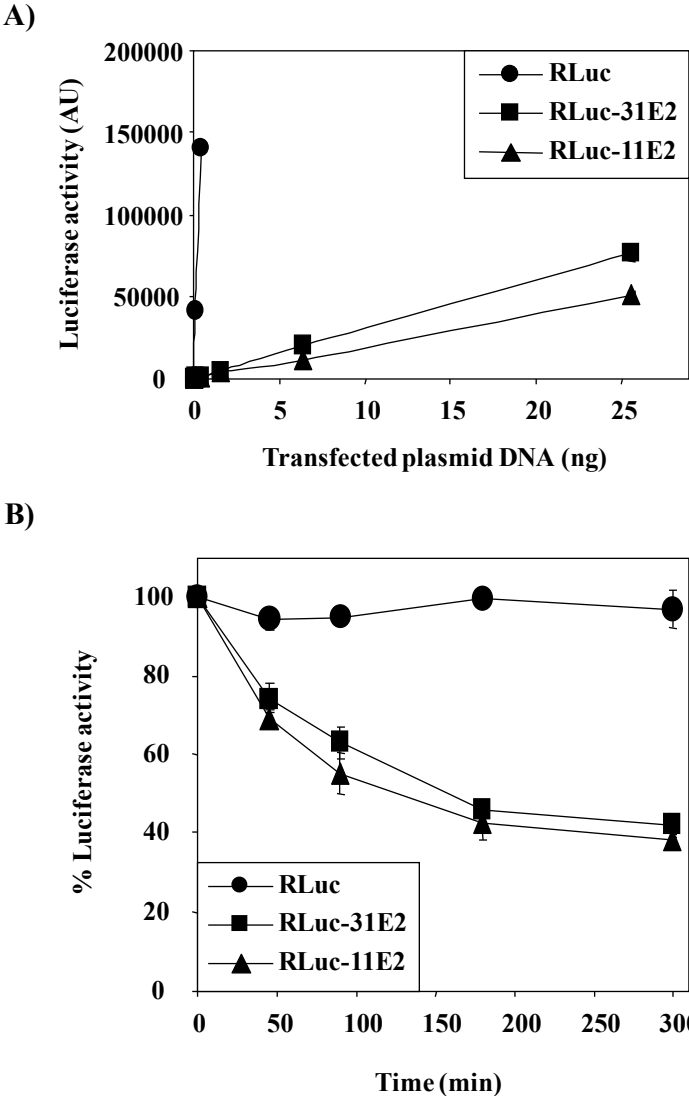


Figure 2

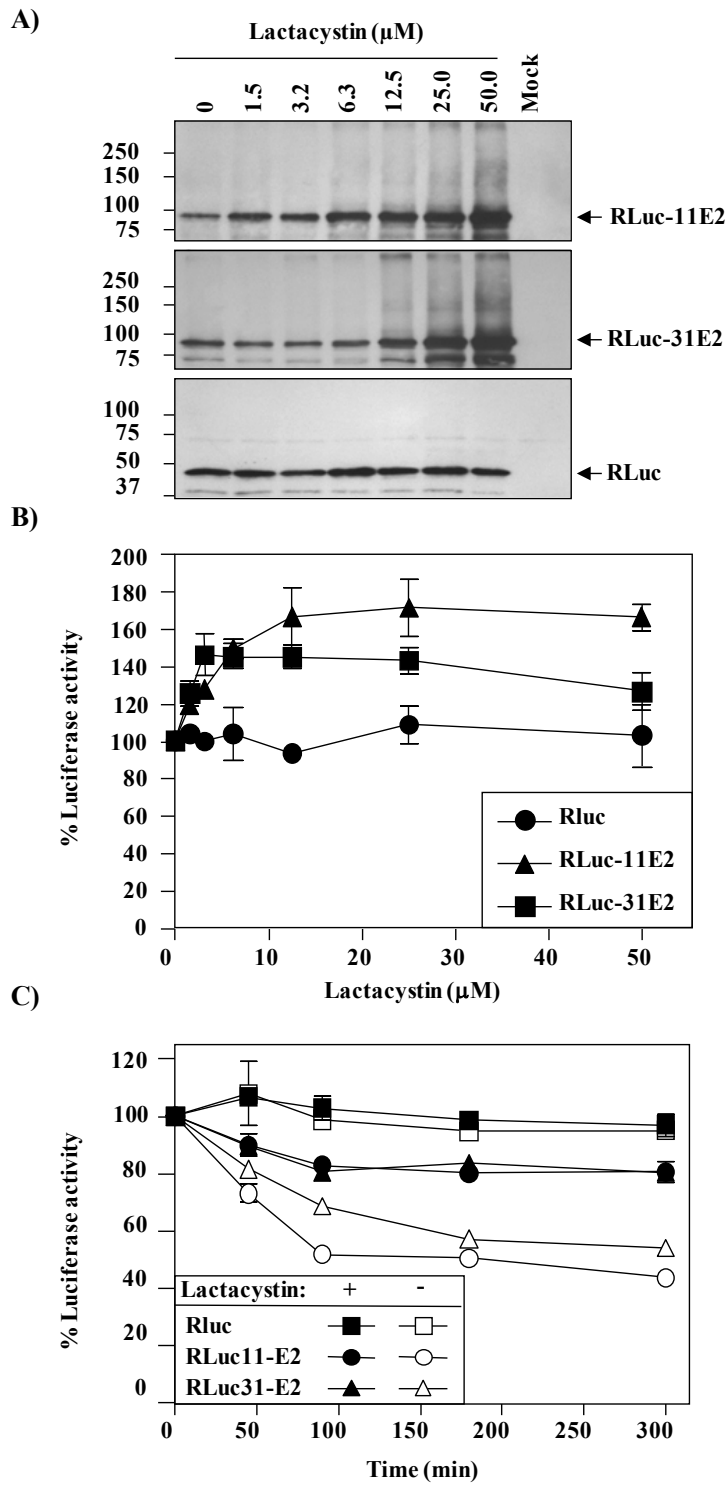
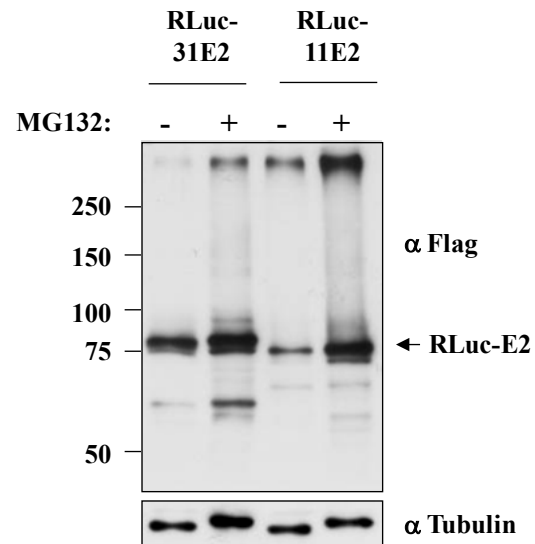


Figure 3

A)



B)

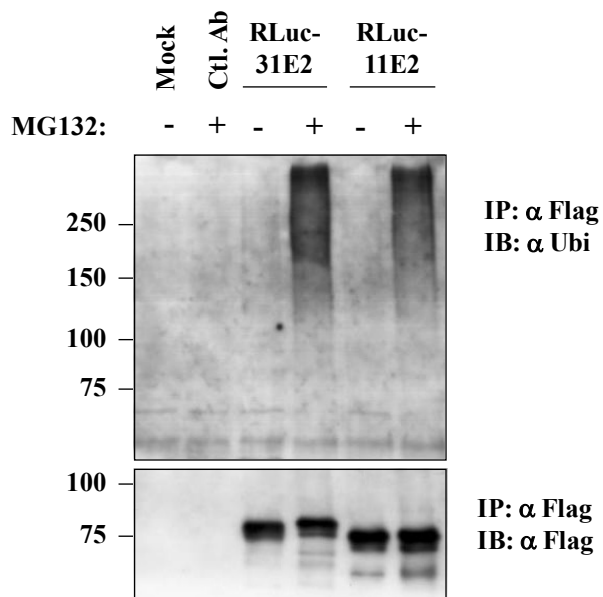


Figure 4

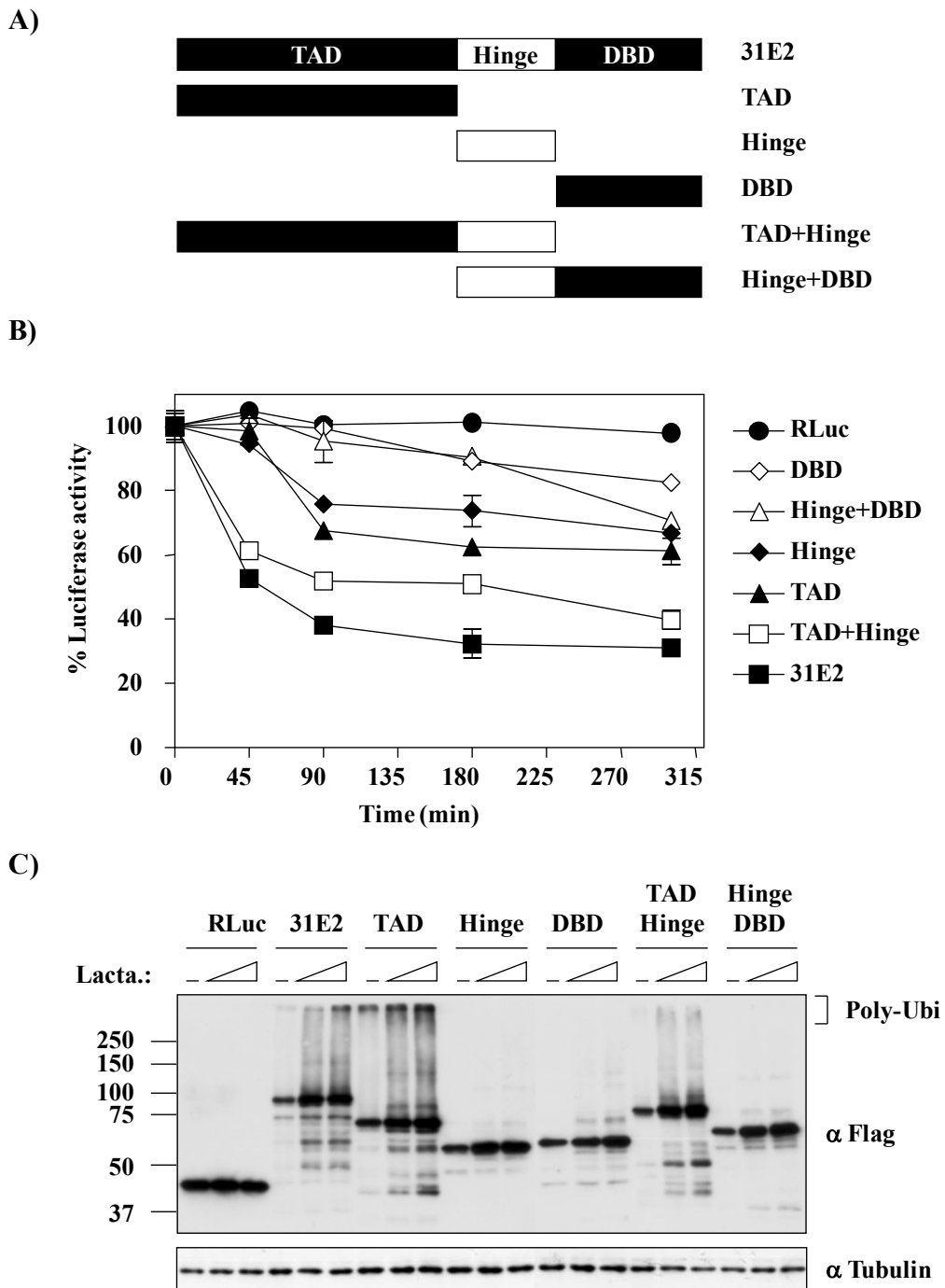


Figure 5

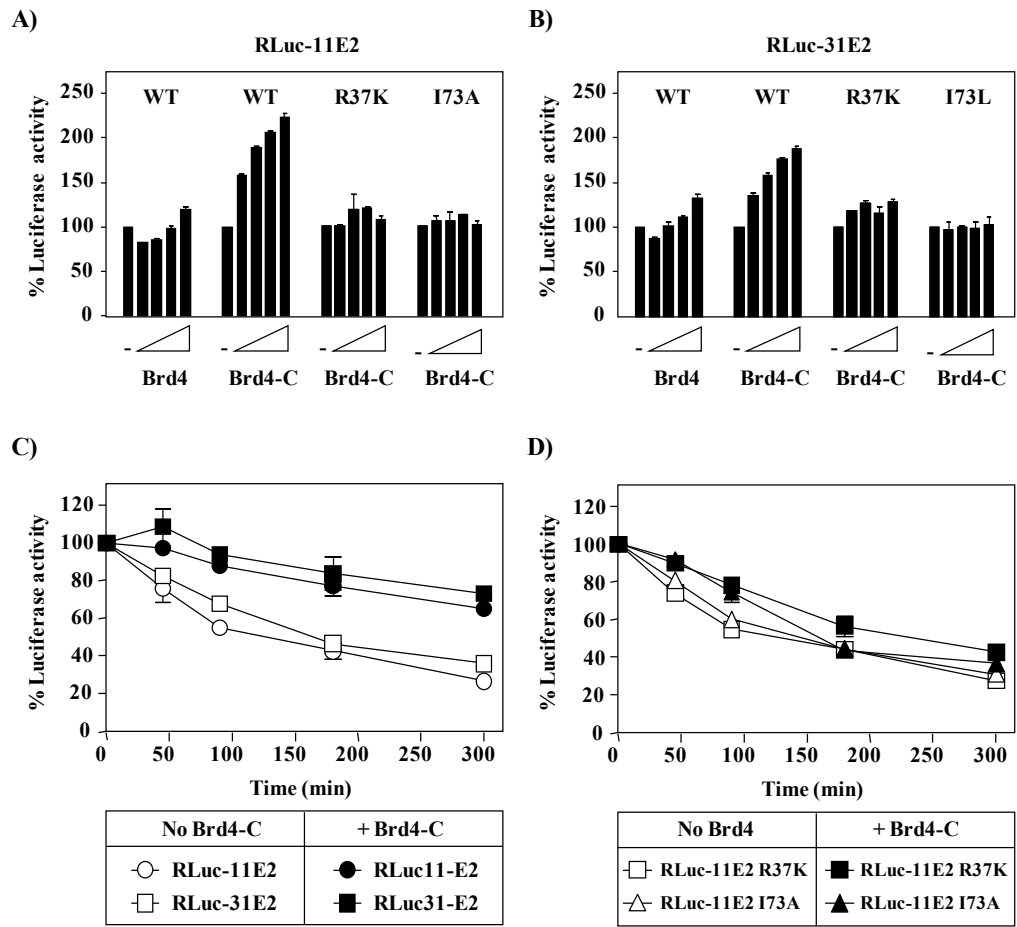
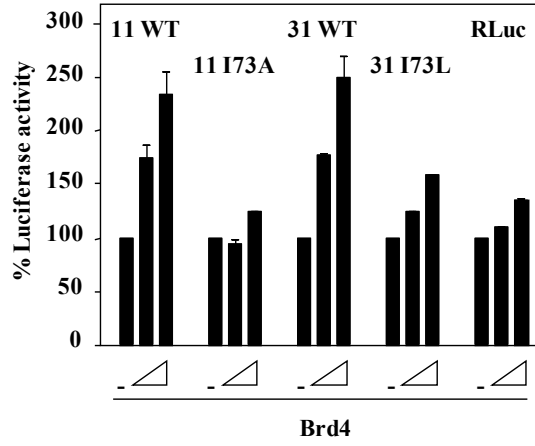
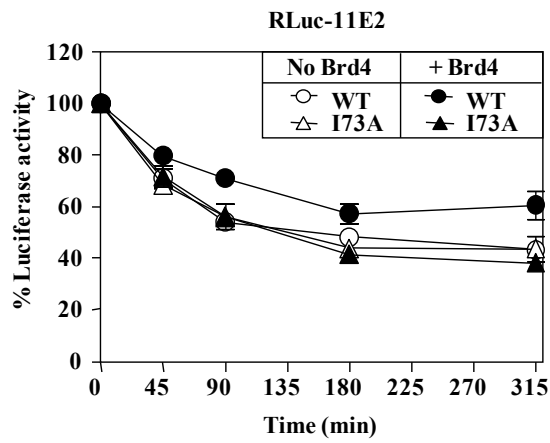


Figure 6

A)



B)



C)

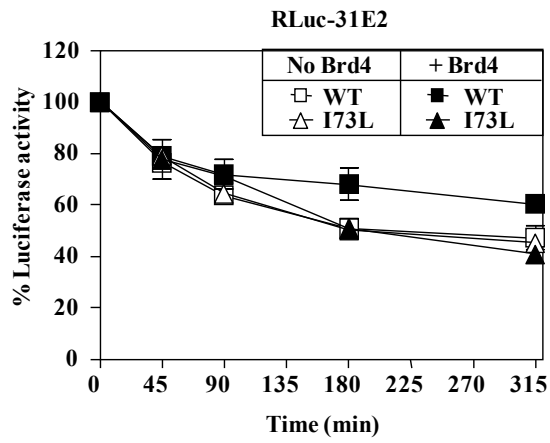
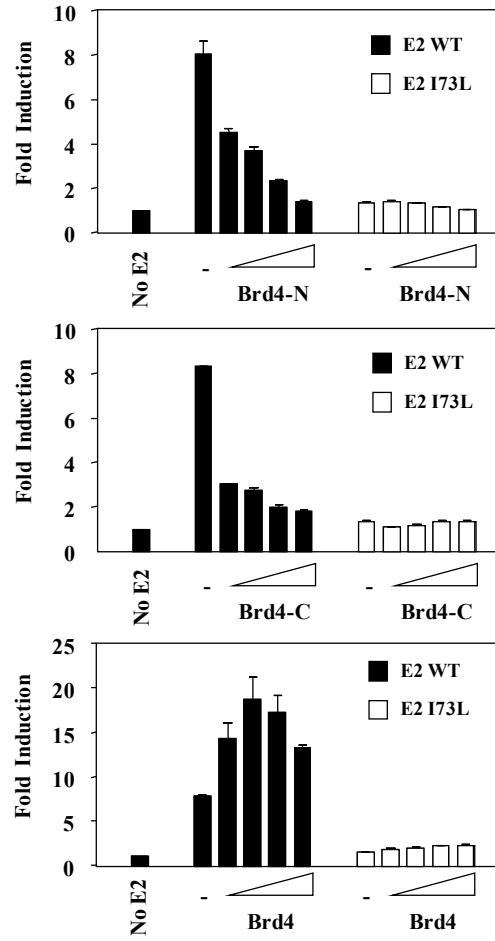


Figure 7

A) Transactivation



B) RLuc-E2 expression

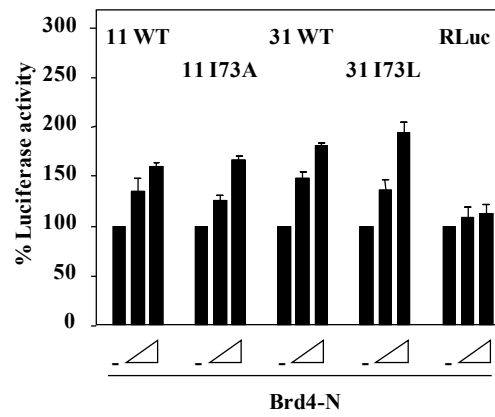


Figure 8

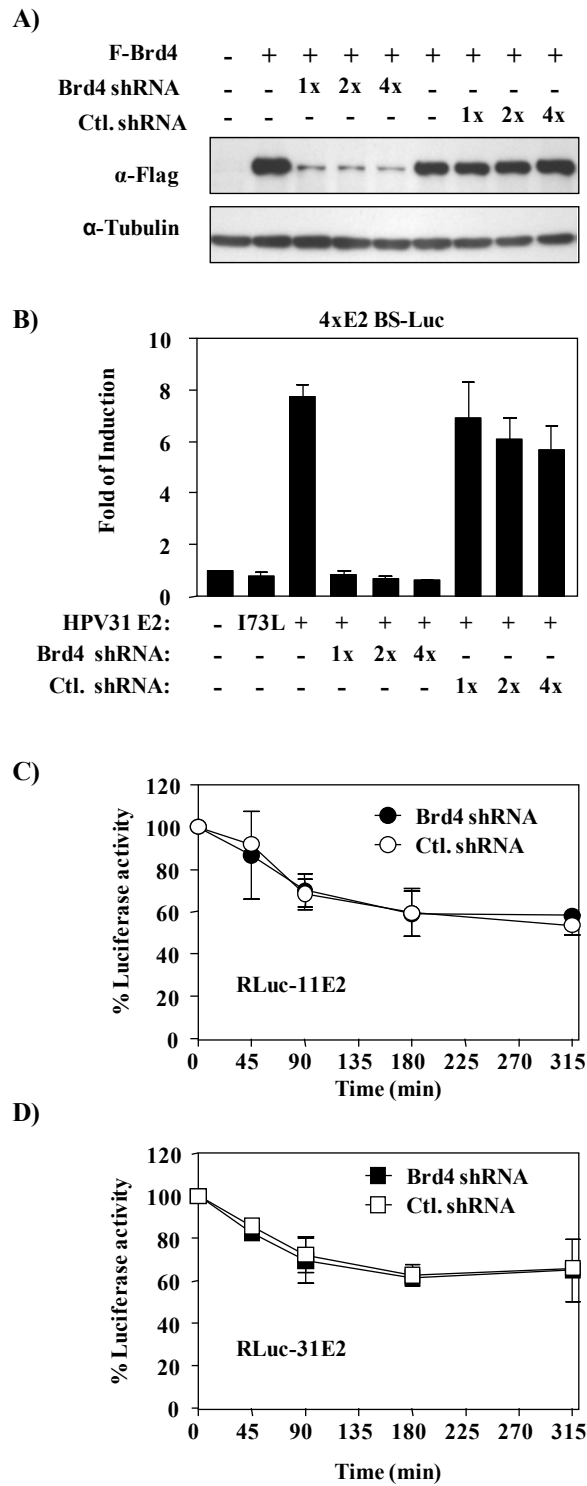


Figure 9

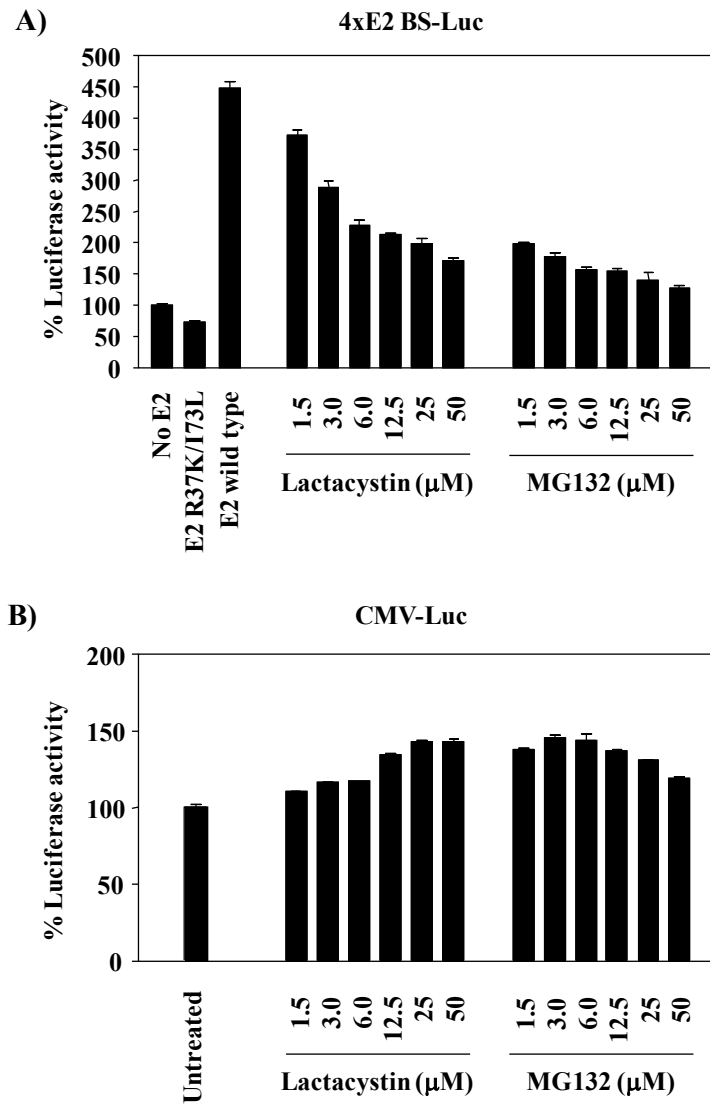
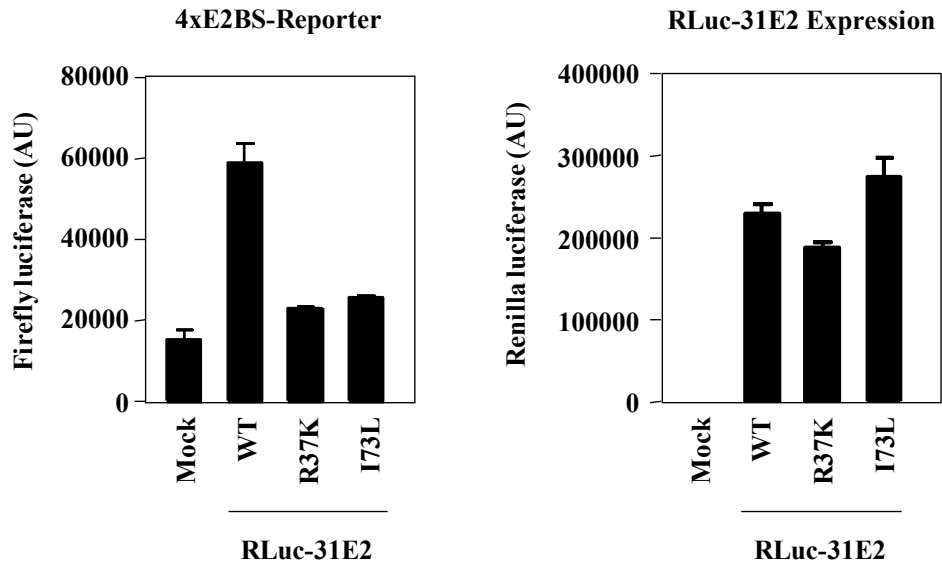


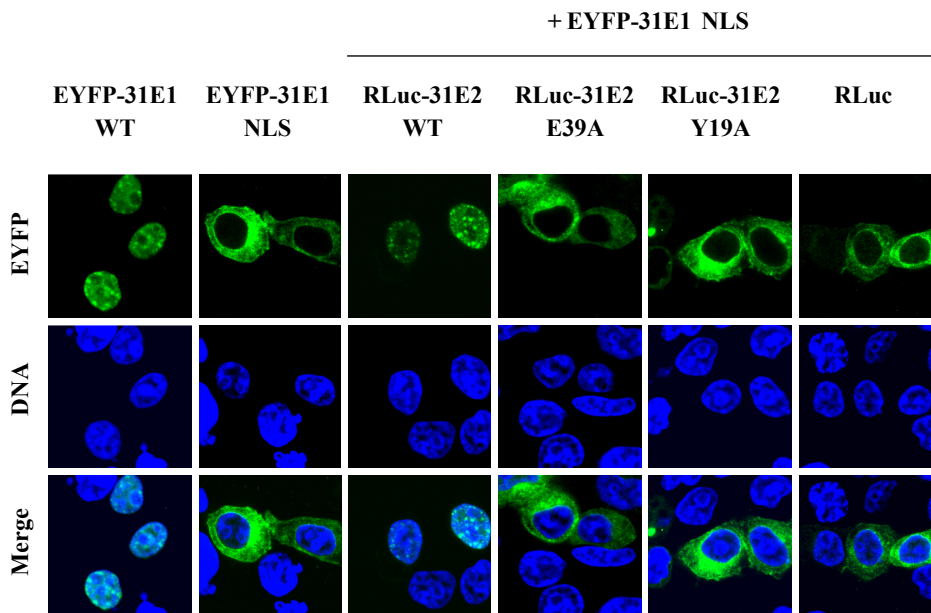
Figure 10

SUPPLEMENTARY FIGURES

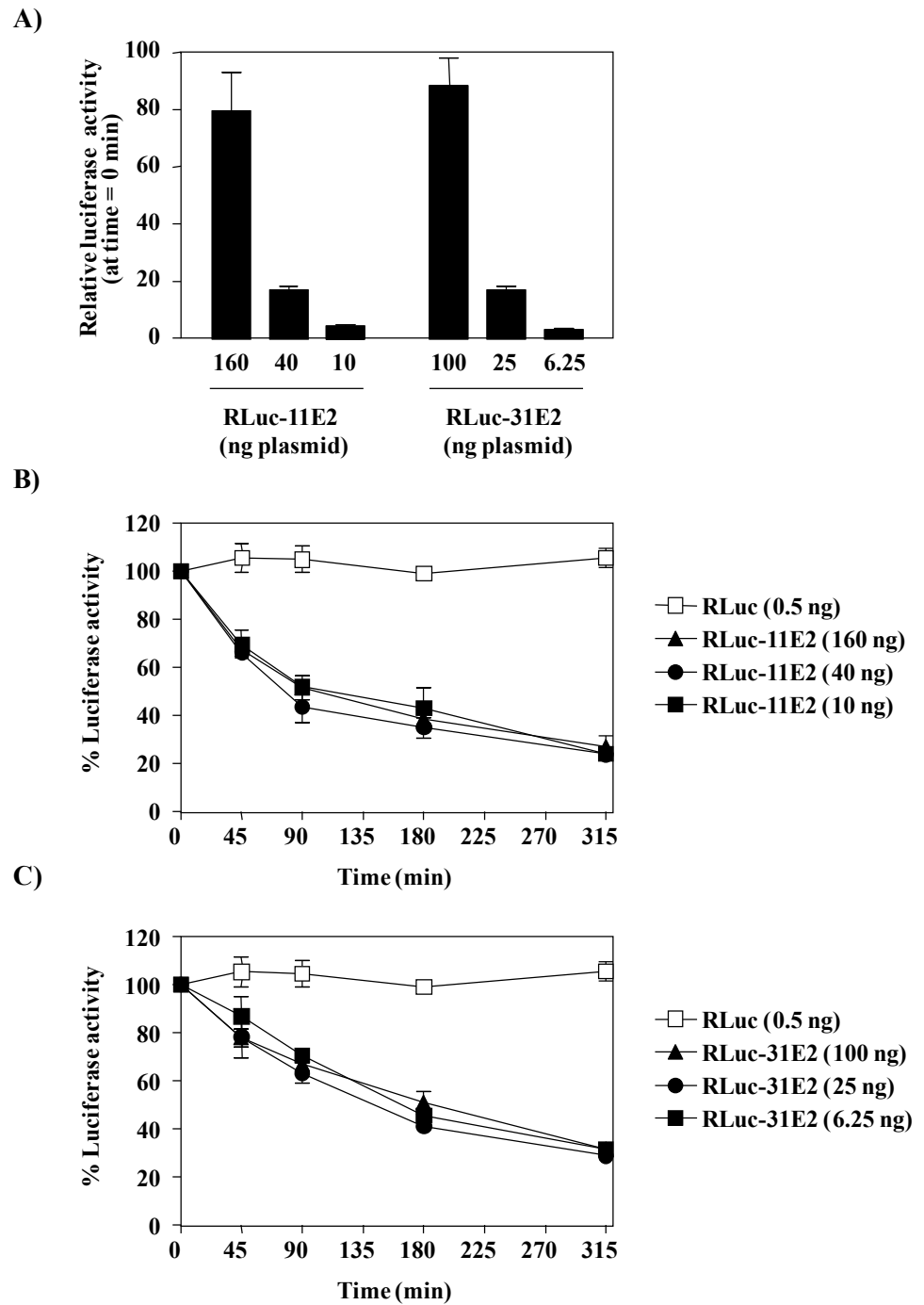
A)



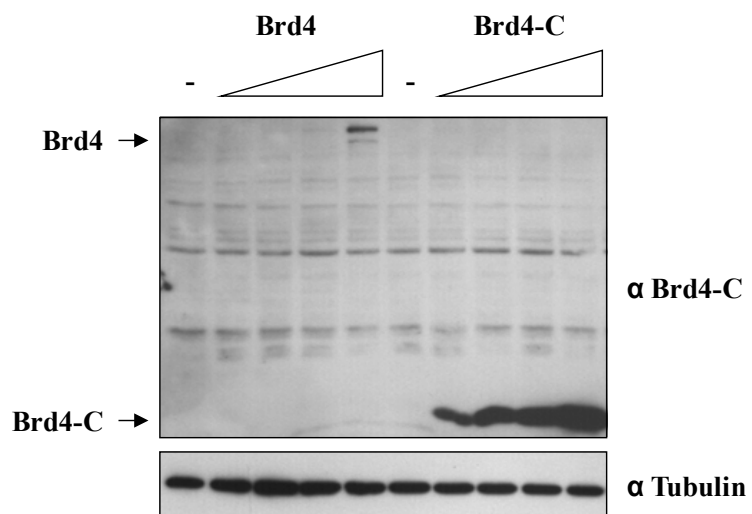
B)



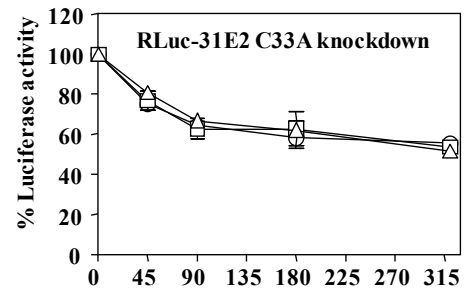
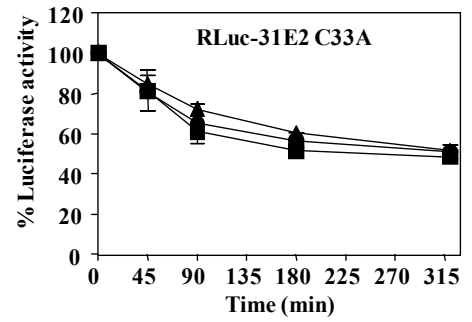
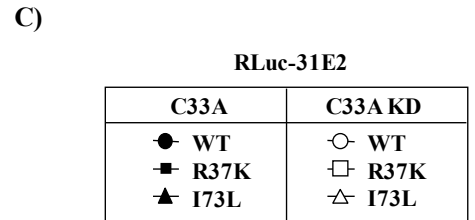
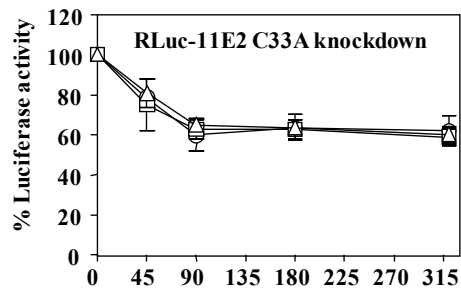
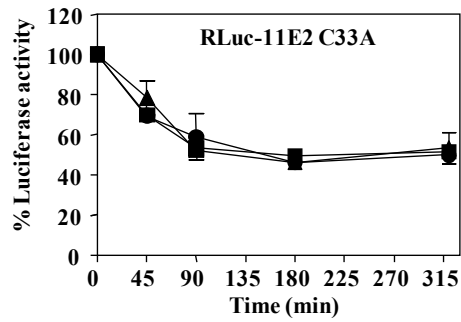
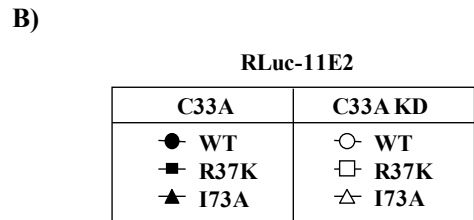
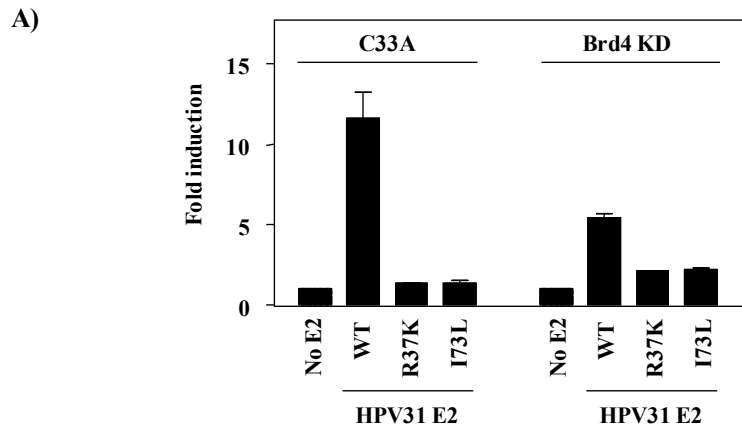
Supplementary Figure 1



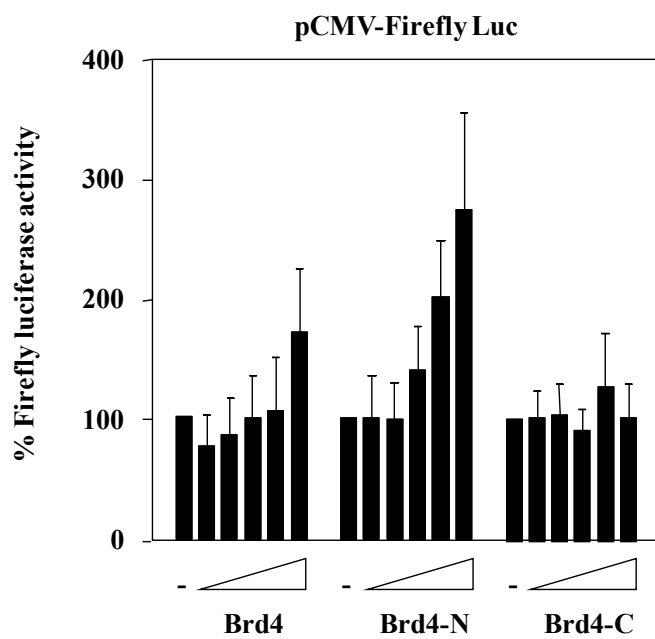
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

Bibliographie

Abbate, E.A., Berger, J.M., Botchan, M.R., 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* 18, 1981-1996.

Abbate, E.A., Voitenleitner, C., Botchan, M.R., 2006. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 24, 877-889.

Abroi, A., Ilves, I., Kivi, S., Ustav, M., 2004. Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol* 78, 2100-2113.

Abroi, A., Kurg, R., Ustav, M., 1996. Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* 70, 6169-6179.

Ai, W., Narahari, J., Roman, A., 2000. Yin yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J Virol* 74, 5198-5205.

Ai, W., Toussaint, E., Roman, A., 1999. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J Virol* 73, 4220-4229.

Akgul, B., Garcia-Escudero, R., Ekechi, C., Steger, G., Navsaria, H., Pfister, H., Storey, A., 2011. The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures. *Med Microbiol Immunol* 200, 127-135.

Allikas, A., Ord, D., Kurg, R., Kivi, S., Ustav, M., 2001. Roles of the hinge region and the DNA binding domain of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein in initiation of DNA replication. *Virus Res* 75, 95-106.

Alphs, H.H., Gambhira, R., Karanam, B., Roberts, J.N., Jagu, S., Schiller, J.T., Zeng, W., Jackson, D.C., Roden, R.B., 2008. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5850-5855.

Amin, A.A., Titolo, S., Pelletier, A., Fink, D., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272, 137-150.

Amine, A., Rivera, S., Opolon, P., Dekkal, M., Biard, D.S., Bouamar, H., Louache, F., McKay, M.J., Bourhis, J., Deutsch, E., Vozenin-Brotans, M.C., 2009. Novel anti-metastatic

action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells. *PLoS One* 4, e5018.

Ammermann, I., Bruckner, M., Matthes, F., Iftner, T., Stubenrauch, F., 2008. Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules. *J Virol* 82, 5127-5136.

Andrei, G., Snoeck, R., Schols, D., De Clercq, E., 2000. Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells. *Oncol Res* 12, 397-408.

Androphy, E.J., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1987. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325, 70-73.

Antson, A.A., Burns, J.E., Moroz, O.V., Scott, D.J., Sanders, C.M., Bronstein, I.B., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Maitland, N.J., 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403, 805-809.

Apt, D., Watts, R.M., Suske, G., Bernard, H.U., 1996. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 224, 281-291.

Arbeit, J.M., Howley, P.M., Hanahan, D., 1996. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2930-2935.

Ashrafi, G.H., Brown, D.R., Fife, K.H., Campo, M.S., 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 120, 208-211.

Asselineau, D., Prunieras, M., 1984. Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br J Dermatol* 111 Suppl 27, 219-222.

Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., Brown, J.C., 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60, 1445-1456.

Barbosa, M.S., Wettstein, F.O., 1988. E2 of cottontail rabbit papillomavirus is a nuclear phosphoprotein translated from an mRNA encoding multiple open reading frames. *J Virol* 62, 3242-3249.

Barnett, A.A., Haller, J.C., Cairnduff, F., Lane, G., Brown, S.B., Roberts, D.J., 2003. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 103, 829-832.

Baseman, J.G., Koutsky, L.A., 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S16-24.

Bastien, N., McBride, A.A., 2000. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 270, 124-134.

Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K., McBride, A.A., 2005. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* 79, 4806-4818.

Bedrosian, C.L., Bastia, D., 1990. The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* 174, 557-575.

Bellanger, S., Blachon, S., Mechali, F., Bonne-Andrea, C., Thierry, F., 2005. High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 4, 1608-1615.

Bellanger, S., Demeret, C., Goyat, S., Thierry, F., 2001. Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol* 75, 7244-7251.

Bellanger, S., Tan, C.L., Nei, W., He, P.P., Thierry, F., 2010. The human papillomavirus type 18 E2 protein is a cell cycle-dependent target of the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *J Virol* 84, 437-444.

Bellanger, S., Tan, C.L., Xue, Y.Z., Teissier, S., Thierry, F., 2011. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res* 1, 373-389.

Benson, J.D., Howley, P.M., 1995. Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *J Virol* 69, 4364-4372.

Benson, J.D., Lawande, R., Howley, P.M., 1997. Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol* 71, 8041-8047.

Berkhout, R.J., Tieben, L.M., Smits, H.L., Bavinck, J.N., Vermeer, B.J., ter Schegget, J., 1995. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 33, 690-695.

Bermudez-Morales, V.H., Gutierrez, L.X., Alcocer-Gonzalez, J.M., Burguete, A., Madrid-Marina, V., 2008. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 26, 1037-1043.

Bermudez-Morales, V.H., Peralta-Zaragoza, O., Alcocer-Gonzalez, J.M., Moreno, J., Madrid-Marina, V., 2011. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol Med Report* 4, 369-375.

Bernard, B.A., Bailly, C., Lenoir, M.C., Darmon, M., Thierry, F., Yaniv, M., 1989. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 63, 4317-4324.

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

Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., de Villiers, E.M., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.

Bharti, A.C., Shukla, S., Mahata, S., Hedau, S., Das, B.C., 2009. Anti-human papillomavirus therapeutics: facts & future. *Indian J Med Res* 130, 296-310.

Blachon, S., Bellanger, S., Demeret, C., Thierry, F., 2005. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* 280, 36088-36098.

Black, P.H., Hartley, J.W., Rowe, W.P., Huebner, R.J., 1963. Transformation of Bovine Tissue Culture Cells by Bovine Papilloma Virus. *Nature* 199, 1016-1018.

Blakaj, D.M., Fernandez-Fuentes, N., Chen, Z., Hegde, R., Fiser, A., Burk, R.D., Brenowitz, M., 2009. Evolutionary and biophysical relationships among the papillomavirus E2 proteins. *Front Biosci* 14, 900-917.

Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Furey, W., Jr., Edwards, A.M., Frappier, L., 1995. Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1. *Cell* 83, 39-46.

Boner, W., Morgan, I.M., 2002. Novel cellular interacting partners of the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2. *Virus Res* 90, 113-118.

Boner, W., Taylor, E.R., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M.S., Morgan, I.M., 2002. A Functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem* 277, 22297-22303.

- Bonne-Andrea, C., Tillier, F., McShan, G.D., Wilson, V.G., Clertant, P., 1997. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol* 71, 6805-6815.
- Booy, F.P., Roden, R.B., Greenstone, H.L., Schiller, J.T., Trus, B.L., 1998. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. *J Mol Biol* 281, 95-106.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., Campo, M.S., Venuti, A., 2010. 1st International Workshop on Papillomavirus E5 Oncogene-a report. *Virology* 408, 135-137.
- Bosch, F.X., de Sanjose, S., 2007. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 23, 213-227.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V., 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55, 244-265.
- Bousarghin, L., Touze, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiau, P., Gaitan, J., Jourdan, M.L., Sizaret, P.Y., Coursaget, P.L., 2009. Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol Cancer Ther* 8, 357-365.
- Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P.Y., Coursaget, P., 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* 77, 3846-3850.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.M., Storey, A., Banks, L., 1994. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 203, 73-80.
- Bream, G.L., Ohmstede, C.A., Phelps, W.C., 1993. Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J Virol* 67, 2655-2663.
- Breiding, D.E., Grossel, M.J., Androphy, E.J., 1996. Genetic analysis of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activation domain. *Virology* 221, 34-43.
- Breiding, D.E., Sverdrup, F., Grossel, M.J., Moscufo, N., Boonchai, W., Androphy, E.J., 1997. Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain. *Mol Cell Biol* 17, 7208-7219.
- Brokaw, J.L., Blanco, M., McBride, A.A., 1996. Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J Virol* 70, 23-29.
- Brown, C., Kowalczyk, A.M., Taylor, E.R., Morgan, I.M., Gaston, K., 2008. P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virol J* 5, 5.

- Bryan, J.T., Brown, D.R., 2000. Association of the human papillomavirus type 11 E1(E4) protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* 277, 262-269.
- Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., Trus, B.L., 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82, 5190-5197.
- Bussiere, D.E., Kong, X., Egan, D.A., Walter, K., Holzman, T.F., Lindh, F., Robins, T., Giranda, V.L., 1998. Structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus serotype 31 at 2.4 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 1367-1376.
- Campo, M.S., Grindlay, G.J., O'Neil, B.W., Chandrachud, L.M., McGarvie, G.M., Jarrett, W.F., 1993. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J Gen Virol* 74 (Pt 6), 945-953.
- Campo, M.S., O'Neil, B.W., Grindlay, G.J., Curtis, F., Knowles, G., Chandrachud, L., 1997. A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology* 234, 261-266.
- Cardenas-Mora, J., Spindler, J.E., Jang, M.K., McBride, A.A., 2008. Dimerization of the papillomavirus E2 protein is required for efficient mitotic chromosome association and Brd4 binding. *J Virol* 82, 7298-7305.
- Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Munoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., Peeling, R.W., Ashley, R., Smith, J.S., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Bosch, F.X., 2006. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 98, 303-315.
- Centeno, F., Ramirez-Salazar, E., Garcia-Villa, E., Gariglio, P., Garrido, E., 2008. TAF1 interacts with and modulates human papillomavirus 16 E2-dependent transcriptional regulation. *Intervirology* 51, 137-143.
- Cha, S., Seo, T., 2011. hSNF5 Is Required for Human Papillomavirus E2-Driven Transcriptional Activation and DNA Replication. *Intervirology* 54, 66-77.
- Chang, S.W., Tsao, Y.P., Lin, C.Y., Chen, S.L., 2011. NRIP, a novel calmodulin binding protein, activates calcineurin to dephosphorylate human papillomavirus E2 protein. *J Virol* 85, 6750-6763.
- Chellappan, S., Kraus, V.B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P.M., Phelps, W.C., Nevins, J.R., 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, 4549-4553.

Chen, G., Stenlund, A., 2001. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *J Virol* 75, 292-302.

Chiang, C.M., Dong, G., Broker, T.R., Chow, L.T., 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* 66, 5224-5231.

Choe, J., Vaillancourt, P., Stenlund, A., Botchan, M., 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* 63, 1743-1755.

Cirelli, R., Tyring, S.K., 1994. Interferons in human papillomavirus infections. *Antiviral Res* 24, 191-204.

Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M.L., Stefanon, B., Venzon, D.J., Shearer, G.M., De Palo, G., Clerici, E., 1997. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89, 245-250.

Clifford, G.M., Rana, R.K., Franceschi, S., Smith, J.S., Gough, G., Pimenta, J.M., 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1157-1164.

Clifford, G.M., Smith, J.S., Plummer, M., Munoz, N., Franceschi, S., 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73.

Clower, R.V., Fisk, J.C., Melendy, T., 2006a. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 80, 1584-1587.

Clower, R.V., Hu, Y., Melendy, T., 2006b. Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology* 348, 13-18.

Collier, B., Oberg, D., Zhao, X., Schwartz, S., 2002. Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 L1 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells. *J Virol* 76, 2739-2752.

Combata, A.L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P.Y., Munoz, N., Coursaget, P., 2001. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 204, 183-188.

Conger, K.L., Liu, J.S., Kuo, S.R., Chow, L.T., Wang, T.S., 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274, 2696-2705.

Conrad, M., Bubb, V.J., Schlegel, R., 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67, 6170-6178.

Cooper, C.S., Upmeyer, S.N., Winokur, P.L., 1998. Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions. *Virology* 241, 312-322.

Coremans, G., Snoeck, R., 2009. Cidofovir: clinical experience and future perspectives on an acyclic nucleoside phosphonate analog of cytosine in the treatment of refractory and premalignant HPV-associated anal lesions. *Expert Opin Pharmacother* 10, 1343-1352.

Corina, K., Grossman, S.R., Barsoum, J., Prakash, S.S., Androphy, E.J., Pepinsky, R.B., 1993. The tryptophan bridge is a critical feature of the papillomavirus E2 DNA binding domain. *Virology* 197, 391-396.

Cote-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D'Abramo, C.M., Lehoux, M., Joubert, S., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., Archambault, J., 2008. Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J Virol* 82, 1271-1283.

Crook, T., Tidy, J.A., Vousden, K.H., 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67, 547-556.

Czelusta, A.J., Evans, T., Arany, I., Tyring, S.K., 1999. A guide to immunotherapy of genital warts: focus on interferon and imiquimod. *BioDrugs* 11, 319-332.

Dao, L.D., Duffy, A., Van Tine, B.A., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Broker, T.R., Chow, L.T., 2006. Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* 80, 4792-4800.

Darvas, K., Rosenberger, S., Brenner, D., Fritsch, C., Gmelin, N., Krammer, P.H., Rosl, F., 2010. Histone deacetylase inhibitor-induced sensitization to TNFalpha/TRAIL-mediated apoptosis in cervical carcinoma cells is dependent on HPV oncogene expression. *Int J Cancer* 127, 1384-1392.

Daulny, A., Tansey, W.P., 2009. Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair (Amst)* 8, 444-448.

Davy, C., McIntosh, P., Jackson, D.J., Sorathia, R., Miell, M., Wang, Q., Khan, J., Soneji, Y., Doorbar, J., 2009. A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1--E4 proteins leads to stabilization of E2. *Virology* 394, 266-275.

Davy, C.E., Jackson, D.J., Raj, K., Peh, W.L., Southern, S.A., Das, P., Sorathia, R., Laskey, P., Middleton, K., Nakahara, T., Wang, Q., Masterson, P.J., Lambert, P.F., Cuthill, S., Millar, J.B., Doorbar, J., 2005. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* 79, 3998-4011.

Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14252-14257.

Day, P.M., Gambhira, R., Roden, R.B., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2008a. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by 12 cross-neutralizing and 11 type-specific antibodies. *J Virol* 82, 4638-4646.

Day, P.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307, 1-11.

Day, P.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2008b. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* 82, 12565-12568.

Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72, 142-150.

de Prat-Gay, G., Nadra, A.D., Corrales-Izquierdo, F.J., Alonso, L.G., Ferreira, D.U., Mok, Y.K., 2005. The folding mechanism of a dimeric beta-barrel domain. *J Mol Biol* 351, 672-682.

de Villiers, E.M., Lavergne, D., McLaren, K., Benton, E.C., 1997. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 73, 356-361.

DeGregori, J., Johnson, D.G., 2006. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 6, 739-748.

del Mar Pena, L.M., Laimins, L.A., 2001. Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J Virol* 75, 10005-10013.

- DeMasi, J., Chao, M.C., Kumar, A.S., Howley, P.M., 2007. Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *J Virol* 81, 9419-9425.
- Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., Thierry, F., 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 71, 9343-9349.
- Demeret, C., Garcia-Carranca, A., Thierry, F., 2003. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22, 168-175.
- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., Thierry, F., 1998. The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* 242, 378-386.
- Demeret, C., Yaniv, M., Thierry, F., 1994. The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* 68, 7075-7082.
- Deng, W., Jin, G., Lin, B.Y., Van Tine, B.A., Broker, T.R., Chow, L.T., 2003. mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* 77, 10213-10226.
- Deng, W., Lin, B.Y., Jin, G., Wheeler, C.G., Ma, T., Harper, J.W., Broker, T.R., Chow, L.T., 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 78, 13954-13965.
- Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., Thierry, F., 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* 16, 504-514.
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., Thierry, F., 1999. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* 18, 4538-4545.
- Devaiah, B.N., Lewis, B.A., Cherman, N., Hewitt, M.C., Albrecht, B.K., Robey, P.G., Ozato, K., Sims, R.J., 3rd, Singer, D.S., 2012. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6927-6932.
- Devaiah, B.N., Singer, D.S., 2012. Cross-talk among RNA polymerase II kinases modulates C-terminal domain phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 38755-38766.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., Ozato, K., 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8758-8763.

Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J., Ozato, K., 2009. Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* 20, 4899-4909.

Diaz-Benitez, C.E., Navarro-Fuentes, K.R., Flores-Sosa, J.A., Juarez-Diaz, J., Uribe-Salas, F.J., Roman-Basaure, E., Gonzalez-Mena, L.E., Alonso de Ruiz, P., Lopez-Estrada, G., Lagunas-Martinez, A., Bermudez-Morales, V.H., Alcocer-Gonzalez, J.M., Martinez-Barnetche, J., Hernandez-Pando, R., Rosenstein, Y., Moreno, J., Madrid-Marina, V., 2009. CD3zeta expression and T cell proliferation are inhibited by TGF-beta1 and IL-10 in cervical cancer patients. *J Clin Immunol* 29, 532-544.

Divya, C.S., Pillai, M.R., 2006. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol Carcinog* 45, 320-332.

Dixon, E.P., Pahel, G.L., Rocque, W.J., Barnes, J.A., Lobe, D.C., Hanlon, M.H., Alexander, K.A., Chao, S.F., Lindley, K., Phelps, W.C., 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270, 345-357.

Donaldson, M.M., Boner, W., Morgan, I.M., 2007. TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *J Virol* 81, 4338-4342.

Dong, G., Broker, T.R., Chow, L.T., 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 68, 1115-1127.

Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R.J., Gallimore, P.H., 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J* 5, 355-362.

Doorbar, J., Elston, R.C., Naphine, S., Raj, K., Medcalf, E., Jackson, D., Coleman, N., Griffin, H.M., Masterson, P., Stacey, S., Mengistu, Y., Dunlop, J., 2000. The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* 74, 10081-10095.

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., Crawford, L., 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.

Dormann, D., Madl, T., Valori, C.F., Bentmann, E., Tahirovic, S., Abou-Ajram, C., Kremmer, E., Ansorge, O., Mackenzie, I.R., Neumann, M., Haass, C., 2012. Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J* 31, 4258-4275.

- Dostatni, N., Lambert, P.F., Sousa, R., Ham, J., Howley, P.M., Yaniv, M., 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 5, 1657-1671.
- Dostatni, N., Thierry, F., Yaniv, M., 1988. A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J* 7, 3807-3816.
- Dowhanick, J.J., McBride, A.A., Howley, P.M., 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 69, 7791-7799.
- Dreier, K., Scheiden, R., Lener, B., Eehalt, D., Pircher, H., Muller-Holzner, E., Rostek, U., Kaiser, A., Fiedler, M., Ressler, S., Lechner, S., Widschwendter, A., Even, J., Capesius, C., Jansen-Durr, P., Zwerschke, W., 2011. Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. *Virology* 409, 54-68.
- Duensing, S., Munger, K., 2003a. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res* 5, 383-391.
- Duensing, S., Munger, K., 2003b. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol* 77, 12331-12335.
- El-Sherif, A.M., Seth, R., Tighe, P.J., Jenkins, D., 2001. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol* 195, 179-185.
- Enemark, E.J., Joshua-Tor, L., 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* 442, 270-275.
- Enzenauer, C., Mengus, G., Lavigne, A., Davidson, I., Pfister, H., May, M., 1998. Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology* 41, 80-90.
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., McMillan, N.A., 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71, 2449-2456.
- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K., 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830.
- Favre-Bonvin, A., Reynaud, C., Kretz-Remy, C., Jalinot, P., 2005. Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in

transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol* 79, 4229-4237.

Feeney, K.M., Saade, A., Okrasa, K., Parish, J.L., 2011. In vivo analysis of the cell cycle dependent association of the bovine papillomavirus E2 protein and ChlR1. *Virology* 414, 1-9.

Fehrmann, F., Klumpp, D.J., Laimins, L.A., 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 77, 2819-2831.

Ferguson, M.K., Botchan, M.R., 1996. Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J Virol* 70, 4193-4199.

Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.

Fertey, J., Ammermann, I., Winkler, M., Stoger, R., Iftner, T., Stubenrauch, F., 2010. Interaction of the papillomavirus E8--E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* 84, 9505-9515.

Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., Garcea, R.L., 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 77, 4818-4826.

Finzer, P., Krueger, A., Stohr, M., Brenner, D., Soto, U., Kuntzen, C., Krammer, P.H., Rosl, F., 2004. HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway. *Oncogene* 23, 4807-4817.

Finzer, P., Kuntzen, C., Soto, U., zur Hausen, H., Rosl, F., 2001. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene* 20, 4768-4776.

Finzer, P., Stohr, M., Seibert, N., Rosl, F., 2003. Phenylbutyrate inhibits growth of cervical carcinoma cells independent of HPV type and copy number. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 107-113.

Fisher, C., Garner-Hamrick, P., Singh, M., Crowley, K., Schweitzer, B., Woodard, S., Bashkin, J., 2006. Targeting of HPV31 Episomal DNA with Compounds Designed to Bind the Origin of Replication (ori). *Antiviral Research* 70, 34, abstract 35.

Florence, B., Faller, D.V., 2001. You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 6, D1008-1018.

Florin, L., Becker, K.A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R.E., Sapp, M., 2006. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J Virol* 80, 6691-6696.

Fournier, N., Raj, K., Saudan, P., Utzig, S., Sahli, R., Simanis, V., Beard, P., 1999. Expression of human papillomavirus 16 E2 protein in *Schizosaccharomyces pombe* delays the initiation of mitosis. *Oncogene* 18, 4015-4021.

Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., 2007. Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses. *Antivir Ther* 12, 431-451.

Fradet-Turcotte, A., Brault, K., Titolo, S., Howley, P.M., Archambault, J., 2009. Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. *Virology* 395, 190-201.

Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L.A., Archambault, J., 2010a. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol* 84, 11747-11760.

Fradet-Turcotte, A., Morin, G., Lehoux, M., Bullock, P.A., Archambault, J., 2010b. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* 399, 65-76.

Frattoni, M.G., Hurst, S.D., Lim, H.B., Swaminathan, S., Laimins, L.A., 1997. Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* 16, 318-331.

Frattoni, M.G., Laimins, L.A., 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12398-12402.

Frazer, I.H., 2009. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 384, 410-414.

Fronz, K., Guttinger, S., Burkert, K., Kuhn, U., Stohr, N., Schierhorn, A., Wahle, E., 2011. Arginine methylation of the nuclear poly(a) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *J Biol Chem* 286, 32986-32994.

Gagnon, D., Joubert, S., Senechal, H., Fradet-Turcotte, A., Torre, S., Archambault, J., 2009. Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol* 83, 4127-4139.

Gammoh, N., Gardiol, D., Massimi, P., Banks, L., 2009a. The Mdm2 ubiquitin ligase enhances transcriptional activity of human papillomavirus E2. *J Virol* 83, 1538-1543.

Gammoh, N., Grm, H.S., Massimi, P., Banks, L., 2006. Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J Virol* 80, 1787-1797.

Gammoh, N., Isaacson, E., Tomaic, V., Jackson, D.J., Doorbar, J., Banks, L., 2009b. Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene* 28, 2299-2304.

Garcia-Alai, M.M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D.E., McBride, A.A., Paci, M., Cicero, D.O., de Prat-Gay, G., 2006. Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure* 14, 309-319.

Garland, S.M., 2003. Imiquimod. *Curr Opin Infect Dis* 16, 85-89.

Garland, S.M., Waddell, R., Mindel, A., Denham, I.M., McCloskey, J.C., 2006. An open-label phase II pilot study investigating the optimal duration of imiquimod 5% cream for the treatment of external genital warts in women. *Int J STD AIDS* 17, 448-452.

Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C., Lambert, P.F., 2003. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 77, 2832-2842.

Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway, D.A., 2004. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18, 2269-2282.

Giri, I., Yaniv, M., 1988. Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7, 2823-2829.

Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75, 1565-1570.

Glaunsinger, B.A., Lee, S.S., Thomas, M., Banks, L., Javier, R., 2000. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 19, 5270-5280.

Goodwin, E.C., DiMaio, D., 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12513-12518.

Goodwin, E.C., Naeger, L.K., Breiding, D.E., Androphy, E.J., DiMaio, D., 1998. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 72, 3925-3934.

Goodwin, E.C., Yang, E., Lee, C.J., Lee, H.W., DiMaio, D., Hwang, E.S., 2000. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10978-10983.

Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., Lopez, R., 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38, W695-699.

Grm, H.S., Massimi, P., Gammoh, N., Banks, L., 2005. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 24, 5149-5164.

Grossel, M.J., Sverdrup, F., Breiding, D.E., Androphy, E.J., 1996. Transcriptional activation function is not required for stimulation of DNA replication by bovine papillomavirus type 1 E2. *J Virol* 70, 7264-7269.

Gu, Z., Matlashewski, G., 1995. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 69, 8051-8056.

Hadaschik, D., Hinterkeuser, K., Oldak, M., Pfister, H.J., Smola-Hess, S., 2003. The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol* 77, 5253-5265.

Hagensee, M.E., Yaegashi, N., Galloway, D.A., 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 67, 315-322.

Han, Y., Loo, Y.M., Militello, K.T., Melendy, T., 1999. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* 73, 4899-4907.

Harris, A.J., Purdie, K., Leigh, I.M., Proby, C., Burge, S., 1997. A novel human papillomavirus identified in epidermodysplasia verruciformis. *Br J Dermatol* 136, 587-591.

Harris, S.F., Botchan, M.R., 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284, 1673-1677.

Harry, J.B., Wettstein, F.O., 1996. Transforming properties of the cottontail rabbit papillomavirus oncoproteins Le6 and SE6 and of the E8 protein. *J Virol* 70, 3355-3362.

Harwood, C.A., Proby, C.M., 2002. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 15, 101-114.

Hashida, T., Yasumoto, S., 1991. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol* 72 (Pt 7), 1569-1577.

Hebner, C.M., Laimins, L.A., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16, 83-97.

Hegde, R.S., 2002. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 343-360.

Hegde, R.S., Androphy, E.J., 1998. Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism. *J Mol Biol* 284, 1479-1489.

Hegde, R.S., Grossman, S.R., Laimins, L.A., Sigler, P.B., 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359, 505-512.

Hegde, R.S., Voigt, S., Lingappa, V.R., 1998. Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 2, 85-91.

Heino, P., Zhou, J., Lambert, P.F., 2000. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology* 276, 304-314.

Hernandez-Ramon, E.E., Burns, J.E., Zhang, W., Walker, H.F., Allen, S., Antson, A.A., Maitland, N.J., 2008. Dimerization of the human papillomavirus type 16 E2 N terminus results in DNA looping within the upstream regulatory region. *J Virol* 82, 4853-4861.

Hindmarsh, P.L., Laimins, L.A., 2007. Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virol J* 4, 19.

Hines, C.S., Meghoo, C., Shetty, S., Biburger, M., Brenowitz, M., Hegde, R.S., 1998. DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *J Mol Biol* 276, 809-818.

Hirota, Y., Lahti, J.M., 2000. Characterization of the enzymatic activity of hChIR1, a novel human DNA helicase. *Nucleic Acids Res* 28, 917-924.

Holmgren, S.C., Patterson, N.A., Ozbun, M.A., Lambert, P.F., 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* 79, 3938-3948.

Hoskins, E.E., Gunawardena, R.W., Habash, K.B., Wise-Draper, T.M., Jansen, M., Knudsen, E.S., Wells, S.I., 2008. Coordinate regulation of Fanconi anemia gene expression occurs through the Rb/E2F pathway. *Oncogene* 27, 4798-4808.

Howie, H.L., Katzenellenbogen, R.A., Galloway, D.A., 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384, 324-334.

Hsu, C.Y., Mechali, F., Bonne-Andrea, C., 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* 81, 384-394.

Hubbert, N.L., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Androphy, E.J., 1988. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5864-5868.

Hughes, F.J., Romanos, M.A., 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 21, 5817-5823.

Hummel, M., Hudson, J.B., Laimins, L.A., 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 66, 6070-6080.

Ilves, I., Kivi, S., Ustav, M., 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* 73, 4404-4412.

Ilves, I., Maemets, K., Silla, T., Janikson, K., Ustav, M., 2006. Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle. *J Virol* 80, 3660-3665.

Jablonska, S., Majewski, S., Obalek, S., Orth, G., 1997. Cutaneous warts. *Clin Dermatol* 15, 309-319.

Jang, M.K., Kwon, D., McBride, A.A., 2009. Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin. *J Virol* 83, 2592-2600.

Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., Ozato, K., 2005. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19, 523-534.

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

Johnson, J.A., Gangemi, J.D., 1999. Selective inhibition of human papillomavirus-induced cell proliferation by (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1198-1205.

Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2009. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83, 2067-2074.

Jones, D.L., Alani, R.M., Munger, K., 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11, 2101-2111.

Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., Keller, P.M., 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 5810-5822.

Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., Ustav, M., 2009. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384, 360-368.

Kamangar, F., Dores, G.M., Anderson, W.F., 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24, 2137-2150.

Kamper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., Sapp, M., 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* 80, 759-768.

Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., Schiffman, M., 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 97, 1072-1079.

Kim, J., Lee, D., Gwan Hwang, S., Hwang, E.S., Choe, J., 2003a. BRCA1 associates with human papillomavirus type 18 E2 and stimulates E2-dependent transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 1008-1016.

Kim, K., Garner-Hamrick, P.A., Fisher, C., Lee, D., Lambert, P.F., 2003b. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 77, 12450-12459.

Kim, S.S., Tam, J.K., Wang, A.F., Hegde, R.S., 2000. The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins. *J Biol Chem* 275, 31245-31254.

Kines, R.C., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2009. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20458-20463.

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12180-12184.

Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67, 6929-6936.

Klingelhutz, A.J., Foster, S.A., McDougall, J.K., 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.

Klucevsek, K., Wertz, M., Lucchi, J., Leszczynski, A., Moroianu, J., 2007. Characterization of the nuclear localization signal of high risk HPV16 E2 protein. *Virology* 360, 191-198.

Knappe, M., Bodevin, S., Selinka, H.C., Spillmann, D., Streeck, R.E., Chen, X.S., Lindahl, U., Sapp, M., 2007. Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 282, 27913-27922.

Knight, G.L., Pugh, A.G., Yates, E., Bell, I., Wilson, R., Moody, C.A., Laimins, L.A., Roberts, S., 2011. A cyclin-binding motif in human papillomavirus type 18 (HPV18) E1^{E4} is necessary for association with CDK-cyclin complexes and G2/M cell cycle arrest of keratinocytes, but is not required for differentiation-dependent viral genome amplification or L1 capsid protein expression. *Virology* 412, 196-210.

Knight, J.D., Li, R., Botchan, M., 1991. The activation domain of the bovine papillomavirus E2 protein mediates association of DNA-bound dimers to form DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3204-3208.

Komander, D., Clague, M.J., Urbe, S., 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 550-563.

Koutsky, L.A., Galloway, D.A., Holmes, K.K., 1988. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 10, 122-163.

Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., Franceschi, S., 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 467-475.

Kube, D., Platzer, C., von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M., Tesch, H., 1995. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 7, 1-7.

Kukimoto, I., Kanda, T., 2001. Displacement of YY1 by differentiation-specific transcription factor hSkn-1a activates the P(670) promoter of human papillomavirus type 16. *J Virol* 75, 9302-9311.

Kukimoto, I., Takeuchi, T., Kanda, T., 2006. CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16. *Virology* 346, 98-107.

Kumar, R.A., Naidu, S.R., Wang, X., Imbalzano, A.N., Androphy, E.J., 2007. Interaction of papillomavirus E2 protein with the Brm chromatin remodeling complex leads to enhanced transcriptional activation. *J Virol* 81, 2213-2220.

Kurg, R., Uusen, P., Sepp, T., Sepp, M., Abroi, A., Ustav, M., 2009. Bovine papillomavirus type 1 E2 protein heterodimer is functional in papillomavirus DNA replication in vivo. *Virology* 386, 353-359.

Kurg, R., Uusen, P., Vosa, L., Ustav, M., 2010. Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for long-term maintenance of virus genome. *Virology* 408, 159-166.

Lace, M.J., Ushikai, M., Yamakawa, Y., Anson, J.R., Ishiji, T., Turek, L.P., Haugen, T.H., 2012. The truncated C-terminal E2 (E2-TR) protein of bovine papillomavirus (BPV) type-1 is a transactivator that modulates transcription in vivo and in vitro in a manner distinct from the E2-TA and E8^{E2} gene products. *Virology* 429, 99-111.

Lacey, C.J., 2005. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S82-90.

Lai, M.C., Teh, B.H., Tarn, W.Y., 1999. A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem* 274, 11832-11841.

Lambert, P.F., Hubbert, N.L., Howley, P.M., Schiller, J.T., 1989. Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 63, 3151-3154.

Lambert, P.F., Spalholz, B.A., Howley, P.M., 1987. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50, 69-78.

Law, M.F., Lowy, D.R., Dvoretzky, I., Howley, P.M., 1981. Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2727-2731.

Le Cann, P., Coursaget, P., Iochmann, S., Touze, A., 1994. Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett* 117, 269-274.

Lee, A.Y., Chiang, C.M., 2009. Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability. *J Biol Chem* 284, 2778-2786.

Lee, D., Hwang, S.G., Kim, J., Choe, J., 2002a. Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 277, 6483-6489.

Lee, D., Kim, J.W., Kim, K., Joe, C.O., Schreiber, V., Menissier-De Murcia, J., Choe, J., 2002b. Functional interaction between human papillomavirus type 18 E2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Oncogene* 21, 5877-5885.

Lee, D., Lee, B., Kim, J., Kim, D.W., Choe, J., 2000a. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem* 275, 7045-7051.

Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G.V., Choe, J., 1999. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* 399, 487-491.

Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., Javier, R.T., 2000b. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74, 9680-9693.

Lee, S.S., Weiss, R.S., Javier, R.T., 1997. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6670-6675.

Leemans, C.R., Braakhuis, B.J., Brakenhoff, R.H., 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 9-22.

Lehman, C.W., Botchan, M.R., 1998. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4338-4343.

Lehman, C.W., King, D.S., Botchan, M.R., 1997. A papillomavirus E2 phosphorylation mutant exhibits normal transient replication and transcription but is defective in transformation and plasmid retention. *J Virol* 71, 3652-3665.

- Lehoux, M., D'Abramo, C.M., Archambault, J., 2009. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* 12, 268-280.
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R., Botchan, M.R., 1991. Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65, 493-505.
- Li, X., Coffino, P., 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 70, 4509-4516.
- Lin, B.Y., Ma, T., Liu, J.S., Kuo, S.R., Jin, G., Broker, T.R., Harper, J.W., Chow, L.T., 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 275, 6167-6174.
- Lin, Z., Yemelyanova, A.V., Gambhira, R., Jagu, S., Meyers, C., Kimbauer, R., Ronnett, B.M., Gravitt, P.E., Roden, R.B., 2009. Expression pattern and subcellular localization of human papillomavirus minor capsid protein L2. *Am J Pathol* 174, 136-143.
- Lindelof, B., Sigurgeirsson, B., Gabel, H., Stern, R.S., 2000. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol* 143, 513-519.
- Liou, Y.C., Zhou, X.Z., Lu, K.P., 2011. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* 36, 501-514.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., Broker, T.R., Chow, L.T., 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 270, 27283-27291.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., Makhov, A.M., Cyr, D.M., Griffith, J.D., Broker, T.R., Chow, L.T., 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 273, 30704-30712.
- Longworth, M.S., Laimins, L.A., 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78, 3533-3541.
- Longworth, M.S., Wilson, R., Laimins, L.A., 2005. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 24, 1821-1830.
- Loo, Y.M., Melendy, T., 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78, 1605-1615.

Lu, J.Z., Sun, Y.N., Rose, R.C., Bonnef, W., McCance, D.J., 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 67, 7131-7139.

Lusky, M., Hurwitz, J., Seo, Y.S., 1994. The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8895-8899.

Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., Harper, J.W., 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 382-387.

Major, T., Szarka, K., Sziklai, I., Gergely, L., Czegledy, J., 2005. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol* 58, 51-55.

Marais, D., Gawarecki, D., Rutenberg, N., Allan, B., Ahmed, K., Altini, L., Cassim, N., Gopolang, F., Hoffman, M., Williamson, A.L., 2010. Carraguard, a vaginal microbicide, protects women against HPV infection, 26th International Papillomavirus Conference, Montreal, Canada.

Massimi, P., Banks, L., 2000. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* 276, 388-394.

Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V., Banks, L., 1999. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 18, 7748-7754.

Massimi, P., Shai, A., Lambert, P., Banks, L., 2008. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene* 27, 1800-1804.

Matangkasombut, O., Buratowski, S., 2003. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* 11, 353-363.

Maufort, J.P., Shai, A., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2010. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 70, 2924-2931.

Maufort, J.P., Williams, S.M., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2007. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res* 67, 6106-6112.

McBride, A.A., Bolen, J.B., Howley, P.M., 1989. Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 63, 5076-5085.

- McBride, A.A., Dlugosz, A., Baker, C.C., 2000. Production of infectious bovine papillomavirus from cloned viral DNA by using an organotypic raft/xenograft technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5534-5539.
- McBride, A.A., Howley, P.M., 1991. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* 65, 6528-6534.
- McBride, A.A., McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., 2004. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol* 12, 527-529.
- McBride, A.A., Romanczuk, H., Howley, P.M., 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266, 18411-18414.
- McIntosh, P.B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D.J., Griffin, H.M., Doorbar, J., 2010. E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* 123, 2810-2822.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.W., Munger, K., 2008. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol* 82, 8695-8705.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Munger, K., 2009. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384, 335-344.
- McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., Spindler, J.E., Mitra, R., McBride, A.A., 2006. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* 80, 9530-9543.
- Mochizuki, K., Nishiyama, A., Jang, M.K., Dey, A., Ghosh, A., Tamura, T., Natsume, H., Yao, H., Ozato, K., 2008. The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase. *J Biol Chem* 283, 9040-9048.
- Mok, Y.K., de Prat Gay, G., Butler, P.J., Bycroft, M., 1996. Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain. *Protein Sci* 5, 310-319.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2009. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog* 5, e1000605.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10, 550-560.

- Muller, A., Ritzkowsky, A., Steger, G., 2002. Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76, 11042-11053.
- Muller, H., Gissmann, L., 1978. *Mastomys natalensis* papilloma virus (MnPV), the causative agent of epithelial proliferations: characterization of the virus particle. *J Gen Virol* 41, 315-323.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., Huh, K., 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78, 11451-11460.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527.
- Muratani, M., Tansey, W.P., 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- Nadra, A.D., Eliseo, T., Mok, Y.K., Almeida, C.L., Bycroft, M., Paci, M., de Prat-Gay, G., Cicero, D.O., 2004. Solution structure of the HPV-16 E2 DNA binding domain, a transcriptional regulator with a dimeric beta-barrel fold. *J Biomol NMR* 30, 211-214.
- Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T., Torchia, J., 2007. The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol* 27, 120-134.
- Nakagawa, S., Huibregtse, J.M., 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20, 8244-8253.
- Nasseri, M., Hirochika, R., Broker, T.R., Chow, L.T., 1987. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* 159, 433-439.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., LeRoux, L., Lane, C., Bruya, K., Moroianu, J., 2000. Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* 79, 225-238.
- Nelson, L.M., Rose, R.C., Moroianu, J., 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 277, 23958-23964.
- Newhouse, C.D., Silverstein, S.J., 2001. Orientation of a novel DNA binding site affects human papillomavirus-mediated transcription and replication. *J Virol* 75, 1722-1735.

Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E., Lambert, P.F., 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77, 6957-6964.

Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, J.J., Frizzell, M.A., Howley, P.M., Sakai, H., 2000. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* 74, 3752-3760.

Nomine, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckere, F., Sibler, A.P., Desplancq, D., Atkinson, R.A., Weiss, E., Orfanoudakis, G., Kieffer, B., Trave, G., 2006. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 21, 665-678.

Oberg, D., Collier, B., Zhao, X., Schwartz, S., 2003. Mutational inactivation of two distinct negative RNA elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region induces production of high levels of L2 in human cells. *J Virol* 77, 11674-11684.

Okoye, A., Cordano, P., Taylor, E.R., Morgan, I.M., Everett, R., Campo, M.S., 2005. Human papillomavirus 16 L2 inhibits the transcriptional activation function, but not the DNA replication function, of HPV-16 E2. *Virus Res* 108, 1-14.

Oliveira, J.G., Colf, L.A., McBride, A.A., 2006. Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1047-1052.

Orth, G., 1987. Epidermodysplasia verruciformis, In N. P. Salzman and P. M. Howley (ed.), *The papovaviridae: the papillomaviruses*. Plenum Press, New York, NY., pp. p. 199–243.

Orth, G., 2005. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis in non-melanoma skin cancers: guilty or innocent? *J Invest Dermatol* 125, xii-xiii.

Ottinger, M., Christalla, T., Nathan, K., Brinkmann, M.M., Viejo-Borbolla, A., Schulz, T.F., 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. *J Virol* 80, 10772-10786.

Padlewska, K., Ramoz, N., Cassonnet, P., Riou, G., Barrois, M., Majewski, S., Croissant, O., Jablonska, S., Orth, G., 2001. Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 117, 935-942.

Parish, J.L., Bean, A.M., Park, R.B., Androphy, E.J., 2006a. ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell* 24, 867-876.

Parish, J.L., Kowalczyk, A., Chen, H.T., Roeder, G.E., Sessions, R., Buckle, M., Gaston, K., 2006b. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *J Virol* 80, 4580-4590.

Parish, J.L., Rosa, J., Wang, X., Lahti, J.M., Doxsey, S.J., Androphy, E.J., 2006c. The DNA helicase ChlR1 is required for sister chromatid cohesion in mammalian cells. *J Cell Sci* 119, 4857-4865.

Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M.R., Mohr, I.J., 1994. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8700-8704.

Park, R.B., Androphy, E.J., 2002. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* 76, 11359-11364.

Parkin, D.M., Bray, F., 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/11-25.

Partridge, J.M., Koutsky, L.A., 2006. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 6, 21-31.

Patterson, N.A., Smith, J.L., Ozbun, M.A., 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol* 79, 6838-6847.

Peh, W.L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W.J., Doorbar, J., 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* 76, 10401-10416.

Peng, Y.C., Breiding, D.E., Sverdrup, F., Richard, J., Androphy, E.J., 2000. AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J Virol* 74, 5872-5879.

Penrose, K.J., Garcia-Alai, M., de Prat-Gay, G., McBride, A.A., 2004. Casein Kinase II phosphorylation-induced conformational switch triggers degradation of the papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 279, 22430-22439.

Penrose, K.J., McBride, A.A., 2000. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 74, 6031-6038.

Pfefferle, R., Marcuzzi, G.P., Akgul, B., Kasper, H.U., Schulze, F., Haase, I., Wickenhauser, C., Pfister, H., 2008. The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol* 128, 2310-2315.

Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., Ustav, M., 1996. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 15, 1-11.

Pim, D., Banks, L., 1999. HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene* 18, 7403-7408.

Poddar, A., Reed, S.C., McPhillips, M.G., Spindler, J.E., McBride, A.A., 2009. The human papillomavirus type 8 E2 tethering protein targets the ribosomal DNA loci of host mitotic chromosomes. *J Virol* 83, 640-650.

Powell, M.L., Smith, J.A., Sowa, M.E., Harper, J.W., Iftner, T., Stubenrauch, F., Howley, P.M., 2010. NCoR1 mediates papillomavirus E8;E2C transcriptional repression. *J Virol* 84, 4451-4460.

Prakash, S.S., Grossman, S.R., Pepinsky, R.B., Laimins, L.A., Androphy, E.J., 1992. Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator. *Genes Dev* 6, 105-116.

Purdie, K.J., Suretheran, T., Sterling, J.C., Bell, L., McGregor, J.M., Proby, C.M., Harwood, C.A., Breuer, J., 2005. Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 125, 98-107.

Quinlan, E.J., Culleton, S.P., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Androphy, E.J., 2013. Acetylation of Conserved Lysines in Bovine Papillomavirus E2 by p300. *J Virol* 87, 1497-1507.

Rahman, S., Sowa, M.E., Ottinger, M., Smith, J.A., Shi, Y., Harper, J.W., Howley, P.M., 2011. The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol* 31, 2641-2652.

Ramoz, N., Rueda, L.A., Bouadjar, B., Montoya, L.S., Orth, G., Favre, M., 2002. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet* 32, 579-581.

Rangasamy, D., Wilson, V.G., 2000. Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* 275, 30487-30495.

Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A., Wilson, V.G., 2000. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275, 37999-38004.

Rank, N.M., Lambert, P.F., 1995. Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol* 69, 6323-6334.

Rapp, B., Pawellek, A., Kraetzer, F., Schaefer, M., May, C., Purdie, K., Grassmann, K., Iftner, T., 1997. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J Virol* 71, 6956-6966.

Ravid, T., Hochstrasser, M., 2008. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 679-690.

Rechsteiner, M., Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.

Regan, J.A., Laimins, L.A., 2008. Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J Virol* 82, 10042-10051.

Rehtanz, M., Schmidt, H.M., Warthorst, U., Steger, G., 2004. Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol* 24, 2153-2168.

Remm, M., Brain, R., Jenkins, J.R., 1992. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Res* 20, 6015-6021.

Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Day, P.M., 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1522-1527.

Riemer, A.B., Keskin, D.B., Zhang, G., Handley, M., Anderson, K.S., Brusica, V., Reinhold, B., Reinherz, E.L., 2010. A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ epithelial cancers. *J Biol Chem* 285, 29608-29622.

Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G.D., Kreider, J.W., Gallimore, P.H., 1993. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 197, 176-187.

Roden, R.B., Kirnbauer, R., Jenson, A.B., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1994a. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* 68, 7260-7266.

Roden, R.B., Weissinger, E.M., Henderson, D.W., Booy, F., Kirnbauer, R., Mushinski, J.F., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1994b. Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 68, 7570-7574.

Rohlf, M., Winkenbach, S., Meyer, S., Rupp, T., Durst, M., 1991. Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology* 183, 331-342.

Rosas-Acosta, G., Wilson, V.G., 2008. Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein. *Virology* 373, 149-162.

Russell, J., Botchan, M.R., 1995. cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J Virol* 69, 651-660.

Sakai, H., Yasugi, T., Benson, J.D., Dowhanick, J.J., Howley, P.M., 1996. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J Virol* 70, 1602-1611.

Sanchez-Perez, A.M., Soriano, S., Clarke, A.R., Gaston, K., 1997. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *J Gen Virol* 78 (Pt 11), 3009-3018.

Sanders, C.M., Maitland, N.J., 1994. Kinetic and equilibrium binding studies of the human papillomavirus type-16 transcription regulatory protein E2 interacting with core enhancer elements. *Nucleic Acids Res* 22, 4890-4897.

Sanders, C.M., Sizov, D., Seavers, P.R., Ortiz-Lombardia, M., Antson, A.A., 2007. Transcription activator structure reveals redox control of a replication initiation reaction. *Nucleic Acids Res* 35, 3504-3515.

Sanders, C.M., Stenlund, A., 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J* 17, 7044-7055.

Sanders, C.M., Stenlund, A., 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* 275, 3522-3534.

Sanders, C.M., Stenlund, A., 2001. Mechanism and requirements for bovine papillomavirus, type 1, E1 initiator complex assembly promoted by the E2 transcription factor bound to distal sites. *J Biol Chem* 276, 23689-23699.

Sanders, C.M., Stern, P.L., Maitland, N.J., 1995. Characterization of human papillomavirus type 16 E2 protein and subdomains expressed in insect cells. *Virology* 211, 418-433.

Santé-Canada, 2010. Virus du papillome humain, in: http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/alt_formats/pdf/iyh-vsv/diseases-maladies/hpv-vph-fra.pdf (Ed.).

Sapp, M., Bienkowska-Haba, M., 2009. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J* 276, 7206-7216.

Sarsour, E.H., Kumar, M.G., Chaudhuri, L., Kalen, A.L., Goswami, P.C., 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 11, 2985-3011.

Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Yano, T., Taketani, Y., Kanda, T., 2007. Human papillomavirus type 16 P670 promoter is negatively regulated by CCAAT displacement protein. *Virus Genes* 35, 473-481.

Scheinfeld, N., Lehman, D.S., 2006. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol Online J* 12, 5.

Schiller, J.T., Castellsague, X., Villa, L.L., Hildesheim, A., 2008. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10, K53-61.

Schuck, S., Stenlund, A., 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell* 20, 377-389.

Schweiger, M.R., You, J., Howley, P.M., 2006. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 80, 4276-4285.

Sedman, J., Stenlund, A., 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* 14, 6218-6228.

Sekhar, V., Reed, S.C., McBride, A.A., 2010. Interaction of the betapapillomavirus E2 tethering protein with mitotic chromosomes. *J Virol* 84, 543-557.

Sen, E., Bromberg-White, J.L., Meyers, C., 2002. Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle. *J Virol* 76, 4798-4809.

Senechal, H., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., Archambault, J., 2007. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* 358, 10-17.

Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M., Hurwitz, J., 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 702-706.

Shai, A., Brake, T., Somoza, C., Lambert, P.F., 2007. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res* 67, 1626-1635.

Shamanin, V., zur Hausen, H., Lavergne, D., Proby, C.M., Leigh, I.M., Neumann, C., Hamm, H., Goos, M., Haustein, U.F., Jung, E.G., Plewig, G., Wolff, H., de Villiers, E.M., 1996. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 88, 802-811.

Sherwood, L., 1997. *Human Physiology: from cells to systems*, pp.408-410, Third ed. Wadsworth, USA, p. 753.

Shukla, S., Bharti, A.C., Hussain, S., Mahata, S., Hedau, S., Kailash, U., Kashyap, V., Bhamhani, S., Roy, M., Batra, S., Talwar, G.P., Das, B.C., 2009. Elimination of high-risk human papillomavirus type HPV16 infection by 'Praneem' polyherbal tablet in women with early cervical intraepithelial lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 1701-1709.

Sibbet, G., Romero-Graillet, C., Meneguzzi, G., Campo, M.S., 2000. alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol* 81, 327-334.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.

Silla, T., Mannik, A., Ustav, M., 2010. Effective formation of the segregation-competent complex determines successful partitioning of the bovine papillomavirus genome during cell division. *J Virol* 84, 11175-11188.

Skiadopoulos, M.H., McBride, A.A., 1996. The bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator and repressor proteins use different nuclear localization signals. *J Virol* 70, 1117-1124.

Skiadopoulos, M.H., McBride, A.A., 1998. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* 72, 2079-2088.

Smal, C., Wetzler, D.E., Dantur, K.I., Chemes, L.B., Garcia-Alai, M.M., Dellarole, M., Alonso, L.G., Gaston, K., de Prat-Gay, G., 2009. The human papillomavirus E7-E2 interaction mechanism in vitro reveals a finely tuned system for modulating available E7 and E2 proteins. *Biochemistry* 48, 11939-11949.

Smith, J.A., White, E.A., Sowa, M.E., Powell, M.L., Ottinger, M., Harper, J.W., Howley, P.M., 2010. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-

dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3752-3757.

Snow, A.N., Laudadio, J., 2010. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol* 17, 394-403.

Soeda, E., Ferran, M.C., Baker, C.C., McBride, A.A., 2006. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology* 351, 29-41.

Sokka, M., Parkkinen, S., Pospiech, H., Syvaioja, J.E., 2010. Function of TopBP1 in genome stability. *Subcell Biochem* 50, 119-141.

Southern, S.A., Noya, F., Meyers, C., Broker, T.R., Chow, L.T., Herrington, C.S., 2001. Tetrasomy is induced by human papillomavirus type 18 E7 gene expression in keratinocyte raft cultures. *Cancer Res* 61, 4858-4863.

Spardy, N., Duensing, A., Charles, D., Haines, N., Nakahara, T., Lambert, P.F., Duensing, S., 2007. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein activates the Fanconi anemia (FA) pathway and causes accelerated chromosomal instability in FA cells. *J Virol* 81, 13265-13270.

Steele, C., Cowsert, L.M., Shillitoe, E.J., 1993. Effects of human papillomavirus type 18-specific antisense oligonucleotides on the transformed phenotype of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 53, 2330-2337.

Steele, C., Sacks, P.G., Adler-Storthz, K., Shillitoe, E.J., 1992. Effect on cancer cells of plasmids that express antisense RNA of human papillomavirus type 18. *Cancer Res* 52, 4706-4711.

Steenbergen, R.D., de Wilde, J., Wilting, S.M., Brink, A.A., Snijders, P.J., Meijer, C.J., 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S25-33.

Steger, G., Corbach, S., 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 71, 50-58.

Steger, G., Ham, J., Lefebvre, O., Yaniv, M., 1995. The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J* 14, 329-340.

Steger, G., Schnabel, C., Schmidt, H.M., 2002. The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21(WAF1/CIP1) promoter via interaction with Sp1. *J Gen Virol* 83, 503-510.

Stenlund, A., 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J* 22, 954-963.

Stern, P.L., Brown, M., Stacey, S.N., Kitchener, H.C., Hampson, I., Abdel-Hady, E.S., Moore, J.V., 2000. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 19, 57-66.

Stevaux, O., Dyson, N.J., 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 684-691.

Stockfleth, E., Ulrich, C., Meyer, T., Arndt, R., Christophers, E., 2001. Skin diseases following organ transplantation--risk factors and new therapeutic approaches. *Transplant Proc* 33, 1848-1853.

Stoppler, M.C., Straight, S.W., Tsao, G., Schlegel, R., McCance, D.J., 1996. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223, 251-254.

Storey, A., Piccini, A., Massimi, P., Bouvard, V., Banks, L., 1995. Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify a region of the protein involved in binding to E1 protein. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 819-826.

Stubenrauch, F., Colbert, A.M., Laimins, L.A., 1998a. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J Virol* 72, 8115-8123.

Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., Laimins, L.A., 2000. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* 74, 1178-1186.

Stubenrauch, F., Lim, H.B., Laimins, L.A., 1998b. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol* 72, 1071-1077.

Stubenrauch, F., Straub, E., Fertey, J., Iftner, T., 2007. The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins. *Int J Cancer* 121, 2284-2292.

Stubenrauch, F., Zobel, T., Iftner, T., 2001. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 75, 4139-4149.

Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., Schlegel, R., 2008. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* 27, 1071-1078.

Sverdrup, F., Khan, S.A., 1994. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol* 68, 505-509.

Sverdrup, F., Khan, S.A., 1995. Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol* 69, 1319-1323.

Swindle, C.S., Engler, J.A., 1998. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* 72, 1994-2001.

Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A., Chow, L.T., 1999. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* 73, 1001-1009.

Tan, C.H., Tachezy, R., Van Ranst, M., Chan, S.Y., Bernard, H.U., Burk, R.D., 1994. The *Mastomys natalensis* papillomavirus: nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic relationship of a rodent papillomavirus involved in tumorigenesis of cutaneous epithelia. *Virology* 198, 534-541.

Tan, S.H., Gloss, B., Bernard, H.U., 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* 20, 251-256.

Tatti, S., Stockfleth, E., Beutner, K.R., Tawfik, H., Elsasser, U., Weyrauch, P., Mescheder, A., 2010. Polyphenon E: a new treatment for external anogenital warts. *Br J Dermatol* 162, 176-184.

Terenzi, F., Saikia, P., Sen, G.C., 2008. Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *EMBO J* 27, 3311-3321.

Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., Lo Muzio, L., Campisi, G., 2008. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 19, 1681-1690.

Thierry, F., Benotmane, M.A., Demeret, C., Mori, M., Teissier, S., Desaintes, C., 2004. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 64, 895-903.

Thierry, F., Demeret, C., 2008. Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. *Cell Death Differ* 15, 1356-1363.

Thierry, F., Howley, P.M., 1991. Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol* 3, 90-100.

Thierry, F., Yaniv, M., 1987. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 6, 3391-3397.

Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., Laimins, L.A., 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8449-8454.

Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P.W., Archambault, J., 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77, 5178-5191.

Titolo, S., Pelletier, A., Pulichino, A.M., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 74, 7349-7361.

Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Amin, A., Cordingley, M.G., Archambault, J., 1999. Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* 73, 5282-5293.

Tugizov, S., Berline, J., Herrera, R., Penaranda, M.E., Nakagawa, M., Palefsky, J., 2005. Inhibition of human papillomavirus type 16 E7 phosphorylation by the S100 MRP-8/14 protein complex. *J Virol* 79, 1099-1112.

Valle, G.F., Banks, L., 1995. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol* 76 (Pt 5), 1239-1245.

van der Burg, S.H., Melief, C.J., 2011. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol*.

Van Tine, B.A., Dao, L.D., Wu, S.Y., Sonbuchner, T.M., Lin, B.Y., Zou, N., Chiang, C.M., Broker, T.R., Chow, L.T., 2004. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4030-4035.

Veldman, T., Liu, X., Yuan, H., Schlegel, R., 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8211-8216.

Voitenleitner, C., Botchan, M., 2002. E1 protein of bovine papillomavirus type 1 interferes with E2 protein-mediated tethering of the viral DNA to mitotic chromosomes. *J Virol* 76, 3440-3451.

von Knebel Doeberitz, M., Rittmuller, C., zur Hausen, H., Durst, M., 1992. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 51, 831-834.

von Krogh, G., 1981. Podophyllotoxin for condylomata acuminata eradication. Clinical and experimental comparative studies on Podophyllum lignans, colchicine and 5-fluorouracil. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 98, 1-48.

Vosa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M., Kurg, R., 2012. Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J Virol* 86, 348-357.

Wang, W., Fang, Y., Sima, N., Li, Y., Li, W., Li, L., Han, L., Liao, S., Han, Z., Gao, Q., Li, K., Deng, D., Meng, L., Zhou, J., Wang, S., Ma, D., 2011. Triggering of death receptor apoptotic signaling by human papillomavirus 16 E2 protein in cervical cancer cell lines is mediated by interaction with c-FLIP. *Apoptosis* 16, 55-66.

Wang, X., Naidu, S.R., Sverdrup, F., Androphy, E.J., 2009. Tax1BP1 interacts with papillomavirus E2 and regulates E2-dependent transcription and stability. *J Virol* 83, 2274-2284.

Wang, Y., Coulombe, R., Cameron, D.R., Thauvette, L., Massariol, M.J., Amon, L.M., Fink, D., Titolo, S., Welchner, E., Yoakim, C., Archambault, J., White, P.W., 2004. Crystal structure of the E2 transactivation domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor. *J Biol Chem* 279, 6976-6985.

Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P.L., Clarke, A.R., Gaston, K., 2000. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 87-94.

Welchman, R.L., Gordon, C., Mayer, R.J., 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.

White, P.W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276, 22426-22438.

White, P.W., Titolo, S., Brault, K., Thauvette, L., Pelletier, A., Welchner, E., Bourgon, L., Doyon, L., Ogilvie, W.W., Yoakim, C., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2003.

Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists of the E1-E2 protein interaction. *J Biol Chem* 278, 26765-26772.

Wiley, D., Masongsong, E., 2006. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv* 61, S3-14.

Wilson, R., Fehrmann, F., Laimins, L.A., 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 79, 6732-6740.

Wilson, R., Laimins, L.A., 2005. Differentiation of HPV-containing cells using organotypic "raft" culture or methylcellulose. *Methods Mol Med* 119, 157-169.

Wilson, V.G., West, M., Woytek, K., Rangasamy, D., 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24, 275-290.

Winn, P.J., Religa, T.L., Battey, J.N., Banerjee, A., Wade, R.C., 2004. Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure* 12, 1563-1574.

Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S., 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7, 11-22.

Wooldridge, T.R., Laimins, L.A., 2008. Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology* 374, 371-380.

Wright TC, K.R.a.F.A., 1994. Precancerous lesions of the cervix., In: Kurman RJ (ed) *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Springer-Verlag, New York, pp. 229-277.

Wu, S.Y., Chiang, C.M., 2007. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282, 13141-13145.

Wu, S.Y., Lee, A.Y., Hou, S.Y., Kemper, J.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chiang, C.M., 2006. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* 20, 2383-2396.

Xiao, H., Hasegawa, T., Isobe, K., 2000. p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem* 275, 1371-1376.

Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C., Lu, K.P., 1997. Sequence-

specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957-1960.

Yan, J., Li, Q., Lievens, S., Tavernier, J., You, J., 2010. Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression. *J Virol* 84, 76-87.

Yang, J., Pu, Y.G., Zeng, Z.M., Yu, Z.J., Huang, N., Deng, Q.W., 2009. Interferon for the treatment of genital warts: a systematic review. *BMC Infect Dis* 9, 156.

Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D.A., Nohaile, M., Botchan, M., 1993. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5086-5090.

Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., Zhou, Q., 2005. Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19, 535-545.

Yao, J.M., Breiding, D.E., Androphy, E.J., 1998. Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 72, 1013-1019.

Yasugi, T., Vidal, M., Sakai, H., Howley, P.M., Benson, J.D., 1997. Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins. *J Virol* 71, 5942-5951.

Yoon, C.S., Kim, K.D., Park, S.N., Cheong, S.W., 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 668-673.

You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K., Howley, P.M., 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117, 349-360.

You, J., Schweiger, M.R., Howley, P.M., 2005. Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 79, 14956-14961.

You, J., Srinivasan, V., Denis, G.V., Harrington, W.J., Jr., Ballestas, M.E., Kaye, K.M., Howley, P.M., 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes. *J Virol* 80, 8909-8919.

Yu, T., Peng, Y.C., Androphy, E.J., 2007. Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis. *J Virol* 81, 1736-1745.

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W., Jansen-Durr, P., 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323-2330.

Zheng, G., Schweiger, M.R., Martinez-Noel, G., Zheng, L., Smith, J.A., Harper, J.W., Howley, P.M., 2009. Brd4 regulation of papillomavirus protein E2 stability. *J Virol* 83, 8683-8692.

Zheng, P.S., Brokaw, J., McBride, A.A., 2005. Conditional mutations in the mitotic chromosome binding function of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol* 79, 1500-1509.

Zobel, T., Iftner, T., Stubenrauch, F., 2003. The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. *Mol Cell Biol* 23, 8352-8362.

Zou, N., Lin, B.Y., Duan, F., Lee, K.Y., Jin, G., Guan, R., Yao, G., Lefkowitz, E.J., Broker, T.R., Chow, L.T., 2000. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 74, 3761-3770.

zur Hausen, H., 1996. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 3-13.

zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-350.