

Université de Montréal

**Caractérisation de la fonction de la protéine cellulaire
p80/UAF1 dans la réplication du génome
du virus du papillome humain**

par

Michaël Lehoux

Département de biochimie

Faculté de médecine

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

Janvier 2014

© Michaël Lehoux, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la fonction de la protéine cellulaire
p80/UAF1 dans la réplication du génome du virus du papillome humain

présentée par
Michaël Lehoux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nathalie Grandvaux, président-rapporteur
Dr Jacques Archambault, directeur de recherche
Dr Nikolaus Heveker, membre du jury
Dr Louis Flamand, examinateur externe
Dr Benoît Coulombe, représentant du doyen de la FESP

Résumé

Le virus du papillome humain (VPH) est l'agent étiologique du cancer du col utérin, ainsi que d'autres néoplasies anogénitales et des voies aérodigestives supérieures. La réplication de son génome d'ADN double brin est assurée par les protéines virales E1 et E2, de concert avec la machinerie cellulaire de réplication. E1 assure le déroulement de l'ADN en aval de la fourche de réplication, grâce à son activité hélicase, et orchestre la duplication du génome viral. Nos travaux antérieurs ont démontré que le domaine N-terminal de E1 contient un motif de liaison à la protéine cellulaire p80/UAF1 qui est hautement conservé chez tous les VPH anogénitales. L'intégrité de ce motif est essentielle au maintien de l'épisome viral.

Les travaux présentés dans cette thèse ont d'abord déterminé que le motif de liaison à UAF1 n'est pas requis pour l'assemblage du pré-réplisome viral, mais important pour la réplication subséquente de l'ADN du VPH. Nous avons constaté qu'en présence de E1 et E2, UAF1 est relocalisé dans des foyers nucléaires typiques de sites de réplication du virus et qu'en outre, UAF1 s'associe physiquement à l'origine de réplication du VPH. Nous avons aussi déterminé que l'inhibition du recrutement de UAF1 par la surexpression d'un peptide dérivé de E1 (N40) contenant le motif de liaison à UAF1 réduit la réplication de l'ADN viral. Cette observation soutient le modèle selon lequel UAF1 est relocalisé par E1 au réplisome pour promouvoir la réplication de l'ADN viral.

UAF1 est une protéine à domaine WD40 n'encodant aucune activité enzymatique et présumée exploiter des interactions protéine-protéine pour accomplir sa fonction. Nous avons donc investigué les protéines associées à UAF1 dans des cellules du col utérin et avons détecté des interactions avec les enzymes de déubiquitination USP1, USP12 et USP46, ainsi qu'avec la phosphatase PHLPP1. Nous avons établi que E1 forme un complexe ternaire avec UAF1 et n'importe laquelle des USP associées : USP1, USP12 ou USP46. Ces USP sont relocalisés au noyau par E1 et s'associent à l'ADN viral. De plus, l'activité enzymatique des USP est essentielle à la réplication

optimale du génome viral. Au contraire, PHLPP1 ne forme pas de complexe avec E1, puisque leurs interactions respectives avec UAF1 sont mutuellement exclusives. PHLPP1 contient un peptide de liaison à UAF1 homologue à celui de E1. Ce peptide dérivé de PHLPP1 (P1) interagit avec le complexe UAF1-USP et, similairement au peptide N40, antagonise l'interaction E1-UAF1. Incidemment, la surexpression du peptide P1 inhibe la réplication de l'ADN viral. La génération de protéines chimériques entre P1 et des variants de E1 (E1 Δ) défectifs pour l'interaction avec UAF1 restaure la capacité de E1 Δ à interagir avec UAF1 et USP46, ainsi qu'à relocaliser UAF1 dans les foyers nucléaires contenant E1 et E2. Ce recrutement artificiel de UAF1 et des USP promeut la réplication de l'ADN viral, un phénotype dépendant de l'activité déubiquitinase du complexe.

Globalement, nos travaux suggèrent que la protéine E1 du VPH interagit avec UAF1 afin de recruter au réplisome un complexe de déubiquitination dont l'activité est importante pour la réplication de l'ADN viral.

Mots-clés : Papillomavirus, VPH, hélicase E1, réplication de l'ADN, UAF1, p80, WDR48, déubiquitinase, USP1, USP12, USP46, PHLPP1

Abstract

Human papillomaviruses (HPVs) are the etiological agents of cervical cancers, as well as multiple other anogenital and oropharyngeal neoplasias. The viral proteins E1 and E2, in concert with the host DNA replication machinery, mediate the replication of the double-stranded DNA genome of HPV. E1 exploits its helicase activity to unwind DNA ahead of the replication fork and orchestrates synthesis of the viral genome. Our previous work demonstrated that E1 contains in its N-terminus a binding motif for the host protein p80/UAF1, a domain that is highly conserved amongst anogenital HPVs. The integrity of this region was essential for the maintenance of the viral episome.

The research presented here first demonstrated that the UAF1-binding motif is not required for the assembly of the E1-E2-Origin pre-replisome, but important for the following viral DNA replication. We have determined that UAF1 is relocalized, in presence of E1 and E2, in nuclear foci reminiscent of viral DNA synthesis sites. UAF1 also physically interacted, through E1-binding, with the viral origin of replication. Moreover, we have shown that inhibition of E1-UAF1 interaction through the overexpression of an E1-derived and UAF1-binding peptide, N40, interferes with HPV DNA replication. This is in agreement with the model according to which E1 recruits UAF1 to the replisome to promote viral DNA replication.

UAF1 is a WD40-containing protein with no enzymatic activity and presumed to function through interactions with other cellular factors. We have investigated the UAF1 interaction network in cervical cells and discovered that UAF1 associates with the deubiquitinating enzymes USP1, USP12 and USP46, as well as with the phosphatase PHLPP1. E1 was found to assemble as a ternary complex with UAF1 and any of the associated USPs: USP1, USP12 or USP46. These USPs were also relocalized by E1 to the nucleus and they associated with the viral origin in presence of E2. Moreover, their enzymatic function was essential for optimal viral genome replication. In contrast, PHLPP1 did not associate with E1, and the interactions of the latter proteins with UAF1 were shown to be mutually exclusive. PHLPP1 contains a UAF1-binding motif

homologous to the one encoded within E1. This PHLPP1-derived peptide, P1, interacts with the UAF1-USP complex and, similarly to N40, competes with E1-UAF1 interaction. Accordingly, P1 overexpression leads to inhibition of HPV DNA replication. The fusion of the peptide P1 to an E1 protein (E1 Δ) defective for UAF1-binding restored its capacity to interact with UAF1 and USP46, as well as to relocalize UAF1 into E1-E2-containing nuclear foci. This artificial recruitment of UAF1 and of the associated USPs increased viral DNA replication, a process that involved the enzymatic activity of the USPs.

Collectively, our work suggests that HPV E1 interacts with UAF1 in order to recruit to the replisome a deubiquitinating complex whose activity is required for optimal viral DNA replication.

Keywords : Papillomavirus, HPV, E1 helicase, DNA replication, UAF1, p80, WDR48, Deubiquitinase, USP1, USP12, USP46, PHLPP1

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xx
1 INTRODUCTION	1
1.1 Infections et oncogenèse.....	1
1.2 Virus du papillome humain.....	1
1.2.1 Généralités	1
1.2.2 Étiologie et aspects cliniques	2
1.2.2.1 VPH à bas-risque.....	2
1.2.2.2 VPH à haut-risque	3
1.2.2.3 Traitement et prévention.....	4
1.2.3 Cycle réplicatif viral	6
1.2.4 Organisation génomique et protéines virales	9
1.2.4.1 Longue région de contrôle (LCR)	10
1.2.4.2 E1 et E2	11
1.2.4.3 E6 et E7	12
1.2.4.4 L1 et L2 : protéines structurales.....	18
1.2.4.5 E1 [^] E4 et E5.....	18
1.3 Réplication de l'ADN viral.....	20
1.3.1 Machinerie de réplication de l'ADN eucaryote.....	20
1.3.2 Hélicases à ADN	21
1.3.3 Mécanisme de réplication de l'ADN viral.....	22
1.3.4 Instabilité génomique associée à la réplication.....	25
1.3.5 Approches expérimentales pour l'étude de la réplication virale	27
1.3.6 Intérêt thérapeutique.....	30

1.4 E1 : hélicase virale	31
1.4.1 Topologie et fonctions	31
1.4.1.1 Domaine hélicase/ATPase	32
1.4.1.2 Domaine de liaison à l'origine	33
1.4.1.3 Domaine N-terminal	35
1.4.2 Assemblage de l'hélicase	36
1.4.3 Localisation cellulaire.....	41
1.4.4 Modifications post-traductionnelles	43
1.4.4.1 Phosphorylation	43
1.4.4.2 Ubiquitination et SUMOylation	45
1.4.4.3 Clivage par les caspases	46
1.4.5 Interaction avec les facteurs de l'hôte.....	47
1.4.5.1 Facteurs de réplication de l'ADN.....	47
1.4.5.2 Facteurs de remodelage de la chromatine : H1 et hSNF5.....	50
1.4.5.3 Chaperonnes : Hsp40 et Hsp70.....	51
1.4.5.4 p56 et E1-BP.....	52
1.4.5.5 UAF1	53
1.5 Ubiquitination et déubiquitination	54
1.5.1 Ubiquitination	54
1.5.2 Déubiquitination.....	56
1.5.3 Ubiquitine et infections virales.....	58
1.6 UAF1	59
1.6.1 Généralités.....	59
1.6.2 Évolution et structure de UAF1.....	60
1.6.3 Rôle comme cofacteur de DUB.....	62
1.6.4 USP1	64
1.6.5 USP12 et USP46.....	69
1.7 But du projet de recherche.....	73
2 INHIBITION DE LA RÉPLICATION DU VIRUS DU PAPILLOME HUMAIN PAR UN PEPTIDE DÉRIVÉ DE E1 ET INTERAGISSANT AVEC UAF1	75
2.1 Mise en contexte de l'article.....	76

2.2	Contribution des auteurs.....	76
2.3	Texte de l'article	78
2.3.1	Abstract.....	78
2.3.2	Introduction	78
2.3.3	Materials and Methods.....	81
2.3.4	Results.....	86
2.3.4.1	The p80-binding domain of E1 is required for efficient viral DNA replication.....	86
2.3.4.2	The p80-binding domain of E1 is dispensable for the assembly of the E1-E2-ori complex	89
2.3.4.3	The p80-binding domain is not required for the stable assembly of E1 at the viral origin	91
2.3.4.4	p80 is relocalized to nuclear foci in an E1- and E2-dependent manner.....	95
2.3.4.5	Endogenous p80 interacts with E1 and is recruited to the viral origin <i>in vivo</i>	97
2.3.4.6	Inhibition of the E1-p80 interaction by N40, a short peptide spanning the p80-binding domain of HPV31 E1.....	99
2.3.4.7	N40 prevents the E1- and E2-dependent recruitment of p80 to the origin and inhibits viral DNA replication	102
2.3.4.8	N40 expression has little to no effect on cell cycle progression and DNA synthesis	104
2.3.4.9	HPV DNA replication is attenuated in N40-expressing stable cell lines.....	107
2.3.4.10	The N40 p80-binding peptide is intrinsically disordered.....	109
2.3.4.11	E1 interacts with amino acids 1-573 of p80	111
2.3.5	Discussion	113
2.3.6	Acknowledgments	117
2.3.7	References.....	117
3	LE RECRUTEMENT PAR E1 ET UAF1 D'UN COMPLEXE À ACTIVITÉ DÉUBIQUITINASE EST IMPORTANT POUR LA RÉPLICATION DE L'ADN DU VPH	125
3.1	Mise en contexte de l'article	126
3.2	Contribution des auteurs.....	126
3.3	Texte de l'article	127
3.3.1	Abstract.....	127
3.3.2	Introduction	127

3.3.3	Materials and methods.....	129
3.3.4	Results	133
3.3.4.1	UAF1 associates with three members of the USP family in cervical carcinoma cells.....	133
3.3.4.2	UAF1 interacts with USP12 and USP46 through its N-terminal WD40 motif.....	136
3.3.4.3	HPV E1 simultaneously recruits UAF1 and USP1, USP12 or USP46.....	138
3.3.4.4	The UAF1-associated deubiquitinase complex is recruited to the viral origin.....	141
3.3.4.5	UAF1 and USPs expression is required for cell proliferation	144
3.3.4.6	USPs enzymatic activity is required for efficient HPV DNA replication	147
3.3.4.7	Inhibition of HPV DNA replication by catalytically inactive USP1, USP12 and USP46 requires the UAF1-binding site in E1.....	152
3.3.5	Discussion	154
3.3.6	Acknowledgements	158
3.3.7	References	158

4 LE RECRUTEMENT ARTIFICIEL DE UAF1 PAR UNE PROTÉINE CHIMÉRIQUE PHLPP1-E1 PROMEUT LA RÉPLICATION DE L'ADN DU VPH 165

4.1	Mise en contexte de l'article.....	166
4.2	Contribution des auteurs	166
4.3	Texte de l'article.....	167
4.3.1	Abstract.....	167
4.3.2	Introduction	167
4.3.3	Materials and methods.....	169
4.3.4	Results	173
4.3.4.1	UAF1 interacts <i>in vivo</i> with PHLPP1 and PHLPP2.....	173
4.3.4.2	HPV E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 are mutually exclusive	175
4.3.4.3	PHLPP1 encodes a UAF1-binding peptide similar to that of HPV E1	178
4.3.4.4	The peptide P1 inhibits HPV DNA replication	183
4.3.4.5	PHLPP1-E1 chimera interacts with UAF1-USP46.....	187
4.3.4.6	The PHLPP1-E1 chimera facilitates HPV DNA replication	191
4.3.5	Discussion	194
4.3.6	Acknowledgements	196
4.3.7	References	196

5	DISCUSSION	201
5.1	Réplication de l'ADN du VPH : interaction E1-UAF1	202
5.2	Relation structure-fonction du motif de liaison à UAF1.....	204
5.3	Recrutement d'un complexe à activité déubiquitinase	207
5.4	Étude d'un UBP dérivé de PHLPP1	212
5.5	Fonction du complexe E1-UAF1-USP.....	213
5.5.1	Modèle 1 : Stabilisation du réplisome viral	215
5.5.2	Modèle 2 : Remodelage de la chromatine.....	218
5.5.3	Modèle 3 : Régulation des voies de réponse aux dommages à l'ADN.....	219
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	227
7	BIBLIOGRAPHIE.....	I
8	ANNEXES	XXXVII
Annexe 1	xxxviii
Annexe 2	xl
Annexe 3	xli
9	CURRICULUM VITAE.....	XLIII

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Substrats connus de USP1, USP12 et USP46	72
Table 3.1 Cell cycle distribution of shRNA-expressing cells	147
Table 4.1 Statistical analysis of inhibitory activity of USP-CI	194

Liste des figures

Figure 1.1 Cancer du col de l'utérus	5
Figure 1.2 Cycle réplcatif du VPH	8
Figure 1.3 Organisation du génome viral et de l'origine de répllication	9
Figure 1.4 E7 : induction de la prolifération cellulaire et instabilité génomique	14
Figure 1.5 Fonctions de l'oncogène E6	16
Figure 1.6 E1 : domaines fonctionnels	32
Figure 1.7 E1 : structure de l'OBD	35
Figure 1.8 Assemblage du pré-réplisome viral	37
Figure 1.9 E1 : domaine hélicase	40
Figure 1.10 Réplisome du VPH (modèle)	48
Figure 1.11 E3 ubiquitine-ligase de type SCF	55
Figure 1.12 UAF1 : topologie, structure et évolution	62
Figure 1.13 USP1 : topologie et fonctions	65
Figure 2.1 The p80-binding domain of E1 is required for efficient HPV DNA replication	88
Figure 2.2 The p80-binding domain of E1 is dispensable for the assembly of the E1-E2-ori complex	90
Figure 2.3 The p80-binding domain is not required for the stable assembly of E1 at the viral origin	93
Figure 2.4 p80 is relocalized nuclear foci in an E1- and E2-dependent manner	96
Figure 2.5 Endogenous p80 interacts with E1 and is recruited to the viral origin <i>in vivo</i>	98
Figure 2.6 Inhibition of the E1-p80 interaction by N40	101
Figure 2.7 N40 prevents the recruitment of p80 to the origin and inhibits viral DNA replication	103
Figure 2.8 N40 expression has little to no effect on cell cycle progression and DNA synthesis	106

Figure 2.9 HPV DNA replication is attenuated in N40-expressing stable cell lines	108
Figure 2.10 The N40 p80-binding peptide is intrinsically disordered	110
Figure 2.11 E1 interacts with amino acids 1-573 of p80	112
Figure 3.1 Identification of UAF1-interacting proteins	135
Figure 3.2 UAF1 WD40 repeats are required for interaction with USP12 and 46	137
Figure 3.3 HPV31 E1 assembles as a ternary complex with UAF1 and USP1, USP12 or USP46	140
Figure 3.4 HPV E1 recruits USP1, USP12 and USP46 to the viral origin	143
Figure 3.5 shRNA-mediated knockdown of UAF1, USP1, USP12 or USP46 inhibits cell proliferation	146
Figure 3.6 Overexpression of catalytically inactive versions of USP1, USP12 or USP46 does not inhibit cell proliferation	149
Figure 3.7 USPs-CI specifically inhibit HPV DNA replication	151
Figure 3.8 USP-CI-mediated inhibition of HPV DNA replication is UAF1-binding dependent	153
Figure 4.1 Identification of cellular proteins interacting with UAF1	174
Figure 4.2 HPV E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 are mutually exclusive	177
Figure 4.3 PHLPP1 contains a UAF1-binding peptide between amino acids 1027-1126	179
Figure 4.4 The PHLPP1-derived peptide P1 is sufficient for interaction with UAF1 and USP46	182
Figure 4.5 The peptide P1 inhibits HPV DNA replication	184
Figure 4.6 P1 expression does not affect cellular proliferation	186
Figure 4.7 P1-E1Δ chimeras restore the capacity of E1Δ to interact with UAF1 and USP46	188
Figure 4.8 P1-E1Δ chimeras recruits UAF1 to nuclear foci	190
Figure 4.9 P1 fusion to E1Δ facilitates HPV DNA replication in a UAF1-dependent manner	192
Figure 5.1 Prédiction de désordre des peptides UBP	205
Figure 5.2 Effet de la substitution S33A sur la réplication de l'ADN viral	206

Figure 5.3 Identification des domaines requis pour les interactions entre UAF1 et ses partenaires	209
Figure 5.4 Fonction du complexe E1-UAF1-USP (modèle)	215
Figure 5.5 Modèle de UAF1 agissant comme une sous-unité de reconnaissance de substrats	218
Figure 5.6 Transition d'un mode de réplication bidirectionnel à un mode unidirectionnel (modèle)	225

Liste des abréviations

AT : adénine et thymine
aa : acides aminés
AAA+ : ATPase associated with various cellular activities
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
APC/C : anaphase-promoting complex/cyclosome
AR : androgen receptor
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATP : adénosine triphosphate
ATR : ATM and Rad3-related
ATRIP : ATR-interacting protein
Bak : bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax : bcl2-associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
 β -TrCP : Beta-Transducin Repeat Containing Protein
bHLH : basic helix-loop-helix
BRCA1 : breast cancer 1, early onset
Brd4 : bromodomain-containing protein 4
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine
CAPNS1 : calpain small subunit 1
CBM : cyclin-binding motif
Cdc6 : cell division cycle 6
Cdk : cyclin-dependent kinase
CELO virus : chick embryo lethal orphan virus
CFS : common fragile sites
Chk2 : checkpoint kinase 2

CK2 : casein kinase 2
CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMV : cytomegalovirus
Crm1 : chromosome region maintenance 1 protein homolog
db : double brin
DBD : DNA-binding domain
DUB : déubiquitinase
Duf1 : DUB-associated factor 1
E1 Δ : E1 (40-629)
E1BS : E1-binding site
E2BS : E2-binding site
E6-AP : E6-associated protein
EBNA1 : Epstein-Barr nuclear antigen 1
EBV : Epstein-Barr virus
EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF : epidermal growth factor
ELG1 : enhanced level of genomic instability 1
FA : Fanconi anemia
FANCD2 : Fanconi anemia complementation group D2
FANCI : Fanconi anemia complementation group I
Fluc : firefly luciferase
GLR-1 : glutamate receptor 1
HAUSP : herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
hDlg : human discs large
HECT : homologous to E6-associated protein C-terminus
HFK : human foreskin keratinocytes
HR : homologous recombination
hScribb : human scribble
Hsp40 : heat shock protein 40
Hsp70 : heat shock protein 70

HSPG : heparan sulfate proteoglycan
hTERT : human telomerase reverse transcriptase
ICL : interstrand crosslink lesion
ICP0 : infected Cell Polypeptide 0
ID : inhibitor of DNA-binding
IFN : interféron
Ini1/hSNF5 : integrase interactor 1/human sucrose non-fermenting 5
JAMM : JAB1/MPN/Mov31 metalloenzyme
kb : kilobases
kDa : kiloDalton
KSHV : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
Lck : lymphocyte-specific kinase
LCR : long control region
LT : large T antigen
MAGI-1, -2 et -3 : membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCM : mini-chromosome maintenance
MJD : Machado-Joseph disease protein domain protease
MRN : Mre11-Rad50-NBS1
MUPP-1 : multi-PDZ domain protein 1
Nbs1 : Nijmegen breakage syndrome 1
NES : nuclear export signal
NHEJ : non-homologous end-joining
NIKS : normal immortalized keratinocytes
NLS : nuclear localization signal
OBD : origin-binding domain
ORC : origin recognition complex
ORF : open reading frame
Ori : origine de répliation
OTU : ovarian tumor protease

P1-E1 Δ : protéine chimérique constituée de la fusion du peptide P1 à E1 Δ

P : phospho

Pap : Papanicalaou (test)

PATJ : Pals1-associated tight junction

pb : paire de bases

PCNA : proliferating Cell Nuclear Antigen

PCR : polymerase chain reaction

PDGF β : platelet-derived growth factor β

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

PDZ : PSD95/Dlg/ZO-1

PHLPP1 : PH domain leucine-rich protein phosphatase 1

pI : point isoélectrique

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PLpro : papain-like protease

Pol α -prim : DNA polymerase α -primase

pRb : protéine du rétinoblastome

pre-RC : pre-replication complex

PTPN13 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13

RFC : replication factor C

RFP : red fluorescent protein

RING : really interesting new gene

Rluc : renilla luciferase

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : reactive oxygen species

RPA : replication protein A

sb : simple brin

SCF : SKP1-CUL1-F box

shRNA : short hairpin RNA

SIM : SUMO-like domain-interacting motif

siRNA : small interfering RNA

SLD : SUMO-like domain
SUMO : small ubiquitin-related modifier
SV40 : simian virus 40
SWI/SNF : switch/sucrose non-fermenting
TAD : transactivation domain
TCR : T-cell receptor
Tip : tyrosine kinase-interacting protein
TLR-7 : toll-like receptor 7
TLS : translesion synthesis
TNF : tumor necrosis factor
TopBP1 : topoisomerase 2-binding protein 1
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRIP13 : thyroid hormone receptor interactor 13
UAF1 : USP1-associated factor 1
UBH1 : ubiquitin hydrolyzing enzyme 1
UBM : ubiquitin-binding motif
Ubp : ubiquitin-specific proteins
UBX : ubiquitin-like X
UCH : ubiquitin C-terminal hydrolase
USP : ubiquitin-specific protease
USP-CI: catalytically inactive ubiquitin-specific protease
VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine 1
VLP : virus-like particles
VPB1 : virus du papillome bovin 1
VPH : virus du papillome humain
WT : type sauvage

*Ce qu'il nous faut à nous, c'est, aux lueurs des lampes,
La science conquise et le sommeil dompté,
C'est le front dans les mains du vieux Faust des estampes,
C'est l'Obstination et c'est la Volonté !*

*C'est la Volonté sainte, absolue, éternelle,
Cramponnée au projet comme un noble condor
Aux flancs fumants de peur d'un buffle, et d'un coup d'aile
Emportant son trophée à travers les cieux d'or !*

*Ce qu'il nous faut à nous, c'est l'étude sans trêve,
C'est l'effort inouï, le combat nonpareil,
C'est la nuit, l'âpre nuit du travail, d'où se lève
Lentement, lentement, l'Œuvre, ainsi qu'un soleil !*

(Paul Verlaine, Poèmes saturniens)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur, le Dr Jacques Archambault, de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir soutenu mes travaux au cours des sept dernières années. Merci aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et au Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) pour le soutien financier.

Je voudrais aussi remercier les membres de mon jury pour la lecture attentive et l'évaluation de ma thèse. Merci également aux membres de mon comité de suivi pour les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de mon parcours : Dr Pascale Legault, Dr Éric A. Cohen et Dr Jean-Philippe Gratton. Merci au laboratoire du Dr Éric A. Cohen, du Dr Benoît Coulombe et du Dr Jean-François Côté pour le partage de réactifs.

Il ne faudrait pas passer sous silence le soutien de plusieurs membres du personnel de l'IRCM dont la contribution fut indispensable. Merci à Odile Neyret, Éric Massicotte et Dominic Filion pour leur patience infinie dans le partage de leur savoir. Je souhaite aussi remercier le Dr Gilles Travé pour l'extraordinaire expérience dans son laboratoire à l'École supérieure de biotechnologie de Strasbourg.

Je tiens également à souligner ma gratitude à l'ensemble des membres, actuels et passés, du laboratoire de virologie moléculaire pour les discussions scientifiques, l'aide technique et surtout, le soutien moral dans cette folle aventure. Merci à tous les étudiants stagiaires (Julien, Shannon, Fanny et Matthieu) qui ont travaillé avec moi au cours des dernières années et qui ont apporté une contribution significative à nos travaux. Merci à tous ceux qui ont participé à la lecture et la critique de ma thèse : Amélie Fradet-Turcotte, Manishha Patel, Jessica MT Pham et Maxime Lataille.

Je me dois de remercier Claudia M D'abramo, Andrea Liliam Gomez, Chirine Toufaily, Hélène Sénéchal et Matthieu Rousseau pour l'étroite et enrichissante collaboration scientifique, leur passion, leur engagement et pour leur soutien inconditionnel.

Un doctorat ne constitue pas qu'un travail de recherche. C'est aussi une aventure humaine, où se confond un éventail d'émotions, qui nous appelle à développer une certaine maturité, scientifique et personnelle, mais aussi nous invite à faire face à des défis qui parfois dépassent nos attentes initiales. La réussite d'une entreprise telle que celle-ci serait inconcevable sans le soutien d'un certain nombre de personnes importantes.

D'abord, un merci tout particulier à Amélie, de qui j'ai appris énormément sur le plan scientifique, mais aussi sur le plan personnel. J'ai au cours de mon doctorat découvert une grande amie qui, je l'espère, m'accompagnera longtemps.

Un immense merci à tous mes amis pour être demeurés à mes côtés pendant ce long périple, malgré mes humeurs et mon indisponibilité. Votre énergie et votre soutien indéfectible ont été essentiels.

Merci aux membres de ma famille qui ont su croire en moi et me donner la foi nécessaire pour avancer. Merci à mes parents, Monique et Jacques, qui ont su être indulgents face à mes absences et attentifs à mes angoisses.

Et merci Maxime. Merci pour tes conseils, ton humour, ta passion, ta patience, ta présence... Merci infiniment.

1 Introduction

1.1 Infections et oncogénèse

Un nombre grandissant de pathogènes, de nature virale ou bactérienne, ont été démontrés comme agents étiologiques d'une grande variété de cancers, représentant approximativement 20% de tous les cancers mondialement (de Martel & Franceschi, 2008; Parkin et al., 2005). Les plus importants sont certainement les virus de l'hépatite B et C, la bactérie *Helicobacter pylori* et le virus du papillome humain (VPH), associés respectivement aux cancers hépatiques, gastriques et du col utérin. Le VPH est responsable du tiers des cancers associés aux infections à travers le monde et, conséquemment, le cancer du col de l'utérus est le deuxième le plus fréquent chez la femme. En outre, le VPH est maintenant reconnu comme étant associé à de nombreuses autres lésions dysplasiques. La carcinogénèse est un processus complexe et procédant en plusieurs étapes qui, dans le contexte des infections par le VPH, est en partie modulée par l'activité des protéines virales. Les prochaines sections décrivent les mécanismes de l'oncogénèse induite par le VPH ainsi que les caractéristiques pathogéniques du virus.

1.2 Virus du papillome humain

1.2.1 Généralités

Les papillomavirus appartiennent à la famille des *papillomaviridae* et sont de petits virus icosaédriques non enveloppés, encodant un génome d'ADN double brin circulaire et ayant un tropisme pour les épithéliums stratifiés. On retrouve des papillomavirus chez la plupart des vertébrés, suggérant que leur origine évolutive est très ancienne. On répertorie plus de 170 génotypes de papillomavirus infectant l'humain ciblant les épithéliums cutanés ou les muqueuses, principalement anogénitales. Des analyses phylogénétiques ont mené à la classification des VPH en plusieurs genres : alpha, beta, gamma, mu et nu (de Villiers, 2013). Les quatre derniers genres englobent les VPH cutanés, alors que le genre alpha comprend principalement les VPH muqueux. Un génotype est défini selon la conservation de la séquence de l'un des gènes du virus, celui encodant la protéine structurale L1, lorsqu'il possède moins de 90% d'homologie

avec les types connus. On répertorie aussi des sous-types et des variants de chaque génotype qui sont caractérisés par une variation de séquence du gène L1 de 2-10% pour les sous-types ou inférieure à 2% pour les variants.

1.2.2 Étiologie et aspects cliniques

Les VPH cutanés sont principalement associés au développement de lésions bénignes, telle la verrue plantaire, sauf dans le contexte de maladies rares comme l'épidermodysplasie verruciforme, et seront peu abordés dans cette thèse. Les VPH anogénitaux sont des virus extrêmement prévalents, qu'on estime mondialement à 11,7% chez la femme, et constituent l'infection transmissible sexuellement la plus commune (Bruni et al., 2010). Les infections demeurent asymptomatiques dans la plupart des cas et sont rapidement éliminées par le système immunitaire 6-12 mois après l'infection (zur Hausen, 2002). Toutefois, une fraction des infections peut persister et occasionner des pathologies (résumé dans (Cubie, 2013; Lehoux et al., 2009)). Les VPH anogénitaux, dont on retrouve plus de 40 génotypes, sont ceux qui occasionnent la plus grande proportion des complications médicales. Ces VPH sont conséquemment sous-divisés en deux groupes, soit les VPH à haut-risque et à bas-risque, en fonction de la gravité des lésions auxquelles ils sont associés.

Les VPH16 et 18 sont les génotypes à haut-risque les plus souvent associés à la carcinogenèse, étant responsables d'environ 70% de tous les cancers du col utérin (Hoory et al., 2008). Les VPH à bas-risque de type 6 et 11, pour leur part, sont imputables de la vaste majorité des lésions bénignes (Lacey et al., 2006).

1.2.2.1 VPH à bas-risque

Un aspect clinique important des infections par les VPH est associé aux génotypes à bas-risque. Bien que ces VPH causent rarement des complications graves, ils sont connus pour être à l'origine d'une pathologie rare appelée papillomatose respiratoire récurrente et caractérisée par l'apparition de verrues sur le larynx pouvant entraîner des difficultés respiratoires sérieuses (Larson & Derkay, 2010). Outre ce cas d'exception, les VPH à bas-risque sont surtout connus pour causer les condylomes anogénitaux, dont la prévalence est estimée à 0,2-5,1% au sein de la population sexuellement active (Patel et al., 2013). Les génotypes 6 et 11 sont responsables de la

grande majorité des verrues anogénitales. Le suivi et le traitement de ces lésions bénignes constituent un fardeau économique important pour les systèmes de santé ; on estime à 288 millions de dollars le coût occasionné annuellement par ces infections aux États-Unis (Chesson et al., 2012). Cette variable doit nécessairement être prise en compte dans les politiques de santé publique en matière de coût-efficacité.

1.2.2.2 VPH à haut-risque

Le VPH est reconnu comme agent étiologique de divers cancers, notamment le cancer du col de l'utérus. La relation de causalité entre le VPH et le cancer du col utérin est maintenant clairement établie : le VPH est d'ailleurs reconnu par l'Organisation mondiale de la santé comme un agent cancérigène (Bohmer et al., 2003; Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999). L'identification du VPH comme agent causal du cancer du col de l'utérus fut une avancée importante récompensée par l'attribution du prix Nobel de physiologie ou médecine au Dr Harald Zur Hausen en 2008 (zur Hausen, 1996). On estime qu'environ 70% des cas de cancer du col utérin sont associés aux VPH16 (54%) ou VPH18 (16%) (Castellsagué et al., 2007). Il est cependant important de noter que l'association entre le VPH et plusieurs autres types de cancers a également été établie, incluant une proportion importante des cancers du tractus génital, chez l'homme et la femme, ainsi qu'à plus de 80% des cancers de l'anus (Daling et al., 2004; Frisch et al., 1999; Jemal et al., 2008; Partridge & Koutsky, 2006). Une immunosuppression causée par une infection au VIH ou des traitements antirejet de greffes d'organes contribuent considérablement à accroître les risques de développement de cancers anogénitaux associés au VPH (de Sanjose & Palefsky, 2002; Fakhry et al., 2006; Nindl & Rosl, 2008). Le VPH serait aussi un facteur de risque important, à l'instar du tabagisme et de la consommation d'alcool, dans le développement d'une proportion considérable des cancers des voies aérodigestives supérieures (Gillison et al., 2000; Kreimer et al., 2005; Syrjanen, 2005, 2007). À nouveau, le VPH16 semble être le génotype le plus présent dans ces cancers, tous tissus confondus. Certaines prédispositions telles que l'immunosuppression semblent également rendre certains patients plus vulnérables non seulement aux cancers des muqueuses mentionnés ci-haut, mais également à des cancers de la peau autres que les mélanomes aux sites d'exposition

aux radiations ultraviolettes (Harwood et al., 1999; Nindl & Rosl, 2008; Shamanin et al., 1996).

Bien que le VPH soit nécessaire à la progression vers le cancer, l'infection virale est insuffisante en soi et doit être accompagnée par des altérations génétiques dans certains oncogènes cellulaires. L'instabilité génomique induite par les oncoprotéines virales facilite probablement ce processus. La persistance de l'infection et l'intégration du virus dans le génome cellulaire sont aussi des facteurs de risque importants (Pett et al., 2004; Schiffman et al., 2010; Woodworth et al., 1989; zur Hausen, 1996). D'autres facteurs indépendants du virus contribuent également à la carcinogénèse, notamment la grossesse, les hautes parités, le tabagisme, l'utilisation de contraceptifs oraux, le nombre de partenaires sexuels, ainsi que d'autres infections transmissibles sexuellement.

1.2.2.3 Traitement et prévention

Depuis les années 1940, la plupart des pays occidentaux ont vu la mise en place d'un programme de dépistage des lésions précancéreuses du col de l'utérus basé sur le test Papanicolaou ou test Pap (Papanicolaou, 1942; Traut & Papanicolaou, 1943). Le test Pap consiste en une analyse cytologique d'un frottis du col de l'utérus qui permet de détecter par microscopie les morphologies dysplasiques. Ainsi, ce test ne détecte pas directement la présence du VPH. Des tests permettant la détection de l'ADN du VPH ont été développés au cours des dernières années et leur potentiel d'utilisation pour le dépistage et/ou le diagnostique est présentement à l'étude. La campagne de dépistage au test Pap s'est avérée extrêmement efficace dans la prévention des cancers du col utérin et fut accompagnée mondialement d'une chute de 80% de l'incidence de ce type de cancer (Kaufmann et al., 2012). Pourtant, le test Pap possède deux principales limitations : le coût important nécessaire à son application et aux suivis qui en découlent (40,5 millions de dollars par année au Québec) et les infrastructures complexes requises pour le prélèvement des spécimens et les analyses cytologiques (Ouhoumane et al., 2013). Ces deux inconvénients sont d'ailleurs les principaux obstacles freinant l'adoption de telles méthodologies dans les pays en voie de développement, où la majorité des cas de cancer du col de l'utérus (~80%) surviennent présentement (Figure 1.1).

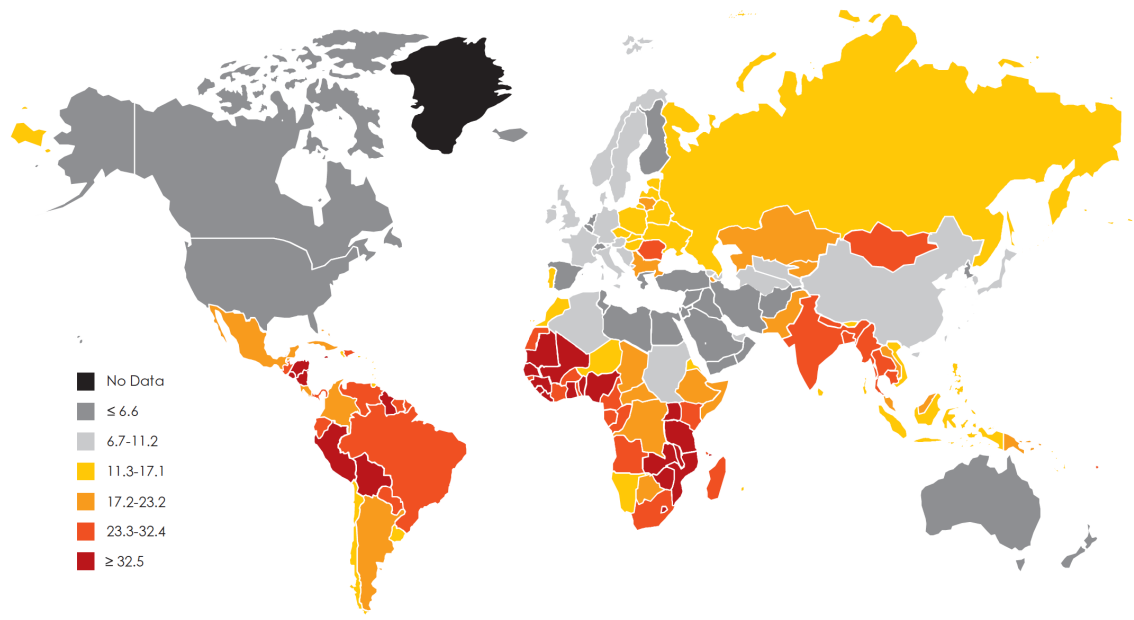


Figure 1.1 Cancer du col de l'utérus

Carte illustrant l'incidence des cancers du col utérin en 2008, par pays, après standardisation selon l'âge (par 100 000 personnes). La figure est tirée de (Forman et al., 2012), avec la permission de Elsevier, et basée sur les données de GLOBOCAN, 2008 (Ferlay et al., 2010).

Les lésions précancéreuses identifiées par le test Pap sont confirmées par colposcopie et généralement traitées par l'élimination du tissu anormal, soit par thérapie excisionnelle (excision électrochirurgicale à l'anse ou excision au laser) ou ablative (cryochirurgie ou ablation au laser). Ces interventions sont généralement efficaces lorsque le dépistage permet la détection des stades précoces de la pathologie. Toutefois, plus de 530 000 nouveaux cas de cancer du col utérin sont diagnostiqués chaque année à travers le monde. Le taux de survie à ces cancers suite à la chimio-radiation basée principalement sur l'administration de cisplatine est de 66-79% après cinq ans (Lowy & Schiller, 2012; Stern et al., 2012).

Outre l'ablation du tissu, peu de stratégies thérapeutiques existent présentement pour traiter les lésions associées aux papillomavirus. Le VPH est sensible à la réponse antivirale de la voie de l'interféron qui réduit la capacité du virus à répliquer son génome (Chang et al., 2002; Herdman et al., 2006). Le virus a toutefois développé des mécanismes permettant d'atténuer cet effet en inhibant les gènes répondant à l'interféron (Chang & Laimins, 2000; Li et al., 1999; Park et al., 2000; Perea et al., 2000; Ronco et

al., 1998). L'utilisation topique de l'imiquimod, un immunomodulateur qui induit notamment une réponse interféron- α via le récepteur TLR-7 (*toll-like receptor 7*) et une réponse immunitaire adaptative, s'est avérée efficace dans le traitement des lésions cutanées et de certains cancers associés au VPH. D'autres stratégies thérapeutiques ont aussi été proposées et sont basées sur l'utilisation de petites molécules pour cibler les oncogènes viraux, l'entrée du virus ou encore la réplication virale (résumé dans (Fradet-Turcotte & Archambault, 2007)).

Enfin, les compagnies Merck & Co. et GlaxoSmithKline ont commercialisé en 2006 des vaccins prophylactiques contre le VPH, respectivement connus sous les noms de Gardasil[®] et Cervarix[®]. Ces deux vaccins protègent des infections par les VPH16 et 18, alors que Cervarix[®] prévient également les infections par les VPH à bas-risque de type 6 et 11. Depuis, toutes les provinces canadiennes ont adopté un programme de vaccination en milieu scolaire. Les stratégies vaccinales actuelles exploitent les propriétés immunogéniques des particules virales artificielles (VLP, *virus-like particles*) constituées de la protéine structurale L1. De façon générale, l'injection de VLP issus d'un génotype viral particulier ne confère une protection que contre ce génotype avec une réactivité croisée très limitée contre d'autres génotypes (Kemp et al., 2011; Szarewski, 2010). Les prochaines générations de vaccin comprendront des VLP issus d'un plus grand nombre de génotypes et de nouvelles études suggèrent que l'ajout de la protéine L2 dans ces vaccins pourrait conférer une protection croisée plus efficace (Jagu et al., 2011; Karanam et al., 2009; Wang & Roden, 2013). La protéine L2, bien que moins immunogénique, possède des épitopes neutralisants hautement conservés permettant une protection étendue à plusieurs génotypes. L'utilité de la vaccination des hommes, pour leur protection contre les pathologies du tractus anogénital masculin, ou encore pour le bénéfice de l'immunité grégaire (*herd immunity*), demeure aussi sujet à débats dans les sphères de la santé publique.

1.2.3 Cycle répliatif viral

Le cycle de vie du VPH est un processus complexe en plusieurs étapes et qui est sommairement résumé dans cette section (pour plus de détails, voir (Doorbar, 2006; Hebner & Laimins, 2006; Hoory et al., 2008)). Le cycle répliatif du VPH est initié par l'entrée du virus dans les cellules basales de l'épithélium stratifié, un processus

s'effectuant vraisemblablement via des microlésions naturelles du tissu (Egawa, 2003; Raff et al., 2013). Le mécanisme d'entrée du virus dans ses cellules cibles demeure à ce jour incomplètement caractérisé. L'interaction de L1 avec la membrane basale (ou matrice extracellulaire), via les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*) et possiblement la laminine 5, semble un prérequis pour initier l'entrée dans les cellules basales (Combita et al., 2001; Culp et al., 2006; Drobni et al., 2003; Giroglou et al., 2001; Johnson et al., 2009; Joyce et al., 1999; Roberts et al., 2007). La liaison de L1 avec le HSPG induit un changement conformationnel qui résulte en l'exposition dans L2 d'un motif de clivage par la furine, indispensable pour l'internalisation du virus (Day et al., 2008; Richards et al., 2006). La nature du ou des récepteurs permettant l'entrée reste un sujet controversé, mais l'implication de l'intégrine $\alpha 6$ a notamment été proposée (Evander et al., 1997; McMillan et al., 1999; Yoon et al., 2001).

Suite à l'interaction virus-cellule hôte, le virion est présumé être internalisé par un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine ou des *caveolae*, bien que des voies alternatives aient aussi été suggérées (Bousarghin et al., 2003; Spoden et al., 2008). Le virus chemine alors dans la voie endosomale où le génome viral est décapsidé par un mécanisme associé à l'acidification de l'endosome précoce (Smith et al., 2008). L'ADN viral est subséquentement transloqué au noyau, une étape nécessitant l'interaction L2-ADN viral et la polymérisation des microtubules (Florin et al., 2006; Kamper et al., 2006). Le génome viral est ensuite transcrit grâce à son promoteur précoce contenu dans la longue région de contrôle (LCR, *long control region*) (section 1.2.4.1). Les transcrits précoces encodent les protéines E7 et E6 qui facilitent, respectivement, la prolifération cellulaire et l'inhibition des voies apoptotiques activées par la dérégulation de la division cellulaire (voir section 1.2.4.3). L'hyperprolifération induite par les oncogènes E6 et E7 crée un environnement favorable à la réplication de l'ADN viral en maintenant la cellule infectée en division active tout en permettant sa différenciation, un contexte cellulaire paradoxal typique des infections aux papillomavirus. Le génome du VPH est répliqué sous une forme extrachromosomique au cours de diverses étapes finement régulées. La réplication permet l'établissement et le maintien de l'ADN viral pendant la phase précoce et de persistance de l'infection, et l'amplification massive du génome viral lors de la phase productive (ou végétative) (voir section 1.3.3). Cette dernière phase est

accompagnée de la transcription des gènes tardifs encodant les protéines de la capside, L1 et L2 (voir section 1.2.4.4), qui permettent l'encapsidation de l'ADN viral et la relâche des virions matures lors de la desquamation des couches supérieures de l'épithélium (Bryan & Brown, 2001). Les principales étapes du cycle viral sont résumées dans la Figure 1.2. Les protéines virales et leurs fonctions sont décrites plus en détails dans la section 1.4.

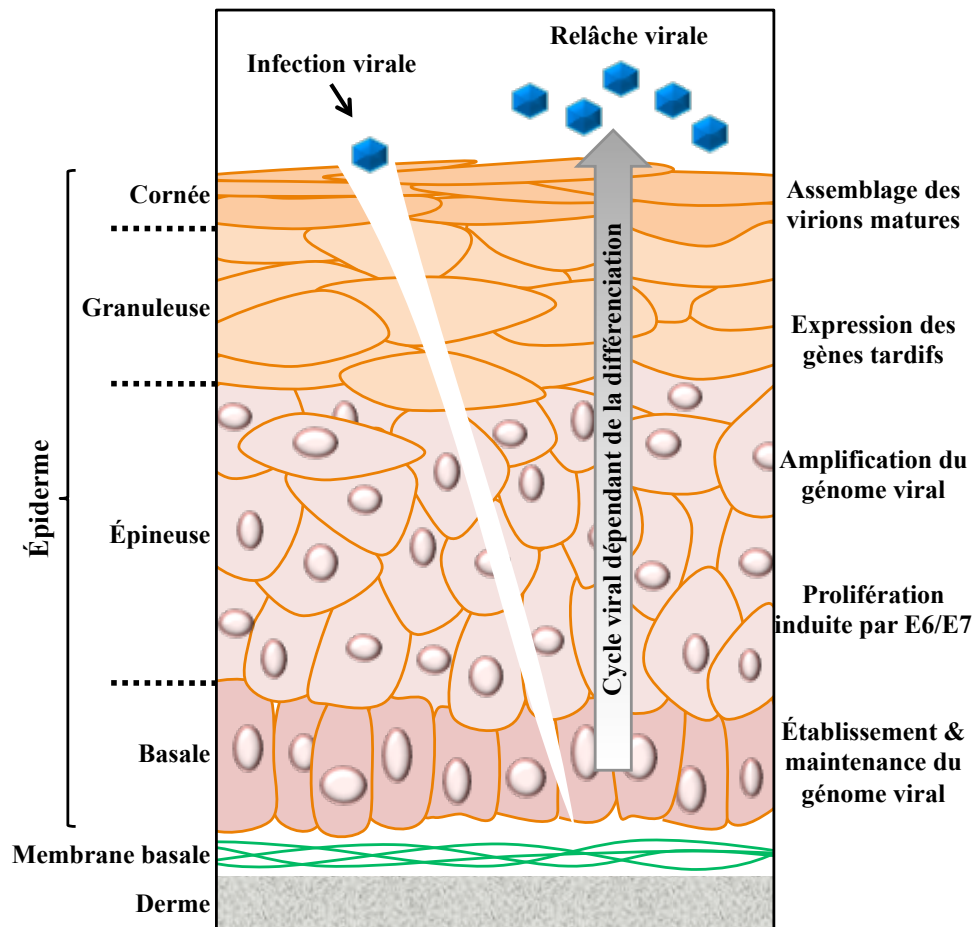


Figure 1.2 Cycle réplcatif du VPH

Cycle réplcatif du VPH dans un épithélium stratifié en différenciation. Les virions infectent d'abord les cellules basales où le génome viral est établi et maintenu par un faible niveau de réplcation de l'ADN viral. L'expression des oncogènes E6 et E7 induit la prolifération cellulaire, prévient la différenciation terminale et inhibe les mécanismes d'arrêt de la division et d'apoptose qui surviennent lors d'une dérégulation du cycle cellulaire. Au fil de la migration des cellules infectées dans les couches supérieures de l'épithélium et de la différenciation cellulaire, le génome viral est amplifié à un haut nombre de copies et les gènes tardifs sont induits. La synthèse des protéines structurales permet

l'encapsulation de nouvelles particules virales matures qui seront relâchées par la desquamation naturelle du tissu. Les couches de l'épithélium (à gauche) et les principales étapes du cycle viral (à droite) sont représentées de chaque côté de l'illustration. La figure est adaptée de (Lehoux et al., 2009), avec la permission de S. Karger AG, Basel.

1.2.4 Organisation génomique et protéines virales

Le génome du VPH contient un nombre limité d'éléments de par sa petite taille d'environ huit kilobases (kb). Le virus encode huit gènes, localisés soit dans la région précoce (E1, E2, E1[^]E4, E5, E6 et E7) ou dans la région tardive (L1 et L2), ainsi qu'un LCR permettant la régulation de la transcription, de la réplication et de la ségrégation du génome (voir Figure 1.3A et résumé dans (Hebner & Laimins, 2006)).

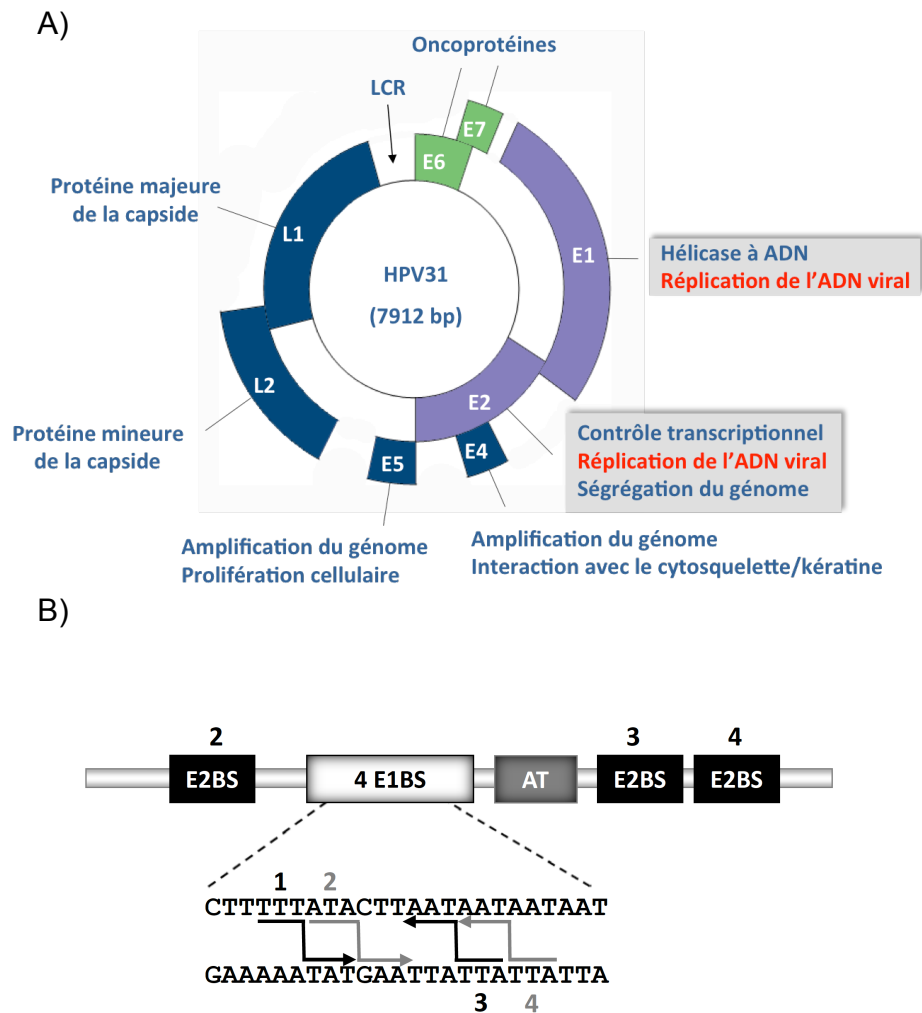


Figure 1.3 Organisation du génome viral et de l'origine de réplication

A) Organisation du génome viral. La position relative du LCR, des gènes précoces (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) et des gènes tardifs (L1 et L2) est indiquée. Les fonctions principales des protéines encodées dans ces gènes sont indiquées. Adapté de (D'Abramo & Archambault, 2011). B) Structure de l'origine de réplication. Représentation schématique d'une portion du LCR comprenant l'origine de réplication. Les sites de liaison de E1 (E1BS), de E2 (E2BS) et la région riche en adénines et thymines (AT) sont représentés. Les E1BS disposés en deux paires inversées sont illustrés par des flèches. D'après (D'Abramo et al., 2011).

1.2.4.1 Longue région de contrôle (LCR)

Le LCR contient deux promoteurs : un promoteur précoce (p97) et un promoteur tardif (p742). Comme leurs noms l'indiquent, les promoteurs sont temporellement régulés au cours du cycle viral de telle sorte que le promoteur précoce est actif dans les cellules basales et le promoteur tardif est activé lorsque les cellules infectées migrent dans les couches supérieures de l'épithélium et entament leur processus de différenciation (del Mar Pena & Laimins, 2001; Hummel et al., 1992; Ozbun & Meyers, 1997, 1998a, 1998b; Zheng & Baker, 2006). Un nombre variable de sites de liaison à E2 (E2BS, *E2-binding site*) se trouvent dans le LCR. En plus de leur fonction au cours de la réplication (voir ci-bas), ces E2BS sont aussi impliqués dans la régulation de la transcription virale, puisque E2 est un facteur de transcription. En fonction du niveau d'occupation des E2BS par E2, la réponse transcriptionnelle varie. Ainsi, lorsque E2 est très abondant, tous les sites de liaison sont occupés, induisant la répression du promoteur p97 et l'inhibition de l'expression des oncogènes E6 et E7 (Alexander & Phelps, 1996; Demeret et al., 1997; Romanczuk et al., 1990; Sanchez et al., 2008; Steger & Corbach, 1997). La liaison de E2 aux E2BS joue aussi un rôle important lors de la ségrégation du génome viral pendant la mitose. Les fonctions de E2 au cours du cycle viral sont détaillées dans la section 1.2.4.2.

Les ARN messagers (ARNm) des gènes viraux sont transcrits sous une forme polycistronique qui nécessite un balayage par le ribosome pour permettre la traduction des ORF individuels (Remm et al., 1999). Outre le choix du promoteur (précoce ou tardif), la régulation de l'expression des gènes viraux implique aussi de l'épissage alternatif et l'expression de micro-ARN (Gunasekharan & Laimins, 2013; Hummel et

al., 1995; Johansson & Schwartz, 2013; Klumpp & Laimins, 1999; Klumpp et al., 1997; Qian et al., 2013; Schwartz, 2013; Zheng & Baker, 2006).

Une autre séquence nucléotidique hautement conservée dans le LCR et essentielle pour la réplication du génome viral se nomme origine de réplication (ori). L'ori se situe à l'extrémité 3' du LCR et comprend des séquences palindromiques de liaison à E1 (E1BS, *E1-binding site*), une région riche en adénines et thymines (AT) et trois E2BS situés de part et d'autre des E1BS (voir Figure 1.3B) (Chen & Stenlund, 2001; Holt & Wilson, 1995; Lee et al., 1997; Lu et al., 1993; Mendoza et al., 1995; Russell & Botchan, 1995; Spalholz et al., 1993; Stubenrauch et al., 1998; Sun et al., 1996; Sverdrup & Khan, 1995; Titolo et al., 2003). On retrouve quatre E1BS disposés en deux paires inversées qui contiennent normalement la séquence consensus ATTGTT, bien que certains sites puissent tolérer des variations (Chen & Stenlund, 2001; Titolo et al., 2003). La fonction de ces éléments génétiques est détaillée dans la section traitant de la réplication virale (voir section 1.3).

1.2.4.2 E1 et E2

Les protéines E1 et E2 jouent un rôle fondamental au cours de la réplication du VPH, qui est décrite en détails à la section 1.3 et 1.4 (Ustav & Stenlund, 1991). Brièvement, E1 permet l'initiation de la réplication grâce la reconnaissance de l'ori, une étape nécessitant également la protéine E2. E1 possède une activité hélicase permettant de dérouler l'ADN viral en aval de la fourche de réplication. Cette thèse s'intéresse particulièrement à la fonction de E1 et ses mécanismes de régulation, justifiant qu'une section séparée lui soit consacrée (voir section 1.4).

La protéine E2 est une protéine d'environ 360 acides aminés (aa) qui se localise naturellement au noyau grâce à son NLS (Klucevsek et al., 2007; Zou et al., 2000). Outre son rôle dans la réplication virale, E2 est aussi un facteur de transcription et de ségrégation du génome viral. E2 contient un domaine de transactivation (TAD, *transactivation domain*) en N-terminal, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA-binding domain*) en C-terminal, séparés par une région charnière. Le TAD est aussi impliqué dans l'interaction avec E1 lors de la réplication virale (Berg & Stenlund, 1997; Storey et al., 1995). Le domaine C-terminal, quant à lui, est impliqué dans

l'homodimérisation de E2, la forme sous laquelle E2 se lie à l'ADN (Gagnon et al., 2013; McBride et al., 1989).

Tel que mentionné précédemment, E2 joue un rôle de régulateur transcriptionnel en réprimant l'expression des oncogènes E6 et E7. On détecte d'ailleurs que dans la majorité des cas de cancer du col utérin, l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire mène à la destruction du cadre de lecture de E2 et induit une surexpression des oncoprotéines (Baker et al., 1987; Durst et al., 1985). Différents facteurs cellulaires interagissant avec E2 contribuent aussi à son activité de transactivation, notamment Brd4, TopBP1 et CDH6 (Boner et al., 2002; Fertey et al., 2010; Gagnon et al., 2009; Lee & Chiang, 2009; McPhillips et al., 2006; Senechal et al., 2007; Wu et al., 2006).

E2 est également impliqué dans la ségrégation du génome viral lors de la mitose par sa capacité à interagir simultanément avec l'ADN viral et les chromosomes cellulaires. L'interaction du DBD de E2 avec les E2BS du génome viral a été précédemment décrite, mais E2 peut aussi lier la chromatine cellulaire via son TAD. Cette dernière interaction est indirecte et nécessite la liaison avec des facteurs cellulaires associés à l'ADN mitotique tels que Brd4, ChR1, MKlp2 ou TopBP1 (Boner et al., 2002; Donaldson et al., 2007; McPhillips et al., 2006; Parish et al., 2006; Yu, Peng, et al., 2007). Cette interaction avec les chromosomes cellulaires permet la partition des génomes viraux dans les cellules filles lors de la cytokinèse et assure la persistance de l'ADN viral au fil des divisions.

Certaines études ont également rapporté l'existence de la protéine E8^{E2C} (ou E8), une protéine résultant de l'épissage alternatif des transcrits de E2. E8 est constitué de la fusion du cadre de lecture ouvert de E8 (12 aa) avec le domaine C-terminal de E2. C'est donc une protéine qui a le potentiel de lier les E2BS, mais dépourvue du TAD, et pouvant donc compétitionner et moduler la fonction de E2 lors de la transcription et de la réplication (Doorbar et al., 1990; Fertey et al., 2011; Stubenrauch et al., 2000; Stubenrauch et al., 2007; Stubenrauch et al., 2001; Zobel et al., 2003).

1.2.4.3 E6 et E7

Au cours d'une infection productive, les protéines E6 et E7 régulent une pléiade de voies cellulaires permettant à la cellule hôte de maintenir un état actif de division

cellulaire tout en échappant à l'apoptose activée par la prolifération anormale induite par le virus. Les partenaires d'interaction de ces protéines, ainsi que leurs fonctions, sont très nombreux et ne seront que brièvement résumés ici (voir (Lehoux et al., 2009)).

E7 est une petite protéine d'environ 100 aa dont la principale fonction est d'induire la prolifération des cellules infectées (voir Figure 1.4) (Roman & Munger, 2013). E7 interagit avec les protéines de l'hôte de la famille pRb (pRb, p107 et p130) via son domaine LxCxE (Chan et al., 2001; Dyson et al., 1989; Munger, Werness, et al., 1989). pRb est impliqué dans la séquestration des facteurs de transcription de la famille E2F, requis lors de la transition de la phase G1/S du cycle cellulaire (Cobrinik, 2005). La relâche des facteurs E2F, un phénomène normalement contrôlé par la phosphorylation de pRb par les kinases Cdk2 et Cdk4, est artificiellement induite par la liaison de E7 et mène à l'activation des gènes répondant à E2F. Parmi les gènes cibles de E2F, on retrouve plusieurs facteurs impliqués dans la phase S du cycle cellulaire, dont les enzymes de synthèse de l'ADN et Cdk2. Ceci a pour effet de maintenir la cellule infectée dans un état favorable à la réplication de l'ADN viral. La protéine E7 issue des VPH à bas-risque mène à la dissociation du complexe pRb-E2F, alors que E7 des VPH à haut-risque induit la dégradation de pRb par le protéasome, possiblement via la E3 ubiquitine-ligase contenant la Culline 2 (Gonzalez et al., 2001; Huh et al., 2007; Pim & Banks, 2010; Zhang et al., 2006). En plus d'induire l'expression de Cdk2 par l'inactivation des protéines pRb, E7 active directement Cdk2 et inactive les inhibiteurs de Cdk p21 et p27 (Funk et al., 1997; He et al., 2003; Jones, Alani, et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996). E7 lie et inhibe également les histone déacétylases de classe I (HDAC), dont la présence réprime la transcription des gènes répondant à E2F2 et la progression en phase S (Longworth & Laimins, 2004; Longworth et al., 2005). Globalement, E7 maintient la cellule infectée en prolifération active, malgré l'entrée en différenciation, et est ainsi grandement responsable du phénotype hyperplasique.

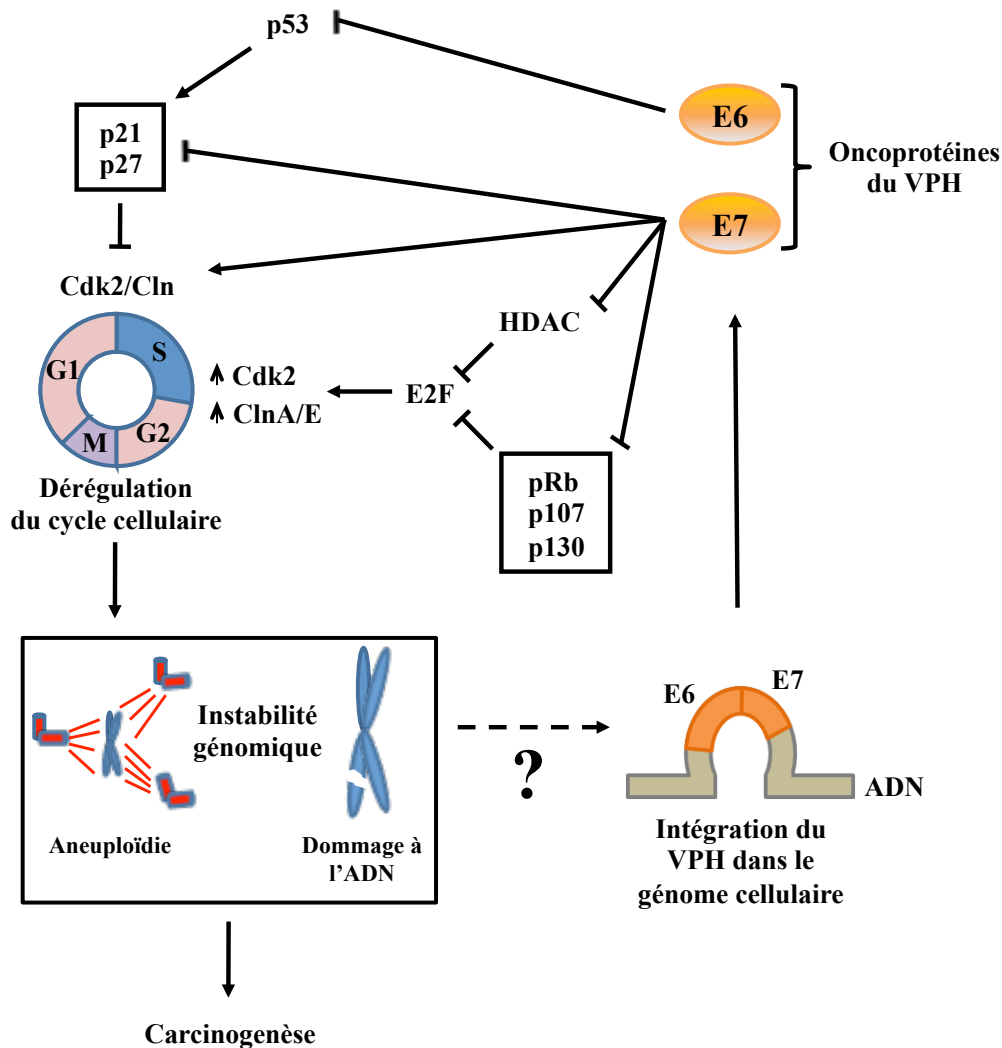


Figure 1.4 E7 : induction de la prolifération cellulaire et instabilité génomique

Les principaux mécanismes par lesquels E7 induit la prolifération cellulaire sont indiqués :

1. Inhibition et dégradation des protéines de la famille pRb,
2. Induction des cyclines (Cln) A/E-Cdk2,
3. Inhibition des inhibiteurs de Cdk p21 et p27,
4. Inhibition des histones déacétylases (HDAC) impliquées dans la répression des gènes répondant à E2F.

E6 inhibe l'apoptose en interférant avec p53. Les effets synergétiques de E7 et E6 favorisent la prolifération cellulaire et s'accompagnent également d'un climat d'instabilité génomique, contribuant au potentiel oncogénique de E6 et E7. La figure est adaptée de (Lehoux et al., 2009), avec la permission de S. Karger AG, Basel.

La prolifération anormale et soutenue induite par E7 génère typiquement une réponse menant à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose via l'activation de p53 (Jones, Thompson, et al., 1997). Cette réponse antivirale est spécifiquement ciblée par la protéine E6, une petite protéine multifonctionnelle

d'environ 150 aa comportant deux motifs en doigts de zinc (Vande Pol & Klingelutz, 2013). E6 forme un complexe ternaire avec E6-AP (*E6-associated protein*), une E3 ubiquitine-ligase cellulaire, et p53. Cette interaction mène à la dégradation de p53 (Huibregtse et al., 1995; Huibregtse et al., 1991; Mesplede et al., 2012). E6-AP est une E3 ubiquitine-ligase de type HECT (voir section sur l'ubiquitination, section 1.5) qui n'est pas impliquée dans la régulation de la stabilité de p53 de façon endogène, mais dont l'activité est détournée par la liaison à E6 (Beer-Romero et al., 1997). E6 contient aussi dans son extrémité C-terminale un motif de liaison (xT/SxV/L) aux domaines PDZ qui permet à E6 d'interagir avec plusieurs protéines de l'hôte comportant ce domaine, dont hDlg, hScribb, MUPP-1, PATJ, TIP-2/GIPC, PTPN13 et MAGI-1, -2 et -3 (Favre-Bonvin et al., 2005; Lee & Laimins, 2004; McLaughlin-Drubin & Munger, 2009; Nguyen et al., 2003; Spanos et al., 2008; Storrs & Silverstein, 2007). Ces interactions promeuvent la dégradation protéasomale de ces protéines à PDZ via l'ubiquitination par E6-AP, et contribuent aussi à l'oncogenèse de manière indépendante de l'inactivation de p53 (Shai et al., 2007). La plupart de ces protéines à PDZ sont impliquées dans le maintien de la polarité apicobasale, la prolifération et l'adhésion cellule-cellule et agissent comme suppresseurs de tumeurs, pouvant expliquer le potentiel oncogénique de leur dégradation par E6. Cette fonction de E6 semble être très importante comme on peut en juger par la grande conservation du domaine de liaison aux PDZ. Un exemple atypique de la conservation de cette fonction est illustré par le virus du papillome du singe Rhesus qui ne possède pas ce domaine dans E6, mais l'encode dans la protéine E7 (Tomaic et al., 2008). E6 a aussi la capacité d'induire l'immortalisation des cellules infectées en interférant directement avec l'activité des téloméras (hTERT, *human telomerase reverse transcriptase*), permettant ainsi d'éviter la sénescence induite ultimement par l'érosion des télomères associée à une prolifération dérégulée. E6 active la transcription de hTERT et induit la dégradation de ses répresseurs transcriptionnels (Galloway et al., 2005; Gewin & Galloway, 2001; Gewin et al., 2004; Oh et al., 2001; Sekaric et al., 2008; Veldman et al., 2001; Veldman et al., 2003).

Notons que E6 possède aussi un potentiel anti-apoptotique indépendant de p53. Effectivement, E6 est tout de même capable d'inhiber l'apoptose dans des souris transgéniques p53 *-/-* (Pan & Griep, 1995). Il a été suggéré que E6 pourrait notamment inhiber les facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak, interférer avec des voies apoptotiques

extrinsèques telles que celles induites par TNF- α , TRAIL et FAS, et bloquer l'anoïkose en interagissant avec des molécules d'adhésion focale incluant Paxillin, Zysin et Fibulin-1 (Degenhardt & Silverstein, 2001; Du et al., 2002; Filippova et al., 2004; Filippova et al., 2002; Kabsch et al., 2004; Thomas & Banks, 1998, 1999; Thompson et al., 2001; Tong & Howley, 1997; Vande Pol et al., 1998; Vogt et al., 2006). Les fonctions de E6 sont résumées dans la Figure 1.5.

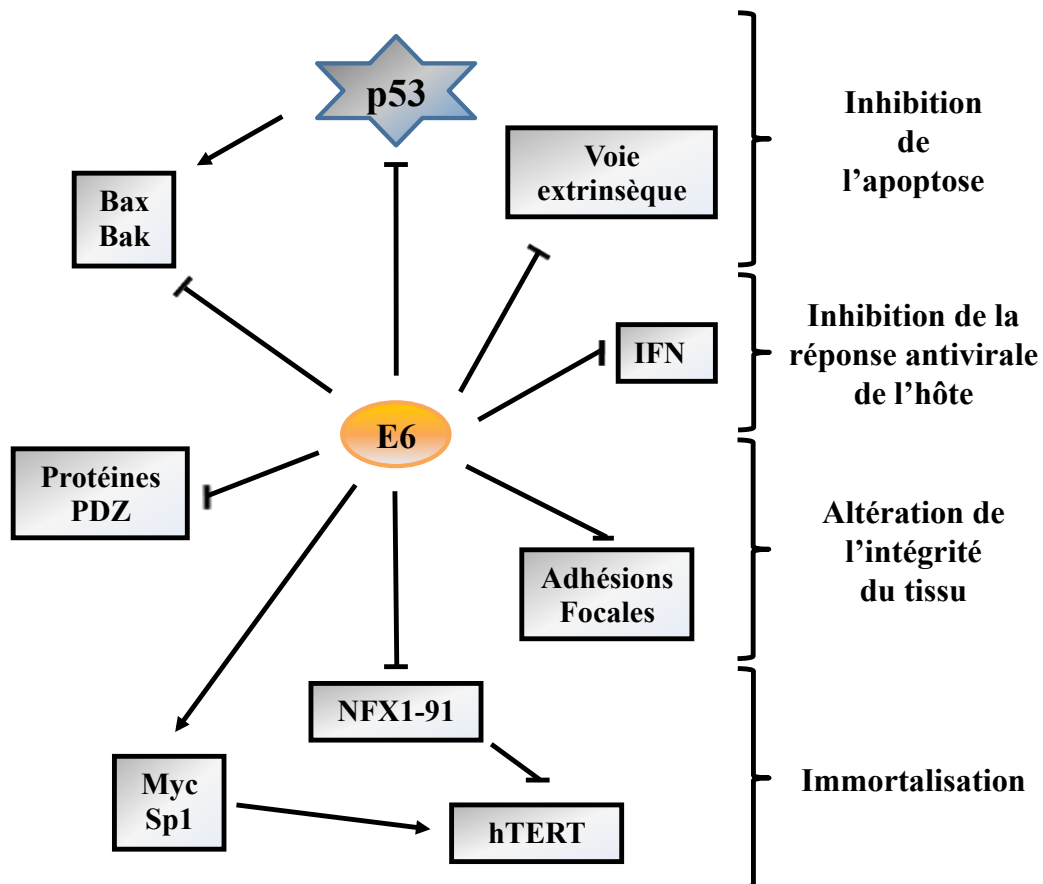


Figure 1.5 Fonctions de l'oncogène E6

E6 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose, la réponse antivirale, l'intégrité des tissus et l'immortalisation. La principale fonction anti-apoptotique de E6 s'effectue par l'inhibition de p53. E6 interfère aussi avec les voies apoptotiques extrinsèques et la fonction de Bax et Bak. En outre, E6 contribue à déstabiliser l'intégrité tissulaire en liant les molécules d'adhésion focale et les protéines à domaine PDZ. E6 contribue également à l'immortalisation cellulaire en induisant la télomérase hTERT via l'activation transcriptionnelle par Myc et Sp1, et en inhibant les répresseurs transcriptionnels NFX1-191. Finalement, E6 inhibe aussi la réponse antivirale de l'interféron (IFN). La figure est adaptée de (Lehoux et al., 2009), avec la permission de S. Karger AG, Basel.

Un variant de E6 appelé E6*, produit par épissage alternatif, est aussi exprimé dans les tissus infectés. Cette forme alternative et tronquée de E6 conserve le domaine amino-terminal de liaison à E6-AP, mais est dépourvue de son motif de liaison aux domaines PDZ. E6* s'associe également avec E6 pleine longueur et bloque son interaction avec p53 *in vitro* et *in vivo* (Pim et al., 1997). E6* pourrait aussi induire la dégradation de protéines cellulaires dont certaines sont des cibles naturelles de E6, alors que d'autres lui sont uniques (résumé dans (Vande Pol & Klingelutz, 2013)). Cette protéine module donc vraisemblablement l'activité du E6 pleine longueur et réduit son potentiel anti-apoptotique.

Ainsi, E6 et E7 ont une fonction synergétique qui favorise la prolifération tout en inhibant les réponses indésirables qui y sont associées. De par leur potentiel à déréguler la prolifération cellulaire et l'apoptose, les gènes E6 et E7 sont également reconnus comme étant les oncogènes viraux et sont suffisants pour immortaliser des kératinocytes primaires (Hawley-Nelson et al., 1989; Munger, Phelps, et al., 1989). En outre, l'expression de ces oncogènes dans des souris transgéniques, ensemble ou séparément, est tumorigénique (Herber et al., 1996; Riley et al., 2003; Song et al., 1999). Bien que nécessaire, l'expression des oncogènes seuls est néanmoins insuffisante pour induire la carcinogenèse. Des kératinocytes primaires immortalisés par E6 et E7 ne peuvent induire de tumeurs malignes lors de xénogreffes que s'ils sont cultivés sur de nombreux passages, leur permettant d'acquérir des mutations génétiques additionnelles (Hurlin et al., 1991). Ceci est similaire au contexte clinique qui requiert de nombreuses années, voire des décennies, d'infections persistantes pour permettre l'apparition de lésions malignes. Dans le contexte du col utérin, tel que mentionné précédemment, ce sont souvent les événements d'intégration du génome et de destruction du gène E2 qui sont associés à la surexpression des oncogènes favorisant le processus de transformation. Cet événement d'intégration s'effectue de manière aléatoire, mais préférentiellement au niveau des sites fragiles communs (CFS, *common fragile sites*) (Matovina et al., 2009; Thorland et al., 2003; Wentzensen et al., 2004). L'expression des oncogènes induit aussi l'instabilité génomique, favorisant l'apparition de mutations potentiellement tumorigéniques, et pouvant possiblement contribuer à l'intégration du génome viral, qui

à son tour accentue l'instabilité du génome (Lehoux et al., 2009). C'est donc un phénomène de dérégulation du cycle viral normal qui est causatif du processus d'oncogenèse. Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse induite par le VPH sont le sujet d'une revue entière (voir (Lehoux et al., 2009)).

1.2.4.4 L1 et L2 : protéines structurales

Les protéines L1 et L2 sont deux protéines tardives formant la capsid virale, qui est constituée de 72 pentamères de L1 et d'une quantité incertaine de L2 (Baker et al., 1991; Chen et al., 2000; Sapp & Day, 2009). L'assemblage d'une capsid mature nécessite la formation d'un réseau complexe de ponts disulfures dont l'architecture exacte est mal connue (Li et al., 1998; Sapp et al., 1998). L2 n'est pas strictement requis pour la formation de la capsid. Ceci est appuyé par le fait qu'il est possible de synthétiser *in vitro* des VLP simplement en mélangeant des monomères de L1 dans les bonnes conditions de solution (Kirnbauer et al., 1993; Mach et al., 2006; Zhou et al., 1992). Ce sont d'ailleurs ces VLP de L1 qui sont utilisés dans la conception des vaccins prophylactiques contre le VPH, puisqu'ils ont un excellent potentiel immunogénique (voir section 1.2.2.3). Les deux protéines structurales, L1 et L2, sont toutefois indispensables *in vivo* pour l'assemblage de particules virales infectieuses. L1 et L2 jouent un rôle important lors de l'internalisation du virus (voir section 1.2.3). La protéine L2 est aussi impliquée lors de l'encapsidation du génome viral, possiblement via une interaction L2-ADN (Holmgren et al., 2005).

1.2.4.5 E1[^]E4 et E5

Les fonctions de E1[^]E4 et de E5 sont peu connues, mais ces deux protéines sont requises pour l'amplification du génome viral (Fehrmann et al., 2003; Genter et al., 2003; Wilson et al., 2005).

E1[^]E4 est une protéine résultant de la fusion par épissage alternatif du codon d'initiation et des quelques premiers résidus de E1 avec l'ORF de E4 (Doorbar, 2013). Elle est principalement exprimée suite à la différenciation des kératinocytes, ce qui est cohérent avec son importance lors de la phase végétative, et est l'une des protéines les plus fortement exprimées au cours du cycle viral. Son abondance facilite sa détection, constituant un excellent biomarqueur d'une infection virale active. Il a aussi été proposé

que E1^{E4} pourrait être impliqué dans l'interaction et la déstabilisation du cytosquelette de kératine, facilitant la desquamation des cellules cornifiées et favorisant la relâche des particules virales matures (Bryan & Brown, 2000; Doorbar et al., 1991; McIntosh et al., 2010; Nakahara et al., 2005; Peh et al., 2004; Pray & Laimins, 1995; Roberts et al., 1994; Roberts et al., 1997; Wang, Griffin, et al., 2004; Wilson et al., 2005; Wilson et al., 2007). L'instabilité du cytosquelette induite par E1^{E4} semble impliquer une interaction directe avec la cytokératine et l'induction de sa polyubiquitination. La propension de E1^{E4} à multimériser semble contribuer à cette fonction. E1^{E4} encode aussi un motif de liaison aux cyclines (CBM) et son interaction avec les cyclines-Cdk induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2 qui n'est toutefois pas requis pour l'amplification du génome viral (Knight et al., 2011).

La protéine E5, quant à elle, est une protéine hydrophobique et transmembranaire (DiMaio & Petti, 2013). Elle est considérée comme la troisième oncoprotéine, après E6 et E7, et possède une activité de transformation lorsque exprimée dans des cellules en culture. Cette activité de transformation est en partie expliquée chez le virus du papillome bovin de type 1 (VPB1) par la capacité de E5 à lier et stimuler le récepteur du facteur de croissance PDGF β (*platelet-derived growth factor β*) (Drummond-Barbosa et al., 1995; Goldstein et al., 1992; Goldstein et al., 1994; Lai et al., 1998, 2000; Petti et al., 1991). Pour le VPH, l'activité oncogénique de E5 est beaucoup plus faible et semble associée au récepteur du EGF (*epidermal growth factor*) dont l'expression à la surface plasmique est augmentée (Bouvard et al., 1994; Maufort et al., 2010; Maufort et al., 2007; Stoppler et al., 1996; Suprynowicz et al., 2005; Valle & Banks, 1995). (Crusius et al., 1997; Crusius et al., 1998; Genther Williams et al., 2005; Leechanachai et al., 1992; Pim et al., 1992; Straight et al., 1995; Straight et al., 1993; Suprynowicz et al., 2010; Tomakidi et al., 2000). Outre l'interaction avec les récepteurs de facteurs de croissance, E5 pourrait agir comme un canal ionique selon des modélisations *in silico*, des observations en microscopie électronique et des essais de perméabilité de liposomes (Wetherill et al., 2012). Finalement, E5 est impliqué dans l'évasion du système immunitaire en interférant avec la présentation des antigènes par les molécules CMH I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) (Ashrafi et al., 2006; Ashrafi et al., 2005).

1.3 Réplication de l'ADN viral

1.3.1 Machinerie de réplication de l'ADN eucaryote

Puisque le VPH exploite la machinerie cellulaire de réplication pour assurer la duplication de son propre ADN, il est utile de traiter sommairement de la réplication de l'ADN eucaryote. La synthèse de l'ADN cellulaire débute par l'assemblage d'un pré-réplisome, ou complexe de pré-réplication (pre-RC), sur des séquences spécifiques d'ADN pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Tout d'abord, les protéines ORC1 à ORC6 (*origin recognition complex*) reconnaissent ces origines de réplication, qui sont multiples chez les eucaryotes. Ensuite, au début de la phase S, s'assemble le complexe MCM (*mini-chromosome maintenance*) qui possède une activité hélicase et qui catalyse le déroulement de l'ADN de manière homologue à l'hélicase virale E1. Le complexe MCM est hexamérique et est constitué des six sous-unités MCM2 à MCM7 qui permettent d'amorcer l'élongation de la réplication. Les protéines Cdc6 et Cdt1 modulent le recrutement de MCM et le licenciement du pre-RC. Les complexes cycline-Cdk sont également impliqués dans la phosphorylation du pre-RC pour son assemblage et son activation.

Le réplisome implique aussi les ADN polymérases (α -primase, δ et ϵ), le complexe de chargement RFC (*replication factor C*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et les topoisomérases. Sur le brin direct (ou précoce), la polymérase ϵ synthétise l'ADN de façon continue et dans le même sens que le déroulement de l'ADN, alors que sur le brin retardé, la polymérase δ synthétise l'ADN de manière discontinue. Les fragments d'ADN dupliqués sur le brin retardé sont appelés fragments d'Okazaki et débutent par une amorce d'ARN synthétisée par la polymérase α -primase, une amorce qui est ensuite éliminée par l'élongation du fragment d'Okazaki en amont. Le chargement et le déchargement de PCNA sur l'ADN sont catalysés par le complexe RFC, et PCNA est essentiel pour promouvoir l'interaction entre les polymérases et l'ADN. La protéine RPA (*replication protein A*) est nécessaire pour stabiliser l'ADN simple brin (sb) exposé et éviter la formation de structures secondaires dans l'ADN. Finalement, les topoisomérases sont aussi recrutées afin de relâcher le stress de torsion induit par le déroulement de l'ADN. La réplication cellulaire est hautement régulée dans

le but d'éviter qu'elle ne survienne dans des conditions défavorables à la duplication fidèle du génome et pour éviter la ré-initiation de la synthèse d'ADN.

1.3.2 Hélicases à ADN

De manière endogène, les acides nucléiques existent souvent sous forme de duplex résultant de la capacité des bases azotées des nucléotides à s'hybrider à des bases complémentaires. Plusieurs processus cellulaires, dont la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN, requièrent la séparation de ces paires de bases nucléotidiques (résumé dans (Hickman & Dyda, 2005; Patel & Donmez, 2006)). Les hélicases sont responsables de la catalyse de ce déroulement selon un processus dépendant de l'hydrolyse de nucléotides triphosphates, typiquement de l'ATP. On retrouve des hélicases dans le génome de tous les organismes vivants ; leur importance étant illustrée par le fait que près de 1% des gènes eucaryotes encodent des hélicases connues ou présomptives (Wu, 2012). Les hélicases peuvent avoir des directionalités variables (5'-3' ou 3'-5') et avoir pour substrat des duplex d'ADN et/ou d'ARN. Six superfamilles d'hélicases ont été identifiées, chacune caractérisée par la conservation de certains motifs dans leur séquence primaire. Toutes les hélicases partagent toutefois certaines similarités dans leur structure tridimensionnelle.

La protéine virale E1 appartient à la superfamille 3 des hélicases à ADN, qui englobe d'ailleurs principalement des enzymes d'origine virale. Les hélicases de cette superfamille fonctionnent sous forme d'un hexamère en forme d'anneau. Elles agissent comme des pompes qui forcent le passage d'un seul des deux brins d'ADN à l'intérieur du canal contenu au centre de l'enzyme, induisant ainsi la séparation des duplex. L'antigène grand T de SV40 en est un membre prototypique et a souvent servi de modèle pour l'étude des hélicases à ADN. Le couplage des différents monomères de l'enzyme à des nucléotides triphosphate, ainsi que l'hydrolyse de ces derniers, détermine les changements conformationnelles qui assurent la translocation de l'ADN à l'intérieur du canal et le déroulement des acides nucléiques sur une longue distance. La réplication de l'ADN du VPH requièrent la fonction hélicase catalysée par E1, mais aussi diverses autres activités exécutées par cette protéine virale.

1.3.3 Mécanisme de réplication de l'ADN viral

Bien que E1 soit la protéine initiatrice de la réplication, E2 est strictement requis pour le recrutement de E1 à l'ori. L'interaction E1-E2, ainsi que la capacité de E2 à lier l'ori, permettent la liaison coopérative de E1 sur l'ADN viral (Abbate et al., 2004; Berg & Stenlund, 1997; Blitz & Laimins, 1991; Bonne-Andrea et al., 1997; Chiang et al., 1992; Frattini & Laimins, 1994a; Kuo et al., 1994; Mohr et al., 1990; Sanders & Stenlund, 1998, 2000, 2001; Sedman & Stenlund, 1995; Seo, Muller, Lusky, Gibbs, et al., 1993; Ustav & Stenlund, 1991; Yang et al., 1991). E1 possède une faible spécificité pour la reconnaissance de l'ADN et sa liaison peut aisément être inhibée par la compétition avec des séquences d'ADN non-spécifiques, comme cela est le cas dans un contexte cellulaire où la quantité d'ADN de l'hôte dépasse largement la quantité d'ADN viral (Dixon et al., 2000; Sedman & Stenlund, 1995; Sedman et al., 1997; Titolo et al., 2003; Yang et al., 1991). Alternativement, E1 peut lier l'ori *in vitro* en absence de E2 lors de l'utilisation de concentrations élevées de E1 (Bonne-Andrea, Santucci, & Clertant, 1995). Dans un contexte *in vivo*, E2 est toutefois requis afin d'augmenter la concentration locale de E1 près de l'origine et ainsi lui permettre de reconnaître spécifiquement les E1BS.

Outre les protéines E1 et E2, la réplication de l'ADN viral nécessite la machinerie cellulaire de synthèse de l'ADN (voir section 1.3.1). C'est cependant la protéine E1 qui orchestre l'ensemble des étapes d'initiation et d'élongation de la duplication de l'ADN, notamment en recrutant directement certains facteurs de réplication de l'hôte dont la polymérase α -primase, la topoisomérase I et RPA (voir section 1.4.5). Hormis les facteurs de réplication directement recrutés par E1, d'autres protéines cellulaires sont aussi requises pour la synthèse de l'ADN viral. Ces protéines ont été identifiées par la reconstitution *in vitro* d'un essai de réplication acellulaire en utilisant des facteurs de l'hôte purifiés et des extraits cellulaires fractionnés. Certaines de ces protéines furent validées par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou d'anticorps neutralisants. Parmi celles-ci se trouvent l'ADN polymérase δ , le facteur de processivité PCNA, le facteur de chargement RFC et les topoisomérases. Ces travaux suggèrent aussi que d'autres protéines, inconnues à ce jour, sont requises pour la réplication virale, dont

l'ADN polymérase ϵ a été proposée comme candidate (Kuo et al., 1994; Melendy et al., 1995; Muller et al., 1994).

Le génome viral est répliqué sous la forme d'un élément extrachromosomique nommé épisome. Le cycle réplcatif du VPH comprend trois étapes de réplcation de l'ADN : l'établissement, le maintien et l'amplification. Tout d'abord, E1 assure l'établissement de l'infection en réplquant le génome viral à un faible niveau jusqu'à environ 50-100 copies par cellule (Frattini et al., 1996; Taichman et al., 1983). Ceci assure au virus l'accumulation d'un nombre de copies du génome suffisant pour accomplir les étapes subséquentes, dont l'expression des gènes viraux. Cette phase est rapide et transitoire, expliquant nos connaissances limitées sur le sujet. La rapidité de cette étape de réplcation passe nécessairement par une expression rapide de E1 au début de l'infection qui pourrait être expliquée par un épissage alternatif favorisant la traduction de E1 ainsi que par l'utilisation de certains facteurs cellulaires de transcription (Demeret et al., 1995; Deng et al., 2003; Hubert & Laimins, 2002). Ensuite, la réplcation virale assure le maintien du génome du VPH dans les cellules basales de l'épithélium. Ce maintien est une étape de réplcation de l'ADN, dite ordonnée, qui survient en synchronie avec le cycle de la cellule hôte et qui est présumée survenir une fois seulement par division cellulaire (Roberts & Weintraub, 1988). Notons que certains laboratoires ont rapporté l'existence d'une réplcation aléatoire du génome, i.e. ayant lieu plus d'une fois par cycle cellulaire (Gilbert & Cohen, 1987; Piirsoo et al., 1996; Ravnan et al., 1992). Cette disparité pourrait être attribuable aux conditions de surexpression de E1 utilisées dans ces études et moins représentatives des niveaux naturellement présents lors du maintien (Hoffmann et al., 2006). Le maintien du génome, conjointement avec la ségrégation mitotique de l'épisome accomplie par E2, permet d'assurer la persistance d'un nombre constant de copies du génome dans les cellules filles infectées et crée un réservoir viral dans la couche basale. Ce faible niveau de réplcation est modulé par E1 dont l'expression est limitée par la répression du promoteur p97 par E2 dans les cellules non différenciées. Finalement, l'amplification du génome survient lors des étapes tardives de l'infection, de façon concomitante avec la différenciation cellulaire et l'activation du promoteur tardif (p742) qui conduit à la surexpression de E1 et E2. Ainsi, une réplcation accrue de l'ADN viral est induite et mène à la production massive de copies du génome visant à leur encapsidation et la

production de nouvelles particules virales infectieuses (Bedell et al., 1991; Grassmann et al., 1996; Hummel et al., 1992; Klumpp & Laimins, 1999; Ozbun & Meyers, 1997, 1998a, 1998b). La réplication n'est alors plus synchronisée avec le cycle cellulaire et devient donc aléatoire. Il est à noter que les génomes encapsidés sont sous forme de chromatine, associés à des histones cellulaires (Favre et al., 1977; Swindle & Engler, 1998). Toutes ces étapes de réplication (établissement, maintien et amplification) impliquent E1 comme protéine initiatrice, bien que certaines études controversées suggèrent que la réplication puisse parfois survenir indépendamment de la présence de E1 (Angeletti et al., 2002; Egawa et al., 2012; Kim & Lambert, 2002; Pittayakhajonwut & Angeletti, 2008, 2010). Notons aussi que bien que l'ADN viral soit fréquemment détecté sous forme intégrée au génome cellulaire dans l'occurrence de cancers, ce phénomène est abortif pour la réplication et ne fait probablement pas partie du cycle viral normal.

Plusieurs études suggèrent que la réplication du génome viral est effectuée de manière bidirectionnelle. En effet, les propriétés électrophorétiques de l'ADN répliqué lorsque analysé par gel de polyacrylamide bidimensionnel sont caractéristiques d'un mode de réplication bidirectionnel (Auborn et al., 1994; Geimanen et al., 2011; Kadaja et al., 2007; Schwartzman et al., 1990). De plus, la présence de bulles de réplication, i.e. une ouverture de l'ADN double brin (db) en forme d'oreilles de lapin, telle qu'observée en microscopie électronique est aussi en faveur de ce mode de réplication (Fouts et al., 1999; Lin et al., 2002). Il a toutefois été proposé que pendant la phase productive de la réplication (ou amplification), la synthèse de l'ADN procède selon un mécanisme de cercles roulants typique d'une réplication unidirectionnelle (Dasgupta et al., 1992; Flores & Lambert, 1997; Kusumoto-Matsuo et al., 2011). Une réplication en cercles roulants génèrerait des concatémères d'ADN qui devraient éventuellement être clivés et refermés sous forme de génomes viraux circulaires individuels. Les protéines qui permettraient un tel type de réplication par le VPH demeurent inconnues. Certaines publications récentes suggèrent que les facteurs de réparation de l'ADN du complexe MRN (Mre11-Rad50-NBS1) sont impliqués lors de l'amplification du génome viral ((Gillespie et al., 2012; Kadaja et al., 2009) et communication personnelle par CA Moody). Ces protéines sont normalement utilisées pour la réparation de l'ADN via le recrutement de facteurs de recombinaison homologue qui pourraient constituer une

machinerie capable de recirculariser des génomes concatémériques. Il pourrait donc y avoir une transition entre ces deux modes de réplication, bidirectionnel et unidirectionnel, lors du passage du maintien à l'amplification du génome, induite par la différenciation cellulaire. Cette hypothèse reste à être confirmée.

Globalement, la réplication de l'ADN viral survient pendant différentes phases (établissement, maintien et amplification) et passe possiblement par différents modes de réplication (bi- ou unidirectionnel). Toutes ces étapes ont en commun l'implication de E1 comme protéine initiatrice, le recrutement des protéines de réplication de l'hôte et l'induction de la phase S grâce aux protéines E6 et E7. Des études récentes suggèrent aussi que certaines voies de réponse aux dommages à l'ADN sont activées lors de l'infection virale et ces aspects sont décrits dans la prochaine section.

1.3.4 Instabilité génomique associée à la réplication

Plusieurs infections virales induisent une activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN qui est soit exploitée en faveur du cycle réplicatif du virus ou qui constitue une réponse antivirale. Le VPH n'échappe pas à cette réalité et l'activation de ces voies a été détectée dans des kératinocytes primaires qui maintiennent le génome viral de manière stable, un phénotype qui est exacerbé lors de la différenciation (Edwards et al., 2013; Gillespie et al., 2012; Moody & Laimins, 2009). Plus précisément, l'activation de la voie ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) a été observée telle qu'indiqué par la phosphorylation de Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1), BRCA1 (breast cancer 1, early onset), Chk2 (checkpoint kinase 2) et H2AX. La kinase ATM est typiquement activée en réponse aux bris db de l'ADN suite à leur détection par le complexe MRN et mène à la réparation par des mécanismes de recombinaison homologue ou non-homologue. La phosphorylation de ATM permet d'arrêter la division cellulaire pendant la réparation et induit notamment la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) qui facilite le recrutement des facteurs de réparation en amplifiant le signal de dommage et en décondensant la chromatine. La voie ATM semble directement requise pour l'amplification du génome viral, puisque l'utilisation d'inhibiteurs d'ATM (KU-55933) ou de Chk2 (Chk2i) réduit l'efficacité de réplication de l'ADN viral dans les kératinocytes en différenciation (Moody & Laimins, 2009). Ceci suggère que l'activation de ces voies est non délétère pour le cycle viral, un constat cohérent avec

l'observation que l'induction artificielle de dommages à l'ADN n'affecte pas la réplication transitoire de l'ADN viral, contrairement à la réplication cellulaire qui est inhibée (Fradet-Turcotte et al., 2011; King et al.). L'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN semble même bénéfique pour l'amplification du génome du VPH, alors qu'elle n'est pas requise pour le maintien ou la réplication transitoire. De plus, certaines études suggèrent que les facteurs de réparation de l'ADN sont relocalisés dans les foyers de réplication de l'ADN viral. Notamment, p-ATM, Nbs1 et γ H2AX colocalisent avec les protéines virales E1 et E2, ainsi qu'avec le marquage EdU indiquant les sites actifs de synthèse d'ADN (Sakakibara et al., 2011). L'activation de la voie ATR a également été rapportée et les effecteurs de cette voie (p-ATR et ATRIP) colocalisent avec les foyers de réplication virale (Reinson et al., 2013). Plusieurs facteurs de recombinaison homologue, tels RAD51 et BRCA1, sont aussi recrutés dans des foyers nucléaires contenant l'ADN viral (Gillespie et al., 2012; Sakakibara, Chen, Jang, et al., 2013). La possible implication des voies de recombinaison homologue pourrait être en faveur d'un modèle de réplication unidirectionnel de l'ADN viral permettant de générer des génomes matures à partir de structures concatémériques (voir section 1.3.2).

L'activation de réponses aux dommages à l'ADN, et l'induction de dommages *per se*, ont été répertoriées dans le passé et associées principalement aux fonctions de E6 et E7 (Duensing & Munger, 2002; Hashida & Yasumoto, 1991; White et al., 1994). Il a été récemment observé, néanmoins, que l'expression seule de E1 peut induire une activation de ATM et provoquer un arrêt de progression du cycle cellulaire au début de la phase S (Fradet-Turcotte et al., 2011; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010; Sakakibara et al., 2011). On observe dans les cellules exprimant E1 une forte phosphorylation de H2AX et de Chk2. L'arrêt de prolifération cellulaire induit par E1 est dépendant de sa localisation nucléaire et de ses activités de liaison à l'ADN et ATPase, mais indépendant du domaine N-terminal. L'hélicase active semble donc être requise pour ce phénomène, possiblement par l'interaction non-spécifique de E1 avec l'ADN de l'hôte. Ce phénotype est conservé chez tous les génotypes de VPH étudiés, qu'ils soient à haut-risque ou à bas-risque, et même chez le VPB1. Aussi, l'assemblage du replisome viral sur des fragments d'ADN du VPH intégrés au génome cellulaire favorise l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN et de recombinaison,

et contribue vraisemblablement à l'instabilité génomique propice à la carcinogenèse (Kadaja et al., 2009). La modulation dynamique du transport nucléocytoplasmique de E1, grâce à son export nucléaire, constitue possiblement un mécanisme de régulation ou d'atténuation de la réponse aux dommages qui accompagne l'expression de E1, puisqu'elle est néfaste pour la survie des cellules hôtes infectées. Globalement, le VPH induit l'activation de plusieurs voies de réponse aux dommages à l'ADN, dont certaines sont importantes pour l'amplification du génome viral. Le niveau d'activation de ces processus est contrôlé afin d'éviter l'induction d'effets néfastes sur le cycle cellulaire qui seraient abortifs pour le cycle réplcatif du VPH.

1.3.5 Approches expérimentales pour l'étude de la réplication virale

L'étude du VPH est toujours aujourd'hui limitée par l'inexistence d'un système efficace pour reproduire le cycle viral complet. Certains modèles animaux existent et permettent l'étude des dysplasies, de la réponse immunitaire et de la réplication des papillomavirus chez le bœuf, le chien et le lapin. Toutefois, ces modèles animaux sont beaucoup plus complexes et coûteux à mettre en place que des modèles murins sans compter que les papillomavirus de ces animaux se comportent souvent différemment des virus humains. Certains systèmes de xéno greffes de tumeurs humaines chez la souris ont été décrits, mais leur complexité les rend peu accessibles pour l'investigation de la réplication virale (Dollard et al., 1989; Sexton et al., 1995). Des approches *in vitro* et *in vivo* ont donc été développées pour l'étude de certaines étapes de l'infection, dont celle de la réplication de l'ADN viral.

Le système le plus simple est basé sur l'utilisation de lysats cellulaires ou de fractions d'extraits cellulaires qui reconstituent la machinerie de réplication de l'ADN (Kuo et al., 1994; Li & Kelly, 1984; Melendy et al., 1995). Les éléments minimaux requis pour la réplication virale ont été décrits précédemment (voir section 1.3.3). On utilise dans ce système *in vitro* un plasmide contenant l'ori du VPH, suffisante à l'assemblage de la machinerie de réplication et à la duplication subséquente de l'ADN plasmidique. Cette méthode requiert aussi l'ajout des protéines virales E1 et E2 qui sont produites dans un système de réticulocytes de lapin ou encore dans un système d'expression baculoviral. L'ADN répliqué est ensuite détecté par autoradiographie grâce à l'incorporation de nucléotides radiomarqués.

Il est aussi possible d'observer la réplication de l'ADN du VPH dans des cellules transfectées, une réplication dite transitoire. Il suffit de co-transfecter dans des lignées cellulaires permissives les plasmides encodant E1 et E2 et un troisième plasmide contenant l'ori virale (ou encore le génome viral complet) (Cote-Martin et al., 2008; Del Vecchio et al., 1992; Frattini & Laimins, 1994b; Ziegler et al., 2004). Quelques jours après la transfection, l'ADN est extrait des cellules en utilisant des techniques favorisant l'isolation des petits ADN et digéré avec l'endonucléase DpnI qui détruit l'ADN initialement transfecté (et Dam-méthylé puisque isolé de bactéries) et de ne conserver que l'ADN synthétisé *de novo*. L'ADN répliqué est ensuite détecté en utilisant une approche de buvardage de type Southern ou encore par PCR quantitatif (Morgan & Taylor, 2005). Cette dernière approche a l'avantage de permettre une quantification plus précise de la réplication de l'ADN viral, mais est relativement fastidieuse en ce qui a trait à la purification et l'analyse de l'ADN. Ceci limite l'application à grande échelle de la méthode et augmente les risques d'erreur de manipulation. Notre laboratoire a récemment développé un nouvel essai de réplication transitoire, à la fois quantitatif et à haut débit (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010). Cette méthode est basée sur l'ajout d'un rapporteur luciférase de la luciole (Fluc, *firefly luciferase*) en cis dans le plasmide contenant l'ori, et sous contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV). Ainsi, lorsque le nombre de copies du vecteur ori augmente suite à la réplication virale, l'expression du gène de la luciférase augmente proportionnellement et est quantifiée par luminométrie. L'essai développé contient aussi un contrôle interne grâce à la co-transfection d'un vecteur encodant la luciférase renilla (Rluc, *renilla luciferase*) qui permet de normaliser et contrôler le signal en fonction de la mortalité cellulaire, des effets généraux sur la transcription et de l'efficacité de transfection. La transfection est effectuée dans la lignée cellulaire immortalisée C33A qui est dérivée d'un cancer du col utérin négatif pour le VPH, évitant toute interférence par des éléments génétiques viraux extérieurs. Cette technique est grandement exploitée dans les travaux présentés dans de cette thèse. Globalement, la réplication transitoire de l'ADN du VPH permet d'étudier rapidement et facilement la réplication virale en se concentrant sur les fonctions des protéines virales E1 et E2 en absence du reste du protéome viral. Elle permet ainsi de tester l'effet de mutations dans les ORF encodant ces protéines ou de la modulation de

fonctions cellulaires par la surexpression ou la déplétion de protéines ou l'utilisation de petites molécules inhibitrices.

Bien que ces essais transitoires soient des outils très utiles, ils possèdent certaines limitations. Ces techniques utilisent des cellules immortalisées et la réplication y est indépendante de la différenciation cellulaire, contrairement au cycle viral normal lors de l'amplification. Certaines études suggèrent que la réplication transitoire récapitule l'étape initiale d'établissement du génome viral (Hubert et al., 1999). En tout état de cause, la réplication transitoire ne permet pas de discriminer entre les étapes de réplication (établissement, maintien et amplification) et d'investiguer les conditions propices à la réplication à chacune de ces phases. Un autre système expérimental permet d'effectuer ces analyses et est généralement basé sur l'utilisation de kératinocytes primaires humains isolés de prépuces néonataux (HFK, *human foreskin keratinocytes*) (Meyers et al., 1992; Meyers et al., 1997). Ces HFK sont mis en culture, transfectés et immortalisés avec le génome pleine longueur du VPH. Ces lignées stables répliquent naturellement le génome du VPH sous forme épisomale au fil des passages et reconstituent ainsi l'étape du maintien du génome viral. Il est aussi possible d'induire artificiellement la différenciation des HFK, soit par la resuspension dans un milieu riche en calcium ou en méthylcellulose, ou encore par la création d'une interface air-liquide (*raft culture*) (Fehrmann et al., 2003; Hummel et al., 1992). Les HFK en différenciation induisent la surexpression des protéines virales E1 et E2, et incidemment la réplication du génome viral, imitant ainsi l'étape d'amplification de l'ADN viral. Le génome complet étant présent dans ces cellules, les autres protéines virales sont aussi exprimées et peuvent participer à la modulation des fonctions cellulaires et contribuer indirectement à la réplication de l'ADN. Cette approche est intéressante, mais comporte plusieurs limitations. D'abord, elle est longue, fastidieuse et chaque lignée provient d'un isolat unique de patient qui entraîne nécessairement une grande variabilité inter-expérimentale. Également, les kératinocytes ici utilisés ne sont pas parfaitement identiques aux cellules de col utérin qui sont originaires d'un épithélium muqueux et non cutané. Pour les mêmes fins, plutôt que les HFK, on peut aussi utiliser des lignées de kératinocytes immortalisés comme les NIKS (*normal immortalized keratinocytes*) ou les HaCat (Boukamp et al., 1988; Flores et al., 1999; Schoop et al., 1999). Notons aussi qu'il existe certaines lignées cellulaires dérivées de lésions du col utérin et capables de

maintenir naturellement l'épisode du VPH, dont les lignées CIN-612 et W12-E. Ces lignées permettent d'étudier le maintien et l'amplification dépendante de la différenciation de manière plus reproductible (Bedell et al., 1991; Stanley et al., 1989). Cependant, ce ne sont pas des lignées primaires et elles ont le désavantage, comme toute lignée immortalisée, de contenir des mutations génétiques pouvant affecter les résultats obtenus.

1.3.6 Intérêt thérapeutique

La réplication de l'ADN étant une étape clef du cycle viral, beaucoup d'énergie a été investie dans l'objectif de développer des molécules antivirales ciblant cette fonction (résumé dans (Fradet-Turcotte & Archambault, 2007)). La réplication est particulièrement intéressante comme cible thérapeutique pour les pathologies occasionnées par les VPH à bas-risque, dont les condylomes et les papillomatoses respiratoires récurrentes, ou encore potentiellement pour les lésions pré-cancéreuses dans lesquelles le génome viral n'est pas encore intégré. Évidemment, dans le processus de carcinogenèse par les VPH à haut-risque, la progression de la pathologie dépend principalement de l'expression des oncogènes E6 et E7 et est indépendante de la réplication virale suite aux événements d'intégration.

La difficulté de cibler la réplication virale réside dans le fait que le VPH dépend largement des enzymes de l'hôte pour assurer la synthèse de son ADN. Effectivement, la seule protéine virale détenant une activité enzymatique est l'hélicase E1. Plusieurs inhibiteurs de réplication ont été décrits au cours des dernières années, mais ont eu un succès mitigé *in vivo*. Des inhibiteurs de l'interaction E1-E2 (classe indandione) ont été décrits et sont efficaces pour l'inhibition de la réplication transitoire du VPH6 et VPH11 (Wang, Coulombe, et al., 2004; White et al., 2003; Yoakim et al., 2003). D'autres approches se sont concentrées sur l'inhibition de la capacité de liaison à l'ADN de E1 ou de E2. Certains résultats positifs ont été obtenus par l'utilisation de polyamides liant des séquences spécifiques du LCR et empêchant la liaison des protéines virales sur l'ADN (Schaal et al., 2003). Finalement, des inhibiteurs de la famille des acides biphénylesulphoniques se sont avérés efficaces pour inhiber l'activité ATPase de E1 (Faucher et al., 2004). Ces résultats constituent une preuve de concept que la réplication

virale peut être ciblée, mais se sont soldés jusqu'à maintenant par bien peu d'applications cliniques.

1.4 E1 : hélicase virale

1.4.1 Topologie et fonctions

E1 est la seule protéine virale à encoder une activité enzymatique, celle d'une hélicase à ADN, et constitue la protéine initiatrice de la réplication du VPH. C'est aussi le plus long gène viral, encodant une protéine d'environ 600-650 aa, et celui qui est le mieux conservé entre les génotypes (résumé dans (Bergvall et al., 2013)). E1 possède des similarités de séquence et de structure avec l'antigène grand T (LT, *large T antigen*) du virus simien 40 (SV40), ce qui a guidé les études initiales dans la recherche d'une relation structure-fonction (Clertant & Seif, 1984). Plusieurs connaissances sur E1 nous proviennent d'études basées sur différents génotypes humains ou sur la protéine E1 du VPB1. Plusieurs outils existent dans notre laboratoire pour l'étude de la protéine E1 du VPH31, qui représente l'un des génotypes les plus prévalents après le VPH16 et le VPH18. Ainsi, dans les travaux ci-après présentés, VPH31 E1 est utilisée comme protéine modèle. On peut diviser E1 en trois domaines fonctionnels : un domaine C-terminal encodant l'activité hélicase/ATPase, un motif central de liaison à l'ADN (OBD) et une région N-terminale (voir Figure 1.6).

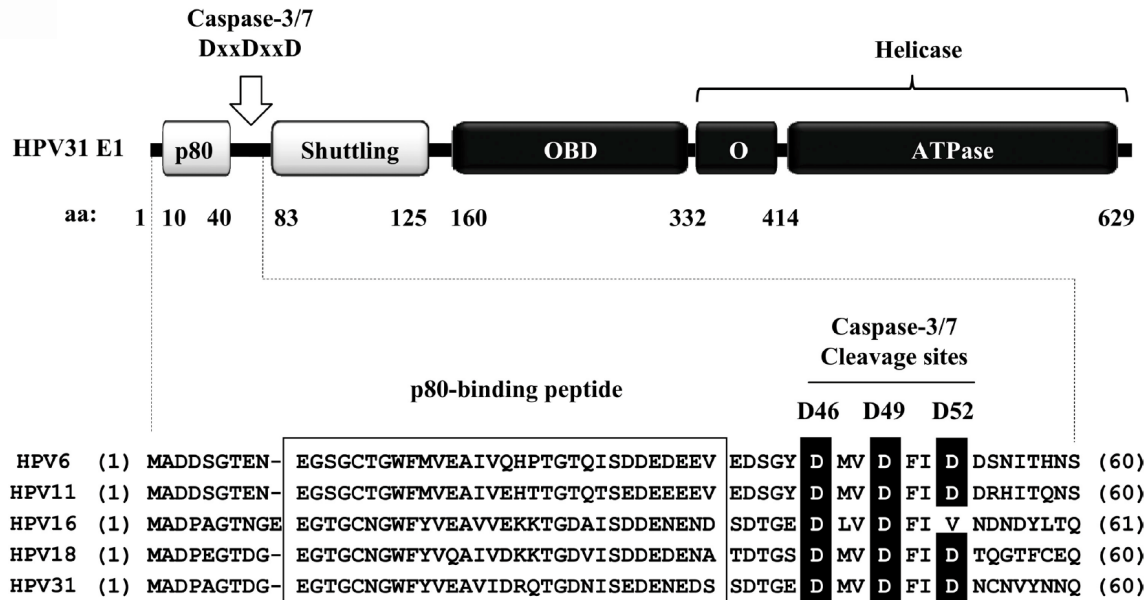


Figure 1.6 E1 : domaines fonctionnels

Représentation schématique de VPH31 E1 (haut) indiquant les trois grands domaines fonctionnels : la région N-terminale, le domaine de liaison à l'origine (OBD) et le domaine hélicase. Certains éléments fonctionnels connus dans le N-terminal sont également mentionnés : le domaine de liaison à UAF1 (p80), le site de clivage par les caspases 3 et 7 (séquence DxxDxxD) et le domaine de transport nucléocytoplasmique (shuttling). Le domaine hélicase est sous-divisé en deux régions, le domaine d'oligomérisation (O) et le domaine ATPase. Un alignement de séquence d'une portion du N-terminal est illustré (bas) pour cinq génotypes différents. Le domaine de liaison à UAF1 est indiqué par un encadré et les résidus formant la séquence reconnue par les caspases sont surlignés en noir. Adapté de (Morin et al., 2011).

1.4.1.1 Domaine hélicase/ATPase

L'homologie de séquence entre le domaine C-terminal de E1 et de LT du SV40 a permis de présumer que E1 pouvait posséder une activité ATPase-Hélicase (Clertant & Seif, 1984). Cette activité enzymatique fut confirmée plus tard par des études *in vitro* utilisant du E1 recombinant (Hughes & Romanos, 1993a; Jenkins et al., 1996; Raj & Stanley, 1995; Rocque et al., 2000; Santucci et al., 1995; Sedman & Stenlund, 1998; Seo, Muller, Lusky, & Hurwitz, 1993; White et al., 2001; Yang et al., 1993). Le domaine C-terminal de E1 est aussi impliqué dans l'oligomérisation de la protéine menant à son assemblage en un double hexamère, la forme active de l'hélicase virale.

D'ailleurs, le C-terminal, lorsque purifié seul, est suffisant pour s'assembler en hexamères capables de dérouler de courts oligonucléotides (Castella, Burgin, et al., 2006; White et al., 2001). Les détails de l'assemblage de E1 sur l'ori virale sont discutés dans la section 1.4.2. E1 appartient à la superfamille III des hélicases à ADN, tout comme LT, et son domaine C-terminal possède une activité ATPase encodée dans son module AAA+ (*ATPase associated with various cellular activities*) qui utilise un cation magnésium comme cofacteur (Liu & Stenlund, 2010; MacPherson et al., 1994; Raj & Stanley, 1995; Titolo et al., 1999; White et al., 2001). Ces hélicases sont caractérisées par la présence des domaines *Walker A*, *Walker B*, et du motif C. Les régions *Walker A* et *Walker B* permettent l'hydrolyse de l'ATP sous forme de chélate avec le magnésium. Le motif C contient un « doigt d'arginine » qui sert de senseur du nucléotide associé au monomère voisin et permet de coordonner les mouvements de l'hexamère en fonction de l'hydrolyse de l'ATP (Abbate et al., 2004; Castella, Bingham, et al., 2006; Liu & Stenlund, 2010; Sanders et al., 2007). Plusieurs mutations ont été rapportées ayant un effet sur l'activité ATPase de E1, dont la substitution K463A contenue dans le domaine *Walker A* (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010; Titolo et al., 2000).

C'est aussi dans le C-terminal de E1 qu'on retrouve l'interface d'interaction avec le TAD de E2 qui recrute E1 sur l'ADN viral et module son oligomérisation (Lusky & Fontane, 1991; Masterson et al., 1998; Moscufo et al., 1999; Muller & Sapp, 1996; Sarafi & McBride, 1995; Sun et al., 1998; Titolo et al., 1999; Yasugi, Benson, et al., 1997). La structure cristallographique du complexe entre le TAD de E2 et le C-terminal de E1 a été précédemment résolue et indique que l'interface d'interaction est vaste (940 Å²), expliquant les difficultés passées à identifier des mutations uniques affectant l'interaction E1-E2 (Abbate et al., 2004).

1.4.1.2 Domaine de liaison à l'origine

Le domaine de liaison à l'origine (OBD), ou encore domaine de liaison à l'ADN, permet la reconnaissance par E1 des E1BS présents dans l'origine, mais avec une faible affinité (Chen & Stenlund, 1998; Dixon et al., 2000; Leng et al., 1997; Sarafi & McBride, 1995; Sun et al., 1998; Thorner et al., 1993; Titolo et al., 2003; Titolo et al., 2000). L'interaction E1-E2 est nécessaire pour la reconnaissance spécifique de l'origine par E1. Néanmoins, la liaison de E1 avec l'ADN est requise pour la formation d'un

complexe stable sur le génome viral. L'OBD est un domaine dont le repliement compact a rapidement permis l'obtention de sa structure cristallographique et l'étude de sa liaison à l'ADN (Auster & Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2000; Enemark et al., 2002; Gonzalez et al., 2000; West & Wilson, 2002). L'OBD est composé d'un feuillet β antiparallèle à cinq brins qui forme le centre de la structure, entouré de six hélices alpha ($\alpha 1$ - $\alpha 6$). Cette structure comporte deux interfaces d'interaction : l'une sert à l'homodimérisation de molécules de E1 (*helix $\alpha 3$*) et l'autre est impliquée directement dans l'interaction avec l'ADN (*DNA-binding loop* et *helix $\alpha 4$*) (Figure 1.7) (Bergvall et al., 2013). L'interaction E1-ADN repose principalement sur des interactions électrostatiques non-spécifiques avec le phosphosquelette de l'ADN. Certaines interactions de Van der Waals avec les bases azotées de l'ADN permettent de créer un minimum de spécificité dans la reconnaissance des E1BS. Tel que mentionné à la section 1.2.4.1, les E1BS sont des palindromes présents dans l'origine et disposés sous forme de deux paires de séquences inversées se chevauchant (Figure 1.3). Cette disposition particulière et l'espacement des E1BS sont optimaux pour la liaison d'un homodimère de E1 sur chacune des deux paires, sur des faces opposées (Chen & Stenlund, 2001; Titolo et al., 2003). Certaines mutations dans l'OBD, dont la double substitution K265A/R267A, affectent le positionnement de l'hélice $\alpha 4$ et inhibent sa liaison avec l'ADN viral (Titolo et al., 2003; West et al., 2001; West & Wilson, 2002).

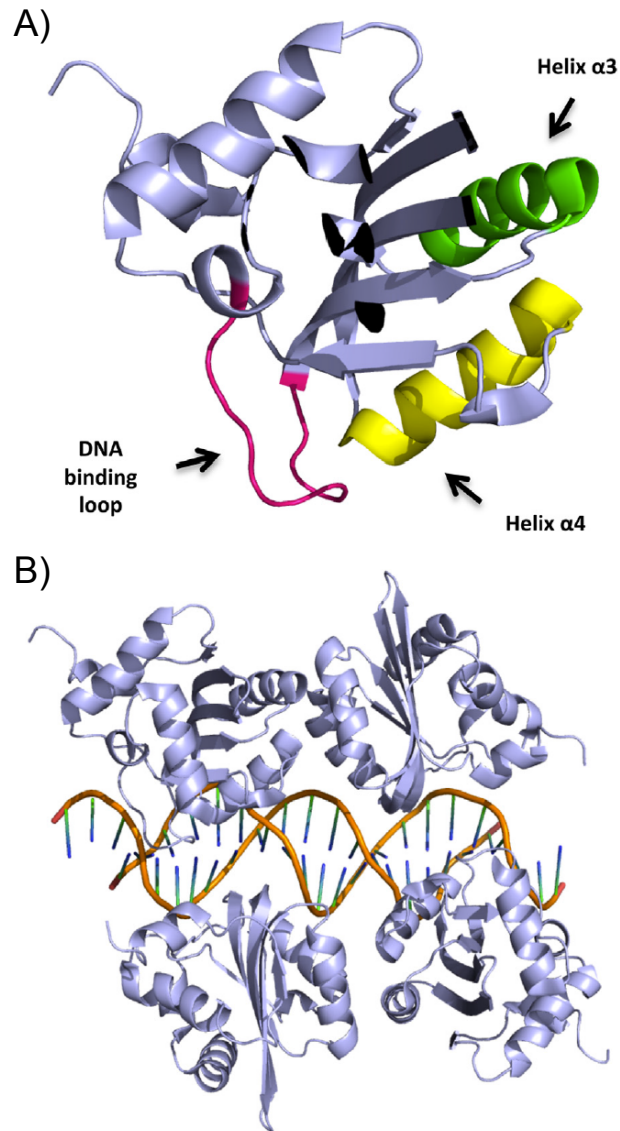


Figure 1.7 E1 : structure de l'OBD

A) Structure cristallographique du domaine OBD du VPB1 E1. Les régions impliquées dans l'homodimérisation (helix $\alpha 3$) et la liaison à l'ADN (DNA-binding loop et helix $\alpha 4$) sont identifiées. B) Structure de deux homodimères de E1 liés sur l'ADN. Cette représentation illustre bien que les deux dimères s'associent à l'ADN sur des faces opposées. D'après (Bergvall et al., 2013), avec la permission de Elsevier, et (Enemark et al., 2002), PDB no 1KSX.

1.4.1.3 Domaine N-terminal

Le domaine N-terminal de E1 n'est pas requis pour la réplication de l'ADN dans un système *in vitro*, mais est absolument essentiel pour la réplication *in vivo* (Amin et

al., 2000; Ferran & McBride, 1998). Peu d'information existe quant à la structure de ce domaine, mais sa sensibilité aux protéases et des prédictions *in silico* suggèrent qu'il est intrinsèquement désordonné (Hughes & Romanos, 1993b; Morin et al., 2011); une hypothèse qui a pu être vérifiée au cours des travaux présentés dans cette thèse pour la région 1-83 (voir section 2, (Lehoux et al., 2012)). Le domaine N-terminal contient certains motifs qui expliquent en partie son importance biologique (voir Figure 1.6). On y retrouve une région permettant de réguler la localisation cellulaire de E1 et comprenant une séquence de localisation nucléaire (NLS) bipartite, une séquence d'export nucléaire (NES), un motif de liaison aux cyclines (CBM), ainsi qu'un nombre variable de sites de phosphorylation par Cdk2. L'ensemble de ces motifs permet une régulation fine de la localisation cellulaire de E1, un mécanisme complexe qui mérite qu'une section de cette thèse lui soit accordée (voir section 1.4.3). Notre laboratoire a aussi déterminé *in silico* qu'une portion du domaine N-terminal était typique d'une hélice amphipathique (ϕ -x-x- ϕ - ϕ , où ϕ est un résidu hydrophobe), similaire aux domaines de transactivation de p53 et de VP16 du virus de l'herpes simplex (Morin et al., 2011). Cette région serait intrinsèquement désordonnée et pourrait adopter une structure hélicoïdale suite à sa liaison à des facteurs cellulaires comme Tfb1, similairement à p53 et VP16. Tout comme ces derniers, des études antérieures ont démontré que E1 peut induire la transcription (Demeret et al., 1998; Titolo et al., 2000). De plus, la mutation des résidus hydrophobes MFI dans cette région s'est avérée néfaste pour la réplication transitoire de l'ADN du VPH, suggérant une implication de cette structure au cours du cycle viral. En outre, un site de clivage par les caspases 3 et 7 a été identifié dans la région N-terminale (D46xxD49) (Moody et al., 2007)). Sa fonction est discutée plus en détails dans la section 1.4.4.3. Finalement, le domaine N-terminal encode aussi le motif de liaison à UAF1 et est essentiel au maintien de l'épisome (section 1.4.5.5).

1.4.2 Assemblage de l'hélicase

L'initiation de la réplication débute par l'assemblage d'un complexe E1-E2-Ori qui précède une série d'étapes d'oligomérisation menant à la formation d'un double hexamère de E1 (voir Figure 1.8). Tel que précédemment mentionné, grâce à son OBD, E1 s'associe à l'ori virale sous forme de deux homodimères reconnaissant chacun une

paire de E1BS. Ces dimères interagissent avec l'ADN sur des faces opposées et n'interagissent vraisemblablement pas ensemble (Enemark et al., 2002). Cette dimérisation de E1 accroît son affinité pour l'ADN et facilite les étapes subséquentes d'oligomérisation de l'hélicase virale. En effet, des mutations dans E1 qui abolissent l'interaction E1-E1 réduisent sa capacité de répllication de l'ADN viral (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010; Schuck & Stenlund, 2005b). De plus, cette dimérisation est possible grâce à l'espacement exact de trois nucléotides entre les paires de E1BS (Titolo et al., 2003). Pour le VPH11, la région N-terminale de E1 pourrait aussi jouer un rôle dans la liaison à l'ADN tel qu'illustré par l'augmentation importante de l'affinité pour une sonde d'oligonucléotide suite à la délétion des 71 résidus amino-terminaux (Titolo et al., 2000). E1 passe ensuite de son état de double dimère à un double hexamère selon un processus d'oligomérisation mal caractérisé. Des études ont démontré l'existence de certains intermédiaires dans l'assemblage de VPB1 E1, tels que des doubles trimères, mais qui n'ont jamais été confirmés chez le VPH (Schuck & Stenlund, 2005a; Sedman & Stenlund, 1996).

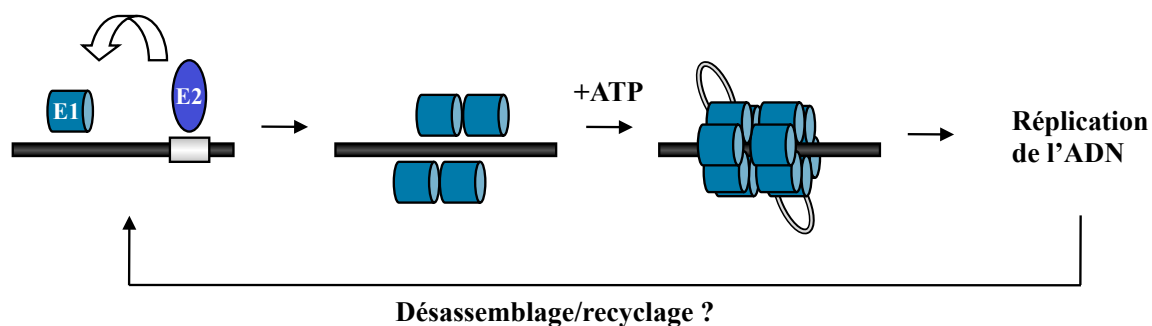


Figure 1.8 Assemblage du pré-réplisome viral

Les monomères de E1 sont recrutés sur l'origine virale par E2, via l'interaction E1-E2 et la liaison de E2 sur les E2BS (rectangle gris) contenus dans l'origine. La disposition des E1BS, en deux paires inversées se chevauchant, permet la liaison coopérative de deux homodimères de E1 sur des faces opposées. D'autres monomères de E1 sont ensuite recrutés afin de permettre l'oligomérisation de E1 en un double hexamère, un processus dépendant de l'ATP et de l'exclusion de E2 de l'origine. Chacun des hexamères entoure l'ADN simple brin des deux brins opposés. Ce double hexamère forme l'hélicase virale active capable de dérouler l'ADN viral et de recruter la machinerie cellulaire de répllication afin d'assurer la synthèse de l'ADN du VPH. À la fin de la complétion d'un cycle de répllication, le réplisome est probablement désassemblé pour permettre une ré-initiation éventuelle de la répllication.

La formation du complexe E1-E2-Ori et l'initiation de l'oligomérisation induisent une courbure de l'ADN qui provoquent graduellement l'ouverture des deux brins, facilitant ainsi le recrutement de monomères de E1 additionnels dans le complexe (Chen & Stenlund, 2002; Gillette et al., 1994; Gillitzer et al., 2000; Sanders & Stenlund, 2000). Cette torsion introduite dans l'ADN db induit la dissociation des deux brins dans la région en aval riche en AT qui possède une faible température de fusion. La liaison et l'hydrolyse de l'ATP participent aussi à la séparation des deux brins d'ADN, tout comme au processus d'oligomérisation (Gillette et al., 1994; Sanders & Stenlund, 1998; Seo, Muller, Lusky, Gibbs, et al., 1993).

L'hexamérisation de E1 peut être induite *in vitro* par la simple présence d'ADN sb (Sedman & Stenlund, 1998; Titolo et al., 2000). Cependant, la formation d'hexamères doubles nécessite aussi la présence d'ATP (Fouts et al., 1999). Lors de la complétion de l'oligomérisation, l'hélicase virale passe d'un état de liaison spécifique à l'ADN db, i.e. la liaison de l'OBD avec les E1BS, à une forme de liaison non-spécifique du domaine C-terminal avec l'ADN sb (Castella, Burgin, et al., 2006; Stenlund, 2003). Cette liaison non-spécifique est requise pour l'activité hélicase qui nécessite une interaction continue avec l'ADN à dérouler. Lors de l'assemblage du réplisome, l'interaction E1-E2 inhibe l'oligomérisation de E1 par encombrement stériquement de la surface de E1 requise pour l'hexamérisation. L'activité de liaison non-spécifique de E1 est donc inhibée à cette étape précoce où elle serait prématurée (Bonne-Andrea et al., 1997; Lin et al., 2002; Stenlund, 2003). Ensuite, E2 est évincé du réplisome lors de l'oligomérisation de l'hélicase (Lusky et al., 1994; Sanders & Stenlund, 1998). La structure de l'oligomère suggère que la transition conformationnelle qui exclue E2 est induite par la liaison à l'ATP (Abbate et al., 2004; White et al., 2001). Ainsi, l'ATP est essentiel à la fois pour favoriser l'oligomérisation de E1 et pour exclure E2 de l'origine, dont la présence serait incompatible avec la structure active de l'hélicase. En absence de E2, le domaine hélicase de E1 interagit non-spécifiquement avec une région étendue de l'ADN adjacente aux E1BS qui inclut la région riche en A/T (Stenlund, 2003).

L'oligomérisation de E1 requiert non seulement la liaison à l'ATP, mais aussi une région d'interaction entre les monomères appelée région A et homologue à un

domaine de LT (Titolo et al., 2000). Dans le double hexamère final, chacun des deux lobes de l'hélicase encercle l'un des deux brins opposés. À l'intérieur de chaque hexamère, une portion de E1 forme une structure toroïdale définissant un canal dans lequel se loge l'ADN sb, et illustré dans la Figure 1.9A (Bergvall et al., 2013; Enemark & Joshua-Tor, 2006). En C-terminal de cet anneau se trouve la région possédant l'activité ATPase. Chaque sous-unité de l'hélicase se trouve successivement dans un état lié à l'ATP, lié à l'ADP ou non lié (apo) au fur et à mesure des réactions d'hydrolyse de l'ATP catalysées par E1. Chacun de ces états de liaison possède sa conformation propre. Ce sont les permutations séquentielles de ces trois états pour chacun des monomères de l'hélicase qui permettent la translocation unidirectionnelle de l'ADN à l'intérieur du canal. L'interaction E1-ADN dans l'hexamère est principalement effectuée par une courte région de E1 appelée boucle en épingle à cheveux (β -hairpin). La position de cette boucle dépend du type de nucléotide lié (ATP, ADP ou aucun). Une sous-unité liée à l'ATP est dans une conformation où la boucle est dans une position haute (vers l'extrémité 5'), l'apo-E1 est dans une position basse (vers l'extrémité 3') et le E1-ADP se trouve dans une position intermédiaire. Le positionnement relatif des boucles de chacune des sous-unités forme une structure similaire à un « escalier en spirale » qui permet l'interaction avec le squelette de déoxyribose-phosphate. Puisque chaque boucle liée à l'ADN garde un contact constant avec un seul nucléotide et que l'hydrolyse de l'ATP induit un mouvement de la boucle vers le bas de « l'escalier en spirale », l'ADN est déplacé de façon continue au travers du canal dans une direction 3'-5'. Ensuite la réaction se répète par la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP au monomère apo et sa boucle est ramenée à nouveau à sa position haute. Globalement, chaque cycle de translocation implique un changement conformationnel des six monomères de E1, l'hydrolyse de six molécules d'ATP et permet une translocation de six nucléotides de l'ADN (Figure 1.9B). Il est à noter qu'une structure cristallographique plus récente, obtenue en absence d'ADN, suggère que les changements conformationnels de l'hélicase à l'origine de la translocation ne requièrent pas nécessairement l'hydrolyse de six molécules d'ATP par cycle (Sanders et al., 2007). Effectivement, l'hydrolyse de l'ATP par seulement une fraction des monomères de l'hélicase pourrait être suffisante pour assurer la propagation de la vague de changements conformationnels et la translocation des six nucléotides, et ainsi assurer un mécanisme ayant une meilleure

« efficacité énergétique ». C'est ce déplacement des acides nucléiques qui occasionne la séparation des deux brins par exclusion stérique du brin complémentaire, i.e. l'activité hélicase. Sommairement, l'activité hélicase de E1 procède par la translocation de l'ADN en direction 3'-5' et demande l'oligomérisation de E1 en double hexamère, et de manière dépendante de l'hydrolyse de l'ATP.

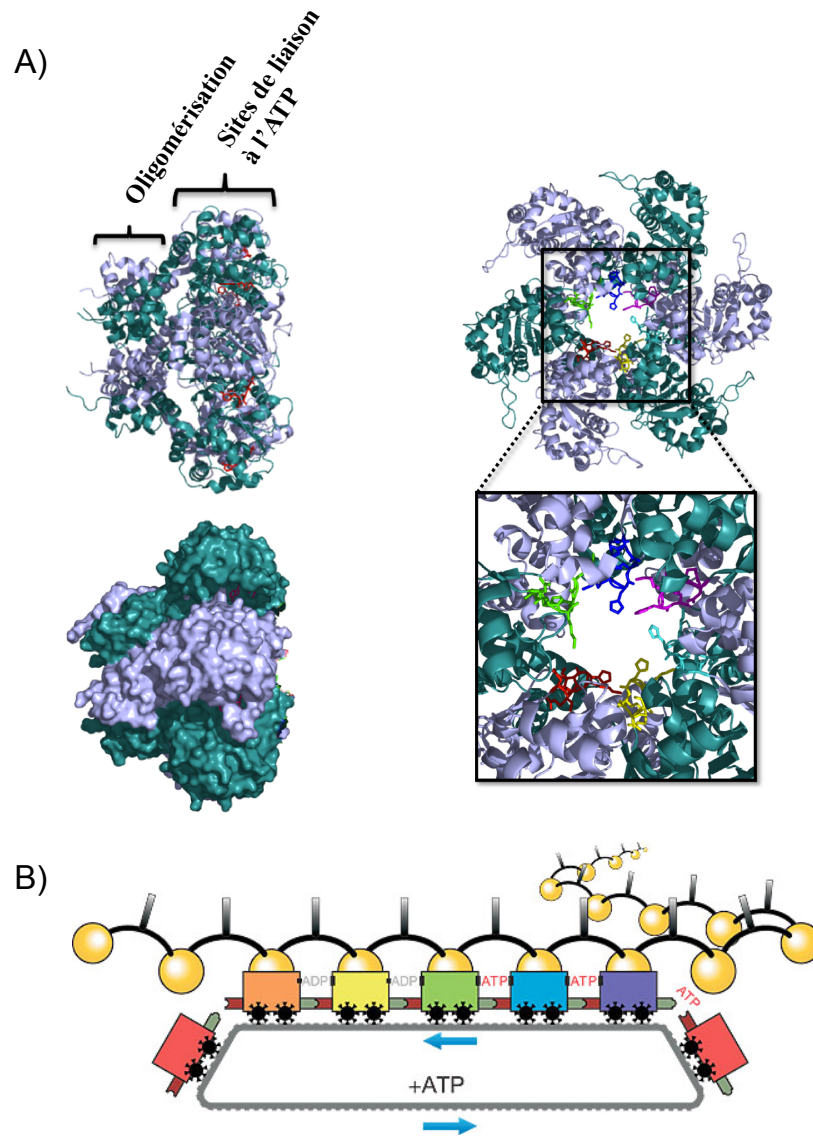


Figure 1.9 E1 : domaine hélicase

A) Structure cristallographique du domaine hélicase de E1. La structure hexamérique de BPV1 E1 lié à l'ADP et à l'ADN simple brin (non montré) est représentée. Les six monomères sont colorés alternativement en bleu et en violet, et l'ADP en rouge. L'hexamère est représenté sous forme de rubans (haut) et de surfaces (bas). La vue de côté (gauche) montre la position relative de la région requise pour l'oligomérisation, formant ici un anneau serré, et de la région liant l'ATP. La vue de face (droite) montre

clairement que les six monomères s'assemblent pour former une structure toroïdale avec un canal central. Les boucles en épingle à cheveux (β -hairpin), responsables de la liaison aux nucléotides et de la translocation de l'ADN, sont représentées par différentes couleurs pour chaque monomère. D'après (Bergvall et al., 2013) et (Enemark & Joshua-Tor, 2006), avec les permissions de Elsevier et de Nature publishing group, respectivement. PDB no 2GXA. B) Translocation de l'ADN catalysée par E1. Chaque monomère de E1 est représenté par un wagon coloré qui transporte chacun un nucléotide de la droite vers la gauche (direction 3'-5'). L'hydrolyse de l'ATP et la relâche de l'ADP surviennent au cours du processus et sont illustrées par les nucléotides identifiés entre les wagons. Le wagon rouge à gauche se détache de l'ADN et retourne à droite suite à sa liaison à une nouvelle molécule d'ATP. Ce wagon lie ensuite le prochain nucléotide de la séquence d'ADN et continue à le transloquer vers la gauche. D'après Enemark (2006), avec la permission de Nature publishing group.

Il a longtemps été présumé que les deux hexamères de E1 restaient associés ensemble pendant le processus de déroulement de l'ADN, alors que chacun des deux brins était transloqué dans l'un des deux hexamères. Ce modèle a quelque peu été remis en question par la découverte récente que l'hélicase eucaryote MCM et l'hélicase LT peuvent se dissocier et former deux hexamères se déplaçant indépendamment sur chacun des brins (Yardimci et al., 2010; Yardimci et al., 2012). Ce nouveau modèle implique tout de même la structure dodécamérique comme complexe d'initiation du déroulement de l'ADN, mais ce double hexamère ne serait pas requis pour l'élongation.

1.4.3 Localisation cellulaire

Le domaine N-terminal de E1 contient divers motifs régulant sa localisation : un NLS, un NES, un CBM et plusieurs sites de phosphorylation. Le NLS bipartite de E1 permet la relocalisation de la protéine au noyau, le compartiment où se déroule la majeure partie des étapes du cycle viral, dont la synthèse de l'ADN du virus (Deng et al., 2004; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010; Leng & Wilson, 1994; Lentz et al., 1993). Le NLS de E1 est hautement conservé d'un génotype à l'autre et exploite possiblement un mécanisme d'import dépendant des importines $\alpha 3$, $\alpha 4$ ou $\alpha 5$ (Bian et al., 2006). La translocation nucléaire est stimulée par la phosphorylation de certains résidus sérine et thréonine par les MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ERK1 (*extracellular regulated kinase 1*) et JNK2 (*c-Jun N-terminal protein kinase*) (Yu, Lin, et al., 2007). Deux sites de liaison aux MAPK ont été identifiés dans le C-terminal de E1 et leur

mutation réduit la localisation nucléaire de E1, tout comme l'inhibition de ces MAPK par des inhibiteurs spécifiques. Ces études ont aussi proposé que les sites S89 et S93 du VPH11 sont phosphorylés par ces MAPK et que leur substitution en alanines réduit l'import nucléaire. Ces résultats semblent incompatibles avec d'autres études, mentionnées ci-bas, qui suggèrent que la phosphorylation de ces mêmes résidus favorise, au contraire, la rétention nucléaire. Notons également que bien que la mutation du NLS affecte la localisation de E1 lorsque exprimé seul, la co-expression de E2, qui encode son propre NLS et interagit avec E1, suffit pour relocaliser E1 au noyau. Ce phénomène explique possiblement le fait que la mutation du NLS de E1 interfère peu avec son activité de réplication transitoire de l'ADN en présence de E2 (Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010).

À l'équilibre, E1 est principalement localisé au noyau, bien qu'une certaine proportion soit aussi observée dans le cytoplasme. Effectivement, la protéine E1 de tous les génotypes étudiés est capable d'entrer et de sortir du noyau, de manière dynamique, en utilisant son NLS et son NES. La présence d'un NES riche en leucines permet l'export nucléaire de E1 via un mécanisme dépendant de l'exportine cellulaire Crm1 (Deng et al., 2004; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010). La présence du CBM, pour sa part, permet l'interaction avec les cyclines A/E-Cdk2 et la phosphorylation de leurs sites consensus S/T-P, qui sont au nombre de deux dans le N-terminal du VPH31 : S92 et S106 (Cueille et al., 1998; Lentz et al., 2006; Ma et al., 1999). L'export de E1 est régulé par la phosphorylation de ces sites par Cdk2 qui permet l'inactivation du NES et par conséquent, la rétention nucléaire (Deng et al., 2004; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010; Ma et al., 1999). En effet, l'expression de p21 ou encore le traitement des cellules avec la Roscovitine, tous deux des inhibiteurs de l'activité Cdk, favorisent l'export de E1 au cytoplasme. Cette régulation par Cdk2, dont l'activité est restreinte aux phases G1 et S, permet vraisemblablement de dicter la localisation de E1 de manière synchronisée avec le cycle cellulaire. Bien que l'import et la rétention nucléaire soient essentiels pour la réplication du virus, le NES joue aussi un rôle important au cours du cycle viral. Bien que le NES ne soit pas strictement requis pour la réplication transitoire de l'ADN viral, un virus défectif pour l'export nucléaire montre un défaut prononcé pour le maintien du génome du VPH et inhibe la prolifération de la cellule hôte (Deng et al., 2004; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010). Cet effet sur la cellule infectée passe possiblement par un

mécanisme d'activation de voies de réponse aux dommages à l'ADN (voir section 1.3.4).

Lorsque E1 est exprimé seul, sa localisation est principalement diffuse dans le nucléoplasme. Or, si co-exprimé avec E2, les deux protéines virales colocalisent dans des foyers nucléaires, et ce, même en absence de l'ori (Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010; Sakakibara et al., 2011; Swindle et al., 1999). En effet, cette localisation est dépendante de l'interaction E1-E2 puisque l'introduction de mutations dans E2 qui abolissent sa capacité de liaison à E1 prévient la relocalisation dans les foyers (Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010). La fonction de ces sous-domaines intranucléaires est incomplètement caractérisée, mais il a été suggéré qu'ils constituent des foyers de réplication de l'ADN. Plus précisément, E1 colocalise dans ces régions avec le facteur cellulaire de réplication RPA32 et ces sites montrent une activité d'incorporation de BrdU, une indication de synthèse active d'ADN (Swindle et al., 1999). En présence de l'origine virale, E1 et E2 s'assemblent également en foyers nucléaires colocalisant avec les facteurs de l'hôte RPA70, RFC1 et l'ADN polymérase δ (Wang et al., 2013). La protéine Brd4 serait aussi recrutée dans ces foyers, via l'interaction avec E2, mais son importance pour la réplication de l'ADN viral demeure controversée (Sakakibara, Chen, Jang, et al., 2013; Wang et al., 2013).

Ainsi, le N-terminal de E1 régule dynamiquement son transport nucléocytoplasmique de manière dépendante de la phosphorylation et de l'interaction avec E2 afin de permettre ses fonctions nucléaires lors de la réplication, tout en atténuant les effets antiprolifératifs occasionnés par sa suraccumulation au noyau.

1.4.4 Modifications post-traductionnelles

1.4.4.1 Phosphorylation

Outre la phosphorylation du N-terminal par Cdk2 et les MAPK décrite en détails dans la section 1.4.3, d'autres types de phosphorylation ont été identifiés dans E1. Un site de phosphorylation par Cdk2 est aussi présent dans l'OBD de E1 du VPB1. Sa phosphorylation favorise l'export nucléaire de la protéine et réduit la réplication de l'ADN (Hsu et al., 2007). L'existence d'un tel mécanisme de régulation pour le VPH demeure inconnue.

La protéine E1 du VPB1 a aussi été rapportée comme étant un substrat de la kinase CK2 (*casein kinase 2*) *in vitro* et *in vivo*, et menant à la phosphorylation des sites S48 et S584 (Lentz et al., 2002; Lentz, 2002; Lentz et al., 2006; McShan & Wilson, 1997, 2000). CK2 est une kinase à sérine/thréonine considérée comme étant constitutivement active, ubiquitaire et régulant une grande variété de processus cellulaires. La substitution de ces sérines dans E1 en résidus non-phosphorylables (S48G ou S584A) réduit grandement son activité de réplication de l'ADN viral (Lentz et al., 2002; McShan & Wilson, 2000). Au contraire, la substitution de S48 en résidus phosphomimétiques (aspartate ou glutamate) n'affecte aucunement la fonction de réplication de E1. Les substitutions S48G et S584A ont peu ou pas d'effet sur la liaison de E1 à l'ADN, l'interaction E1-E2 ou l'activité d'oligomérisation. La fonction exacte de ces phosphorylations reste donc à être évaluée. Les résidus S48 et S584 ne sont cependant pas très bien conservés chez le VPH. Une étude plus récente a démontré que plusieurs sites CK2 additionnels sont présents dans le domaine N-terminal de E1 du VPB1 et du VPH (Schuck et al., 2013). Ces sites sont phosphorylés *in vitro* et peuvent être détectés par spectrométrie de masse. La phosphorylation du N-terminal par CK2 inhibe drastiquement la capacité de l'OBD du VPB1 et du VPH à lier spécifiquement l'ADN. Cependant, des génomes du VPB1 mutants pour ces sites de phosphorylation sont répliqués normalement dans des essais de réplication transitoire ou stable. La mutation du site T43A dans E1 du VPH31 n'a pas non plus d'effet sur la réplication transitoire de l'ADN (Morin et al., 2011). Toutefois, la surexpression de CK2 dans un essai de réplication transitoire inhibe la réplication virale, un effet qui dépend de la présence des sites de phosphorylation dans E1. Ainsi, la mutation de combinaisons de sites en alanines dans le N-terminal de E1 du VPB1 ou la délétion de portions du N-terminal pour E1 du VPB1 ou du VPH lèvent l'inhibition par CK2. Cela indique que la phosphorylation du N-terminal agit à distance sur la capacité de l'OBD à reconnaître les E1BS. Similairement, le clivage du N-terminal par un traitement à la caspase 3 restaure la capacité de la protéine E1 phosphorylée par CK2 à lier l'ADN, et ce, pour le VPB1 et le VPH.

1.4.4.2 Ubiquitination et SUMOylation

La modification des protéines par la liaison covalente à l'ubiquitine ou à de petites protéines similaires à l'ubiquitine, tel SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), permet de moduler l'activité, la localisation, les interactions ou la stabilité de ces dernières. Les mécanismes d'ubiquitination et de déubiquitination sont décrits de manière détaillée dans la section 1.5. Il a été suggéré que le faible niveau d'expression de E1 dans les cellules infectées et la modulation de l'abondance de E1 au cours des étapes du cycle viral pourraient être contrôlés par la stabilité de la protéine. La dégradation protéasomale dépendante de l'ubiquitine a précédemment été rapportée dans le cas de la protéine E1 du VPB1 (Malcles et al., 2002). Cette instabilité peut être inhibée par l'ajout de cycline E-Cdk2 dans un extrait cellulaire, indépendamment de son activité kinase, suggérant que la simple liaison à Cdk2 protège E1 de la dégradation. De plus, il a été proposé que E1 est polyubiquitiné *in vitro* et *in vivo* lorsqu'en conditions de réplication. Effectivement, l'instabilité de E1 du VPB1 peut être réduite par l'ajout d'aphidicoline, un inhibiteur des ADN polymérases, indiquant que la dégradation intervient de manière dépendante de la synthèse d'ADN. La E3 ubiquitine-ligase APC (*anaphase-promoting complex*) a été suggérée comme étant responsable de l'ubiquitination de E1 (Mechali et al., 2004). L'inhibition de APC stabilise E1 et promeut la réplication de l'ADN viral. Le même phénotype peut être obtenu par l'introduction de mutations dans les motifs de destruction présomptifs (*D-box* ou *KEN*) contenus dans E1. Ces motifs de destruction ne sont toutefois pas conservés chez le VPH et aucune ubiquitination de E1 n'a été décrite à ce jour dans le cas de génotypes humains. L'existence d'ubiquitination chez l'humain, ainsi que la nature des E3 ubiquitine-ligases et déubiquitinases restent donc à être évaluées.

La SUMOylation est une modification similaire à l'ubiquitination qui consiste en l'attachement d'une protéine SUMO à son substrat. Cette modification post-traductionnelle requiert, comme l'ubiquitination, une cascade enzymatique impliquant une protéine activatrice E1, une protéine de conjugaison E2 et une E3 SUMO-ligase (Flotho & Melchior, 2013). Contrairement à la voie de l'ubiquitination, on ne retrouve qu'une seule protéine E2 pour la SUMOylation, nommée Ubc9, et elle est directement impliquée dans la reconnaissance des substrats via un site consensus de SUMOylation.

Une étude de double-hybride chez la levure a permis d'identifier que la protéine E1 du VPH interagit avec Ubc9 (Yasugi & Howley, 1996). Certaines substitutions d'aa ont été décrites dans E1 qui abolissent son interaction avec Ubc9 et ont coïncidé avec une réduction de sa capacité de réplication de l'ADN viral, suggérant une relation entre ces deux fonctions (Yasugi, Vidal, et al., 1997). Cette interprétation est toutefois difficile à établir avec certitude puisque ces mutations affectent plusieurs fonctions de E1. Rangasamy et al. suggèrent que l'interaction VPB1 E1-Ubc9 mène à la SUMOylation de E1 et que des mutations prévenant cette modification empêchent la localisation de la protéine dans des foyers intra-nucléaires (Rangasamy & Wilson, 2000). Les E3 SUMO-ligase de la famille PIAS ont été proposées comme partenaires d'interaction de E1 et comme stimulateurs de sa SUMOylation (Rosas-Acosta et al., 2005). En outre, l'affinité de l'exportine Crm1 pour E1 est augmentée par la SUMOylation de E1 *in vitro*, suggérant à nouveau un rôle de cette modification dans la localisation de E1 (Rosas-Acosta & Wilson, 2008). Au cours de ces travaux, diverses localisations cellulaires souvent contradictoires ont été rapportées pour les mutants non-SUMOylables. Une étude plus récente effectuée dans notre laboratoire a confirmé l'existence d'une interaction E1-Ubc9, mais exclut un rôle de la SUMOylation pour la régulation de la localisation cellulaire de E1 (Fradet-Turcotte et al., 2009). Effectivement, les mutations affectant l'interaction avec Ubc9, l'inhibition directe de Ubc9 à l'aide de la protéine Gam1 de l'adénovirus aviaire CELO, la déplétion de Ubc9 par interférence par l'ARN ou l'expression de dominants négatifs de Ubc9 n'ont pas d'effet sur la rétention nucléaire de E1. La mutation du site de SUMOylation présomptif (K514 chez VPB1 E1) n'a pas non plus eu d'effet sur son activité de réplication. Le rôle de la voie de la SUMOylation au cours du cycle viral reste donc à être élucidé.

1.4.4.3 Clivage par les caspases

Le domaine N-terminal de E1 contient aussi un site de clivage par les caspases 3 et 7 (DxxD) qui est reconnu par les caspases *in vitro* (Moody et al., 2007). Lors de la différenciation des kératinocytes infectés, l'activité des caspases est induite par le VPH, une activation qui est insuffisante pour causer l'apoptose des cellules infectées. Cette absence d'apoptose peut possiblement être expliquée par le faible niveau d'activation des caspases, mais aussi par l'induction simultanée de l'expression de facteurs anti-

apoptotiques de l'hôte comme Bcl-2 et survivine. L'activité des caspases et la présence du site de clivage sont requises pour l'amplification du génome viral. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur de caspase Z-VAD-FMK ou l'inactivation du site de clivage par la mutation D49A réduisent la capacité du génome viral à être amplifié suite à la différenciation. La mutation D49A n'a toutefois aucun effet sur la réplication transitoire du génome viral ou le maintien de l'épisome, suggérant que le rôle des caspases est limité à l'étape végétative du cycle viral.

1.4.5 Interaction avec les facteurs de l'hôte

1.4.5.1 Facteurs de réplication de l'ADN

L'assemblage de E1 sur le génome viral assure l'initiation de la réplication et le déroulement de l'ADN par sa fonction hélicase. Le VPH n'encode toutefois pas la machinerie nécessaire à la synthèse de l'ADN *per se* et le virus doit donc recruter les composantes cellulaires permettant d'assurer la réplication. E1 est central dans l'orchestration de cette fonction en interagissant directement avec plusieurs facteurs de l'hôte requis pour la réplication de l'ADN dont l'ADN polymérase α -primase, la topoisomérase I et RPA (illustré dans la Figure 1.10) (Bergvall et al., 2013). Ce mode de réplication est similaire à celui du virus SV40 dont la réplication est initiée par son hélicase, LT, et qui a souvent servi de modèle d'étude de la réplication des virus à ADN.

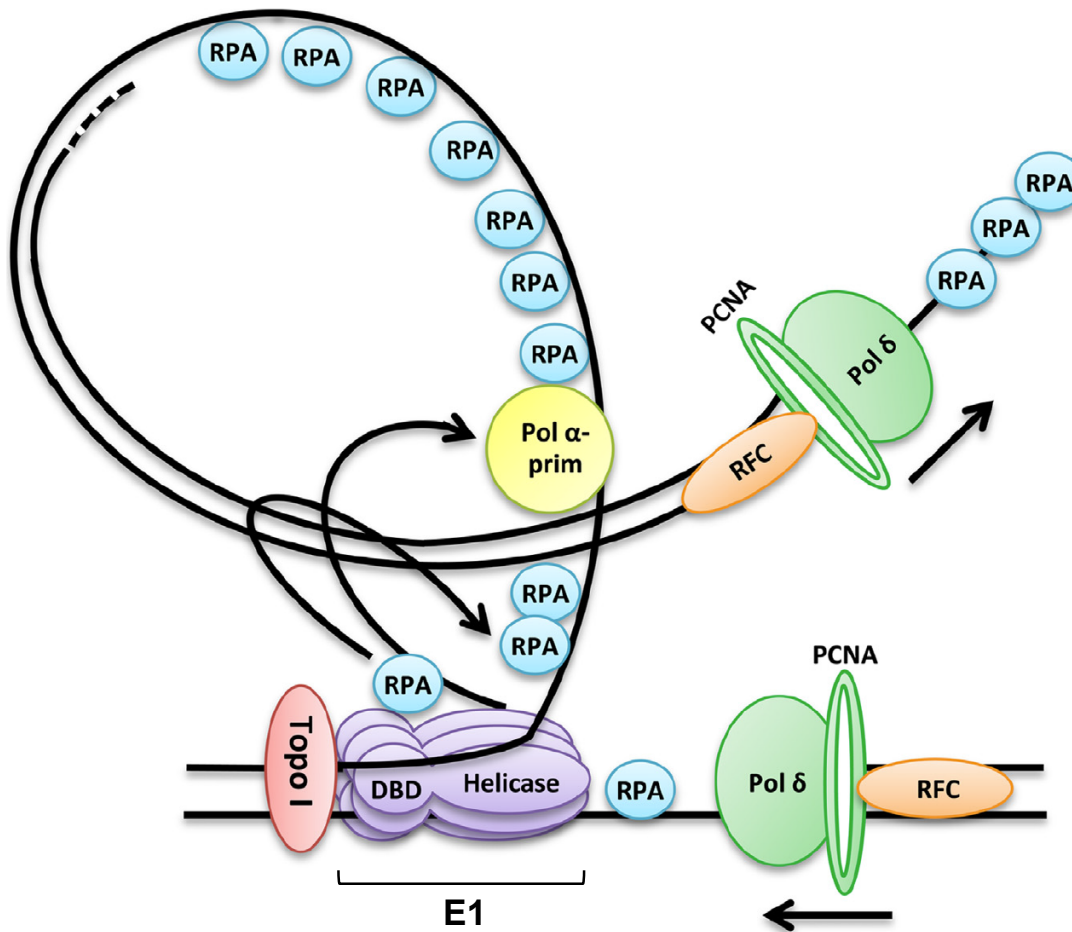


Figure 1.10 Réplisome du VPH (modèle)

La protéine E1 est liée à l'ADN sous la forme d'un double hexamère (un seul est représenté ici), la forme active de l'hélicase virale. L'hexamère entoure un seul brin de l'ADN et le transloque à l'intérieur de son canal. L'interaction E1-topoisomérase I favorise la liaison spécifique de E1 à l'origine et remodèle la topologie de l'ADN afin de libérer le stress de torsion. L'interaction E1-RPA mène au recrutement de RPA sur l'ADN sb fraîchement déroulé par l'hélicase virale. E1 recrute la polymérase α -primase qui participe à la synthèse d'ADN, particulièrement sur le brin retardé. Le facteur RFC induit le chargement de PCNA et la polymérase δ . L'ensemble de ces facteurs forment le réplisome viral et contribuent à la synthèse de l'ADN du VPH. D'après (Bergvall et al., 2013), avec la permission de Elsevier.

L'ADN polymérase α -primase (pol α -prim) est une enzyme impliquée principalement dans la synthèse de l'ADN sur le brin retardé grâce à sa double fonction enzymatique de synthèse d'amorce d'ARN et d'ADN polymérase. Ces oligoribonucléotides permettent à la pol α -prim d'initier la synthèse de l'ADN viral à

plusieurs loci du brin retardé et d'en assurer la réplication. La pol α -prim est composée de quatre sous-unités : p180, p70, p58 et p48 (Hubscher et al., 2002). Les activités enzymatiques primase et polymérase sont assurées par les sous-unités p48 et p180, respectivement. p58 et p70 n'ont pas d'activité enzymatique, mais sont impliqués dans la régulation de la polymérase. L'activité de la pol α -prim est essentielle, conjointement avec la polymérase δ , pour la réplication du VPH et de SV40. L'utilisation d'anticorps neutralisants contre pol α -prim inhibe la réplication du VPH *in vitro* et l'ajout de pol α -prim recombinante stimule la synthèse d'ADN viral (Melendy et al., 1995). E1 est directement impliqué dans le recrutement de la pol α -prim, mais le mécanisme exact demeure incertain. Des disparités ont été observées dans la nature de la sous-unité de pol α -prim et du domaine de E1 impliqués dans l'interaction. Une interaction avec E1 a été rapportée pour les sous-unités p70 et p180 de pol α -prim, mais la plupart des études n'ont observé une interaction qu'avec p70 (Amin et al., 2000; Bonne-Andrea, Santucci, Clertant, et al., 1995; Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998; Park et al., 1994). L'importance de p70 pour le recrutement est supportée par l'observation que SV40 LT procède aussi principalement via cette sous-unité pour le recrutement de la polymérase (Zhou et al., 2012). Également, c'est le domaine C-terminal de E1 qui semble être impliqué dans l'interaction, et ce, pour tous les génotypes étudiés (VPB1, VPH11 et VPH16). De plus, les interactions E1-pol α -prim et E1-E2 sont mutuellement exclusives, puisque la surexpression de E2 inhibe le recrutement de la polymérase. Ceci suggère que la polymérase est recrutée à une étape postérieure à la dissociation de E2 de l'ADN.

Lors de la réplication du génome, le déroulement de l'ADN en aval de la fourche de réplication induit un superenroulement de l'ADN. Cette tension topologique peut devenir problématique si non corrigée et entraîner un arrêt du réplisome. Les topoisomérases ont pour fonction de relâcher la torsion en créant une coupure dans l'ADN (sb ou db), en relaxant la structure et en ligaturant l'ADN sur lui-même (Wang, 2002). C'est donc la topologie et non la séquence de l'ADN qui est altérée par l'intervention des topoisomérases, d'où l'origine de leur nom. Il existe deux classes de topoisomérases qui se distinguent par leur mécanisme d'action. La topoisomérase I relâche les structures de l'ADN par une coupure sb, alors que la topoisomérase II procède par une coupure db. La réplication du génome viral induit aussi un stress de

torsion qui doit être relâché par l'activité topoisomérase. D'ailleurs, l'inhibition des topoisomérases par l'utilisation de petites molécules inhibitrices, telles l'étoposide et la camptothécine, induit une réduction importante de la réplication virale *in vitro* (Kuo et al., 1994; Melendy et al., 1995). De surcroît, E1 interagit directement avec la topoisomérase I, via les domaines OBD et C-terminal de E1, et accroît l'activité topoisomérase (Clower et al., 2006). L'interaction avec la topoisomérase I stimule aussi la liaison de E1 avec l'ori, mais la topoisomérase ne demeure pas associée à l'ADN (Hu et al., 2006). L'interaction E1-topoisomérase pourrait ultérieurement être utile pour son recrutement lors de l'élongation et faciliter la réplication virale en relâchant le stress de torsion. L'importance de ces activités durant la réplication de l'ADN n'a néanmoins jamais été prouvée *in vivo*.

Finalement, E1 interagit avec le facteur de réplication RPA, une protéine de liaison à l'ADN sb. RPA est constitué de trois sous-unités, RPA70, RPA32 et RPA14, et joue un rôle important lors de la réplication pour stabiliser l'ADN déroulé. E1 interagit avec la sous-unité RPA70, via le domaine de liaison à l'ADN sb de cette dernière (Han et al., 1999; Loo & Melendy, 2004). D'ailleurs, Loo et al. ont démontré *in vitro* que les interactions de RPA avec l'ADN et avec E1 sont mutuellement exclusives, puisque l'ADN sb compétitionne l'interaction E1-RPA. Ils suggèrent que E1 interagit avec RPA pour son chargement sur l'ADN fraîchement déroulé et qu'une fois l'ADN lié, E1 libère RPA et s'engage dans la liaison d'un nouveau hétérotrimère de RPA. Il est à noter que E2 a aussi été proposé comme partenaire d'interaction de RPA, suggérant que les deux protéines virales puissent coopérer pour le recrutement de RPA sur le génome du VPH (Li & Botchan, 1993).

1.4.5.2 Facteurs de remodelage de la chromatine : H1 et hSNF5

Puisque la réplication virale exploite la machinerie cellulaire de réplication, il n'est pas étonnant que le génome du VPH soit associé à des nucléosomes. Incidemment, on peut s'attendre à ce que la chromatine virale subisse des changements similaires à la chromatine cellulaire, soit par la modification post-traductionnelle des histones ou par le remodelage de l'organisation chromatinienne. Une interaction entre le domaine N-terminal de E1 (1-185 pour E1 du VPH11) et l'histone H1 a été rapportée (Swindle & Engler, 1998). La liaison de E1 à H1 a été détectée non seulement *in vitro*, mais aussi

par une approche de co-immunoprécipitation d'extraits nucléaires. Contrairement aux histones qui forment les nucléosomes octamériques, l'histone H1 ne fait pas partie de cette structure en « collier de perles » observée en microscopie électronique. Sa fonction est plutôt de stabiliser les nucléosomes et de s'associer à l'ADN dans les régions inter-nucléosomales afin de favoriser la compaction de la chromatine par des interactions nucléosome-nucléosome (Kowalski & Palyga, 2012). La modulation de l'interaction entre H1 et l'ADN permet de réguler cette compaction d'ordre supérieur et de réguler les fonctions cellulaires qui y sont sensibles, dont la transcription et la réplication. Effectivement, les nucléosomes font obstacles à la synthèse de l'ADN lors de la réplication du VPB1 (Li & Botchan, 1994). Les travaux de *Swindel et al.* suggèrent que E1 permet d'inhiber l'interaction entre H1 et l'ADN, tel que démontré par des essais de protection des endonucléases. L'action de E1 sur le déplacement de H1 et la modification de la topologie de la chromatine virale pourrait constituer un mécanisme facilitant l'élongation durant la réplication de l'ADN du VPH.

Une approche de double hybride a aussi permis l'identification d'une interaction entre E1 et le facteur Ini1/hSNF5, une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (*switch/sucrose non-fermenting*) (Lee et al., 1999). Ce complexe multiprotéique module activement la position et la composition en histones de la chromatine grâce à son activité ATPase. Des essais de réplication transitoire ont révélé que SNF5 favorise la synthèse de l'ADN viral de telle sorte que sa surexpression ou sa déplétion par ARN interférence module à la hausse ou à la baisse, respectivement, la réplication du VPH. L'interaction semble requérir certains résidus dans l'OBD et le domaine C-terminal de E1, et les aa 182-331 de hSNF5. Ainsi, la régulation de la compaction de la chromatine pourrait être effectuée directement par des interactions de E1 avec les protéines de remodelage et faciliter la réplication virale.

1.4.5.3 Chaperonnes : Hsp40 et Hsp70

Une interaction entre E1 et les chaperonnes cellulaires Hsp70 et Hsp40 (*heat shock protein*) a été rapportée dans la littérature (Lin et al., 2002; Liu et al., 1998). Les fonctions cellulaires de Hsp70 sont diverses et impliquent notamment le repliement des polypeptides, le transport des protéines et l'assemblage de complexes multiprotéiques. Hsp40 est une famille de chaperonnes, comprenant Hdj1 et Hdj2, dont la fonction est

principalement de moduler l'activité et la spécificité de Hsp70 (Fan et al., 2003; Mayer & Bukau, 2005). L'association et la dissociation de Hsp70 à son substrat sont régulées par la liaison de l'ATP, et l'activité ATPase de Hsp70 est induite par des co-chaperonnes telles que Hsp40. Les travaux de *Liu et al.* suggèrent que Hsp70 et Hsp40 stimulent *in vitro* l'assemblage de E1 sur l'ori virale, et ce, de manière indépendante et additive. Ils démontrent également que Hsp70 interagit transitoirement avec E1, alors que Hsp40 semble se lier de manière stable et former un complexe E1-Hsp40-ADN. Cette activation par Hsp70 nécessite l'hydrolyse de l'ATP, alors que celle induite par Hsp40 est indépendante de l'ATP. De plus, Hsp40 stimule l'oligomérisation en double hexamère et incidemment, l'addition de Hsp70 et Hsp40 stimule légèrement la réplication transitoire de l'ADN du VPH. Tel que précédemment mentionné, lors de l'assemblage du réplisome viral, E2 agit comme facteur de coopérativité pour le recrutement spécifique de E1 à l'origine, mais E2 doit ultérieurement être évincé de l'ADN pour permettre l'initiation de la réplication sinon inhibée. Les travaux de *Lin et al.* suggèrent que les chaperonnes jouent un rôle actif dans l'exclusion de E2 du complexe E1-ADN. L'effet inhibiteur d'un excès de E2 dans des essais hélicase, dans lesquels l'activité de déroulement de l'ADN par E1 est évaluée, est levé par l'ajout de Hsp70 ou Hsp40. De plus, ces chaperonnes ne demeurent pas associées à l'ADN une fois que l'hélicase virale a initié son activité. Ainsi, les protéines Hsp70 et Hsp40 pourraient être impliquées à une étape précoce pour promouvoir l'assemblage du pré-réplisome.

1.4.5.4 p56 et E1-BP

Les interférons sont des facteurs connus pour leur capacité à inhiber la réplication du génome du VPH. Une étude suggère que p56, une protéine dont l'expression est régulée par l'interféron, inhibe la réplication de l'ADN viral (Terenzi et al., 2008). La réplication du génome viral est augmentée par la déplétion de p56. Le domaine C-terminal de E1 interagit avec p56, une interaction qui relocalise E1 du noyau au cytoplasme. De plus, p56 inhibe *in vitro* la réplication de l'ADN viral, ainsi que l'activité hélicase de E1 (Terenzi et al., 2008). Cet effet pourrait être occasionné par le potentiel inhibiteur de p56 sur l'interaction E1-E2 et E1-ori (Saikia et al., 2010). La délétion du résidu F399 de E1 du VPH18 génère une protéine incapable d'interagir avec

p56. Cette mutation n'affecte pas l'activité de réplication de E1, mais la rend insensible à l'effet inhibiteur de p56 et de l'interféron. Cependant, des études utilisant d'autres génotypes montrent que la substitution en alanine du résidu correspondant à F399 affecte profondément l'activité de réplication de E1 (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010; Titolo et al., 2000). De plus, nos propres études n'ont pas permis de détecter une interaction entre E1 et p56 (Lehoux & Archambault, non publié).

E1-BP (ou TRIP13, *thyroid hormone receptor interactor 13*) est une autre protéine identifiée comme interagissant avec E1 du VPH16. Des mutants de E1 défectifs pour cette interaction présentent un défaut de réplication de l'ADN, mais aussi une altération d'autres activités de E1 (oligomérisation, ATPase ou interaction avec E2). Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'implication directe de E1-BP dans la réplication virale.

1.4.5.5 UAF1

L'interaction E1-UAF1 a été identifiée par notre laboratoire via une approche de chromatographie d'affinité en tandem couplée à la spectrométrie de masse. La région N-terminale de E1 de tous les VPH anogénitaux contient un domaine de liaison hautement conservé pour UAF1, contrairement aux virus cutanés ou aux virus du boeuf et du lapin (Cote-Martin et al., 2008). L'interaction a été validée avec plusieurs VPH anogénitaux : VPH6, VPH11, VPH16, VPH18, VPH31 et VPH33 (données non publiées et (Cote-Martin et al., 2008)). Ce domaine d'interaction a été délimité aux résidus 10-40 de E1 pour le VPH31. Trois protéines mutantes de E1, contenant des substitutions d'aa en alanines, ont aussi été générées et identifiées comme étant défectives pour l'interaction avec UAF1 : W17A/F18A (ou E1 WF), V20A/E21A (ou E1 VE) et V23A/I24A (ou E1 VI).

Nous avons démontré que l'interaction E1-UAF1 induit la relocalisation de UAF1 du cytoplasme jusqu'au noyau, un phénomène abolit par n'importe laquelle des trois mutations de E1. De plus, des génomes pleine longueur encodant ces substitutions (WF, VE ou VI) génèrent un défaut majeur de maintien de l'épisome viral dans des HFK non différenciés. Plus spécifiquement, la réplication transitoire catalysée par ces protéines mutantes est moins efficace, sans toutefois être totalement inhibée (Cote-

Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010). Similairement, une version tronquée de E1, dépourvue de son domaine de liaison à UAF1 (E1 Δ , 40-629), présente aussi un important défaut de réplication transitoire de l'ADN (Morin et al., 2011). Ce phénotype semble indiquer que l'interaction avec UAF1 est importante pour la réplication de l'ADN viral.

Cette thèse s'intéresse essentiellement à la fonction de UAF1 dans le cycle viral et de son implication dans la régulation de la déubiquitination. Les prochaines sections sont donc consacrées aux voies de l'ubiquitination et de la déubiquitination (section 1.5), ainsi qu'aux fonctions endogènes connues de UAF1 (section 1.6).

1.5 Ubiquitination et déubiquitination

1.5.1 Ubiquitination

L'ubiquitination, à l'instar de la phosphorylation, est une modification post-traductionnelle réversible. Lors de la réaction d'ubiquitination, l'ubiquitine, une petite protéine de 76 aa, est attachée de manière covalente à un substrat, typiquement sur la chaîne latérale de résidus lysine de ce dernier (Welchman et al., 2005). Le transfert de l'ubiquitine se fait en trois étapes qui nécessitent chacune une famille d'enzymes : une enzyme activatrice (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une ubiquitine-ligase (E3).

Les E3 ubiquitine-ligases sont les enzymes qui agissent comme facteurs de sélectivité du substrat à ubiquitiner (Metzger et al., 2012). Les E3 sont sous-divisés en deux familles, en fonction de leur mécanisme catalytique : les E3 à domaine HECT (homologous to E6-associated protein C-terminus) ou à domaine RING (really interesting new gene). Les E3 de type HECT contiennent un résidu cystéine qui est utilisé pour transférer l'ubiquitine au substrat et est donc directement impliqué dans le mécanisme catalytique. Les E3 à domaine RING, pour leur part, ne sont pas directement impliqués dans le transfert de l'ubiquitine, mais agissent plutôt comme protéines d'échafaudage permettant le rapprochement du substrat et d'une enzyme de conjugaison E2 qui transfère directement l'ubiquitine. Il existe plus de 600 E3 ubiquitine-ligases, mais ce nombre demeure relativement limité comparativement au grand nombre de substrats potentiels et ne permet pas d'expliquer à lui seul la spécificité de la réaction

d'ubiquitination. Ce mystère fut en partie résolu par la découverte d'un nouveau niveau de complexité dans la régulation de cette modification. En 1997, un complexe multiprotéique de type SCF fut identifié et constitue présentement le membre prototypique de la superfamille des ligases Culline-RING (Feldman et al., 1997; Sarikas et al., 2011; Skowyra et al., 1997). Les SCF sont des E3 ubiquitine-ligases de la famille RING et sont composées de quatre sous-unités : la protéine d'échafaudage Cull1, la protéine à domaine RING Rbx1/Roc1, l'adaptateur Skp1 et une protéine de type F-box. La protéine F-box agit comme un récepteur de substrat et en détermine la spécificité, et β -TrCP est devenu l'un de ses membres le mieux caractérisé (voir Figure 1.11). Ces ligases Culline-RING étant modulaires, les différentes isoformes des sous-unités s'assemblent de manière combinatoire en un très grand nombre de E3 ubiquitine-ligases différentes avec des spécificités de substrat variables.

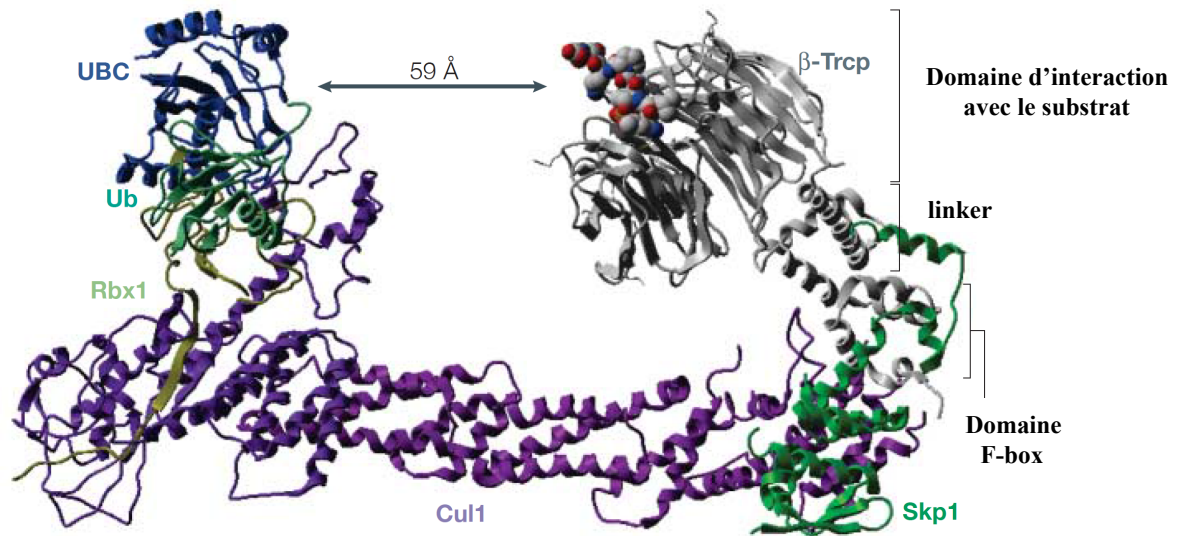


Figure 1.11 E3 ubiquitine-ligase de type SCF

Modèle du membre prototypique des E3 ubiquitine-ligases de type SCF(β -TrCP). Les sous-unités Rbx1, Cull1, Skp1 et la protéine F-box β -TrCP sont identifiées, ainsi que le substrat indiqué à droite par un peptide de format « atomes colorés ». Adapté de (Cardozo & Pagano, 2004), avec la permission de Nature Publishing Group.

L'ubiquitination possède plusieurs fonctions biologiques qui sont en partie expliquées par les différents types d'ubiquitination. Contrairement à la phosphorylation, l'ubiquitination prend plusieurs formes en fonction du nombre d'ubiquitines transférées sur un même substrat et variant de la monoubiquitination à la polyubiquitination. De plus, l'ubiquitine possède sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) qui peuvent toutes être utilisées pour la conjugaison de chaînes d'ubiquitines à topologie variable qui spécifieront leurs fonctions. La variante de l'ubiquitination la plus connue est certainement la polyubiquitination de type K48 et qui est généralement utilisée comme signal de ciblage vers le protéasome, un complexe multiprotéique impliqué dans la dégradation des protéines. Un autre patron d'ubiquitination classique est le type K63 qui est notamment exploité dans le marquage de cargos membranaires pour l'endocytose et le tri intracellulaire, permettant notamment l'internalisation de récepteurs plasmiques. Cette endocytose induite par l'ubiquitination permet de désensibiliser les voies modulées par ces récepteurs, et de réguler leur abondance en surface soit en dictant leur recyclage ou leur dégradation lysosomale. L'ubiquitination d'une protéine permet des interactions avec des motifs de liaison à l'ubiquitine (UBM, *ubiquitin-binding motif*) contenus dans un très grand nombre de protéines qui dictent la liaison de substrats spécifiques ayant des topologies d'ubiquitination particulières. Ces protéines à UBM contribuent grandement à dicter la fonction et le destin du substrat ubiquitiné.

1.5.2 Déubiquitination

Tout comme la phosphorylation, les réactions d'ubiquitination doivent être finement régulées. Bien que la réaction d'ubiquitination soit hautement contrôlée, temporellement et par la spécificité du substrat, la réaction inverse de déubiquitination est également importante. Ceci est illustré par le nombre grandissant de pathologies associées à des défauts de déubiquitination (Nijman, Luna-Vargas, et al., 2005). La déubiquitination est catalysée par les déubiquitinases (DUB) dont on estime le nombre dans le génome humain à 95 membres. Les DUB sont des protéases appartenant soit à la classe des métallo-protéases (sous-classe JAMM, *JAB1/MPN/Mov31 metalloenzymes*) ou à celle des protéases à cystéine. Les DUB utilisant une cystéine comme résidu catalytique peuvent être sous-divisées en quatre sous-classes : hydrolases C-terminale de l'ubiquitine (UCH), protéases Otubain (OTU, *ovarian tumor proteases*), protéases MJDs

(*Machado-Joseph disease protein domain proteases*) et protéases spécifiques à l'ubiquitine (USP, *ubiquitin-specific proteases*).

Les USP sont des protéases à cystéine qui englobent plus de la moitié des DUB connues. Ils possèdent deux motifs hautement conservés, une boîte histidine et une boîte cystéine, contenant les résidus catalytiques. Les déterminants de la spécificité de ces enzymes sont peu connus et il est intrigant que le nombre de E3 ubiquitine-ligases soit largement supérieur au nombre de DUB, suggérant l'existence de mécanismes de régulation inconnus. Ceci est encore une fois similaire aux réactions de phosphorylation dans lesquelles le nombre de phosphatases est nettement inférieur à celui des kinases. Dans le cas des phosphatases, on sait maintenant que l'association avec des sous-unités régulatrices et la compartimentalisation cellulaire sont des modes de régulation de la déphosphorylation (Sacco et al., 2012). Il a été démontré expérimentalement que les USP ont une sélectivité pour un nombre limité de substrats et que certains sont spécifiques à certaines formes d'ubiquitination ou de branchements d'ubiquitine (Faesen et al., 2011; Nijman, Luna-Vargas, et al., 2005). Les deux boîtes catalytiques des USP sont souvent séparées par des régions hautement variables en composition et en longueur qui pourraient vraisemblablement être impliquées dans la régulation de ces protéases (Ye et al., 2009). Plusieurs modifications post-traductionnelles peuvent moduler l'activité des DUB, dont la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination (Villamil et al., 2013). Les USP sont aussi régulés dans leur abondance via la modulation de leur stabilité, de leur transcription et de leur localisation cellulaire. Le clivage protéolytique des USP est un autre moyen de contrôler leur activité. Notamment, USP7 est inactivé par un clivage dépendant des caspases, alors que USP1 subit un auto-clivage qui stimule sa dégradation protéasomale (Huang et al., 2006; Vugmeyster et al., 2002). Finalement, plusieurs USP comportent aussi des motifs d'interaction leur permettant de s'associer avec leurs substrats ou des protéines régulatrices, et plusieurs complexes protéiques comportant des USP ont été répertoriés (Sowa et al., 2009; Ventii & Wilkinson, 2008). Par exemple, l'interaction entre la GMP synthétase et USP7 a été démontré comme étant stimulatrice pour son activité protéolytique (van der Knaap et al., 2005). En outre, la protéine UAF1 fonctionne comme cofacteur de USP1, USP12 et USP46 (voir section 1.4.4).

1.5.3 Ubiquitine et infections virales

Les infections virales entraînent l'activation d'une multitude de voies dont certaines constituent une réponse antivirale face à laquelle les virus développent souvent des stratégies d'évasion, alors que d'autres servent au bénéfice du virus. Les voies de l'ubiquitine ne font pas exception et sont souvent modulées lors des infections. Certains virus détournent des E3 ubiquitine-ligases cellulaires ou encodent leurs propres enzymes pour favoriser l'ubiquitination et la dégradation de diverses protéines néfastes pour le cycle viral (Gao & Luo, 2006; Isaacson & Ploegh, 2009). L'inhibition de la réponse immunitaire par la dégradation des protéines présentatrices d'antigène CMH I est observée dans plusieurs cas, notamment par les E3 ubiquitine-ligases K3 et K5 de l'herpèsvirus humain 8 (ou KSHV, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) qui favorisent la dégradation lysosomale de CMH I. La protéine Vpu du VIH-1 sert aussi de protéine adaptatrice entre la E3 ubiquitine-ligase SCF(β -TrCP) et le corécepteur CD4 des lymphocytes T, qui est ainsi ciblé pour la dégradation par le protéasome (Nomaguchi et al., 2008).

La déubiquitination de certaines protéines peut aussi être contrôlée par les virus. USP7, aussi connu sous le nom de HAUSP (*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*), est impliqué de manière endogène dans la stabilisation de p53. Le virus de l'herpes simplex 1 encode la protéine ICP0 qui interagit avec USP7 et l'empêche de lier et stabiliser p53. Cette interaction inhibe ainsi l'apoptose et l'arrêt de la prolifération cellulaire. ICP0, étant une E3 ubiquitine-ligase, peut aussi induire directement la polyubiquitination et l'instabilité de p53. La liaison ICP0-USP7 est aussi connue pour stabiliser ICP0, qui autrement est déstabilisé par son auto-ubiquitination (Canning et al., 2004). De façon similaire, la protéine EBNA1 du virus Epstein-Barr (EBV) séquestre USP7 et déstabilise p53. L'interaction EBNA1-USP7 semble aussi jouer un rôle au cours de la réplication de l'ADN viral (Sarkari et al., 2009). USP7 est directement recruté sur le génome du EBV et est impliqué dans la déubiquitination de l'histone H2B, possiblement pour favoriser un remodelage de la chromatine compatible avec la réplication. Certains virus encodent leurs propres DUB, tels l'*adenain* des adénovirus et la PLpro (*papain-like protease*) des coronavirus, mais leur fonction demeure peu connue à ce jour.

Le détournement des voies de l'ubiquitination joue aussi un rôle prépondérant dans le contexte de l'infection par le VPH, notamment en ce qui a trait à l'induction de l'instabilité des protéines cellulaires p53 et pRb, respectivement par E6 et E7 (voir section 1.2.4.3). Notre laboratoire a aussi identifié dans le passé une interaction entre E1 et UAF1, une protéine associée aux enzymes de déubiquitination USP1, USP12 et USP46. L'implication au cours du cycle viral de UAF1 et des DUB associées est un sujet d'importance dans cette thèse. Les fonctions endogènes connues de ces enzymes sont détaillées dans les prochaines sections.

1.6 UAF1

1.6.1 Généralités

La protéine cellulaire UAF1 (*USP1-associated factor 1*), aussi connue sous le nom de p80 ou de WDR48, a été mentionnée pour la première fois dans la littérature en 2002 par le laboratoire du Dr Jae U. Jung (Park et al., 2002). Dans les cellules humaines, cette protéine s'associe aux enzymes USP1, USP12 et USP46, d'où son nom UAF1 (Cohn et al., 2009; Cohn et al., 2007). La dénomination UAF1 est maintenant généralement acceptée, mais on utilisera le nom p80 dans l'article de la section 2, publié antérieurement à l'adoption de la nouvelle nomenclature.

UAF1 est encodé par un gène localisé sur le chromosome 3 dont aucune mutation n'a été associée à des manifestations cliniques, outre un événement de translocation ayant mené à la fusion de UAF1 avec le récepteur PDGFR dans une leucémie aiguë myéloblastique (Hidalgo-Curtis et al., 2010). Les premières études sur UAF1 ont débuté par l'identification de son interaction avec la protéine Tip (*tyrosine kinase-interacting protein*) du virus de l'herpès Saimiri. Tip s'associe sous forme d'un complexe ternaire avec UAF1 et la tyrosine-kinase Lck (*lymphocyte-specific kinase*) dans les lymphocytes T (Jung et al., 1995; Park et al., 2002). L'interaction Tip-UAF1 induit la formation d'endosomes tardifs et de lysosomes, où UAF1 et Lck sont relocalisés. Ce complexe Tip-UAF1 favorise la dégradation lysosomale de Lck et mène à la déplétion des récepteurs des cellules T (TCR, *T-cell receptor*) et du corécepteur CD4 à la surface des cellules. En outre, l'internalisation des récepteurs TCR requiert le recrutement de ces derniers et de Tip dans des radeaux lipidiques, un phénomène sollicitant également

l'interaction Tip-UAF1 (Park et al., 2003). Ces études suggèrent donc que Tip-UAF1 interfère avec la signalisation des cellules T en modulant le transport endosomal et la dégradation de récepteurs et de kinases. Il est à noter que la localisation lysosomale de UAF1 semble être une observation isolée qu'aucun autre groupe, incluant le nôtre (voir section 2), n'a réussi à reproduire ; une disparité possiblement attribuable aux types cellulaires utilisés. Plusieurs nouvelles fonctions de UAF1 ont été décrites au cours de la dernière décennie et sont assimilables principalement à ses partenaires d'interaction, qui sont énumérés dans les sections subséquentes. Des souris transgéniques déficientes pour UAF1 (*knock-out*) ont été récemment générées (Park et al., 2013). La délétion homozygote (UAF1 $-/-$) est létale au stade embryonnaire avant le jour E7.5, toutefois le mutant hétérozygote (UAF1 $+/-$) est viable. Les souris hétérozygotes montrent plusieurs défauts de développement : elles ont une petite taille, montrent des défauts du développement squelettique, ont des problèmes de fertilité et sont très sensibles aux agents inducteurs de dommages à l'ADN. Ce dernier phénotype est cohérent avec la fonction attribuée à UAF1 dans la régulation des voies de réponse aux dommages à l'ADN via son interaction avec USP1 (voir section 1.6.4). Toutefois, comparativement à la souris transgénique USP1 $-/-$, la souris UAF1 $+/-$ montre une hypersensibilité supérieure aux agents génotoxiques, suggérant que UAF1 accomplit des fonctions indépendantes de USP1 pour le maintien de la stabilité génomique. Les investigations sur les défauts de ces souris, notamment en ce qui a trait aux autres fonctions de UAF1, demeurent à effectuer.

1.6.2 Évolution et structure de UAF1

Aucune information n'est présentement disponible sur le repliement de UAF1, cependant certains domaines structuraux sont identifiables à l'intérieur de la protéine (voir Figure 1.12A). Dans la portion N-terminale, une répétition de 7-8 motifs WD40 est présente et est prédite pouvoir se replier en hélices de feuillets β antiparallèles (ou *β -propeller*). La structure *β -propeller* de WDR5, la protéine à WD40 dont la structure est résolue et ayant la plus grande homologie de séquence avec UAF1, est représentée dans la Figure 1.12B. Le nom du motif WD40 est dérivé du fait que ce domaine est typiquement composé d'environ 40 aa comportant un dipeptide WD en son C-terminal. Chaque WD40 forme une « pale » comportant un feuillet β antiparallèle constitué de

quatre brins β , et l'ensemble des « pales » (en général 7-8) forme une structure en forme d'hélice ou *β -propeller*. La structure est stabilisée par des interactions hydrophobes entre les « pales » et par leur entrelacement de telle sorte que le dernier brin β d'un motif WD40 et les trois premiers brins β du motif subséquent forme chaque « pale ». Cette structure rigide offre une exposition étendue de ses surfaces (latérale, supérieure et inférieure) et est généralement connue pour être impliquée dans des interactions protéine-protéine. Un domaine C-terminal semblable à l'ubiquitine a également été identifié *in silico* dans UAF1. Sa classification n'est pas clairement établie, mais ce domaine pourrait appartenir à la famille des domaines UBX (*ubiquitin-like X*) ou des SLD (*SUMO-like domain*); cette dernière possibilité est supportée par une littérature plus abondante (Sanchez-Pulido et al., 2008; Yang et al., 2011).

UAF1 est une protéine présente chez tous les eucaryotes, de la levure à l'humain (voir Figure 1.12C). Tous les orthologues de UAF1 contiennent les motifs WD40 en N-terminal, suggérant que cette région joue un rôle biologiquement important. Une section du domaine C-terminal est également hautement conservé et comprend le domaine SLD. L'orthologue de UAF1 chez *S. pombe* est nommé Bun107 et interagit avec la DUB Ubp9, l'homologue de USP12 (Kouranti et al., 2010). Bun107 est localisé dans le cytoplasme, principalement dans le septum et près de la membrane. Similairement au complexe UAF1-USP12, Bun107 est important pour l'activité enzymatique de Ubp9 et de plus module sa localisation cellulaire en favorisant sa rétention cytoplasmique. Des analyses d'interactions génétiques ont permis à Kouranti et al. de suggérer que le complexe Bun107-Ubp9 joue un rôle lors de l'endocytose et de la réorganisation du cytosquelette. Un autre élément intéressant est que Bun107 et Ubp9 forment un complexe ternaire avec une autre protéine à WD40, Bun62, qui est l'orthologue de WDR20. Ce complexe ternaire existe également chez l'humain sous la forme UAF1-WDR20-USP12 (voir section 1.6.5). L'orthologue de UAF1 chez *S. cerevisiae* se nomme Duf1 (*DUB-associated factor 1*), ou Yol087c, et s'associe également avec des enzymes de déubiquitination. En l'occurrence, Duf1 interagit avec Ubp9 et Ubp13, les homologues de USP12 et USP46 respectivement (Kanga et al., 2012). Duf1, Ubp9 et Ubp13 sont nécessaires pour la synthèse de la sous-unité Atp9 de l'ATP synthétase mitochondriale.

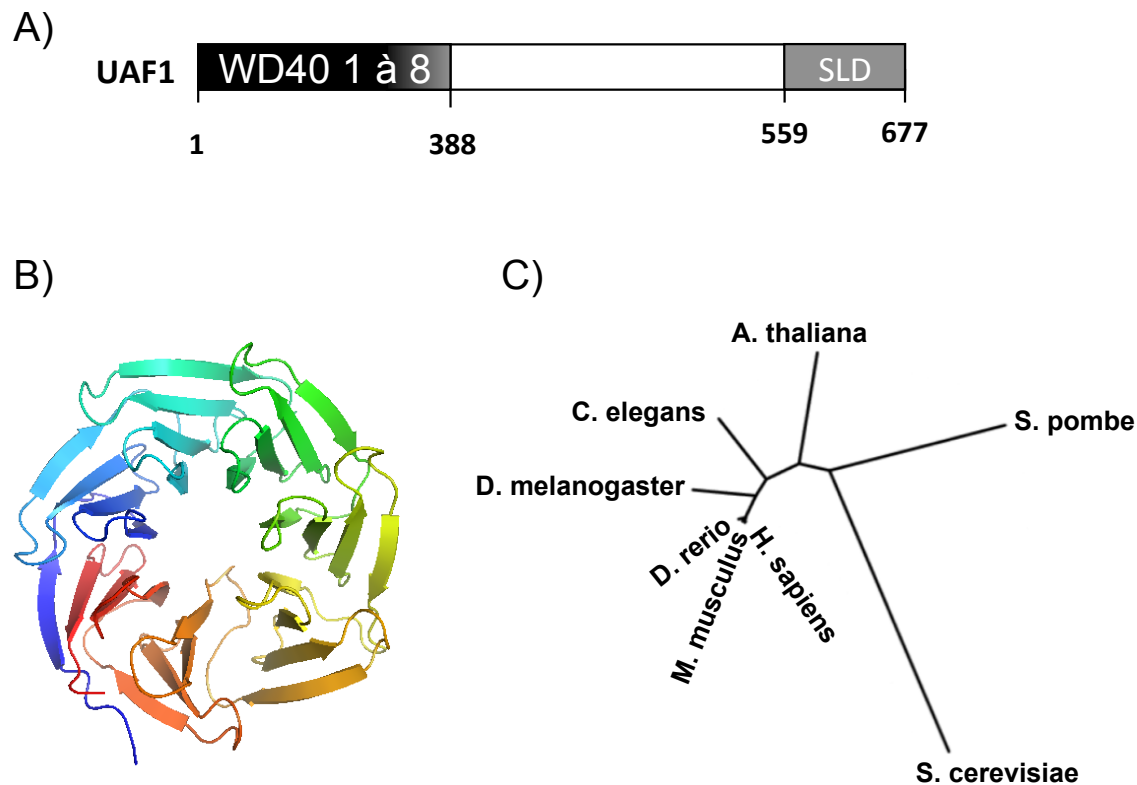


Figure 1.12 UAF1 : topologie, structure et évolution

A) Représentation schématique de la topologie de UAF1. Les 8 motifs WD40 sont identifiés dans la région 1-388. L'authenticité du 8^e WD40 étant incertaine, il est représenté par un dégradé. Le domaine C-terminal de type SLD (SUMO-like domain) est aussi indiqué. B) Structure cristallographique de WDR5, la protéine dont la structure du domaine β -propeller est connue et ayant la plus grande homologie avec UAF1. La protéine est colorée du bleu au rouge, du N-terminal au C-terminal. PDB no 2H68 C) Arbre phylogénétique de différents orthologues de UAF1. Comparaison de la séquence primaire d'orthologues de UAF1 originaires d'une sélection d'organismes eucaryotes variés. L'arbre a été généré par analyse ClustalW non-enraciné (*neighbor joining*). La longueur des branches est inversement proportionnelle à l'homologie de séquence.

1.6.3 Rôle comme cofacteur de DUB

Au cours des dernières années, quelques laboratoires, incluant le nôtre, se sont intéressés aux fonctions endogènes de UAF1. Des études protéomiques ont indiqué que UAF1 s'associe aux enzymes de déubiquitination USP1, USP12 et USP46 (section 3 et

(Cohn et al., 2009; Cohn et al., 2007). Tel que décrit dans la section précédente, ces interactions sont conservées chez tous les eucaryotes et semblent donc être fondamentales dans la fonction de UAF1.

Cohn et al. ont d'abord identifié USP1 comme partenaire d'interaction de UAF1, initiant l'adoption de la nomenclature *USP1-associated factor 1* (Cohn et al., 2007). USP1 est retrouvé majoritairement associé à UAF1 *in vivo*, suggérant un complexe dont la formation est constitutive et stoechiométrique. L'interaction UAF1-USP1 augmente *in vitro* et *in vivo* l'activité déubiquitineuse de USP1 vis-à-vis de son substrat FANCD2 (voir section 1.6.4). D'ailleurs, USP1 possède une activité enzymatique très faible en absence de UAF1. Cette induction dépend de l'augmentation de la constante catalytique (K_{cat} ou *turnover*) et n'affecte que marginalement son affinité pour le substrat (K_m) (Faesen et al., 2011). De plus, la liaison UAF1-USP1 requiert le domaine WD40 de UAF1. Des études subséquentes ont démontré que UAF1 s'associe aussi à deux autres enzymes de déubiquitination, USP12 et USP46, et induit leur activité de manière similaire à USP1 (Cohn et al., 2009). Les complexes UAF1-USP sont mutuellement exclusifs, si bien qu'une seule USP peut s'associer avec UAF1 à un moment donné. L'induction de l'activité déubiquitineuse est également un aspect conservé pour l'orthologue Duf1 (Kanga et al., 2012).

La modulation de l'activité des USP par UAF1 est un nouveau mode de régulation des réactions de déubiquitination. Plusieurs autres DUB ont été identifiées en association avec des protéines à domaine WD40 et la formation de ces complexes pourrait constituer un mécanisme de régulation des DUB assez courant (Cohn et al., 2007; Sowa et al., 2009; Villamil et al., 2013). L'induction de l'activité de USP1 par UAF1 a été plus spécifiquement disséquée et procède via la modulation de la conformation de la triade catalytique, soit par interaction directe avec le site actif ou par un effet allostérique (Villamil, Chen, et al., 2012). Ces résultats démontrent que UAF1 joue un rôle fondamental dans la régulation de l'activité des déubiquitineuses USP1, USP12 et USP46. Il faut noter que l'architecture de ces complexes est probablement plus élaborée, tel que démontré par la découverte que la protéine WDR20, une autre protéine à domaine WD40, peut s'associer sous la forme d'un complexe ternaire avec UAF1 et USP12 et stimuler encore davantage l'activité catalytique de USP12 (Kee et al.,

2010). Pour mieux comprendre la fonction de UAF1 en lien avec la déubiquitination, les prochaines sections sont consacrées aux DUB s'associant avec UAF1.

1.6.4 USP1

Le gène encodant USP1 a été cloné il y a environ 15 ans. USP1 est une protéine de 88 kDa possédant les boîtes catalytiques classiques des USP (Fujiwara et al., 1998). L'activité déubiquitinase de USP1 est dépendante de la cystéine C90 et de l'hétérodimérisation avec UAF1. USP1 joue un rôle central dans la réponse aux dommages à l'ADN en régulant la voie de l'anémie de Fanconi (FA) et de la synthèse translésionnelle de l'ADN (*Translesion synthesis*, TLS), en déubiquitinant respectivement FANCD2 et PCNA. USP1 est également impliqué dans la stabilisation de certaines protéines dont les protéines ID (*inhibitor of DNA-binding*) et PHLPP1 (Figure 1.13A). Les substrats connus de USP1 sont résumés dans le tableau 1.1.

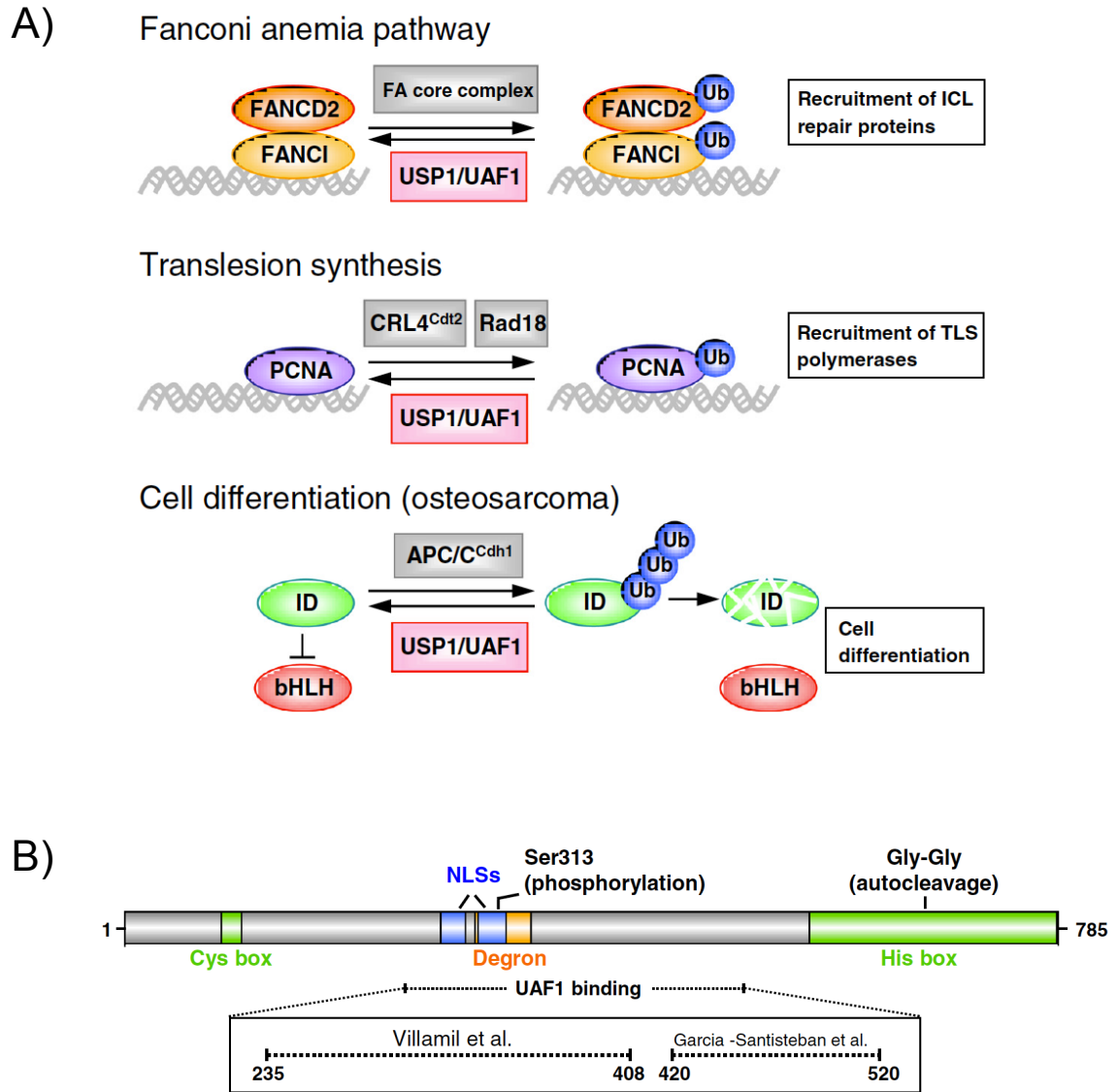


Figure 1.13 USP1 : topologie et fonctions

A) Schéma illustrant le rôle de USP1 dans la régulation de diverses voies cellulaires. Dans la voie de l'anémie de Fanconi (haut), le complexe E3 ubiquitine-ligase (*FA core complex*) monoubiquitine les effecteurs FANCD2 et FANCI qui dimérisent sur l'ADN au site de lésion (ICL) et induisent le recrutement des facteurs de réparation. UAF1-USP1 assure la déubiquitination de FANCD2 et FANCI et permet l'inactivation de la voie. Le recrutement des ADN polymérases translésionnelles requiert la monoubiquitination de PCNA et permet de poursuivre la synthèse de l'ADN malgré la lésion (milieu). UAF1-USP1 antagonise cette voie et assure son activation opportune. UAF1-USP1 inhibe aussi la différenciation cellulaire en stabilisant les protéines ID qui sont des régulateurs négatifs des facteurs de transcription bHLH. B) Représentation schématique des domaines de USP1. Les boîtes cystéine (*cys box*) et histidine (*his box*), requises pour la fonction enzymatique de USP1 sont indiquées en vert. Le motif de destruction (degron) et les NLS sont indiqués en orange et en bleu, respectivement. La région impliquée

dans la liaison avec UAF1 n'est pas clairement définie ; deux domaines ont été proposés et sont indiqués sous le schéma. Le motif d'auto-clivage Gly-Gly et le site de phosphorylation Ser313 sont indiqués. D'après (Garcia-Santisteban et al., 2013).

La voie FA permet notamment de réparer les dommages à l'ADN de type réticulation inter-brin (ICL, *interstrand crosslinks*) en activant un complexe multiprotéique de huit protéines ayant une activité E3 ubiquitine-ligase (*FA core complex*) et menant à la monoubiquitination des protéines effectrices FANCD2 et FANCI. Une fois ubiquitinées, ces protéines hétérodimérisent, s'associent à la chromatine aux sites de dommage et recrutent des facteurs de réparation dont ceux de la recombinaison homologue (Nakanishi et al., 2005). L'activation opportune et la désactivation de la réponse une fois la réparation effectuée s'effectuent via le contrôle du niveau de monoubiquitination de FANCD2 et FANCI. La déubiquitination de FANCD2 est catalysée par USP1, ce qui est aussi présumé pour FANCI puisque la déplétion de USP1 augmente sa monoubiquitination (Nijman, Huang, et al., 2005; Smogorzewska et al., 2007). La reconnaissance de l'hétérodimère FANCD2-FANCI par le complexe UAF1-USP1 nécessite le motif C-terminal SLD de UAF1 qui permet l'interaction avec le motif SIM (*SUMO-like domain-interacting motif*) de FANCI (Yang et al., 2011). La désactivation de la voie FA par USP1 est importante pour le bon fonctionnement de cette voie. Effectivement, la délétion de USP1 dans des souris transgéniques ou des lignées cellulaires génère un phénotype quasi identique à la délétion des gènes impliqués dans la monoubiquitination de FANCD2 et récapitule les effets de l'anémie de Fanconi, dont l'hypersensibilité à certaines génotoxines (Kim et al., 2009; Oestergaard et al., 2007; Parmar et al., 2010). Les cellules USP1 *-/-* montrent une accumulation constitutive de FANCD2 sur la chromatine, une hypersensibilité aux dommages à l'ADN et des défauts dans la voie de recombinaison homologue (Murai et al., 2011; Oestergaard et al., 2007). En outre, les souris USP1 *-/-* exhibent un haut taux de mortalité périnatale (80% de décès dans les deux jours postnataux) et des défauts de spermatogenèse menant à l'infertilité.

La protéine PCNA, un facteur de processivité de la réplication de l'ADN cellulaire, est aussi un substrat de USP1 (Huang et al., 2006). PCNA subit une monoubiquitination, catalysée par Rad18, sur la lysine 164 en réponse à des dommages à

l'ADN occasionnant une pause de la fourche de réplication. L'ubiquitination de PCNA induit le recrutement d'ADN polymérase atypiques qui sont capables de franchir les lésions et ainsi nommées ADN polymérase translésionnelles (*TLS polymerases*). Ces polymérase TLS sont essentielles pour prévenir les bris de l'ADN db pouvant résulter d'un blocage prolongé de la fourche de réplication, mais ont le désavantage d'être plus mutagéniques que les polymérase conventionnelles. Il est donc impératif que le recrutement de ces polymérase TLS soit effectué de manière appropriée et implique le contrôle du niveau de monoubiquitination de PCNA par USP1 (Huang et al., 2006). La déubiquitination de PCNA est aussi facilitée par la protéine ELG1, une composante d'un complexe alternatif de RFC, qui interagit avec le complexe UAF1-USP1 (Lee et al., 2010). Le motif SLD de UAF1 est impliqué dans l'interaction avec ELG1 qui contient un motif de liaison aux SLD (Yang et al., 2011).

Tel que mentionné précédemment, USP1 est aussi impliqué dans la stabilisation des protéines ID, et plus particulièrement les isoformes ID1, ID2 et ID3 (Williams et al., 2011). Les protéines ID sont des répresseurs des facteurs de transcription de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) qui sont impliqués dans la promotion de la différenciation cellulaire de plusieurs tissus. La dégradation des protéines ID est induite dans les tissus différenciés, ou dans les cellules en différenciation, et survient suite à leur polyubiquitination et leur ciblage au protéasome. La stabilisation des facteurs ID par USP1 inhibe l'activité des facteurs de transcription bHLH et maintient les cellules dans un état non différencié et prolifératif. Il a d'ailleurs été proposé que certaines tumeurs surexpriment USP1 afin de préserver leur potentiel prolifératif et échapper à la différenciation terminale. L'inhibition de USP1 dans ces tumeurs pourrait être une approche anti-tumorale prometteuse, notamment pour les ostéosarcomes où la déplétion de USP1 suffit à induire la différenciation (Williams et al., 2011).

Dans certains contextes, USP1 semble au contraire pouvoir jouer un rôle de suppresseur de tumeur en stabilisant PHLPP1 (*PH domain leucine-rich protein phosphatase 1*) et en évitant sa dégradation par le protéasome (Zhiqiang et al., 2012). La phosphatase PHLPP1 est connue pour sa capacité à déphosphoryler divers substrats, dont Akt sur la sérine 473 qui est ainsi inactivée (Gao et al., 2005). La voie PI3K-Akt joue un rôle central dans la survie et la prolifération des cellules normales et tumorales,

et l'inactivation de Akt par PHLPP1 freine la prolifération. Une surexpression de USP1 a été détectée dans certains tissus tumoraux dont dans les cancers du poumon (Garcia-Santisteban et al., 2013). Dans ces cellules, la déplétion de USP1 par ARN interférant mène à la déstabilisation de PHLPP1 et l'augmentation concomitante de la phosphorylation de Akt sur la sérine 473. Tel qu'attendu, la surexpression de PHLPP1 dans les cellules dérivées de tumeurs pulmonaires induit une inhibition de la prolifération cellulaire et une activation de l'apoptose.

Plusieurs mécanismes permettent de réguler l'activité de USP1. Tel que mentionné précédemment, son activité est augmentée par l'interaction avec UAF1 et ELG1. Alors que l'abondance de UAF1 semble être constante au cours du cycle cellulaire, l'expression de USP1 varie et atteint un maximum lors de la phase S (Nijman, Huang, et al., 2005). En outre, l'expression de USP1 est réprimée en réponse aux dommages à l'ADN, permettant ainsi l'activation des voies FA et TLS (Cohn et al., 2007). Cette régulation de l'abondance de USP1 se fait à l'échelle transcriptionnelle, mais aussi par l'induction de la dégradation de USP1 par le protéasome. Les dommages à l'ADN induisent l'auto-clivage de USP1 à l'intérieur d'un motif di-glycine (G670-G671) et les deux fragments générés sont hautement labiles et dégradés par le protéasome. Le fragment C-terminal possède d'ailleurs un dégron de type *N-end rule* (Huang et al., 2006; Piatkov et al., 2012). Ainsi, des mutations dans USP1 qui inactivent son activité catalytique ou la substitution du motif di-glycine entraînent la stabilisation de USP1 (Cotto-Rios, Jones, Busino, et al., 2011). L'autocatalyse de USP1 n'inactive pas nécessairement son activité enzymatique puisque les fragments générés sont maintenus ensemble, en présence de UAF1, sous la forme d'un complexe ternaire actif (Cohn et al., 2007). USP1 est polyubiquitiné par la E3 ubiquitine-ligase APC/C^{Cdh1} (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) en phase G1 (Cotto-Rios, Jones, Busino, et al., 2011). Cette activité est régulée par CAPNS1 (*calpain small subunit 1*) qui antagonise APC/C^{Cdh1} (Cataldo et al., 2013). De plus, USP1 est phosphorylé sur la sérine 313, une modification requise pour l'interaction avec UAF1 et donc pour la formation du complexe enzymatique actif UAF1-USP1 (Villamil, Liang, et al., 2012). La sérine 313 se trouve dans un site de phosphorylation consensus des kinases Cdk. Effectivement, USP1 est phosphorylé par Cdk1 *in vitro* et *in vivo* (Cotto-Rios, Jones, & Huang, 2011) et la forme phosphorylée de USP1 est enrichie lors de la mitose. Ce site de

phosphorylation se trouve exactement à l'intérieur du dégron reconnu par APC/C^{Cdh1} (Figure 1.13B). La phosphorylation de USP1 augmente sa stabilité, possiblement par la liaison de UAF1 qui masque le motif de dégradation. En effet, des études antérieures démontrent que la simple liaison de UAF1 à USP1, pleine longueur ou clivé, induit sa stabilisation (Cohn et al., 2007). Le domaine exact de USP1 requis pour l'interaction avec UAF1 reste toutefois sujet de controverse, mais serait localisé entre les aa 235 et 520 (Garcia-Santisteban et al., 2012; Villamil, Liang, et al., 2012).

USP1 peut aussi être inactivé, mais de manière réversible, par l'oxydation de sa cystéine catalytique par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), une modification permettant de réagir rapidement aux stress oxydatifs et d'assurer l'activation des voies de réparation de l'ADN régulées par USP1 (Cotto-Rios et al., 2012). Un autre fait intéressant est la localisation nucléaire de USP1, alors que nos travaux suggèrent que UAF1 est principalement localisé dans le cytoplasme. Cette différence de localisation constitue peut-être un moyen de réguler l'activité de USP1 par le contrôle de la translocation nucléaire de UAF1. En accord avec cette hypothèse, USP1 encode deux NLS capables *in vivo* d'induire la relocalisation nucléaire de UAF1 (Garcia-Santisteban et al., 2012).

1.6.5 USP12 et USP46

USP12 et USP46 sont également des DUB interagissant avec UAF1 et dont l'activité catalytique est induite par cette interaction. Il est à noter que la protéine WDR20 a aussi été identifiée comme un autre partenaire de UAF1-USP12 et UAF1-USP46. Comme pour UAF1, l'interaction avec WDR20 augmente l'activité catalytique des USP, et ce, de manière additive à l'induction par UAF1 (Kee et al., 2010). Aussi, la liaison de WDR20 est spécifique à USP12 et USP46, puisqu'aucune association n'est détectée avec USP1. Le gène encodant USP12 fut originellement cloné en 1998, et initialement connu sous le nom UBH1 (*ubiquitin hydrolyzing enzyme 1*) (Hansen-Hagge et al., 1998). USP46 est une DUB hautement apparentée à USP12, partageant plus de 88% d'identité de séquence. Leur forte homologie laisse présager que ces enzymes peuvent présenter une redondance fonctionnelle. Certains travaux suggèrent que ces DUB partagent effectivement des substrats communs, mais tel que présenté ci-bas, ces enzymes semblent également posséder une certaine spécificité pour des substrats

distincts. USP12 et USP46 ont aussi des orthologues chez *S. cerevisiae* connues sous les noms respectifs de Ubp9 et Ubp13.

Peu d'information existe à ce jour quant à la fonction de ces DUB. Des souris possédant un polymorphisme pour USP46, menant à la délétion de la lysine 92, montrent de nombreuses altérations comportementales apparentées à la dépression et un défaut de la signalisation par le neurotransmetteur GABA (Tomida et al., 2009). La mutation de K92 occasionne une diminution de l'activité catalytique de USP46 et le phénotype des souris portant cette mutation est similaire aux souris USP46 *-/-*, suggérant que la délétion K92 équivaut à une perte de fonction (Imai et al., 2013; Imai et al., 2012; Zhang et al., 2011). Des études épidémiologiques dans la population japonaise démontrent une légère association entre certains polymorphismes de USP46 et la dépression, mais pas d'association claire avec d'autres pathologies neuropsychiatriques telles la schizophrénie ou les troubles bipolaires (Fukuo et al., 2011; Kushima et al., 2010).

Certains substrats de USP12 et USP46 ont été identifiés dans les dernières années (résumé dans le tableau 1.1). Une étude a proposé que UAF1-USP12 et UAF1-USP46 sont impliqués dans la régulation du niveau de monoubiquitination des histones H2A et H2B, menant à une modulation transcriptionnelle de certains gènes importants lors du développement embryonnaire chez la grenouille et de la gastrulation plus particulièrement (Joo et al., 2011). Plusieurs études ont aussi suggéré que USP12 et USP46 jouent un rôle dans la régulation de la stabilité de plusieurs protéines, soit par l'inhibition de la dégradation lysosomale ou protéasomale.

Certains récepteurs de la membrane plasmique, dont l'endocytose et la dégradation lysosomale sont régulés par l'ubiquitination, sont des substrats de ces USP. Le récepteur du glutamate GLR-1, chez *C. elegans*, est débubiquitiné et stabilisé par USP46 (Kowalski et al., 2011). Lors de la déplétion de USP46, l'abondance de GLR-1 est réduite d'une façon dépendante de l'endocytose par la clathrine et du tri vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Paradoxalement, le récepteur membranaire Notch, aussi connu pour être dégradé par les lysosomes, est régulé négativement par UAF1-USP12 (Moretti et al., 2012). Ainsi, la déplétion de USP12 inhibe la translocation de Notch vers les lysosomes et augmente son expression de surface et son activité. Par contre, l'homologue USP46 n'a aucun effet sur l'abondance de Notch. Ce phénomène

est peut-être occasionné par la modulation d'une autre protéine régulatrice de la stabilité de Notch et qui demeure à être identifiée. L'implication de USP12 et USP46 dans le tri intracellulaire de protéines cargo lors de l'endocytose n'est pas sans rappeler les premières études sur UAF1 ayant démontré sa colocalisation avec des marqueurs des endosomes tardifs et des lysosomes (Park et al., 2002). L'implication de UAF1 lors de l'endocytose est aussi cohérente avec l'observation que l'orthologue Bun107 possède des fonctions endocytiques similaires (Kouranti et al., 2010). Il est vraisemblable que UAF1 et ses USP associés puissent dans certains contextes jouer un rôle dans la voie endocytique, bien que leurs fonctions ne semblent pas limitées à ces compartiments.

USP12 et USP46 inhibent aussi la dégradation protéasomale de certaines protéines. Notamment, USP12 stabilise le récepteur nucléaire des androgènes (AR, *androgen receptor*) et régule ainsi positivement son activité transcriptionnelle (Burska et al., 2013). Cette stabilisation du AR est induite par la présence de UAF1 et de WDR20, deux interactions stimulatrices connues pour USP12. La phosphatase PHLPP1, en plus d'être ciblée par USP1 (voir section 1.6.4), semble aussi être un substrat de USP12 et USP46 (Gangula & Maddika, 2013; Li et al., 2013). Cette stabilisation de PHLPP1 par USP12 et USP46 inhibe la voie PI3K-Akt et réduit la prolifération et la survie cellulaire. La régulation de la stabilité de PHLPP1 par les trois USP normalement associés à UAF1 est intéressante puisqu'une étude protéomique a permis d'inférer que UAF1 et PHLPP1 font partie d'un même complexe (Sowa et al., 2009). L'implication directe de UAF1 dans la modulation de PHLPP1 n'a toutefois pas été investiguée.

Tableau 1.1 **Substrats connus de USP1, USP12 et USP46**

	Substrats	Cofacteurs	Fonction du substrat	Référence
USP1	FANCD2	UAF1	Réparation ADN : Voie FA	(Nijman, Huang, et al., 2005)
	FANCI		Réparation ADN : Voie FA	(Smogorzewska et al., 2007)
	PCNA	UAF1/ELG1	Synthèse translésionnelle	(Huang et al., 2006)
	ID1, 2 et 3	UAF1	Transcription/différenciation	(Williams et al., 2011)
	PHLPP1		Voie PI3K-Akt/Survie/Prolifération	(Zhiqiang et al., 2012)
USP12	H2A/H2B	UAF1	Transcription/embryogenèse	(Joo et al., 2011)
	Notch	UAF1	Prolifération/Survie/Différenciation	(Moretti et al., 2012)
	AR	UAF1/WDR20	Transcription	(Burska et al., 2013)
	PHLPP1	UAF1	Voie PI3K-Akt/Survie/Prolifération	(Gangula & Maddika, 2013)
USP46	H2A/H2B	UAF1	Transcription/embryogenèse	(Joo et al., 2011)
	GLR-1		Signalisation synaptique	(Kowalski et al., 2011)
	PHLPP1		Voie PI3K-Akt/Survie/Prolifération	(Li et al., 2013)

1.7 But du projet de recherche

Les travaux antérieurs de notre laboratoire démontrent que l'hélicase virale E1 interagit *in vivo* avec la protéine cellulaire UAF1. Les substitutions d'aa dans E1 qui interfèrent avec cette interaction ont un effet inhibiteur sur le maintien du génome viral dans des kératinocytes non différenciés. Ces résultats suggèrent que l'interaction E1-UAF1 est importante pour la réplication de l'ADN du VPH.

Le but de ce projet de recherche était d'évaluer directement l'implication de la protéine UAF1 lors de la pathogenèse du VPH, et plus particulièrement lors de la réplication de l'ADN viral. Nous voulions d'abord caractériser le défaut des protéines E1 défectives pour l'interaction avec UAF1 par l'utilisation d'un essai de réplication transitoire et quantitatif de l'ADN du VPH récemment implanté au laboratoire. Ensuite, nous voulions développer un inhibiteur peptidique de l'interaction E1-UAF1 et vérifier son effet antagoniste sur la réplication de l'ADN viral. Ainsi, notre objectif était d'étudier l'importance du recrutement de UAF1 dans le contexte de protéines virales sauvages, évitant tout effet indirect de l'introduction de mutations dans E1. Pour confirmer la vraisemblance d'une implication de UAF1 lors de la synthèse de l'ADN viral, nous avons aussi pour objectif d'évaluer la localisation cellulaire de UAF1 dans un contexte de réplication et son association potentielle avec le réplisome viral et l'origine de réplication (voir section 2).

Ensuite, puisque la fonction de UAF1 est présumée dépendre de ses partenaires d'interaction et que notre compréhension de l'interactome dans le contexte de l'infection est fragmentaire, nous voulions investiguer l'architecture du complexe associé à E1-UAF1 dans des cellules du col utérin. Ces études ayant mené à la découverte des déubiquitinasés USP1, USP12 et USP46 comme partenaires d'interaction de E1-UAF1, nous voulions vérifier si ces enzymes s'associaient au réplisome viral et si leur activité catalytique était importante pour la réplication de l'ADN (voir section 3). Finalement, comme nous avons découvert que la phosphatase PHLPP1 lie UAF1 via un domaine de liaison homologue à E1, nous voulions tester si ce peptide était fonctionnellement équivalent au N40. Notre but était d'évaluer si l'expression ectopique de ce peptide dérivé de PHLPP1 interférerait avec la réplication de l'ADN viral. Nous voulions aussi vérifier si ce peptide agirait comme un mimétique fonctionnel du N40 et pourrait

restaurer l'activité de réplication d'une protéine E1 défective pour l'interaction avec UAF1 (voir section 3). L'objectif était donc de faire la preuve de concept que le domaine N-terminal de E1 (N40) a pour fonction première le recrutement à l'origine virale du complexe UAF1-USP et de déterminer si l'activité déubiquitineuse est importante pour la réplication de l'ADN du VPH.

2 Inhibition de la réplication du virus du papillome humain par un peptide dérivé de E1 et interagissant avec UAF1

Inhibition of Human Papillomavirus Replication by an E1-Derived p80/UAF1-Binding Peptide

Michaël Lehoux, Amélie Fradet-Turcotte, Mathieu Lussier-Price, James G. Omichinski et Jacques Archambault

Cet article a été publié en 2012 dans *Journal of Virology*, 86(7):3486-500

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. Tous droits réservés.

2.1 Mise en contexte de l'article

Notre laboratoire a antérieurement découvert que l'hélicase E1 interagit avec la protéine cellulaire p80/UAF1 (Cote-Martin et al., 2008). L'interaction E1-UAF1 mène à la relocalisation de UAF1 du cytoplasme au noyau. Des substitutions d'aa en alanines qui réduisent l'interaction avec UAF1 ont été introduites dans E1. Ces mutations affectent la capacité du génome viral à être maintenu dans des kératinocytes primaires et réduisent la réplication transitoire de l'ADN. L'implication directe de UAF1 dans le défaut de ces mutants n'a pas été clairement démontrée, pas plus que la localisation de UAF1 dans le contexte de la réplication virale. Le but de cette étude était d'investiguer si l'interaction E1-UAF1 *per se* est importante pour la réplication du génome du VPH et si UAF1 s'associe au réplisome viral. L'objectif était de faire la preuve de concept que l'interaction E1-UAF1 constitue une cible thérapeutique antivirale intéressante.

UAF1 est présenté sous le nom de p80 dans cet article, mais notons que la nomenclature a depuis évolué et UAF1 est maintenant plus généralement accepté.

2.2 Contribution des auteurs

À l'exception de la Figure 2.10D, j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans ce manuscrit. J'ai également purifié les peptides utilisés dans l'expérience de résonance magnétique nucléaire et effectué par Mathieu Lussier-Price (Fig. 2.10D). J'ai aussi écrit l'article, en étroite collaboration avec le Dr Archambault.

Dr Amélie Fradet-Turcotte était étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr Archambault lors de la publication de ce manuscrit. Elle a apporté des commentaires constructifs pour la rédaction de l'article, a réalisé plusieurs clonages et contribué au développement des techniques suivantes utilisées dans cette étude : essai de réplication transitoire de l'ADN du VPH et analyse de la distribution du cycle cellulaire par cytométrie de flux sur des cellules vivantes.

Mathieu Lussier-Price était étudiant au doctorat sous la supervision du Dr Omichinski lors de la publication de cet article. Il a effectué l'acquisition et l'analyse de l'expérience de résonance magnétique nucléaire sur les peptides N40 et N83 (Fig. 2.10D).

Dr James G. Omichinski a apporté des commentaires constructifs pour la rédaction de l'article et supervisé l'expérience effectuée par Mathieu Lussier-Price.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet et écrit l'article avec moi.

2.3 Texte de l'article

2.3.1 Abstract

The papillomavirus E1 helicase is recruited by E2 to the viral origin where it assembles into a double hexamer that orchestrates replication of the viral genome. We previously identified the cellular WD40 repeat-containing protein p80/UAF1 as a novel interaction partner of E1 from anogenital HPV types. p80 was found to interact with the first 40 residues of HPV31 E1 and amino acid substitutions within this domain abrogated the maintenance of the viral episome in keratinocytes. In this study, we report that these p80-binding substitutions reduce by 70% the ability of E1 to support transient viral DNA replication, without affecting its interaction with E2 and assembly at the origin *in vivo*. Microscopy studies revealed that p80 is relocalized from the cytoplasm to discrete subnuclear foci by E1 and E2. Chromatin immunoprecipitation assays further revealed that p80 is recruited to the viral origin in an E1- and E2-dependent manner. Interestingly, overexpression of a 40 amino acid long p80-binding peptide, derived from HPV31 E1, was found to inhibit viral DNA replication by preventing the recruitment of endogenous p80 to the origin. Mutant peptides defective for p80-interaction were not inhibitory demonstrating the specificity of this effect. Characterization of this E1 peptide by NMR showed that it is intrinsically disordered in solution while mapping studies indicated that the WD repeats of p80 are required for E1 interaction. These results provide additional evidence for the requirement of p80 in anogenital HPV DNA replication and highlight the potential of the E1-p80 interaction as a novel antiviral target.

2.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small double-stranded DNA viruses that replicate and cause hyperproliferative lesions within stratified epithelia (reviewed in (26, 34). Among the 100 described HPV genotypes, more than 30 infect the anogenital mucosa (3, 14). These mucosal types are classified as low- or high-risk viruses according to their capacity to cause benign or cancerous lesions, respectively. High-risk HPVs are the etiological agent of cervical cancer, the second leading cause of cancer in

women worldwide (47). These viral types have also been linked with other malignancies of the genital tract and with the majority of anal cancers, both in men and women (2, 13, 24, 48). Specific high-risk types, and in particular HPV16, are also increasingly being associated with a subset of head-and-neck cancers (32).

HPVs infect keratinocytes of the basal cell layer. Upon infection, the viral genome is established as a multi-copy episome in the nucleus of these cells through several rounds of viral DNA replication. Maintenance of the viral episome at 50-100 copies in these undifferentiated cells is then achieved through low levels of DNA replication and is essential for the persistence of the infection, itself a risk-factor for viral-induced carcinogenesis. As the infected cells differentiate and reach the upper layers of the epithelium, the virus switches from the maintenance to the productive phase of its life cycle, characterized by the amplification of the viral episome to greater than 1000 copies per cell and the expression of the late genes encoding the capsid proteins (reviewed in (26)). HPV DNA replication, which is required for establishment and maintenance of the viral episome in undifferentiated cells, as well as for its amplification in response to differentiation, is achieved by the viral E1 and E2 proteins in concert with the host DNA replication machinery. E1, the viral helicase, is recruited by E2 to the viral origin (*ori*) where it assembles into a double-hexameric complex capable of unwinding DNA ahead of the bi-directional replication fork (1, 22, 23, 39, 51, 53, 54, 64). E1 also recruits several cellular DNA replication factors required for viral DNA synthesis, such as the single-stranded DNA binding protein RPA, topoisomerase I and the polymerase α -primase complex (8, 11, 25, 35, 36, 46).

E1 can be subdivided into three functional regions: a C-terminal helicase/ATPase domain, a central origin-binding domain (OBD) that mediates interaction with specific sequences within the *ori*, and an N-terminal regulatory region. The latter encodes several functional elements, such as a nuclear localization sequence (NLS), a nuclear export sequence (NES), a cyclin-binding motif and Cdk2 phosphorylation sites. Altogether, these sequences mediate the nucleo-cytoplasmic shuttling of E1 and its nuclear accumulation during S-phase, when viral DNA replication occurs (15, 19). We previously reported that the N-terminal regulatory region of E1 from anogenital HPV types also interacts with the cellular protein p80 (12), alternatively known as UAF1 or

WDR48. Deletion analysis revealed that amino acids 10 to 40 of E1, a region which is well conserved amongst low- and high-risk HPV genotypes, constitutes the minimal p80-binding domain (Fig. 2.1A). Three independent double amino acids substitutions to alanine within this domain of E1 were identified (highlighted in black; Fig. 2.1A) that prevent p80-binding. These substitutions were found to abrogate the maintenance of the viral genome in immortalized keratinocytes and to reduce transient HPV DNA replication (12, 20). These substitutions appeared to specifically prevent the interaction of E1 with p80 as they neither affected the ability of E1 to bind to DNA or to Cdk2 *in vitro* nor its nuclear accumulation *in vivo*, in transfected cells. Collectively, these findings suggested that p80 is essential for the maintenance of the HPV episome in keratinocytes.

Although p80 was first identified as an interaction partner of the Tip protein from Herpes saimiri virus (6, 7, 44, 45), several recent studies have begun to address its role in uninfected cells. Various cellular proteins that bind p80 have been described, including the deubiquitinating enzymes USP1, USP12 and USP46 (9, 10). Interestingly, p80 was found to enhance the deubiquitinating activity of these enzymes, although the exact substrates of the different p80-USP complexes are only beginning to be unraveled. Amongst those that may be relevant to HPV DNA replication are monoubiquitinated FANCD2 and PCNA, which are deubiquitinated by USP1 as a means of downregulating, respectively, the Fanconi Anemia (FA) DNA repair pathway (30, 43) and DNA translesion synthesis, a DNA-damage tolerance process (27). As for USP12 and 46, they were recently shown to associate with p80 to deubiquitinate monoubiquitinated histones H2A and H2B, perhaps as a way to modulate chromatin structure during transcription (21, 29). Structure-function studies have indicated that p80 interacts with USP1, 12 and 46 through its N-terminal WD40 repeats, predicted to fold as a β -propeller. More recently, the C-terminal domain of p80 was found to contain a ubiquitin-like motif, either a UBX domain (50) or a SUMO-like domain (SLD), that may be involved in targeting specific p80-USP complexes to their appropriate substrates (66).

Despite the studies presented above, our understanding of the function of p80 in normal cell physiology and in HPV episomal maintenance remains limited. This prompted us to characterize in greater details the role of p80 in HPV DNA replication

with an emphasis on determining the potential of the E1-p80 interaction as a therapeutic target. In this study, we report that the DNA replication defect of E1 mutant proteins deficient for p80-binding is unrelated to their capacity to interact with E2 and to assemble into the E1-E2-ori pre-initiation complex *in vivo*. We also demonstrate that in the presence of E1 and E2, p80 is relocalized into nuclear foci and recruited to the viral origin prior to the initiation of DNA synthesis. Importantly, we determined that overexpression of an E1-derived peptide (N40), encompassing the p80-binding motif of HPV31 E1, prevents the recruitment of p80 to the viral genome and, accordingly, inhibits transient HPV DNA replication. NMR and biochemical studies showed that this peptide is intrinsically disordered in solution and likely binds to the WD-repeat region of p80. Collectively, these results provide further evidence that p80 is essential for efficient HPV DNA replication, at a step following assembly of the E1-E2-ori complex. Furthermore, they suggest that the E1-p80 interaction may be a valid therapeutic target, as highlighted by the inhibitory effect of the E1 N40 peptide on HPV DNA replication.

2.3.3 Materials and Methods

Plasmid construction and mutagenesis. The plasmids encoding GFP-E1 and YFP-E1 were previously described (18). The plasmid used to express p80 fused at its N-terminus to a triple-Flag epitope (3F) was constructed by inserting the PCR-amplified p80 ORF between the EcoRV and XhoI sites of pCMV-3Tag-1a (Stratagene). Plasmids expressing codon-optimized 3F-E1 (p31E1) and 3F-E2 (p31E2) were described previously (20). The plasmid used to express untagged E1 was constructed by excising the 3xFlag coding region from pCMV-3Tag-1a by NotI/BamHI digestion and replacing it with the codon optimized E1 ORF. The plasmids expressing the red fluorescent protein (RFP) and RFP-p80 have been described previously (12). The RFP-E2 expression plasmid was constructed by PCR-amplification of the codon-optimized E2 ORF and ligation between the NotI and XbaI sites of the RFP vector. The N40-YFP expression plasmids were obtained by inserting the amplified p80-binding domain coding region of E1 (amino acids 1-40) between the BamHI and AgeI sites of pVenus-N1 (42), upstream of the Venus variant of the yellow fluorescent protein (YFP) coding region. Plasmids to express the N40 and N83 peptides fused to glutathione S-transferase (GST) were constructed by inserting the E1 peptide coding regions (amino acids 1-40

and 1-83, respectively) between the EcoRI and Sall restriction of pGEX-4T-1 (GE Healthcare). 3F-p80 truncations were generated by cloning PCR-amplified p80 fragments between the EcoRV and XhoI sites of pCMV-3Tag-1a for *in vivo* expression, or between the NcoI and XhoI sites of pTM1 (61) for *in vitro* translation. E1 mutants were generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Sequences of primers and additional details on the construction of these plasmids will be made available upon request.

Antibodies and Western blotting. 3xFlag-tagged proteins and β -tubulin were detected using mouse monoclonal antibodies from Sigma-Aldrich (M2-Flag antibody catalog no. F1804 and β -tubulin antibody catalog no. T4026). The mixture of two mouse monoclonal antibodies against GFP was purchased from Roche (catalog no. 11814460001) and the mouse monoclonal antibody against RFP was from Abcam (catalog no. AB65856). The HA antibody was purchased from Covance (HA.11 catalog no. MMS-101P). Rabbit polyclonal antibodies against p80 or E1 were raised, respectively, by injecting rabbits (Open Biosystems) with a purified C-terminal fragment of p80 (amino acids 400-677) or an E1 fragment (amino acids 50-332) produced in bacteria as a GST-6xHis fusion protein. Protein purification and cleavage of the GST moiety were performed as previously described (12). For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and were detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from GE Healthcare, either sheep anti-mouse IgG (catalog no. NA931) or donkey anti-rabbit IgG (NA934V), and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Cell culture and transfections. The human cervical carcinoma cell line C33A was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml of penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. For the selection and the growth of stably transfected cell lines (YFP constructs), the culture medium was supplemented with 15 μ g/ml bleomycin (Bleocin; EMD Millipore catalog no. 203408). Transfections of C33A were performed using the lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Luciferase HPV DNA replication assay. The HPV DNA replication assay was performed as previously described (20). Briefly, C33A cells were plated at a density of 25,000 cells/well in white flat-bottom 96-well plates and were transfected 24 h later with a mix of four plasmids: an origin-containing plasmid with a firefly luciferase reporter *in cis* (pFLORI31), a Renilla luciferase plasmid as an internal control (pRL) and the indicated quantities of codon optimized HPV31 E1 (p31E1) and HPV31 E2 (p31E2) expression vectors. For all experiments, the total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 100 ng (or to 150 ng when N40-YFP was added) with the pCMV-3Tag-1a vector as carrier DNA. Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) 72 h post-transfection. When mentioned in the text, two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine if differences in the replication signal are significant.

Co-immunoprecipitation assays. C33A cells were grown on 100-mm plates and transfected with the indicated DNA. Cells were harvested 48 h post-transfection in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and the following protease inhibitors: 10 µg/ml antipain, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Cleared cellular extracts were then immunoprecipitated for 3 h with 40 µl protein G-sepharose (GE Healthcare), conjugated to 1 µg of anti-Flag or anti-GFP antibodies. The resin was washed 3 times with TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) and the bound proteins were analyzed by Western blotting.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). The ChIP protocol was modified from a previously published procedure (65). C33A cells were plated at a density of 3.6×10^6 cells on 100 mm diameter plates and were transfected 24 h later with the following plasmids: 0.5 µg pFLORI31, 0.1 µg pRL, 1 µg p31E1 and 2 µg RFP-E2. In N40 inhibition studies, 4.2 µg of the plasmid N40-YFP was added. In all experiments, the total quantity of DNA was adjusted to 12 µg with pUC18 DNA as carrier. 24 h post-transfection, cells were cross-linked with 1% formaldehyde, lysed in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, and containing protease inhibitors) and sonicated to shear the DNA. The lysate was diluted 10-fold in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris pH 8.1, 167 mM NaCl,

and containing protease inhibitors) and precleared using protein G-sepharose (GE Healthcare catalog no. 16-0618), pre-blocked with 5 mg/ml BSA and 0.5 mg/ml salmon sperm DNA. The lysates (1 million cells per IP) were then incubated overnight with the indicated antibodies and protein G-sepharose was added and mixed for 3 h to capture the complexes. The resin was then successively washed with the following buffers: Low salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl), High salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl), LiCl buffer (250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% Deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8) and twice with TE buffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). The immunoprecipitate was recovered by two successive elutions in elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) at 65°C, treated with RNase A and the cross-links reversed by overnight incubation in 0.2 M NaCl at 65°C. The eluates were treated with proteinase K for 1 h at 45°C and DNA was purified using QIAGEN spin columns. The eluates and corresponding input DNA were then analyzed by qPCR.

Quantitative real-time PCR. Quantification of DNA samples was done using TaqMan probes and the “PerfeCTa™ PCR SuperMix, UNG, Low ROX” kit (Quanta Biosciences) on a ViiTM 7 real-time PCR system (Applied Biosystems). The primers (Invitrogen) were designed to amplify a fragment overlapping the HPV31 origin within the pFLORI31 plasmid or a portion of the Renilla luciferase gene present in the pRL internal control vector. The TaqMan probes were synthesized by Eurogentec and are labeled with FAM and TAMRA at their 5' and 3' ends, respectively. Real-time qPCR was performed using 900 nM of primers and 125 nM of probe. Quantification was performed using a 7-point standard curve of pFLORI31 or pRL plasmid ranging from 10⁴ to 10⁻² pg (10-fold serial dilutions) using the following PCR amplification conditions: 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, for 40 cycles. The normalized enrichment levels of the ori-plasmid are reported in pg of origin detected in the immunoprecipitate per pg of pRL vector found in the corresponding input DNA. The primers for the ori are 5'-CGAAAACGGTTGGTATATAAAGCA-3' and 5'-GGGAGCCCCCGATTAGAG-3', and the primers for RLuc are 5'-GCTACGAGCACCAGGACAAGA-3' and 5'-TCGTCCAGCTCTCGATCAC-3'. The sequences of the TaqMan probes are 5'-AACCTACGCCGGCTTTCCCCG-3' for the ori and 5'-AAGGCCATCGTGCACGCCGA-3' for RLuc.

Confocal fluorescence microscopy. C33A cells were plated at a density of 6×10^5 cells/well on cover-slips and were transfected 24 h later with the indicated plasmids. 24 h post-transfection, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and their DNA was stained with 1 $\mu\text{g/ml}$ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen catalog no. D1306). Slides were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were collected with a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope and analyzed using the Zen 2009 LE software.

Flow cytometry analysis. (i) Cell cycle analysis. Cell cycle profiles were obtained by staining live cells 48 h post-transfection with 6.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoescht and 50 μM verapamil. (ii) BrdU incorporation. 48 h post-transfection, cells were pulsed for 1 h with 10 μM BrdU and were then fixed and stained using the APC BrdU Flow kit (BD Pharmingen catalog no. 522598). BrdU was detected using allophycocyanin (APC)-conjugated anti-BrdU antibodies and DNA was stained with 7-amino-actinomycin D (7-AAD). The percentage of cells incorporating BrdU was determined using the FlowJo software program (v.8.1). All the flow cytometry acquisitions were done using a BD LSR flow cytometer, gated on the YFP-positive population. When indicated, aphidicolin (1.7 $\mu\text{g/ml}$) was added to the transfected cells for 2 h before the addition of BrdU.

Colony formation assay. C33A cells ($\sim 1.2 \times 10^6$) were transfected with 1.5 μg of the indicated plasmids in a 6 well plate. 24 h post-transfection, cells were trypsinized and 2/5th of the cells were plated onto 100 mm plates in fresh medium. 24 h later, bleomycin-containing media was added and was changed every 3-4 days for a period of about 3 weeks or until fully-resistant cells were selected. Colonies were then fixed in cold methanol for 10 min and stained for 2 min at room temperature with methylene blue (1% w/v in 60% Methanol/H₂O).

NMR spectroscopy. Peptides comprising amino acids 1-40 (N40) or 1-83 (N83) of HPV31 E1, containing the C14A and C14A/C54S substitutions, respectively, were produced as ¹⁵N-labeled GST-fusion proteins in Escherichia coli BL21(DE3) (Novagen) as previously described (16). The GST moiety was cleaved with thrombin and the peptides were purified to homogeneity using anion exchange FPLC (Q-Sepharose). The peptides were lyophilized and resuspended at 400 μM in 20 mM phosphate buffer

pH 6.5 containing 90% H₂O and 10% D₂O. NMR spectra were collected at 300 K on a Varian Unity Inova 600-MHz NMR spectrometer equipped with a z pulsed-field gradient unit and a triple resonance probe.

GST pull-down assays. GST fusion proteins were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) as previously described (55). 3F-p80 truncations were expressed using the TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega catalog no. L1170) with unlabelled methionine. Purified GST and GST-E1 were immobilized on glutathione beads (GE Healthcare) at a concentration of 4 mg/ml. GST pull-down assays were performed as described elsewhere (61), but with a modified buffer A (10 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT and 10% glycerol) and binding buffer (10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT and 10% glycerol). Bound proteins were eluted with binding buffer containing 20 mM reduced glutathione and analyzed by Western blotting.

2.3.4 Results

2.3.4.1 The p80-binding domain of E1 is required for efficient viral DNA replication

We previously reported three double amino acid substitutions in the p80-binding domain of HPV31 E1 (W17A/F18A, V20A/E21A and V23A/I24A; Fig. 2.1A) that abrogate its interaction with p80 and its ability to maintain the viral episome in immortalized keratinocytes (12). These three substitutions were also found to reduce transient HPV31 DNA replication, with little to no effect on the ability of E1 to bind to DNA *in vitro* and to localize to the nucleus and interact with Cdk2 *in vivo*, indicating that they do not grossly alter the structure of E1 (12, 20). Here, we used our recently described luciferase-based DNA replication assay to further characterize and quantify the DNA replication defect imposed by the WF, VE and VI substitutions. First, we investigated if this defect could be rescued by overexpression of the mutant E1 proteins, as could be expected if the p80-binding substitutions reduce the expression and/or stability of E1, for example. To do so, increasing amounts of expression vector for WT or the p80-binding defective E1, tagged with a triple Flag-epitope (3F-E1), were transfected into C33A cells along with a constant amount of E2 expression vector and of

a third plasmid encoding the origin *in cis* of a firefly luciferase-reporter gene. A fourth plasmid encoding Renilla luciferase was used as an internal control to normalize for differences in transfection efficiency and cell viability. As expected, the DNA replication signal obtained with wild type (WT) E1 increased in a dose-dependent manner, eventually reaching a maximum (Fig. 2.1B). The three E1 mutant proteins also supported DNA replication in a dose-dependent manner but their maximum levels were consistently lower than that achieved with WT E1. While WF E1 reached a maximum at approximately 25-35% of WT, overexpression of the VE and VI mutant proteins led to higher values (~50-60% of WT levels). These results indicate that the replication defect of WF E1 is more pronounced than that observed with of the other two mutant proteins. These findings are in complete agreement with results from co-immunoprecipitation experiments indicating that the VE and VI E1 proteins retain weak residual p80-binding activity while WF E1 is completely defective (data not shown).

duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments. C) Anti-Flag Western blot showing the expression of the different E1 proteins. β -tubulin was used as a loading control.

In addition to these three amino acid substitutions, we previously reported three N-terminal deletions that partially or completely remove the p80-binding domain of E1 (C20, C30 and C40; Fig. 2.1A) and reduce its capacity to support viral DNA replication (41). Similarly to what was done above, we tested if overexpression of these truncated E1 could rescue their DNA replication defect but found that none could reach a plateau superior than 30% of WT levels (Fig. 2.1B). These defects are similar to that observed with WF E1. Western blotting was used to confirm that all E1 proteins tested were expressed at comparable levels and thus that the lower DNA replication activities of the p80-binding defective E1 mutant proteins are not due to lower expression (Fig. 2.1C). Collectively, these results indicate that mutation or deletion of the p80-binding domain of E1 reduces transient DNA replication by more than 70% and cannot be compensated for by overexpression of the protein. As such, they provide further evidence that the p80-binding domain of E1 is required for efficient viral DNA replication.

2.3.4.2 The p80-binding domain of E1 is dispensable for the assembly of the E1-E2-ori complex

HPV DNA replication is initiated by the cooperative binding of E1 and E2 to the viral origin (ori). Assembly of the E1-E2-ori complex requires the DNA-binding activities of E1 and E2 as well as a critical protein-protein interaction between both proteins. To test if the DNA replication defects of the p80-binding defective E1 were due to impaired association with E2, these mutant proteins were tested for E2-binding in co-immunoprecipitation assays. C33A cells were co-transfected with an expression plasmid for RFP-E2 together with a vector encoding for 3F-E1, either the WT, WF mutant or C40 truncated protein. For later studies, a mutant E1 protein devoid of ATPase activity (K463A) was also included. Results presented in Fig. 2.2A show that all three mutant proteins are as competent as WT E1 for binding to E2. Thus, the p80-binding domain of E1 is not required for interaction with E2.

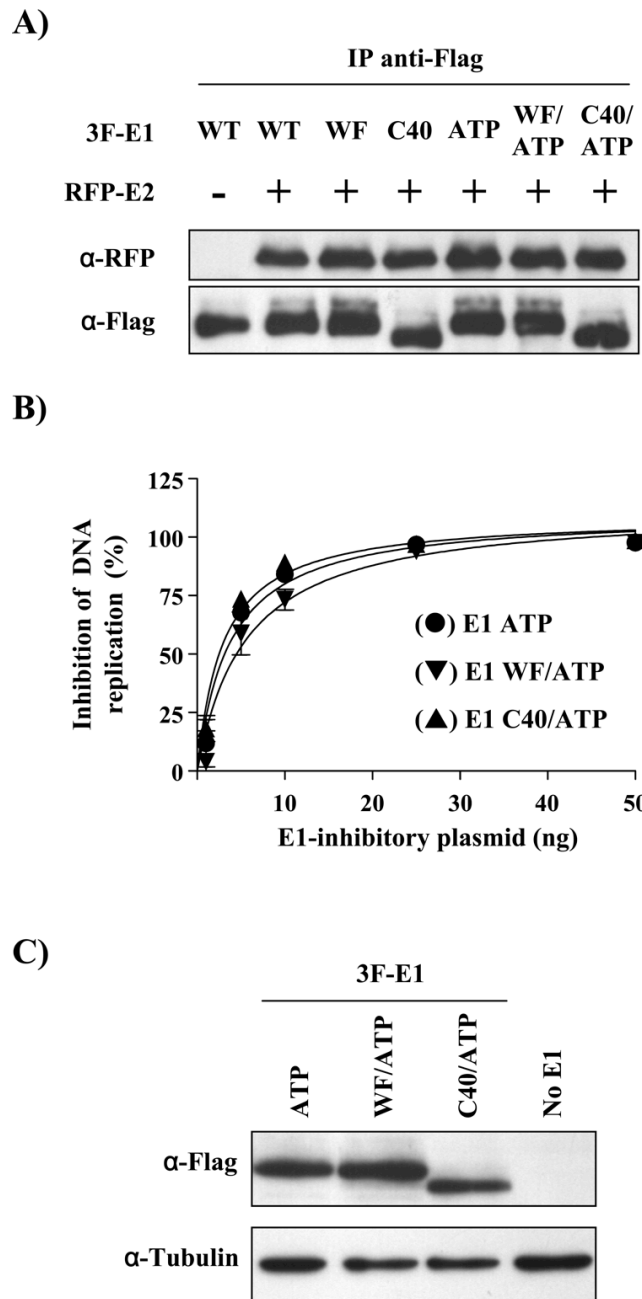


Figure 2.2 The p80-binding domain of E1 is dispensable for the assembly of the E1-E2-ori complex

A) Interaction of HPV31 E1 and E2 *in vivo*. 3F-tagged E1 WT, ATPase mutant K463A (ATP), or p80-binding mutants (WF and C40), alone or in combination, were co-transfected in C33A with RFP-tagged E2. Cells were harvested 48 h post-transfection and whole cell extracts submitted to immunoprecipitation using an anti-Flag antibody. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting using anti-RFP and anti-Flag antibodies. B) Inhibition of HPV DNA replication by the ATPase-negative K463A E1 and derivatives containing the WF or C40 mutations. DNA replication was performed using 5 ng of WT E1 expression plasmid and the indicated amounts of E1-inhibitory plasmid. The error

bars represent the standard deviation of duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments. C) Western blot showing the expression of mutant E1 proteins. β -tubulin was used as a loading control.

Next, we sought to determine if the p80-binding domain was needed for assembly of the E1-E2-ori complex *in vivo*. To do so, we made use of the previous observation that the ATPase-negative K463A E1 has a dominant-negative effect on HPV DNA replication (41). This mutant protein retains the ability to interact with E2, as shown by co-immunoprecipitation (Fig. 2.2A). As such, K463A E1 can compete with WT E1 for assembly into the E1-E2-ori complex; this competition is very efficient as K463A E1 inhibits DNA replication by 50% when expressed in a 1:1 ratio relative to WT E1. Based on these findings, we rationalized that if the WF substitution and C40 truncation affect the formation of the E1-E2-ori complex, they should attenuate the dominant-negative effect of K463A E1. This possibility was addressed by transfecting cells with plasmids encoding WT E1, E2 and the origin (the plasmid mix normally used in the HPV DNA replication) assay together with increasing concentrations of expression vector for K463A E1 or for the same mutant E1 in combination with the p80-binding mutations WF and C40. The double-mutant proteins WF/K463A and C40/K463A were found to inhibit viral DNA replication as efficiently as K463A E1 (50% inhibition at a 1:1 ratio relative to WT E1, Fig. 2.2B). All three mutant E1 proteins were expressed at comparable levels as determined by Western blotting (Fig. 2.2C). These results provide evidence that the p80-binding domain of E1 is not required for its assembly with E2 at the origin *in vivo*.

2.3.4.3 The p80-binding domain is not required for the stable assembly of E1 at the viral origin

To monitor directly the binding of WT and mutant E1 proteins to the viral origin of replication *in vivo*, we developed a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using cells transiently expressing E1 and E2 and containing a plasmid encoding the origin, under similar conditions as those used in the DNA replication assay. E1 was immunoprecipitated using an anti-Flag antibody and the amount of co-precipitated origin plasmid was measured by quantitative real-time PCR (qPCR). As shown in

Fig. 2.3A, immunoprecipitation of 3F-E1 with the anti-Flag antibody led to a significant enrichment of the ori-plasmid, which was not detected when an isotype-matched irrelevant antibody (anti-HA) was used as a control. To further confirm the specificity of the immunoprecipitation, the experiment was repeated with an untagged E1 protein (WT (no tag)) and no enrichment of the viral origin was observed. As additional negative controls, we performed the ChIP assay with a mutant E1 protein defective for DNA-binding (KR265/267AA; OBD) and, separately, with WT E1 in absence of E2. In both cases, little to no enrichment of the ori-plasmid was observed, thus confirming that the presence of E1 at the origin requires its DNA-binding activity and interaction with E2. Interestingly, we also observed that the ATPase-negative mutant K463A E1 did not co-precipitate the origin. This result indicates that the ATP-binding site is required for the stable association of E1 with the origin *in vivo*, similarly to what we previously observed *in vitro* (60). The requirement for a functional ATP-binding site raises the possibility that the ori-bound E1 that is immunoprecipitated in our ChIP assay is oligomeric and, by extension, that the binding of monomeric E1 to DNA may be too weak and/or transient to be detected. Interestingly, when using the p80-binding defective mutant WF and C40 E1, enrichment levels similar to those of WT E1 were obtained, suggesting that the p80-binding domain is not required for the assembly of E1 into a stable complex at the origin, *in vivo*. Expression levels of the different E1 proteins were found to be comparable, as shown in Fig. 2.3B.

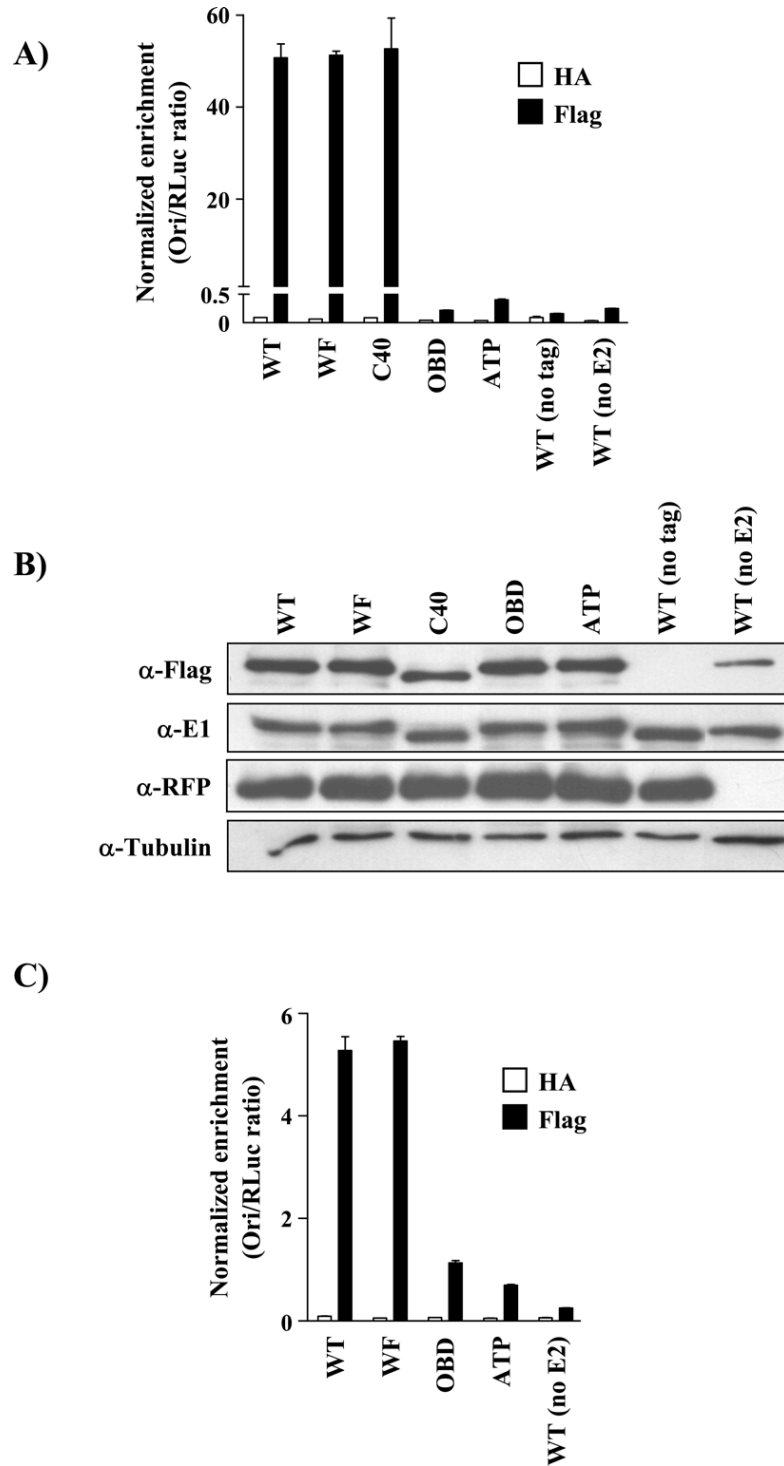


Figure 2.3 The p80-binding domain is not required for the stable assembly of E1 at the viral origin

A) ChIP assays were performed in C33A cells transfected with 3F-E1 (WT or mutant), RFP-E2 and an origin plasmid (pFLORI31). Equal quantities of cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag (E1) or anti-HA (non-specific) antibodies. Results of the ori enrichment levels determined by qPCR

are shown after normalization to input DNA, using the internal control pRL (RLuc). Each value is the average of at least two replicates, with the standard deviation presented as an error bar on the graphs. B) Western blot showing the expression of E1 mutant proteins detected by either the anti-Flag or anti-E1 antibodies, and of RFP-E2 using an anti-RFP antibody. β -tubulin was used as a loading control. C) C33A cells were transfected with plasmids expressing 3F-E1 (WT or mutant) and RFP-E2 and one containing the origin (pFLORI31). The cells were treated with 5 μ g/ml of aphidicolin 4 h post-transfection and ChIP assays were performed on the lysates using anti-Flag and anti-HA antibodies. Results of the ori enrichment levels determined by qPCR are shown after normalization to input DNA using the internal control pRL (RLuc). Each value is the average of at least two replicates, with the standard deviation presented as an error bar on the graphs.

A potential caveat in the aforementioned experiments is the fact that the ori-plasmid can be replicated in cells expressing WT E1 and E2 but not in control cells expressing either the OBD or ATPase mutant E1, or lacking E2. Because replication of the ori-plasmid could potentially contribute to its levels of enrichment in the ChIP experiments, we were cautious to perform these assays 24 h post-transfection, when viral DNA replication is minimal as we previously published (20) and confirmed here by quantification of the total amount of input and replicated DNA (data not shown). However, to definitively rule out an effect of ori-plasmid replication, we repeated the ChIP experiments in cells treated with aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerases α and δ . Aphidicolin treatment reduced by 10-fold the total amount of ori-plasmid extracted from the cells prior to immunoprecipitation, as compared to untreated cells, indicating that it efficiently inhibited ori-plasmid replication (data not shown). Aphidicolin also led to an approximately 10-fold decrease in the levels of ori-plasmid co-precipitated with WT E1 and the WF mutant protein (Fig 3C). Importantly, however, both E1 proteins were bound to the origin to a similar extent and substantially above background levels. Altogether, these results provide further evidence that the p80-binding domain of E1 is not required for the E2-dependent binding of E1 at the origin. From these findings and those presented in the sections above, we surmise that the p80-binding domain of E1 is required for viral DNA replication at a step following assembly of the E1-E2-ori complex and stable binding of E1 to the origin.

2.3.4.4 p80 is relocalized to nuclear foci in an E1- and E2-dependent manner

It is now well established that E1 is relocalized to discrete subnuclear domains when co-expressed with E2 into cells (19, 49, 59). Although the exact function of these nuclear foci remains uncertain, they were previously suggested to be the precursors of DNA replication centers (49, 59). As expected, our GFP-E1 fusion protein also accumulates in nuclear foci, in the presence of E2, where the two viral proteins colocalize (Fig. 2.4A). E1 mutant proteins defective for p80-binding also accumulate in similar foci (data not shown and Fig. 2.4B), suggesting that their DNA replication defect is not due to their mislocalization within the nucleus. Since our previous observations pointed towards a role for the E1-p80 interaction during HPV DNA replication, we investigated if p80 is also present in these nuclear domains. When transiently expressed in C33A cells together with GFP-E1 and 3F-E2, RFP-p80 colocalized with E1 in nuclear foci (Fig. 2.4B). In contrast, RFP-p80 remained cytoplasmic in cells expressing any of the E1 mutants defective for p80-binding. These results indicate that p80 is recruited from the cytoplasm to nuclear foci through its association with E1, consistent with its role in viral DNA replication.

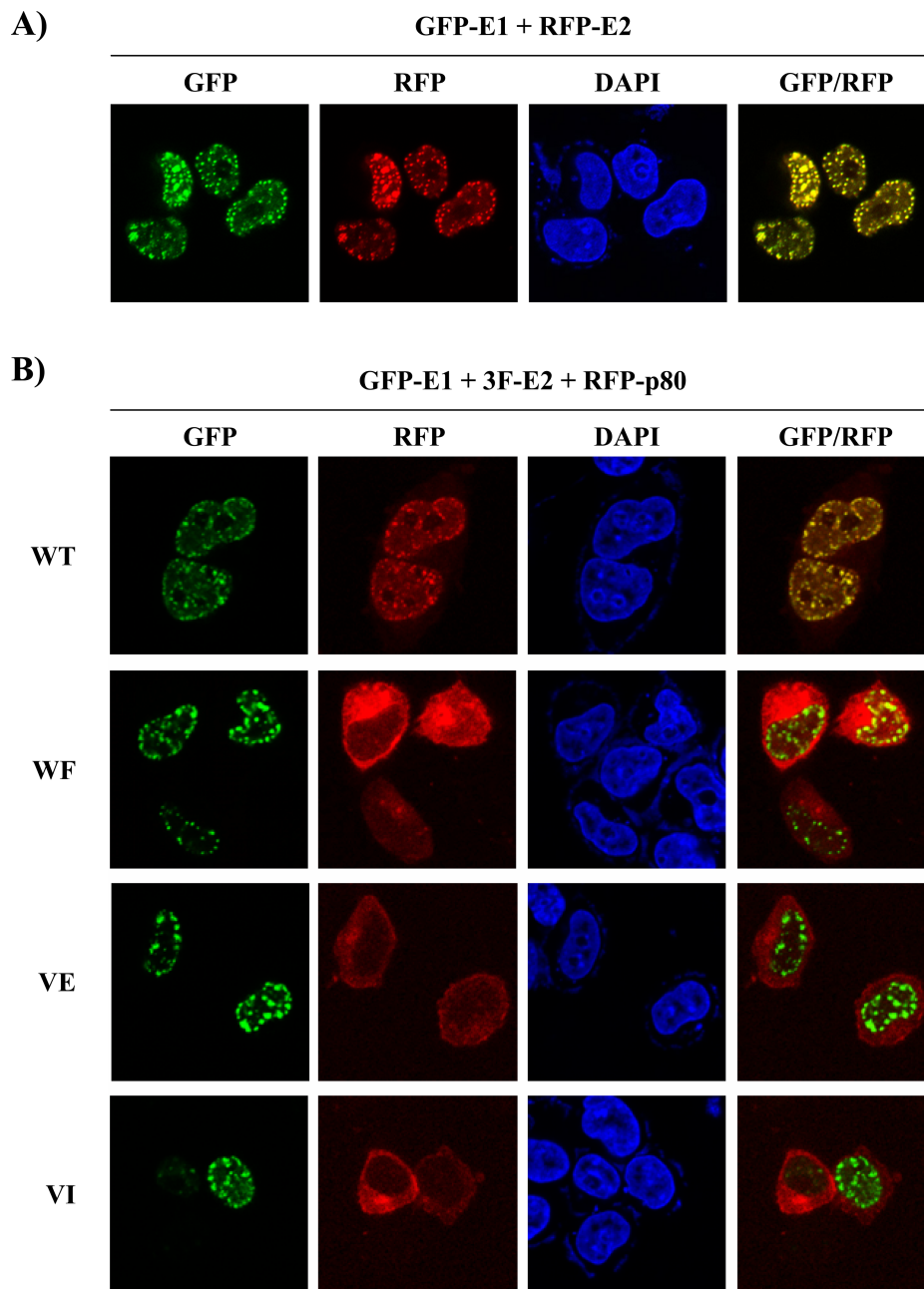


Figure 2.4 p80 is relocalized nuclear foci in an E1- and E2-dependent manner

A) Fluorescence confocal microscopy images showing the subcellular localization of GFP-E1 and RFP-E2. B) Subcellular localization of RFP-p80 when co-expressed with 3F-E2 and WT or p80-binding defective GFP-E1. Nuclei were stained with DAPI.

2.3.4.5 Endogenous p80 interacts with E1 and is recruited to the viral origin *in vivo*

All of our previous studies on p80 were performed with overexpressed and epitope-tagged versions of the protein due to the lack of a good antibody against endogenous p80. This prompted us to develop a rabbit polyclonal antibody against the C-terminal domain of p80 (see Materials and Methods) and to test by co-immunoprecipitation if E1 could interact with endogenous p80. To do so, 3F-E1, either WT or p80-binding mutant derivatives, were transiently expressed in C33A cells and immunoprecipitated 48 h post-transfection. Western blot analysis of the immunoprecipitate showed that WT E1 does interact with endogenous p80, in contrast to the three previously described E1 mutant proteins (WF, VE and VI) which were used as controls (Fig. 2.5A). In addition to confirming the association of E1 with endogenous p80, these results also demonstrate the specificity of the anti-p80 antiserum.

To determine if p80 could be found in association with viral DNA, we next repeated the ChIP experiments using the p80-specific rabbit antiserum or the corresponding non-specific pre-immune serum as a control. As hypothesized, the ori-plasmid was enriched in p80 immunoprecipitates from cells expressing WT E1 and E2 (Fig. 2.5B). This enrichment was specific and dependent upon the interaction of E1 with p80, as it was not observed with the pre-immune serum or when using the E1 WF or C40 mutant proteins. The use of E1 mutant proteins defective for DNA-binding or ATPase activity, as well as conditions without E2, suggested that this enrichment was also dependent on the stable assembly of E1 at the origin. Not surprisingly, pull-down of p80 also led to a significant enrichment of the origin in cells transfected with vectors encoding E2 and untagged E1. We consistently observed throughout these studies that the levels of ori DNA co-precipitated by the anti-p80 antibody were much lower than those obtained by immunoprecipitation of E1, perhaps because the endogenous levels of p80 are limiting compared to those of overexpressed E1. In support of this suggestion, we found that overexpression of p80 (achieved by transfection of a p80-expression plasmid) greatly increased its presence at the origin (Fig. 2.5C). This greater association with the origin was specific as it was not observed when the WF mutant E1 was used.

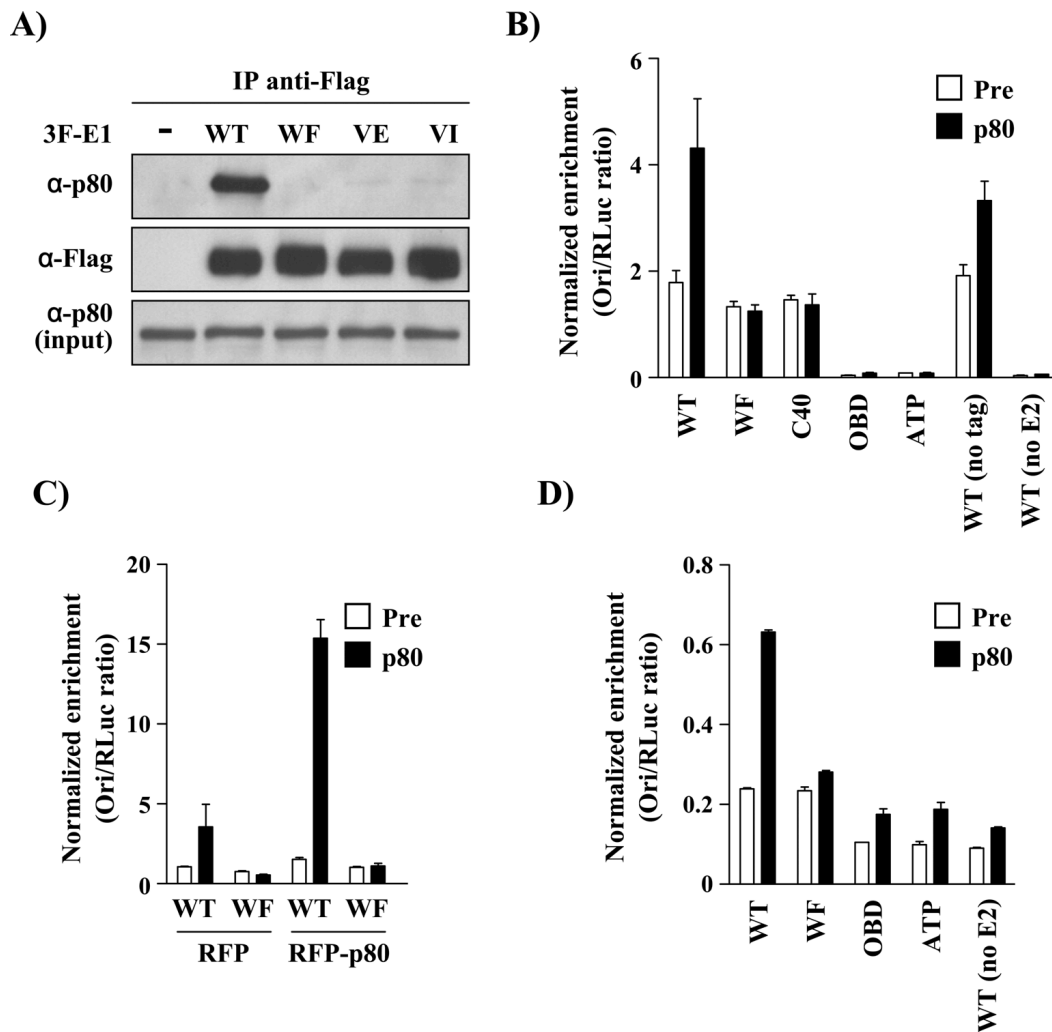


Figure 2.5 Endogenous p80 interacts with E1 and is recruited to the viral origin *in vivo*

A) Co-immunoprecipitation of endogenous p80 with WT or p80-binding defective 3F-E1 (WF, VE and VI). C33A cells were transfected with the indicated E1 expression vectors, harvested 48 h post-transfection and whole cell extracts submitted to immunoprecipitation using an anti-Flag antibody. The immunoprecipitates were analyzed using an anti-Flag antibody or a p80 anti-serum. B) ChIP assays were performed in C33A cells co-transfected with plasmids encoding 3F-E1 (WT or mutant) and RFP-E2 and one containing the origin (pFLORI31). Equal quantities of cell lysates were immunoprecipitated with a rabbit antiserum raised against p80 or the pre-immune serum. C) ChIP assays were repeated with WT and WF E1, in conditions similar to the ones described in (B), but in presence of overexpressed RFP-p80 D) C33A cells were transfected as described in (B) but treated with 5 μ g/ml of aphidicolin 4 h post-transfection. ChIP assays were performed on the lysates using a p80 antiserum or pre-immune serum. For all ChIP experiments, results of the ori enrichment levels determined by qPCR are shown after normalization to input DNA, using the internal control pRL (RLuc). Each value is the average of at least two replicates, with the standard deviation presented as an error bar on the graphs.

To rule out any artefactual bias due to ori-plasmid replication, the ChIP assays were repeated in the presence of aphidicolin. Under this condition, immunoprecipitation of p80 also lead to an enrichment of the ori-plasmid when the latter was co-transfected with WT E1 but not with the WF mutant protein (Fig. 2.5D). These results demonstrate that the recruitment of p80 to the viral origin is specific and does not require viral DNA replication. From these findings, we conclude that endogenous p80 is recruited to the viral origin, by E1 and E2, during the initiation of DNA replication.

2.3.4.6 Inhibition of the E1-p80 interaction by N40, a short peptide spanning the p80-binding domain of HPV31 E1

The results presented above strongly suggest a role for the E1-p80 interaction in HPV DNA replication. To more directly assess the requirement for p80 in viral DNA replication, we sought to downregulate p80 using RNA interference. However, in both cell lines tested, C33A and HeLa, depletion of p80 with short hairpin RNA (shRNA) was found to significantly reduce cellular proliferation and viability as well as cell cycle progression (data not shown). The need for p80 for the growth of non-infected cells is intriguing and is the subject of ongoing experiments, but unfortunately limits the study of its function in viral DNA replication as inhibition of cell cycle progression almost inevitably results in abrogation of viral and host DNA synthesis. Accordingly, we confirmed that shRNA-mediated depletion of p80 reduces HPV DNA replication but this effect is likely indirect (data not shown). To overcome this limitation, we aimed to specifically inhibit the E1-p80 interaction by overexpressing a short E1-derived peptide spanning the p80-binding domain. To do so, we constructed a plasmid encoding the first forty amino acids of E1 fused at their C-terminus to YFP (referred to as N40; Fig. 2.6A). Similar N40 mutant peptides containing the p80-binding substitutions, WF, VE and VI, were also constructed as specificity controls. First, co-immunoprecipitation experiments were used to confirm that the WT N40 peptide is sufficient for interaction with RFP-p80, in contrast to the three mutant peptides (Fig. 2.6B). We repeatedly observed that the VE N40 peptide migrates faster in SDS-PAGE than the WT and other mutant peptides, perhaps because removal of the negatively charged aspartate increases SDS binding on the VE peptide. We then investigated if overexpression of N40 could prevent the

interaction between full-length E1 and p80 *in vivo*. Co-immunoprecipitation experiments showed that the expression of increasing amounts of N40 could efficiently inhibit the binding of full-length 3F-E1 to RFP-p80, in a dose-dependent manner (Fig. 2.6C). In contrast, expression of any of the three N40-mutant peptides, at the highest concentration tested, had no effect on formation of the full-length E1-p80 complex. These results indicate that N40 can efficiently compete with full-length E1 for binding to p80 and, furthermore, that it can be used as a tool to specifically antagonize the E1-p80 interaction *in vivo*.

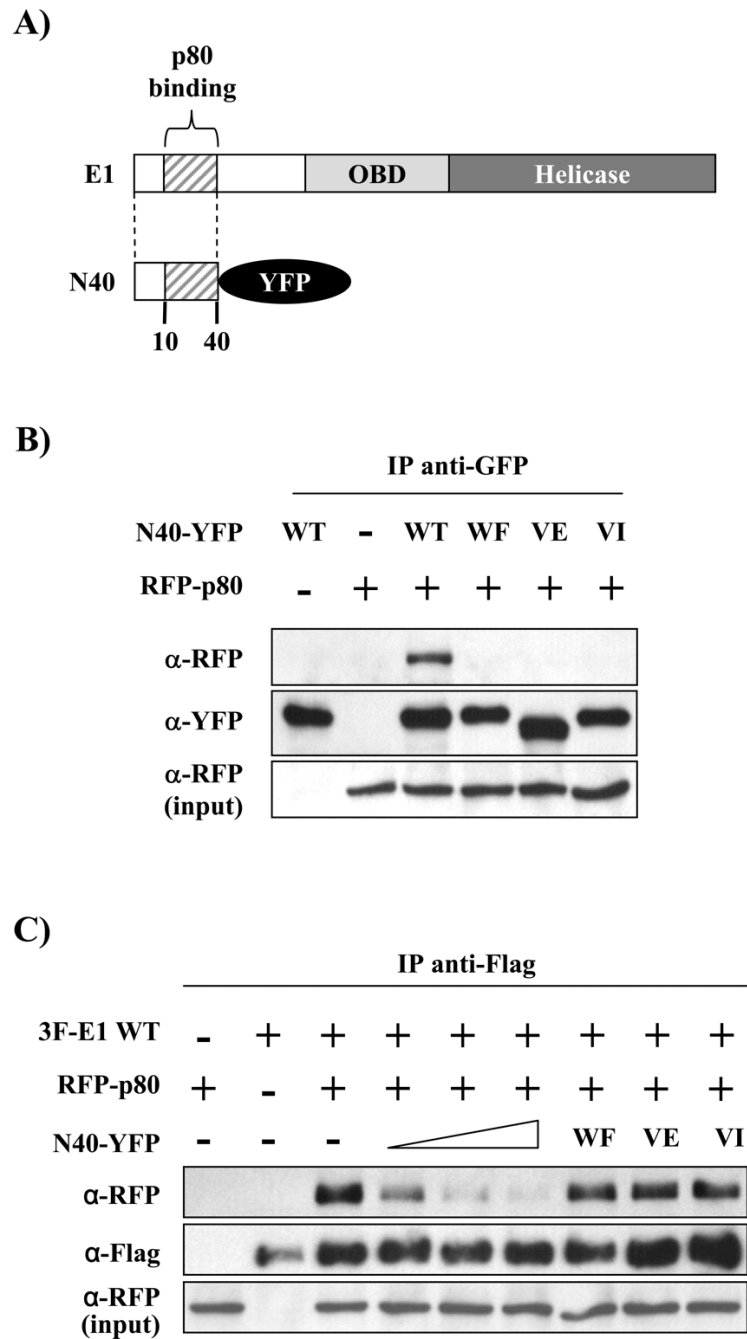


Figure 2.6 Inhibition of the E1-p80 interaction by N40

A) Schematic representation of HPV31 E1 and of the N40 peptide. E1 is subdivided in its three functional domains: the N-terminal regulatory domain (white), the origin-binding domain (OBD; light grey) and the helicase domain (Helicase; dark grey). N40 encompasses amino acids 1-40 of HPV31 E1, which includes the p80-binding motif (striped box), and is fused C-terminally to the Venus yellow fluorescent protein (YFP). B) Co-immunoprecipitation of RFP-p80 with WT or p80-binding defective N40 (WF, VE and VI) fused to YFP (N40-YFP). C33A cells were co-transfected with the indicated N40-YFP and RFP-p80 expression vectors, harvested 48 h post-transfection and whole cell extracts submitted

to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies that also recognize YFP. C) Inhibitory effect of N40-YFP on the co-immunoprecipitation of RFP-p80 with full-length WT 3F-E1. C33A cells were co-transfected with the indicated E1 and p80 expression vectors, as well as with increasing amounts of WT N40 expression plasmid, and harvested 48 h post-transfection. The WF, VE and VI mutant peptides were also tested as controls at the highest level of expression vector. Whole cell extracts were submitted to immunoprecipitation using an anti-Flag antibody.

2.3.4.7 N40 prevents the E1- and E2-dependent recruitment of p80 to the origin and inhibits viral DNA replication

Next, we used the N40 peptide to further probe the requirement for the E1-p80 interaction in viral DNA replication. First, we performed ChIP assays to determine if N40 was able to prevent the recruitment of p80, by E1 and E2, to the viral origin. We observed that N40 had no effect on the ability of E1 to associate with the origin (Fig. 2.7A). In contrast, results shown in Fig. 2.7B indicated that N40, but none of the three N40 mutant peptides or YFP alone (ctl), could efficiently inhibit the recruitment of p80 to the origin. Thus, N40 can be used to exclude p80 from the viral DNA replication complex.

We next tested the effect of N40 on viral DNA replication *per se*, by transfecting increasing amounts of N40 expression vector in the luciferase-based DNA replication assay. Satisfyingly, N40 could efficiently inhibit viral DNA replication in a dose-dependent manner (Fig. 2.7C). This effect was specific as neither YFP alone (ctl) nor any of the three N40 mutant peptides were inhibitory. In several experiments, we noted that WT N40 could not reduce viral DNA replication by more than 75%, consistent with the previous observation that p80-binding defective E1 mutant proteins still support viral DNA replication at approximately 30% of WT levels. From these results, we could also determine that N40 inhibits 50% of the DNA replication signal when its expression plasmid is transfected in a ~ 2:1 ratio relative that of full-length E1, thus providing a measure of its potency. As an important control for the specificity of N40, we verified that it has no effect on expression of the luciferase reporter gene in absence of the viral proteins (i.e. in absence of ori-plasmid replication) (Fig. 2.7D). Co-immunoprecipitation experiments also indicated that N40 does not prevent the interaction between E1 and E2

(data not shown). Altogether, these results indicate that overexpression of the N40 peptide inhibits HPV DNA replication in a manner that recapitulates the effect of the p80-binding substitutions in E1 and, as such, provide additional evidence that p80 is required for efficient HPV DNA replication.

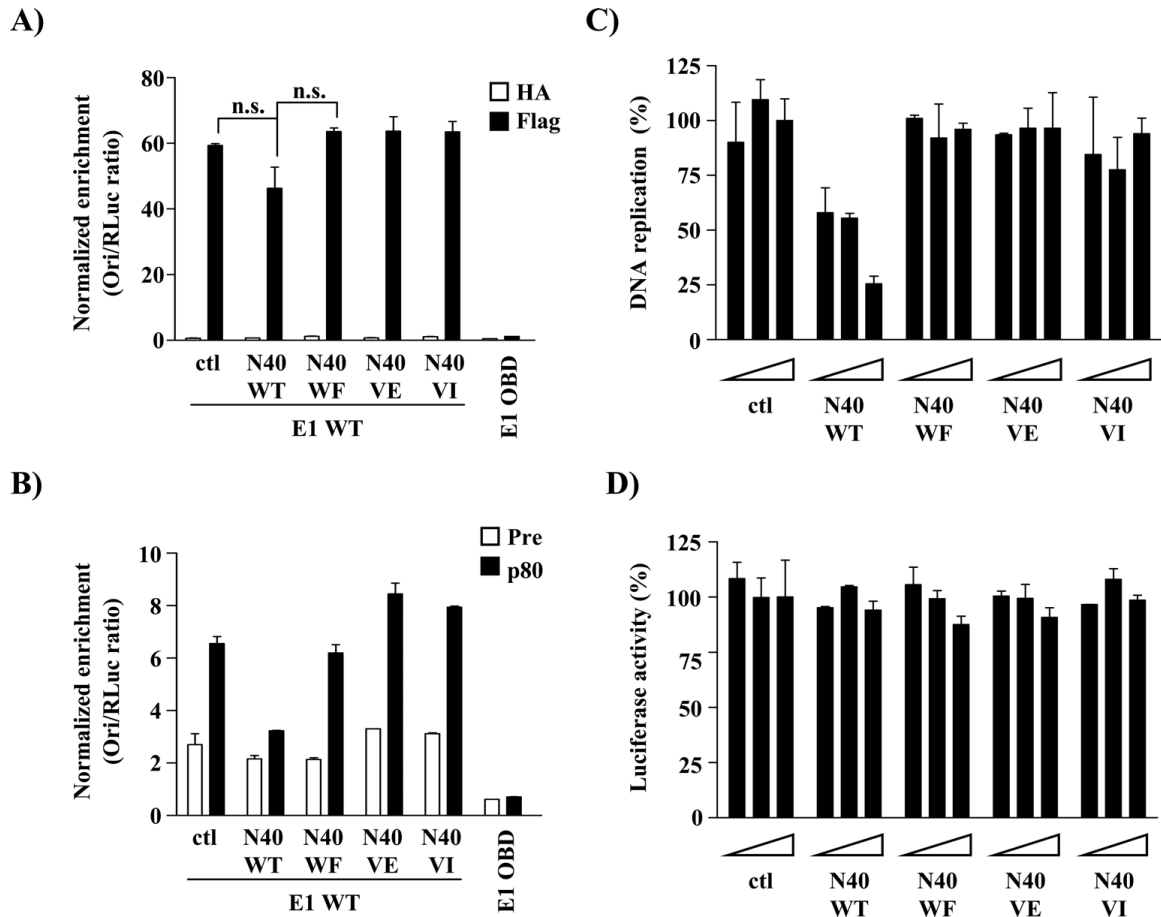


Figure 2.7 N40 prevents the recruitment of p80 to the origin and inhibits viral DNA replication

A) C33A cells were transfected with 3F-E1, RFP-E2 and N40 (WT or mutant) expression vectors, together with an origin plasmid. ChIP assays were performed on the lysates using anti-Flag and anti-HA antibodies or B) with a p80 antiserum or pre-immune serum. Results of the ori enrichment levels determined by qPCR are shown after normalization to input DNA, using the internal control pRL (RLuc). Each value is the average of at least two replicates, with the standard deviation presented as an error bar on the graphs. Unpaired two-tailed Student's t-test was used to determine if differences in enrichment levels are significant. Differences with a p-value greater than 0.05 were deemed to be non-significant (n.s.) and are indicated. C) DNA replication levels in cells expressing a gradient of WT or mutant N40

peptide (1, 10 and 50 ng of N40-YFP expression vector). Cells co-transfected with the empty YFP vector were used as a negative control (ctl). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained at the highest amount of YFP control vector. The error bars represent the standard deviation of duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments. D) Effect of N40-YFP on expression of CMV-FLuc in the absence of the viral proteins. Luciferase signal is reported as a percentage of the signal obtained with the highest amount of empty YFP control vector. The error bars represent the standard deviation of duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments.

2.3.4.8 N40 expression has little to no effect on cell cycle progression and DNA synthesis

HPV DNA replication takes place during the S-phase of the cell cycle and we have previously shown that interfering with cellular proliferation, with the use of chemical inhibitors or shRNA against p80, affects viral DNA replication indirectly ((20) and data not shown). This prompted us to investigate if the inhibitory effect of N40 on viral DNA replication was due to an indirect effect on cell cycle progression. We observed by FACS analysis that transient overexpression of N40 had no major effect on the cell cycle distribution of an asynchronously growing cell population, except for a slight accumulation of cells in G2/M that was not noticed in cells expressing the N40 WF mutant peptide or YFP alone (Fig. 2.8A). Note that only YFP-positive cells were analyzed (i.e. gated) in these experiments. To determine if N40-expressing cells could progress normally through S-phase, they were synchronized in G1/S with the chemical inhibitor mimosine and released in fresh medium lacking mimosine but containing nocodazole to prevent them from progressing past G2/M. Results shown in Fig. 2.8A demonstrate that N40-expressing cells are able to resume cell cycle progression and accumulate in G2/M as efficiently as control cells.

Since host DNA replication factors are absolutely essential for HPV DNA replication, we next tested if the N40 peptide had any effect on cellular DNA synthesis. This was done by measuring BrdU incorporation as a function of cell cycle progression, the latter being determined by staining cellular DNA and measuring its content with 7-AAD. Once again, no major effect on cell cycle distribution was observed in N40-expressing cells, as determined by their DNA staining profile (Fig. 2.8B). Furthermore, N40-expressing cells incorporated BrdU to the same extent as cells expressing the

N40 WF mutant peptide or YFP alone. Treatment with aphidicolin was used as a control to ensure that BrdU incorporation was indeed the result of DNA synthesis. For each condition, the percentage of cells incorporating BrdU was determined from three independent experiments and is reported in Fig. 2.8B. This quantification confirmed that cells expressing the WT or WF N40 mutant peptide incorporate BrdU as efficiently as the control YFP-expressing cells. Collectively, these results indicate that N40 expression has little to no effect on cell cycle progression and cellular DNA synthesis. As such, they suggest that the inhibitory effect of N40 on viral DNA replication is not indirect.

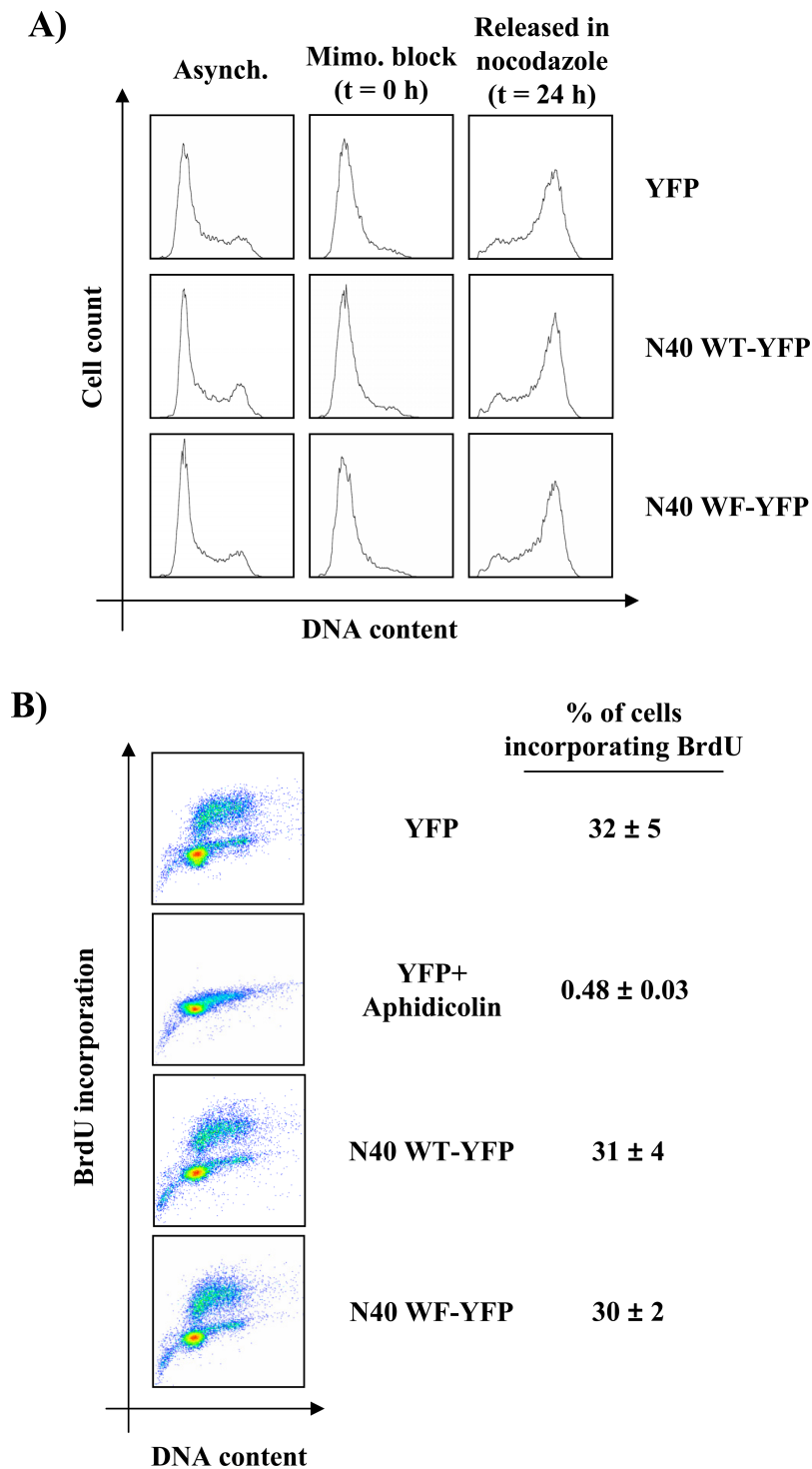


Figure 2.8 N40 expression has little to no effect on cell cycle progression and DNA synthesis

A) Cell cycle analysis of C33A cells transiently expressing YFP alone or YFP-tagged WT or WF N40. DNA content was determined by Hoechst staining and flow cytometry. For each transfection, the cells were either grown asynchronously (Asynch.) or synchronized with mimosine for 24 h (Mimo).

block) and then released in nocodazole for another 24 h (Released in nocodazole). B) BrdU incorporation of C33A cells transiently expressing YFP alone or YFP-tagged WT or WF N40. Cells were pulsed for 1 h with BrdU 48 h post-transfection and were then dual-labeled for BrdU and DNA using an APC-coupled antibody and 7-AAD staining, respectively. For each sample, BrdU incorporation is graphed as a function of DNA content. BrdU incorporation of cells treated with aphidicolin is shown as a negative control. Quantification of the percentage of cells incorporating BrdU, from three independent experiments, is shown on the right (average \pm standard deviation).

2.3.4.9 HPV DNA replication is attenuated in N40-expressing stable cell lines

The results presented above suggested that N40 does not affect cellular proliferation. To extend these findings, we performed colony formation assays and confirmed that cells stably expressing the N40 peptide, either the WT or mutant versions, are viable (Fig. 2.9A). These cells, as well as YFP-expressing control cells, were successfully established as stable lines that remained proliferative for several passages without any detectable defect, while maintaining continuous expression of N40 (Fig. 2.9B). These stable cell lines were then tested for their capacity to support transient HPV DNA replication. As anticipated, the N40 WT stable cell line was able to support lower levels of viral DNA replication than the three N40 mutant lines or the control YFP-expressing cell line (Fig. 2.9C). In three independent experiments, each performed at three different amounts of E1-expression vector, the levels of viral DNA replication were reduced by 30-50% in N40-YFP expressing cells as compared to YFP-expressing control cells (two-way ANOVA, $p < 0.005$). In contrast, no statistically significant reduction in viral DNA replication was observed in cell lines expressing the three N40-YFP mutant peptides. These results provide further evidence that the inhibition of HPV DNA replication by N40 is not caused by an indirect effect on cellular proliferation and indicate that long-term expression of N40 is not deleterious to cell viability. Together, the specificity of the N40 peptide towards p80 and its lack of cytotoxicity suggest that the E1-p80 interaction may be a valuable antiviral target (see Discussion).

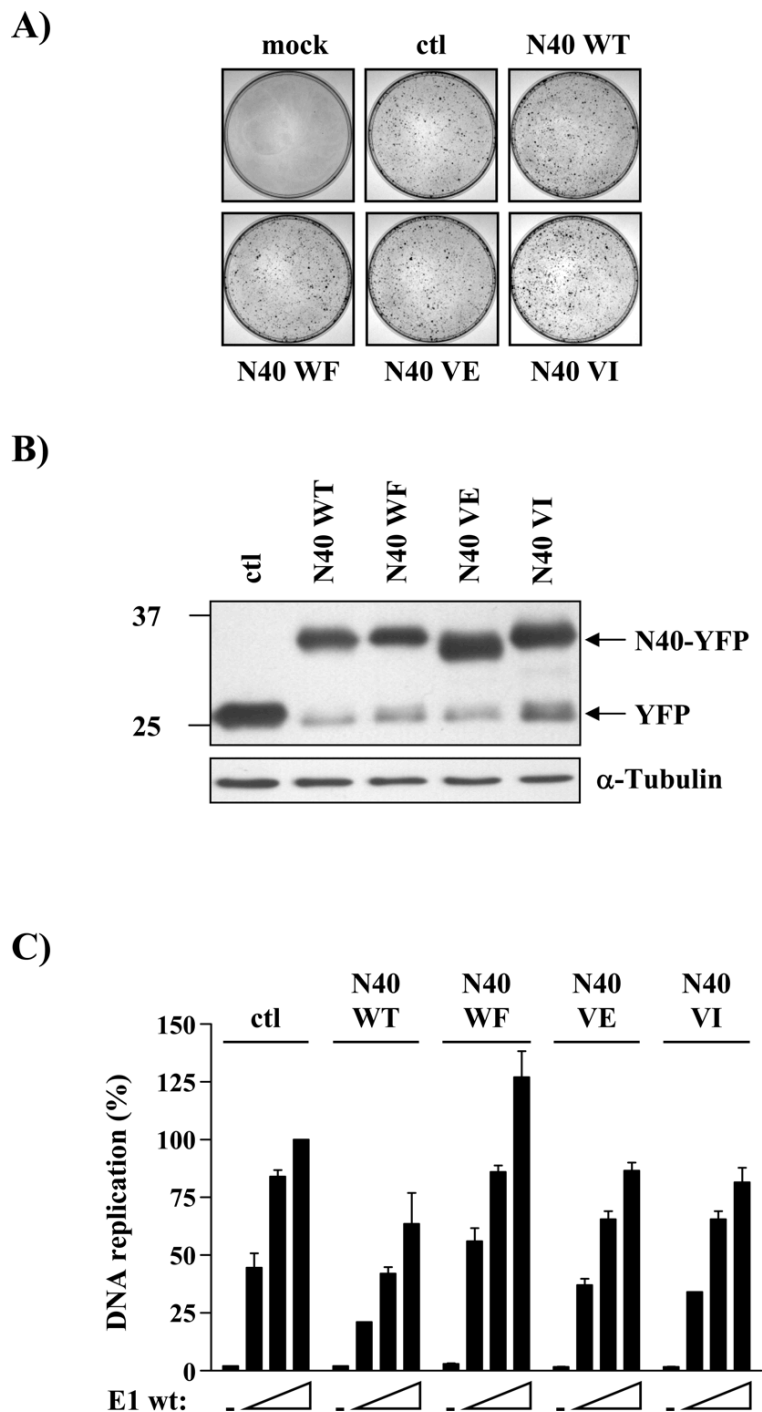


Figure 2.9 HPV DNA replication is attenuated in N40-expressing stable cell lines

A) Colony formation assay. C33A cells were transfected with the indicated expression vectors and then selected for approximately three weeks in bleomycin-containing media. Drug-resistant colonies were fixed with methanol and stained with methylene blue. B) Western blot showing the expression of N40, whether WT or p80-binding mutant (WF, VE and VI), in the established stable cell lines. β -tubulin was used as a loading control. C) DNA replication activities of WT E1 were tested by transfecting three different quantities of E1 expression vector (2.5, 5 and 10 ng) in the indicated N40 stable cell lines. DNA

replication was also measured in a control cell line expressing YFP alone (ctl). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with 10 ng of WT E1 expression vector in the control cell line. The error bars represent the standard deviation of duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments.

2.3.4.10 The N40 p80-binding peptide is intrinsically disordered

We previously reported that the first 83 amino acids of HPV31 E1 (N83), which include the p80-binding domain, are predicted to constitute an intrinsically disordered domain (IDD) (41). To test this prediction, we set out to analyze the structure of the E1-derived N40 and N83 peptides by NMR. However, this region of HPV31 E1 is not ideal for NMR analysis as it contains two cysteine residues, at position 14 and 54, that could possibly become oxidized and complicate the interpretation of the data. To circumvent this problem, both cysteines were changed to alanine and serine, respectively (C14A and C54S). To test if these substitutions had any effect on the function of E1, they were introduced in the context of full-length YFP-E1 and the resulting mutant proteins tested for their ability to support transient DNA replication. Satisfyingly, both substitutions, either alone or in combination, had little to no effect on viral DNA replication (Fig. 2.10A) and E1 levels (Fig. 2.10B). We then produced ^{15}N -labelled versions of the N40 and N83 peptides (containing the cysteine substitutions) as GST fusions in bacteria, purified the proteins and removed the GST moiety by thrombin cleavage. The purified untagged peptides are shown in Fig. 2.10C. Two-dimensional ^1H - ^{15}N heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectra were then acquired for both peptides (Fig. 2.10D). The limited chemical shift dispersion of the signals strongly suggests the absence of either secondary or tertiary structural elements. Moreover, the nearly perfect superposition of the two spectra shows that amino acids 40-83 do not influence the folding of N40. The absence of secondary structural elements was further verified by the absence of medium or long-range NOEs in a three dimensional ^{15}N -NOESY experiment (data not shown). Collectively, these results provide direct evidence that N40 and N83 are disordered in solution. They also support our previous suggestion that the N-terminal region of E1 constitutes an IDD, which could fold upon interaction with binding-partners such as p80.

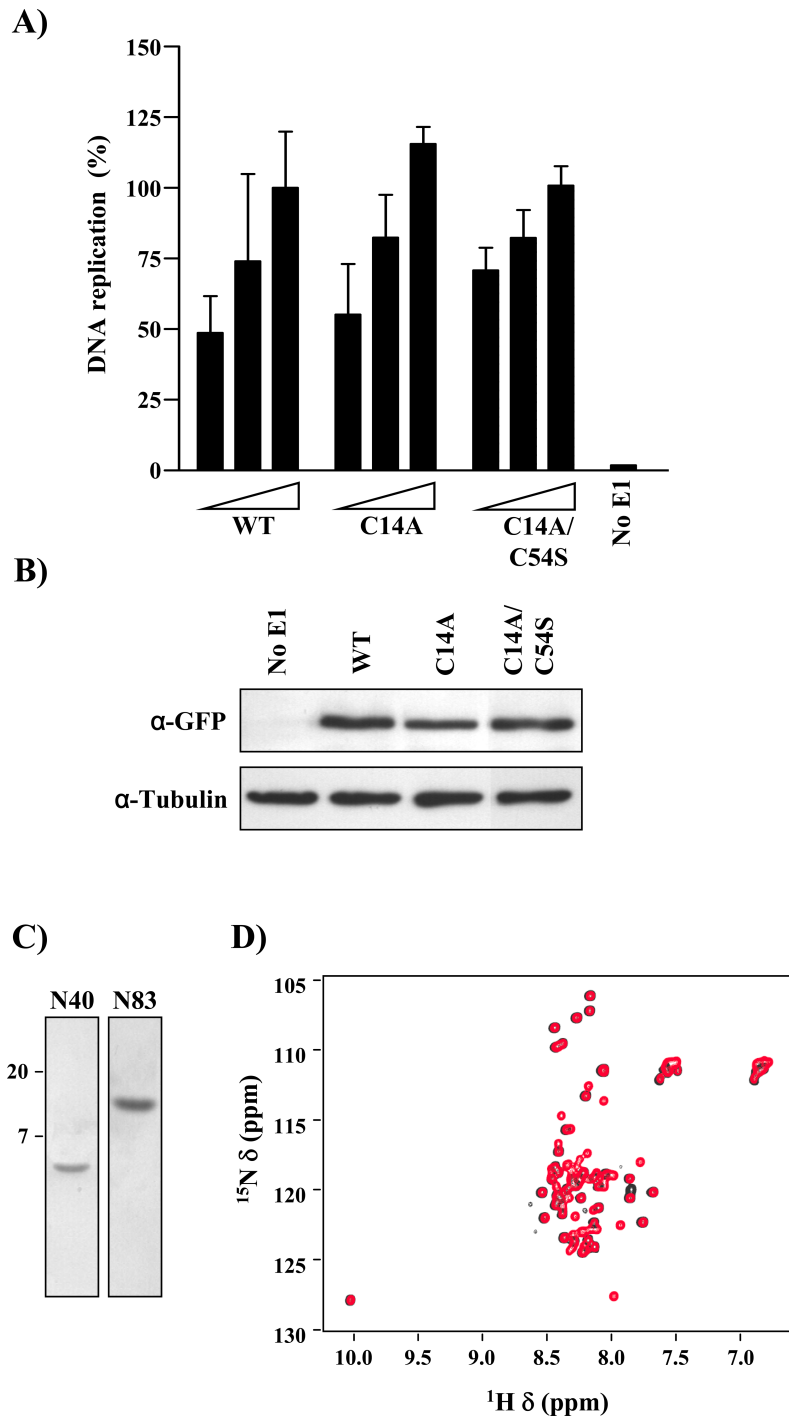


Figure 2.10 The N40 p80-binding peptide is intrinsically disordered

A) DNA replication activities of WT E1 was compared to C14A or C14A/C54S E1 mutant by transfecting three different quantities of E1 expression vector (1.25, 2.5 and 5 ng). C33A cells transfected without an E1 plasmid were used as a negative control (No E1). Replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with 5 ng of WT E1. The error bars represent the standard deviation of

duplicate values. These results are representative of at least three independent experiments. B) Anti-GFP Western blot showing the expression of the E1 mutant proteins in C33A cells. β -tubulin was used as a loading control. C) Coomassie gel showing the purified ^{15}N -labelled peptides D) Overlay of the 2D ^1H - ^{15}N heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectra of ^{15}N -labeled E1 N-terminal peptides N40 (a.a. 1-40; black) and N83 (a.a. 1-83; red).

2.3.4.11 E1 interacts with amino acids 1-573 of p80

To complete the characterization of the E1-p80 interaction, we mapped the domain of p80 required for E1-binding *in vitro* and *in vivo* using the series of p80 truncations shown in Fig. 2.11A. For the *in vitro* studies, each p80 truncation was expressed, as fusions to the triple Flag-epitope (3F-p80), in a rabbit reticulocyte lysate and tested for binding to the N-terminal domain of E1 (1-170), fused to GST, in pull-down assays. The results shown in Fig 11B revealed that the first 573 amino acids of p80 are required for robust binding to E1. This interaction was specific as it was not observed with GST alone and, importantly, was abolished by the VE substitution in E1. Shorter fragments of p80 spanning the first 400 amino acids showed weaker binding to E1 indicating that the WD40 repeat region may constitute the minimal E1-interaction motif. Accordingly, little to no binding of the C-terminal domain of p80 (a.a. 389-677) to E1 was detected.

The same p80 truncations were then tested for interaction with full-length E1 *in vivo* by co-immunoprecipitation. Specifically, the various 3F-p80 fragments were expressed in C33A cells together with YFP-E1, immunoprecipitated using an anti-Flag antibody and the precipitates probed for the presence of YFP-E1 by Western blotting with an anti-GFP antibody. These studies confirmed that the first 573 amino acids of p80 (1-573) interact with E1 as efficiently as the full-length p80 (Fig. 2.11C). However, and in contrast to what was observed *in vitro*, none of the shorter N-terminal fragments of p80 were able to interact with E1, possibly because of the lower concentration of these fragments and of E1 *in vivo* as compared to the *in vitro* assay. Finally, no interaction was detected between E1 and the C-terminal fragment of p80, which contains the putative UBX/SLD. Altogether, these results indicate that the N-terminal 573 amino acids of p80, including the WD40-repeat region, are necessary for interaction with E1.

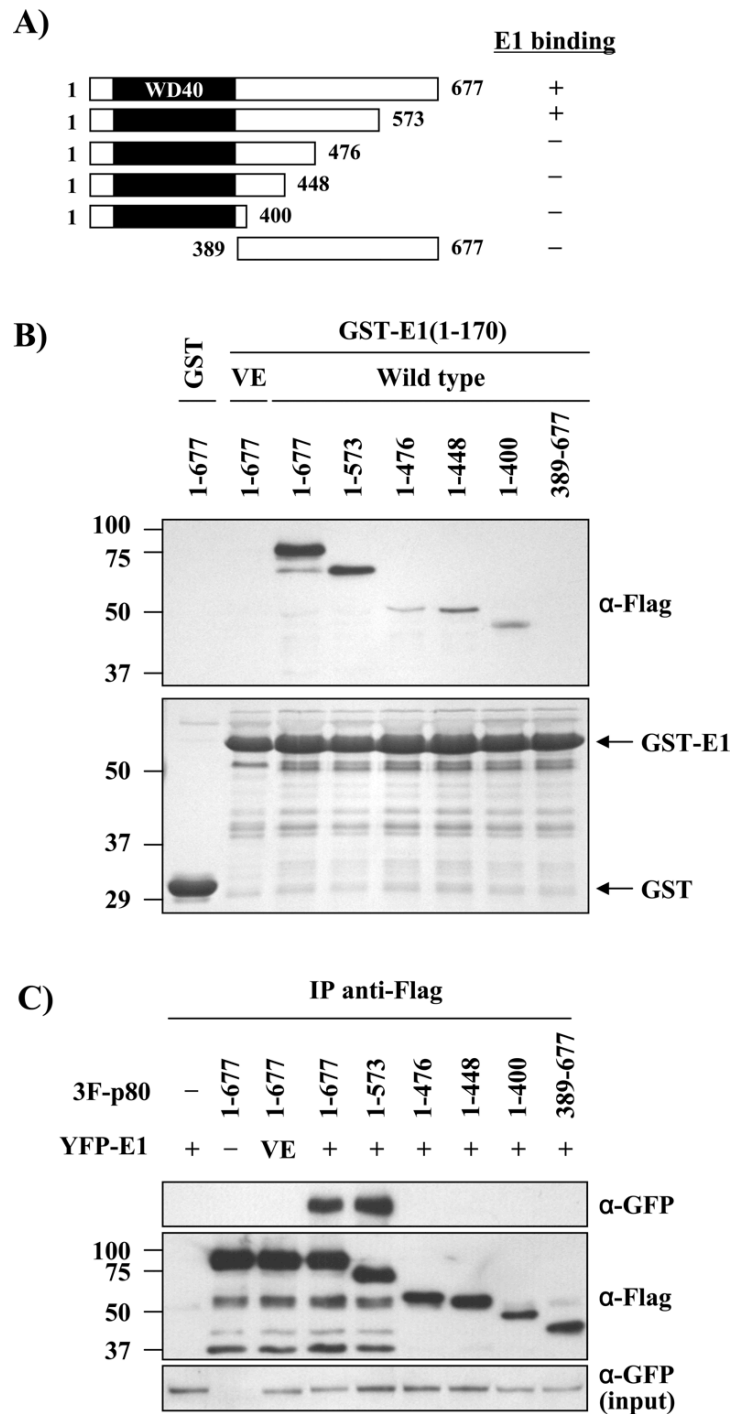


Figure 2.11 E1 interacts with amino acids 1-573 of p80

A) Schematic representation of the p80 truncations used for mapping the E1 binding domain on p80. The WD40 repeats of p80 are identified by a black box. B) *In vitro* pulldown assays. 3F-p80 truncations were expressed in rabbit reticulocyte lysates and tested for binding to the N-terminal domain of E1 (1-170) fused to GST. GST alone or GST-E1 VE were used as negative controls. Bound proteins were detected by Western blotting using an anti-Flag antibody. The bottom panel shows a Coomassie blue-stained SDS-

PAGE gel of the purified GST fusion proteins used in these pull-down experiments. The sizes of molecular weight markers (in thousands) are indicated on the left. C) *In vivo* co-immunoprecipitation assays. The indicated 3F-p80 truncations were expressed in C33A cells together with YFP-E1 and immunoprecipitated using anti-Flag antibodies. The presence of YFP-E1 in the immunoprecipitates was determined by Western blotting using an anti-GFP antibody. Cells expressing the YFP-E1 VE mutant protein and full-length 3F-p80 were used as a negative control.

2.3.5 Discussion

We previously reported that E1 interacts with p80 to promote the maintenance of the viral genome in undifferentiated keratinocytes and mapped the p80-binding domain on E1 to a short N-terminal region of the protein located between amino acids 10-40. This sequence is highly conserved among E1 from mucosal HPV types, but less so between cutaneous types. Accordingly, we previously found that only the E1 proteins from anogenital HPV types interact with p80. In this study, we have determined that the p80-binding domain of E1 is essential for efficient transient HPV DNA replication, a finding which likely accounts for the failure of viral episomes expressing a p80-binding defective E1 to be properly maintained in keratinocytes. Furthermore, we have shown that overexpression of these E1 mutant proteins cannot suppress their transient DNA replication defect, suggesting that the latter it is not due to lower expression and/or stability of these proteins. Importantly, we have also gathered evidence in functional assays and by ChIP that these E1 mutant proteins retain the capacity to interact with E2 at the viral origin, *in vivo*. Collectively, these findings suggest that p80-binding deficient E1 proteins are intrinsically impaired for viral DNA replication, at a step following the assembly of the E1-E2-ori initiation complex.

The results summarized above suggest that the interaction of anogenital HPV E1 with p80 is essential for efficient viral DNA replication. In support of this suggestion, we observed for the different E1 mutant proteins that the magnitude of their DNA replication defect correlates with their capacity to interact with p80. Namely, we found that the WF and C40 E1, which are completely defective for p80-interaction, are more severely compromised for DNA replication than the VI or VE mutant proteins, which both retain weak binding to p80. Additional evidence that the E1-p80 interaction is required for viral DNA replication came from the observation that p80 is recruited from the cytoplasm to discrete nuclear foci and to the viral origin, by E1 and E2, in a manner

dependent on the integrity of the E1 p80-binding domain. Of particular significance was the demonstration that the HPV31 E1-derived peptide N40, which efficiently binds to p80 and antagonizes the E1-p80 interaction *in vivo*, can prevent the recruitment of p80 onto the viral origin and inhibit viral DNA replication. The antagonistic effect of this peptide was specific to viral DNA replication, as it did not affect host DNA synthesis and cell cycle progression or any other host functions required for cellular proliferation and viability. Further evidence of specificity came from the observation that N40 mutant peptides defective for p80-binding have little to no effect on the recruitment of p80 to the viral origin and on transient HPV DNA replication. Together, these findings provide strong evidence that the interaction of E1 with p80 is required for efficient HPV DNA replication.

While the E1-p80 interaction is not strictly essential for transient DNA replication, it greatly enhances the overall efficiency of the process. Indeed, amino acid substitutions or truncations in E1 that abrogate p80-binding, or overexpression of the N40 peptide, reduce transient DNA replication by 70-75% but never completely abolish it. Although the E1-p80 interaction is not essential in transient DNA replication assays, it appears from our previous study to be indispensable for the proper maintenance of the viral episome in keratinocytes. Thus, the E1-p80 interaction seems to be more stringently required for episomal maintenance in immortalized keratinocytes than for viral DNA synthesis in transient assays, perhaps because the latter assays are performed under the less physiologically relevant condition of E1 and E2 overexpression. Although the exact molecular mechanism by which p80 promotes viral DNA replication remains elusive at the moment, we can discuss some possibilities based on our current understanding of the structure and functions of p80. The N-terminal half of p80 is comprised of WD40-repeats, which are known to fold into β -propeller structures that often act as protein-protein interaction modules (56). In this respect, our finding that the WD40 repeats of p80 are needed for interaction with E1 is not surprising. Thus, one possible role of p80 in viral DNA replication may be to act as a scaffold to facilitate either the assembly of a replication-competent E1 double-hexamer, its licensing, its processivity during DNA synthesis or its recycling for further rounds of DNA replication. As such, the p80-binding domain of E1 could play a role similar to that of the SV40 Large T antigen J-domain in polyomavirus DNA replication (57, 63). One

reason for raising this possibility is the previous report that p80 co-purifies with Hsp70, although this interaction was deemed to be non-specific (45). Our finding that p80 is recruited to the viral origin during the initiation of viral DNA replication (i.e. in aphidicolin treated cells) is consistent with p80 playing a role in assembly of the viral DNA replication complex. However, the fact that the WF and C40 E1 still assemble at the origin in our CHIP assays, an activity that requires the ATPase function of E1, suggest that these mutant proteins are capable of oligomerizing at the origin. Thus, we surmise that the requirement for p80 arises after E1 oligomerization, such as for the licensing, processivity, or recycling of the helicase.

Interestingly, p80 was recently shown to associate with and to stimulate the activity of three deubiquitinating enzymes (DUBs), namely USP1, USP12 and USP46 (9, 10). Similarly to what we found for E1, the WD repeats of p80 were shown to be required for interaction with these enzymes. This prompted us to investigate if E1 competes with these DUBs for binding to p80. On the contrary, we found in co-immunoprecipitation assays that E1 can form a ternary complex with p80 and any of the three USPs (M.L. and J.A., unpublished), indicating that their interactions are not mutually exclusive. USP1 has been implicated in two different aspects of the cellular DNA damage response (DDR), namely the Fanconi anemia pathway, which coordinates the repair of DNA damages such as DNA crosslinks, and the translesion synthesis pathway, which allows DNA replication to proceed past certain DNA lesions. It has been found that USP1 can downregulate these two pathways, by deubiquitinating monoubiquitinated FANCD2 and monoubiquitinated PCNA, respectively. Interestingly, FANCD2 activation and recruitment to nuclear foci was previously observed in cells expressing SV40 Large T antigen (5). This activation was shown to correlate with DNA replication-induced stress and to be required for SV40 DNA replication. In the context of HPV, it is tempting to speculate that the presence of p80 at the replication fork may facilitate the recruitment of DDR proteins to promote viral DNA replication or, conversely, to alleviate problems linked with a stalled replication fork. However, we and others recently showed that DNA damage neither interferes nor stimulates transient HPV DNA replication (18, 31), suggesting that the effect of p80 in this context is independent of DDR signaling. Furthermore, Moody et al. also observed using the chemical inhibitor KU-55933 that the ATM pathway has no effect on the stable maintenance of the HPV

episome in undifferentiated keratinocytes (40), in contrast to p80 whose interaction with E1 is essential for this process (12). Altogether, these results suggest a function for p80 in episomal replication and maintenance that is independent of DNA damage signaling events. Another possibility is that p80 could serve to modulate the monoubiquitination status of PCNA during viral DNA replication, through its association with E1 and USP1, perhaps as a means to recruit translesion synthesis polymerases. In this context, it is intriguing that a previous study addressing the protein requirement for papillomavirus DNA replication *in vitro* indicated the need for an unknown cellular factor present in the same biochemical fraction as polymerases α and δ , but different from these two enzymes, that could potentially be a third polymerase such as polymerase ϵ (37).

As for USP12 and USP46, they have been shown to deubiquitinate monoubiquitinated histones H2A and H2B (29). Thus, one possible role of p80 in viral DNA replication may be to modify chromatin to facilitate the assembly of the E1-containing DNA replication complex and/or its progression at the fork. Two other E1-associated proteins, histone H1 and hSNF5, were previously suggested to affect chromatin structure for the benefit of viral DNA replication (33, 58). Interestingly, the initiator protein EBNA1 of Epstein-Barr virus (EBV) has recently been shown to recruit USP7 to the latent viral origin in order to locally deubiquitinate H2B (52). However, the exact function of this process in the EBV life cycle remains to be determined. While a role for USP1, 12 and 46 in the HPV life cycle remains attractive, our current unpublished results obtained using dominant negative versions of these enzymes suggest that their catalytic activity is not required for transient viral DNA replication, although these results should be interpreted with caution as any other negative findings. In summary, it appears that the role of p80 in transient HPV DNA replication does not rely on its association with catalytically active DUBs, a conclusion that does not preclude a role for these interactions in other aspects of the viral life cycle, but one that suggests that p80 can also function independently of these enzymes.

As a first step toward understanding the mechanism of action of the N40 inhibitory peptide, we used NMR to analyze its structure and that of a longer E1 fragment spanning the first 83 amino acids. Both peptides were found to be intrinsically disordered in solution, a finding consistent with our previous *in silico* predictions that

the N-terminal region of E1 is predominantly unstructured (41). In addition to the p80-binding domain, we previously showed that the first 83 residues of E1 contain a conserved $\Phi x \Phi \Phi$ motif (in which Φ indicates a hydrophobic amino acid) that is required for efficient DNA replication and which may fold as an amphipathic helix with structural and functional similarity to those found in the p53 TAD2 and VP16C transactivation domains (41). The latter protein domains are known to be intrinsically disordered in solution and to fold into α -helices upon binding to their interaction partners, such as the Tfb1/p62 subunit of the transcription factor TFIID (4, 16, 28, 62). By analogy, it is possible that the first 83 amino acids of E1 undergo folding upon interaction with binding partners such as p80. Similarly, the E1 N40 peptide may interact with the WD40 repeat region of p80 through an induced-fit mechanism. From a thermodynamic point of view, this type of peptide-protein interaction is disfavored entropically but often compensated for by highly specific and extensive interaction surfaces comprised of several low-affinity contacts (17). By their very nature, these kinds of reversible interactions have been suggested to be ideal targets for therapeutic intervention (38). The finding that the E1-p80 interaction is essential for episomal maintenance, coupled with the discovery of an E1-derived, p80-binding peptide that inhibits viral DNA replication and is well tolerated in cells, represent important steps in the validation of the E1-p80 interface as a novel antiviral target.

2.3.6 Acknowledgments

We thank Michel Bouvier (Université de Montréal) for the gift of the YFP plasmid. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to JA and the Canadian Cancer Society (CCS) to JGO. ML was supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a CIHR Frederick Banting and Charles Best doctoral scholarship award. AFT hold a studentship from the FRSQ.

2.3.7 References

1. Androphy, E. J., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325:70-73.

2. Baseman, J. G., and L. A. Koutsky. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S16-24.
3. Bernard, H. U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. Hausen, and E. M. de Villiers. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70-79.
4. Bochkareva, E., L. Kaustov, A. Ayed, G. S. Yi, Y. Lu, A. Pineda-Lucena, J. C. Liao, A. L. Okorokov, J. Milner, C. H. Arrowsmith, and A. Bochkarev. 2005. Single-stranded DNA mimicry in the p53 transactivation domain interaction with replication protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15412-15417.
5. Boichuk, S., L. Hu, J. Hein, and O. V. Gjoerup. 2010. Multiple DNA damage signaling and repair pathways deregulated by simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 84:8007-8020.
6. Cho, N. H., P. Feng, S. H. Lee, B. S. Lee, X. Liang, H. Chang, and J. U. Jung. 2004. Inhibition of T cell receptor signal transduction by tyrosine kinase-interacting protein of Herpesvirus saimiri. *The Journal of experimental medicine* 200:681-687.
7. Cho, N. H., D. Kingston, H. Chang, E. K. Kwon, J. M. Kim, J. H. Lee, H. Chu, M. S. Choi, I. S. Kim, and J. U. Jung. 2006. Association of herpesvirus saimiri tip with lipid raft is essential for downregulation of T-cell receptor and CD4 coreceptor. *J Virol* 80:108-118.
8. Clower, R. V., J. C. Fisk, and T. Melendy. 2006. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 80:1584-1587.
9. Cohn, M. A., Y. Kee, W. Haas, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2009. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* 284:5343-5351.
10. Cohn, M. A., P. Kowal, K. Yang, W. Haas, T. T. Huang, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2007. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* 28:786-797.

11. Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang. 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.
12. Cote-Martin, A., C. Moody, A. Fradet-Turcotte, C. M. D'Abramo, M. Lehoux, S. Joubert, G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault. 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.
13. Daling, J. R., M. M. Madeleine, L. G. Johnson, S. M. Schwartz, K. A. Shera, M. A. Wurscher, J. J. Carter, P. L. Porter, D. A. Galloway, and J. K. McDougall. 2004. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 101:270-280.
14. de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
15. Deng, W., B. Y. Lin, G. Jin, C. G. Wheeler, T. Ma, J. W. Harper, T. R. Broker, and L. T. Chow. 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 78:13954-13965.
16. Di Lello, P., L. M. Jenkins, T. N. Jones, B. D. Nguyen, T. Hara, H. Yamaguchi, J. D. Dikeakos, E. Appella, P. Legault, and J. G. Omichinski. 2006. Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53. *Molecular cell* 22:731-740.
17. Dyson, H. J., and P. E. Wright. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:197-208.
18. Fradet-Turcotte, A., F. Bergeron-Labrecque, C. A. Moody, M. Lehoux, L. A. Laimins, and J. Archambault. 2011. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J Virol* 85:8996-9012.
19. Fradet-Turcotte, A., C. Moody, L. A. Laimins, and J. Archambault. 2010. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2

- phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol* 84:11747-11760.
20. Fradet-Turcotte, A., G. Morin, M. Lehoux, P. A. Bullock, and J. Archambault. 2010. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* 399:65-76.
 21. Frappier, L., and C. P. Verrijzer. 2011. Gene expression control by protein deubiquitinases. *Current opinion in genetics & development* 21:207-213.
 22. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 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.
 23. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799-804.
 24. Frisch, M., C. Fenger, A. J. van den Brule, P. Sorensen, C. J. Meijer, J. M. Walboomers, H. O. Adami, M. Melbye, and B. Glimelius. 1999. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* 59:753-757.
 25. Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello, and T. Melendy. 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.
 26. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16:83-97.
 27. Huang, T. T., S. M. Nijman, K. D. Mirchandani, P. J. Galardy, M. A. Cohn, W. Haas, S. P. Gygi, H. L. Ploegh, R. Bernards, and A. D. D'Andrea. 2006. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nature cell biology* 8:339-347.
 28. Jonker, H. R., R. W. Wechselberger, R. Boelens, G. E. Folkers, and R. Kaptein. 2005. Structural properties of the promiscuous VP16 activation domain. *Biochemistry* 44:827-839.

29. Joo, H. Y., A. Jones, C. Yang, L. Zhai, A. D. t. Smith, Z. Zhang, M. B. Chandrasekharan, Z. W. Sun, M. B. Renfrow, Y. Wang, C. Chang, and H. Wang. 2011. Regulation of histone H2A and H2B deubiquitination and *Xenopus* development by USP12 and USP46. *J Biol Chem* 286:7190-7201.
30. Kim, J. M., K. Parmar, M. Huang, D. M. Weinstock, C. A. Ruit, J. L. Kutok, and A. D. D'Andrea. 2009. Inactivation of murine *Usp1* results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Developmental cell* 16:314-320.
31. King, L. E., J. C. Fisk, E. S. Dornan, M. M. Donaldson, T. Melendy, and I. M. Morgan. 2010. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling. *Virology* 406:95-102.
32. Kreimer, A. R., G. M. Clifford, P. Boyle, and S. Franceschi. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467-475.
33. Lee, D., H. Sohn, G. V. Kalpana, and J. Choe. 1999. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* 399:487-491.
34. Lehoux, M., C. M. D'Abramo, and J. Archambault. 2009. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public health genomics* 12:268-280.
35. Loo, Y. M., and T. Melendy. 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78:1605-1615.
36. Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, and M. A. Romanos. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 72:7407-7419.
37. Melendy, T., J. Sedman, and A. Stenlund. 1995. Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* 69:7857-7867.
38. Metallo, S. J. 2010. Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Current opinion in chemical biology* 14:481-488.

39. Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, and M. R. Botchan. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699.
40. Moody, C. A., and L. A. Laimins. 2009. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS pathogens* 5:e1000605.
41. Morin, G., A. Fradet-Turcotte, P. Di Lello, F. Bergeron-Labrecque, J. G. Omichinski, and J. Archambault. 2011. A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85:5287-5300.
42. Nagai, T., K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, and A. Miyawaki. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* 20:87-90.
43. Nijman, S. M., T. T. Huang, A. M. Dirac, T. R. Brummelkamp, R. M. Kerkhoven, A. D. D'Andrea, and R. Bernards. 2005. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* 17:331-339.
44. Park, J., N. H. Cho, J. K. Choi, P. Feng, J. Choe, and J. U. Jung. 2003. Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol* 77:9041-9051.
45. Park, J., B. S. Lee, J. K. Choi, R. E. Means, J. Choe, and J. U. Jung. 2002. Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* 17:221-233.
46. Park, P., W. Copeland, L. Yang, T. Wang, M. R. Botchan, and I. J. Mohr. 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.
47. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2005. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.

48. Partridge, J. M., and L. A. Koutsky. 2006. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* 6:21-31.
49. Sakakibara, N., R. Mitra, and A. A. McBride. 2011. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol* 85:8981-8995.
50. Sanchez-Pulido, L., D. Devos, Z. R. Sung, and M. Calonje. 2008. RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC genomics* 9:308.
51. Sanders, C. M., and A. Stenlund. 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.
52. Sarkari, F., T. Sanchez-Alcaraz, S. Wang, M. N. Holowaty, Y. Sheng, and L. Frappier. 2009. EBNA1-mediated recruitment of a histone H2B deubiquitylating complex to the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *PLoS pathogens* 5:e1000624.
53. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Molecular cell* 20:377-389.
54. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* 79:8661-8664.
55. 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* 358:10-17.
56. Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena, and E. J. Neer. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 24:181-185.
57. Sullivan, C. S., and J. M. Pipas. 2002. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:179-202.

58. Swindle, C. S., and J. A. Engler. 1998. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* 72:1994-2001.
59. Swindle, C. S., N. Zou, B. A. Van Tine, G. M. Shaw, J. A. Engler, and L. T. Chow. 1999. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* 73:1001-1009.
60. Titolo, S., A. Pelletier, A. M. Pulichino, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 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.
61. Titolo, S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, A. Amin, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 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.
62. Uesugi, M., O. Nyanguile, H. Lu, A. J. Levine, and G. L. Verdine. 1997. Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* 277:1310-1313.
63. Weisshart, K., P. Taneja, A. Jenne, U. Herbig, D. T. Simmons, and E. Fanning. 1999. Two regions of simian virus 40 T antigen determine cooperativity of double-hexamer assembly on the viral origin of DNA replication and promote hexamer interactions during bidirectional origin DNA unwinding. *J Virol* 73:2201-2211.
64. Wilson, V. G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* 24:275-290.
65. Wooldridge, T. R., and L. A. Laimins. 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.
66. Yang, K., G. L. Moldovan, P. Vinciguerra, J. Murai, S. Takeda, and A. D. D'Andrea. 2011. Regulation of the Fanconi anemia pathway by a SUMO-like delivery network. *Genes Dev* 25:1847-1858.

3 Le recrutement par E1 et UAF1 d'un complexe à activité déubiquitine est important pour la réplication de l'ADN du VPH

E1-mediated recruitment of a p80/UAF1-USP deubiquitinase complex facilitates human papillomavirus DNA replication

Michaël Lehoux, David Gagnon* et Jacques Archambault*

** Ces auteurs ont contribué également aux travaux*

Cet article a été soumis à *Journal of Virology* le 5 février 2014 (en révision)

3.1 Mise en contexte de l'article

L'interaction E1-UAF1 promeut la réplication transitoire de l'ADN du VPH et le maintien de l'épisome dans des kératinocytes primaires. Puisque UAF1 n'encode aucune activité enzymatique, sa fonction est présumée être dépendante de ses partenaires d'interaction. Les interactions endogènes avec le complexe E1-UAF1 sont inconnues. L'objectif de cette étude était de caractériser l'architecture du complexe associé à E1 et UAF1 dans le contexte du réplisome viral et de déterminer l'importance de ces partenaires pour la réplication de l'ADN du VPH.

3.2 Contribution des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans les figures 1-6 de ce manuscrit. Pour les figures 7-8, j'ai développé les réactifs et effectué les expériences préliminaires qui ont ensuite été répétées plusieurs fois et à plus grande échelle par le Dr David Gagnon. J'ai aussi écrit le manuscrit.

Dr David Gagnon était stagiaire postdoctoral dans le laboratoire du Dr Archambault lors de la réalisation des expériences de ce manuscrit. Il a effectué les expériences des figures 7 et 8.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet et apporté des commentaires constructifs pour la réalisation et l'analyse des expériences, ainsi que pour la rédaction du manuscrit.

3.3 Texte de l'article

3.3.1 Abstract

The papillomavirus E1 protein, in concert with E2, initiates viral DNA replication and mediates the recruitment of host replication factors. We have previously identified the cellular protein p80/UAF1 as a novel interaction partner of E1 N-terminal region from anogenital human papillomaviruses (HPVs). The importance of this interaction was demonstrated by showing that mutations within the UAF1-binding domain of E1, or *in trans* overexpression of this UAF1-binding peptide, reduced viral DNA replication by up to 70%. UAF1 has no known enzymatic activity but contains several WD repeats suggesting that it relies on protein-protein interactions to carry out its function. Through affinity purification, we found UAF1 to interact with three deubiquitinating enzymes in cervical cells: USP1, USP12 and USP46. Coimmunoprecipitation experiments demonstrated that E1 binds simultaneously with UAF1 and any of the three USPs, possibly as a ternary complex. Moreover, E1 redistributed USP12 and USP46 from the cytoplasm to the nucleus through their association with UAF1. Chromatin immunoprecipitation assays further revealed that the USPs are recruited to the viral origin by E1 in a UAF1-dependent manner. Overproduction of a catalytically inactive version of the USPs specifically reduced viral DNA replication by up to 70%. These results highlight the importance of UAF1-USP activities during HPV DNA replication.

3.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) infect the stratified epithelium of the skin and anogenital mucosa where they replicate and induce hyperproliferative lesions through the expression of the viral oncogenes E6 and E7. While the vast majority of infections remain subclinical, a subset of anogenital HPV types, known as high-risk, are the etiological agents of cervical cancer and a large proportion of anal and other genital cancers (reviewed in (12, 21, 25)).

Upon establishment of viral infection in the basal cells of the epithelium, the early viral proteins E1 and E2 are expressed; these proteins are essential for the replication of

the episomal double-stranded DNA genome of HPV. Viral DNA replication occurs in three main phases of DNA synthesis (reviewed in (21)). First, the viral genome is established and replicated, as an extrachromosomal element, to approximately 50-100 copies per cell (establishment step). The genome is then maintained over cellular divisions at a constant copy number in the basal cells of the tissue (maintenance step). Maintenance is believed to occur once per cell cycle in a synchronized manner with the cell during S-phase. Finally, as the infected cells migrate through the upper layers of the epithelium, HPV DNA is replicated to high copy numbers, a step that is tightly coupled with the cellular differentiation program (amplification step). At this productive step, the late genes encoding the structural proteins L1 and L2 are also induced, allowing for encapsidation of the genomes in new viral particles, which are shed at the uppermost layers of the epithelium.

In addition to the viral proteins E1 and E2, HPV relies extensively on host proteins to carry out replication of its DNA. The assembly of the viral replisome is first initiated by the binding of E2 to specific sites within the viral origin (*ori*) of replication. Through direct protein-protein interactions, E2 recruits E1 monomers to stimulate the assembly of the active viral helicase composed of an E1 double-hexamers (2, 16, 17, 36, 43-45, 51). Once assembled, the E1 helicase is thought to melt the viral origin, unwind the viral DNA in a bidirectional manner and directly recruit various components of the host DNA replication machinery, such as DNA polymerase α -primase, topoisomerase I and RPA (single-stranded DNA-binding protein) (7, 10, 20, 32, 34, 39).

Apart from its highly-conserved helicase and DNA-binding domains, E1 comprises a more divergent N-terminal region that is strictly required for DNA replication *in vivo* (1, 47). A portion of this N-terminal domain is required for E1 nucleocytoplasmic shuttling. Although E1 is constitutively translocated to the nucleus via its bipartite NLS, it also encodes a NES. E1 shuttling is coordinated by cell cycle-dependent phosphorylation of E1 that inhibits its Crm1-dependent nuclear export. Through proteomic studies, we identified a binding site for the cellular protein p80/UAF1 (USP1-associated factor 1), thereafter named UAF1, located in the N-terminus between amino acids (aa) 10-40 in HPV31 E1 (11). Several lines of evidence support an important role for the E1-UAF1 interaction in replication of the viral genome. First, mutational analysis showed that interaction with UAF1 is required for efficient viral DNA replication and long-term

maintenance of the viral episome in undifferentiated keratinocytes (11, 14). Second, E1 relocalizes UAF1 from the cytoplasm to the nucleus and, in the presence of E2, to specific nuclear foci where viral DNA replication is thought to occur. Third, E1 and E2 recruit UAF1 to the viral origin as evidenced by ChIP experiments (30). Fourth, inhibition of the E1-UAF1 interaction by *in trans* overexpression of an E1-derived UAF1-binding peptide (N40) prevents UAF1 enrichment on the episome and inhibits HPV DNA replication by 70%. Altogether, these observations suggest that UAF1-binding plays a central role in the HPV DNA replication process.

UAF1 has no intrinsic enzymatic activity, but bears WD40 repeats as well as a SUMO-like domain (SLD) (41, 42). These domains are commonly involved in protein-protein interactions and thus, UAF1 probably mediates its activities through binding with other cellular partners. While some groups reported UAF1 interactions with the deubiquitinating enzymes (DUB) USP1, USP12 and USP46 (8, 9, 49), little is known about architecture of this UAF1 complex in the context of HPV infection in cervical cells. In the present study, we show that HPV E1 associates simultaneously with UAF1 and its associated USPs (USP1, USP12 and USP46). We also demonstrate that E1 relocalizes the USPs to the nucleus and recruits them onto the viral origin in a UAF1-dependent manner. Finally, we show that USP enzymatic activity is required for HPV DNA replication and that overexpression of catalytically inactive USPs specifically impairs viral DNA replication without affecting cell proliferation. These results provide evidence that the USPs are actively implicated during HPV DNA replication, therefore extending our knowledge on key factors implicated in HPV infection.

3.3.3 Materials and methods

Plasmid construction and mutagenesis. Short hairpin RNAs (shRNAs) against UAF1, USP1, USP12 or USP46 were expressed from the pLKO.1-Puro plasmid purchased from Open Biosystems. The shRNAs in this study had the following targeting sequence: Control (GCTATGAGAATAACGGTAACA), UAF1 (GTGCAGGTTTCCTATGTTATT), UAF1-mut (GTGCAAGTTTCGTATGTCATT), USP1-B (TTTGATCTAGTTTGTCTCTGG), USP1-C (TAATGCCTGTTTGGTCACTGG), USP1-E (ATCAAACCTCCAAACCACTAGC),

USP12 (TTTCACAAGTAAGACATCTGG) and USP46 (CGCTTACCAATGAAACTCGATCTCGAG). The scrambled control shRNA was generated by randomizing the UAF1 targeting sequence to obtain a non-targeting shRNA with the same nucleotide composition. The UAF1-mut sequence was generated by introducing three point-mutations within the target sequence of UAF1 via site-directed mutagenesis. We previously described the plasmids encoding RFP-UAF1 (11), 3F-UAF1 and its truncations (30), GFP-E1 (13), and vectors expressing codon-optimized 3F-E1 (p31E1) and 3F-E2 (p31E2) (14). USP1, USP12 and USP46 ORFs were obtained from Life Technologies. USP-GFP fusions were constructed by inserting a PCR fragment encoding the corresponding ORFs between the SacI and BamHI sites of the pGFP2-N1 plasmid (BioSignal Packard-Perkin-Elmer). Expression vectors for RFP-USP1, -USP12 and -USP46 were generated by cloning the PCR-amplified ORFs between XhoI and XbaI sites of the RFP plasmid (11). Catalytically inactive mutants of the USPs were generated by site-directed mutagenesis. All DNA constructs were verified by sequencing. Primer sequences and additional details on the construction of these plasmids can be made available upon request.

Antibodies and Western blotting. Mouse monoclonal antibodies from Sigma-Aldrich were used to detect 3xFlag-tagged proteins (M2-Flag antibody, catalog no. F1804) and β -tubulin (catalog no. T4026). The mixture of two mouse monoclonal antibodies against GFP was purchased from Roche (catalog no. 11814460001) and the mouse monoclonal antibody against RFP was from Abcam (catalog no. AB65856). The HA antibody was purchased from Covance (HA.11 catalog no. MMS-101P). Rabbit polyclonal antibodies against UAF1 were raised by injecting rabbits (Open Biosystems) with a purified C-terminal fragment of UAF1 (aa 400-677) produced in bacteria, as previously described (11). For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, either sheep anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG (both from GE Healthcare, catalog no. NA931 and no. NA934V, respectively), and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Cell culture and transfections. The human cervical carcinoma cell line C33A was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml of penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. For the

selection and growth of stably transfected cell lines, the culture medium was supplemented with 15 µg/ml bleomycin (Bleocin; EMD Millipore catalog no. 203408) for USP-GFP constructs or with 2 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, catalog no. P8833) for shRNA plasmids. Transfection of C33A was performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

Luciferase transient DNA replication assays. The HPV and BPV DNA replication assays were performed as previously described (14, 18). Briefly, C33A cells were plated at a density of 25,000 cells/well in white flat-bottom 96-well plates and transfected 24 h later with a mix of four plasmids: an origin-containing plasmid with a firefly luciferase reporter *in cis* (pFLORI31 or pFLORI-BPV1), a Renilla luciferase plasmid as an internal control (pRL) and the indicated quantities of E1 and E2 expression vectors. For all experiments, the total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 100 ng with the RFP vector as carrier DNA. Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) 48 h posttransfection. When indicated, the assay was performed with a firefly luciferase plasmid lacking the viral origin, or with the Renilla luciferase vector alone, to monitor luciferase expression *per se*, in absence of DNA replication.

Coimmunoprecipitation (coIP) assays. C33A cells were grown on 100-mm plates (approximately 5×10^6) and transfected with the indicated DNA. Cells were harvested 48 h posttransfection in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and the following protease inhibitors: 10 µg/ml antipain, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Cleared cellular extracts were then immunoprecipitated for 3 h with 40 µl protein G-sepharose (GE Healthcare), conjugated to 1 µg of anti-Flag or anti-GFP antibodies. The resin was washed 3 times with TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) and the bound proteins were analyzed by Western blotting.

Protein purification and mass spectrometry analysis. The UAF1 complexes were prepared from cervical C33A cells stably expressing 3F alone or 3F-UAF1. Cell pellets from 10x100-mm dishes (approximately 5×10^7 cells) were lysed in lysis buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and the following protease inhibitors: 10 µg/ml antipain, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin,

1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Lysates were cleared by centrifugation and supernatant were incubated for 1 h with anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich catalog no. A2220) and washed extensively with high salt buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 500 mM NaCl). The coimmunoprecipitated proteins were eluted twice with 150 $\mu\text{g/ml}$ 3F peptide, the eluates were pooled and proteins were TCA-precipitated overnight. Samples were resolved on 4-15% gradient SDS-PAGE, after which silver-stained gel slices were sent for mass spectrometry analysis. Tryptic peptides were identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with microcapillary reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to a 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 used to interrogate the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database or Uniref protein database.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). The ChIP protocol was modified from a previously published procedure (30). C33A cells were plated at a density of 3.6×10^6 cells on 100-mm plates and were transfected 24 h later with the following plasmids: 0.5 μg pFLORI31, 0.1 μg pRL, 1 μg p31E1, 2 μg RFP-E2, 4.4 μg RFP-UAF1 and 4 μg USPs-GFP (or GFP alone). In all experiments, the total quantity of DNA was adjusted to 12 μg with pUC18 as carrier DNA. 24 h posttransfection, cells were cross-linked with 1% formaldehyde, lysed in lysis buffer and sonicated with a CovarisTM S2 to shear the DNA. The lysates were diluted 10-fold in ChIP dilution buffer, and precleared using protein G-sepharose (GE Healthcare catalog no. 16-0618) that was preblocked with 5 mg/ml BSA and 0.5 mg/ml salmon sperm DNA. The lysates (1 million cells per IP) were incubated overnight with the indicated antibodies and protein G-sepharose was added and mixed for 3 h to capture the complexes. The resin was successively washed with the following buffers: Low salt buffer, High salt buffer, LiCl buffer and twice with TE buffer. The immunoprecipitate was recovered by two successive elutions in elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO_3) at 65°C, treated with RNase A and the cross-links reversed by overnight incubation in 0.2 M NaCl at 65°C. The eluates were treated with proteinase K for 1 h at 45°C and DNA was purified using QIAGEN spin columns. The eluates and corresponding input DNA were then analyzed by qPCR, as previously described (30).

Confocal fluorescence microscopy. C33A cells were plated at a density of 6×10^5 cells/well on cover-slips and were transfected 24 h later with the indicated plasmids. 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and their DNA was stained with 1 $\mu\text{g/ml}$ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies catalog no. D1306). Slides were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were collected with a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope and analyzed using the Zen 2009 LE software.

Cell cycle analysis. Cell cycle profiles were obtained by staining live cells 48 h posttransfection with 6.3 $\mu\text{g/ml}$ Hoescht and 50 μM verapamil. Acquisitions were done using a BD LSR flow cytometer, gated on the GFP-positive population. Data analysis was performed using the FlowJo (v.8.1) software.

Colony formation assays. C33A cells ($\sim 1.2 \times 10^6$) were transfected with 1.5 μg of the indicated plasmids in a 6-well plate. 24 h posttransfection, cells were trypsinized and plated on a new dish at a 1/15 dilution in fresh medium. 24 h later, media was replaced for a G418- (500 $\mu\text{g/ml}$) or puromycin- (2 $\mu\text{g/ml}$) containing media and then was changed every 3-4 days for about 3 weeks or until fully resistant cells were selected. Colonies were fixed in cold methanol for 10 min and stained for 2 min at room temperature with methylene blue (1% w/v in 60% Methanol/H₂O).

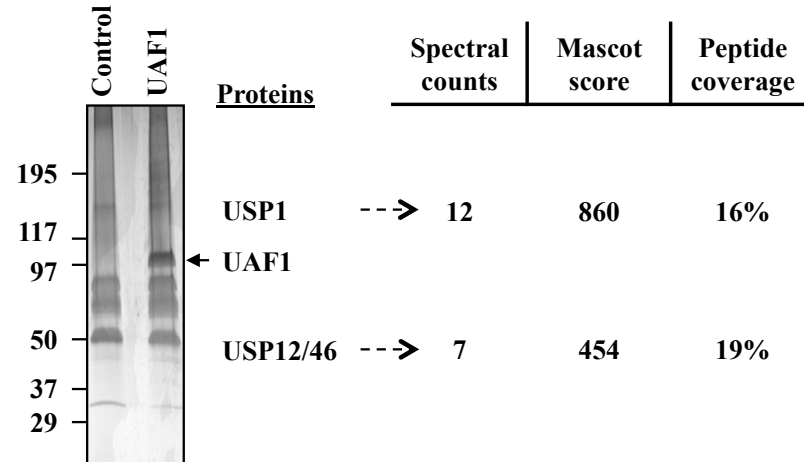
3.3.4 Results

3.3.4.1 UAF1 associates with three members of the USP family in cervical carcinoma cells

We previously showed that the E1-UAF1 interaction is required for efficient HPV31 DNA replication (11, 30). However, the function of UAF1 during the HPV life cycle remains elusive. The absence of any enzymatic activity mediated by UAF1 suggests that it functions by interacting with other cellular proteins. This prompted us to identify novel UAF1 interaction partners from C33A cervical carcinoma cells, a biologically relevant cell line in which all of our previous functional studies on UAF1 were done. In order to do so, affinity purification of UAF1 was performed using a single step

immunoprecipitation approach and interacting proteins were identified by mass spectrometry. Whole cell extracts from a cell line expressing 3xFlag (3F)-tagged UAF1 or 3F alone, used as a negative control, were incubated with a resin covalently linked to anti-Flag M2 antibodies. The immunoprecipitated proteins were then washed and eluted with a 3F peptide. Proteins from the eluate were separated using SDS-PAGE (Fig. 3.1A), from which gel slices were excised for mass spectrometry in order to identify specific interaction partners. Three major proteins, USP1, USP12 and USP46, were identified using this approach, all three showing good spectral counts, Mascot score and peptide coverage as shown in Fig. 3.1A. It is noteworthy that USP12 and USP46 share over 88% amino acids sequence identity and many of their peptides were indistinguishable by mass spectrometry. These interactions were further validated through coIP experiments (Fig. 3.1B). Note that the lack of commercially available antibodies with good enough specificity led us to use GFP-tagged versions of the USPs for the following studies. Briefly, UAF1 was immunoprecipitated from cells cotransfected with 3F-UAF1 and any of the GFP-tagged USPs, using anti-Flag antibodies. A non-relevant protein, USP14, was used as a negative control for interaction specificity. While USP1 was easily detectable using a highly sensitive mass spectrometry approach, coIP was performed in presence of the proteasome inhibitor lactacystin to facilitate detection of USP1, known to be a very labile protein. USP1, USP12 and USP46 interacted with UAF1, while the negative control USP14 did not, therefore showing that UAF1 is capable of assembling *in vivo* in HPV-negative cervical cells with the three deubiquitinating enzymes. Other groups have also previously described a similar UAF1 interaction network in other cellular contexts, substantiating our data (8, 9, 46). Interestingly, orthologs of UAF1, USP12 and USP46 exist in *S. Cerevisiae*, known as Duf1, Ubp9 and Ubp13, respectively. Previous studies showed that both Ubp9 and Ubp13 interact with Duf1, suggesting it is an evolutionarily conserved interaction network within eukaryotes (26).

A.



B.

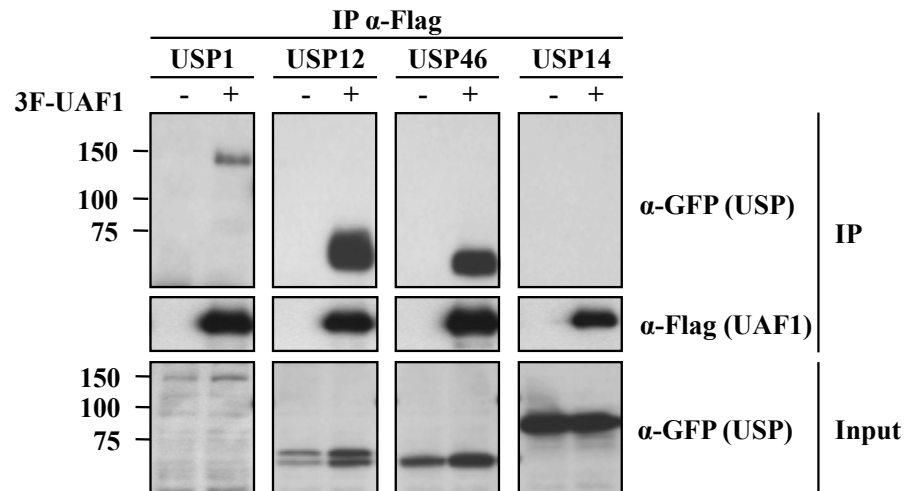


Figure 3.1 Identification of UAF1-interacting proteins

(A) C33A stable cell lines expressing 3F alone (Control) or 3F-UAF1 (UAF1) were subjected to anti-Flag immunoprecipitation. Purified complexes were separated by SDS-PAGE and stained with silver nitrate, after which gel slices were excised and sent for LC-MS/MS analysis. The major identified proteins are indicated to the right with their respective spectral counts, Mascot score and peptide coverage. USP12 and USP46, two proteins with high sequence identity, were often co-detected and are indicated together in the figure. (B) CoIP of 3F-UAF1 with GFP-tagged USP1, USP12, USP46 or USP14. Cells were transfected with the indicated expression vectors and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-GFP (for USPs) and anti-Flag (for UAF1) antibodies. Cells transfected with USP1 expression plasmids were treated for 24 h with 10 μ M Lactacystin prior to cell lysis. USP14 was used as a negative control. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least two independent experiments with similar results.

3.3.4.2 UAF1 interacts with USP12 and USP46 through its N-terminal WD40 motif

To investigate the structure-function relationship of UAF1, we sought to identify which region of UAF1 was required to interact with the USPs. Multiple expression vectors encoding truncated variants of UAF1 were generated, either containing the WD repeats motif or the C-terminal SLD (Fig. 3.2A). We previously observed that UAF1 is an essential gene (data not shown and Fig. 3.5), which is consistent with the fact that deletion of UAF1 is embryonically lethal in mice (38). We first aimed to determine if overexpression of these truncations would act as a dominant-negative UAF1 mutant in regard to cellular proliferation. We reasoned that truncated UAF1 proteins might interact only with a subset of native UAF1 interaction partners and thus prevent cell processes normally regulated through UAF1. UAF1 truncations were expressed in C33A cells and a colony formation assay was performed to monitor cellular proliferation and survival. As shown in Fig. 3.2B, none of the truncation mutants induced a defect in cellular proliferation, thus suggesting that none of the deleted fragments is dominant-negative for cell growth.

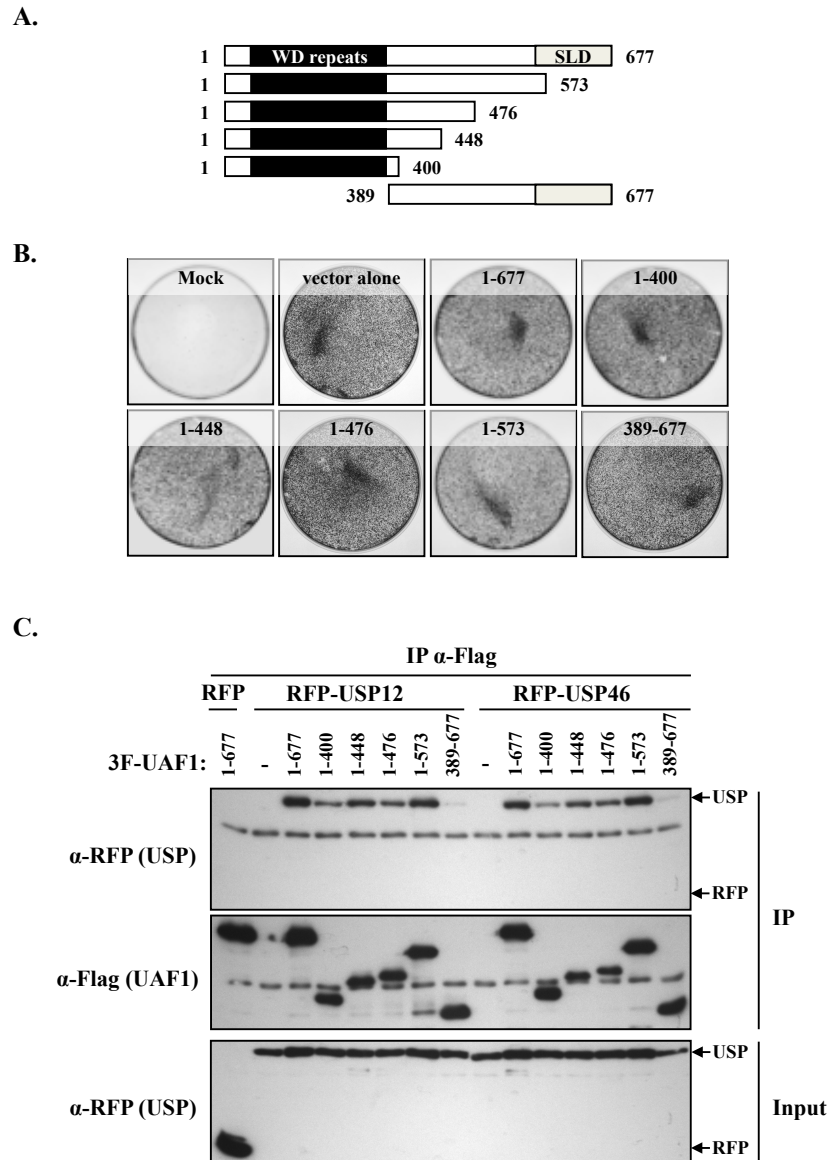


Figure 3.2 UAF1 WD40 repeats are required for interaction with USP12 and 46

(A) Schematic representation of UAF1 truncations. The WD40 repeats of UAF1 are represented by black boxes and the sumo-like domain (SLD) is represented by grey boxes. (B) Colony formation assay. C33A cells were transfected with the indicated vectors encoding UAF1 truncations and then selected for approximately 3 weeks in G418-containing media. Colonies were then fixed with methanol and stained with methylene blue. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) CoIP mapping assay. The indicated 3F-UAF1 truncations were expressed in C33A cells together with RFP-USP12 or RFP-USP46, and immunoprecipitated using anti-Flag antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-GFP (for USPs) and anti-Flag (for UAF1) antibodies. The expected molecular weights of USP and RFP are indicated by arrows on the right. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

The interaction of each of the USPs was then mapped on UAF1. Since the USP1-binding motif was previously located to the N-terminal WD40 repeats of UAF1 (9), we performed similar mapping experiments with USP12 and USP46. To do so, the same series of UAF1 truncations were cotransfected with RFP-USP12 or RFP-USP46 fusions and coIP experiments were performed to assess their capacity to interact. As shown in Fig. 3.2C, interaction of USP12 and USP46 with UAF1 required most of the UAF1 N-terminal domain, again encompassing the WD40 motif. Specifically, the 1-573 domain elicited a robust interaction with the USPs, while the shorter fragments, such as the 1-400 domain, showed weaker binding. Conversely, the C-terminal 389-677 construct, containing the SLD domain, was unable to interact with the USPs. This suggests that UAF1 interaction with any of its associated USPs requires the UAF1 N-terminus, including the WD40 repeats. Previously published data suggested that UAF1 associates with the three USPs as distinct, mutually exclusive, binary complexes. Hence, it is not surprising that the three USPs use a similar interaction region (8). The requirement of the whole N-terminal WD40 repeats domain for interaction of UAF1 with the USPs is reminiscent of the minimal interaction domain with HPV E1 we previously characterized (30). Also, since most of the presently known functions of UAF1 are restricted to the N-terminal region, it explains why none of the UAF1 truncations exhibited a dominant-negative phenotype.

3.3.4.3 HPV E1 simultaneously recruits UAF1 and USP1, USP12 or USP46

We demonstrated that UAF1 relies on its WD40 domain to interact with both HPV E1 and the USPs. These findings raised the question as to whether USP1, USP12 and USP46 compete with E1 for binding to UAF1 or, alternatively, if these proteins interact simultaneously, for instance as a ternary complex. To test this, E1 was immunoprecipitated using anti-GFP antibodies using cells overexpressing the three proteins under study (YFP-E1, 3F-UAF1 and one of the USPs in fusion with RFP) (Fig. 3.3A). Results presented in figure 3.3A show that E1 does not compete with the USPs for binding with UAF1 but, rather, can assemble simultaneously with UAF1 and either USP1, USP12 or USP46. Also, an E1 mutant protein defective in UAF1-binding (V20A/E21A or VE) simultaneously failed to efficiently interact with UAF1 and the

USPs. The fact that point mutations abrogating UAF1-binding also interferes with USP interaction suggests that E1 assembles as a ternary complex with UAF1 and with the USPs, a process requiring UAF1 as a bridging subunit. Further investigation is however required to rule out the possibility that E1 could form two distinct binary complexes with UAF1 and the USPs. Moreover, the catalytic activity of the USPs is not required for interaction since mutating the catalytic cysteines of the USPs had no effect on interactions with UAF1 and E1 (data not shown).

Next, we verified the subcellular localization of the three USPs, when expressed alone. USP1 was exclusively localized to the nucleus (Fig. 3.3B), which is consistent with previous reports (19, 37). To our knowledge, the localization of USP12 and USP46 had not been clearly established in the literature, except for one report suggesting USP46 to be cytoplasmic and to partially localize into cytoplasmic foci (29). Through confocal microscopy, both USP12 and USP46 were detected in the cytoplasm when transfected alone (Fig. 3.3B). This observation led us to investigate the localization of USP12 and USP46 in E1-expressing cells, in which we previously showed UAF1 to be relocated from the cytoplasm to the nucleus (11). To do so, protein localization was visualized through confocal microscopy in cells in which GFP-E1 was cotransfected with either RFP-USP12 or RFP-USP46, along with 3F-UAF1. USP12 and USP46 were found completely relocated to the nucleus in E1 WT-expressing cells, with a perfect subcellular colocalization (Fig. 3.3C). Conversely, transfection of E1 proteins harboring the VE aa substitutions did not change the localization of USP12 or USP46, and they remained completely cytoplasmic. In an attempt to validate our findings, we extended those experiments to the other known E1 mutants (WF and VI), defective for UAF1-binding, and observed a similar incapacity to relocate USP12 and USP46. The fact that any aa substitutions in E1 affecting UAF1-binding also abolish the relocation of the USPs supports the model that E1, UAF1 and the USPs (1, 12 or 46) assemble *in vivo* as a ternary complex that is dependent upon the capacity of E1 to bind UAF1.

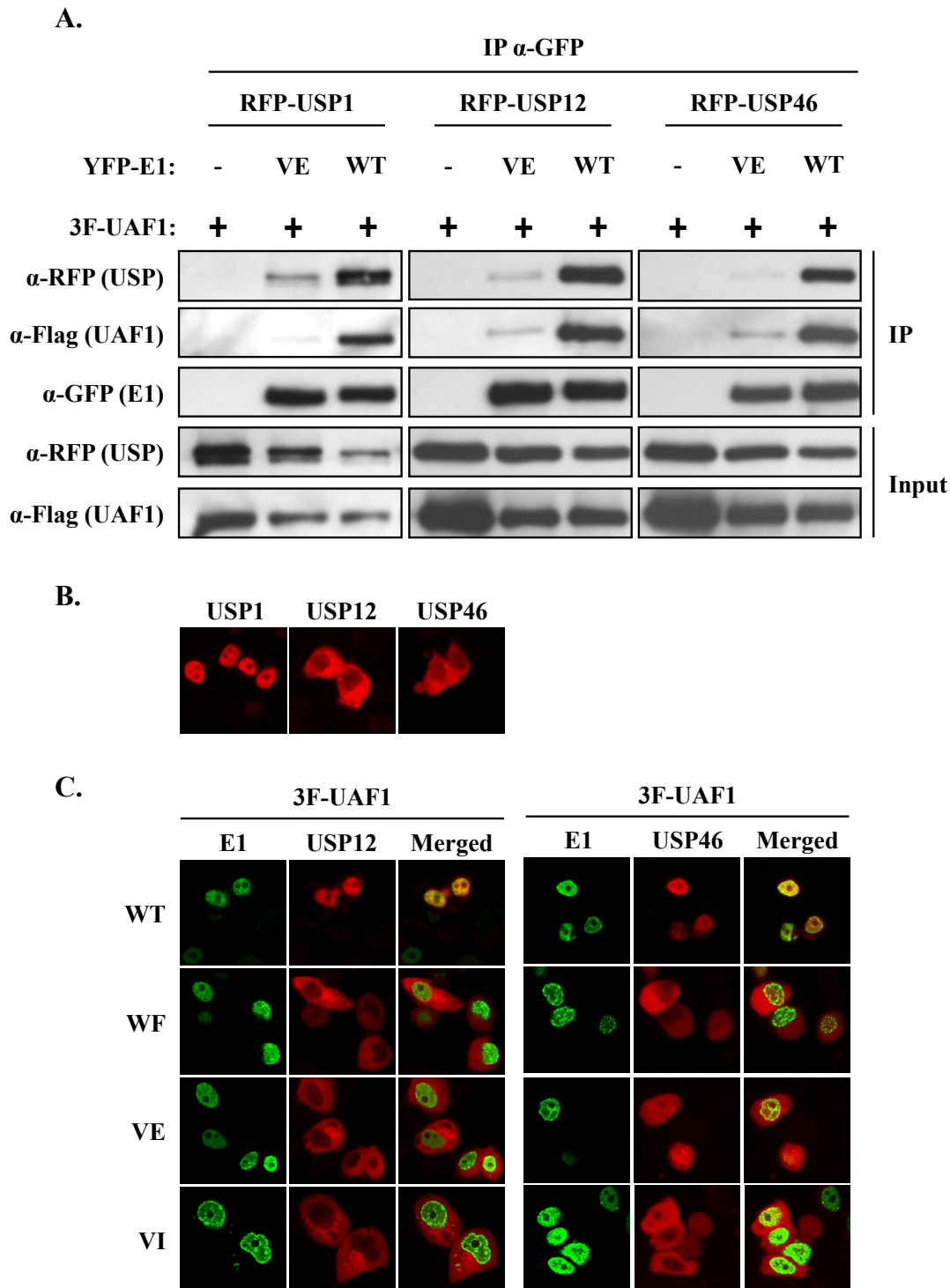


Figure 3.3 HPV31 E1 assembles as a ternary complex with UAF1 and USP1, USP12 or USP46

(A) CoIP of YFP-E1 with 3F-UAF1 and RFP-USP1, -USP12 or -USP46. Cells were transfected with the indicated expression vectors and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies. The UAF1-binding defective YFP-E1 VE

was used as a negative control. The immunoprecipitates were analyzed using anti-RFP (for USPs), anti-Flag (for UAF1) or anti-GFP (for E1) antibodies. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least two independent experiments with similar results. (B-C) Fluorescence confocal microscopy images showing the subcellular localization of the indicated RFP-USPs alone (B) or when coexpressed with 3F-UAF1 and GFP-E1 (C). UAF1-binding defective E1 mutant proteins (WF, VE or VI) were used as negative controls. Nuclei were stained with DAPI. Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

3.3.4.4 The UAF1-associated deubiquitinase complex is recruited to the viral origin

We previously demonstrated using ChIP that UAF1 is relocalized to the viral origin by E1 (30). This prompted us to investigate if the deubiquitinase complex associated with UAF1 was also physically recruited onto the viral DNA. ChIP assays were performed in cells transfected with vectors encoding E1 and E2, as well as a plasmid containing the viral origin, under conditions similar to those used in DNA replication assays. HPV E1 was immunoprecipitated using anti-Flag antibodies and the quantity of coimmunoprecipitated ori plasmid was determined by qPCR. First, the results confirmed that overexpression of the various USPs-GFP had no significant effect on the capacity of E1 to associate with the viral DNA, as compared to GFP expression alone (Fig. 3.4A). Also, the E1 mutant protein VE, defective in UAF1-binding, was found to be as effective as E1 WT to assemble onto the viral DNA. As expected, the E1 protein harboring a mutation within the origin-binding domain (OBD) was defective for DNA-binding. As a specificity control, we assessed that no significant ori enrichment was detected when using the isotype-matched irrelevant anti-HA antibodies.

Next, USP proteins were individually immunoprecipitated using GFP antibodies and the resulting immunoprecipitates were probed for the presence of viral DNA by qPCR. The ori plasmid was significantly enriched in USP12 and USP46 immunoprecipitates from cells expressing E1 WT (Fig. 3.4B). No ori enrichment was observed in the non-relevant USP14 or GFP alone (-) immunoprecipitates. USP1 was also enriched on the viral DNA but rather modestly, which may be explained by the fact that USP1 is very unstable. We would have liked to investigate USP1 enrichment on the viral DNA using lactacystin treatment, similarly to conditions used in Fig. 3.1B, but proteasome inhibition is well known to affect other components of the pre-replisome, such as E2,

that could have indirectly biased our observations. Interestingly, no enrichment of the viral origin was found when immunoprecipitating the USPs in the presence of UAF1-binding defective E1 VE proteins (Fig. 3.4C), therefore confirming that E1-USP interaction requires an intact UAF1-binding domain in E1 and argue in favour of the formation of a ternary E1-UAF1-USP complex. The fact that E1 VE successfully binds to the origin, but does not recruit the USPs, also suggests that UAF1 and the USPs are not required for the assembly of the E1-E2-Ori complex. Altogether, we showed that E1 specifically recruits USP1, USP12 and USP46 to the viral origin through a mechanism that requires an intact UAF1-binding motif in E1.

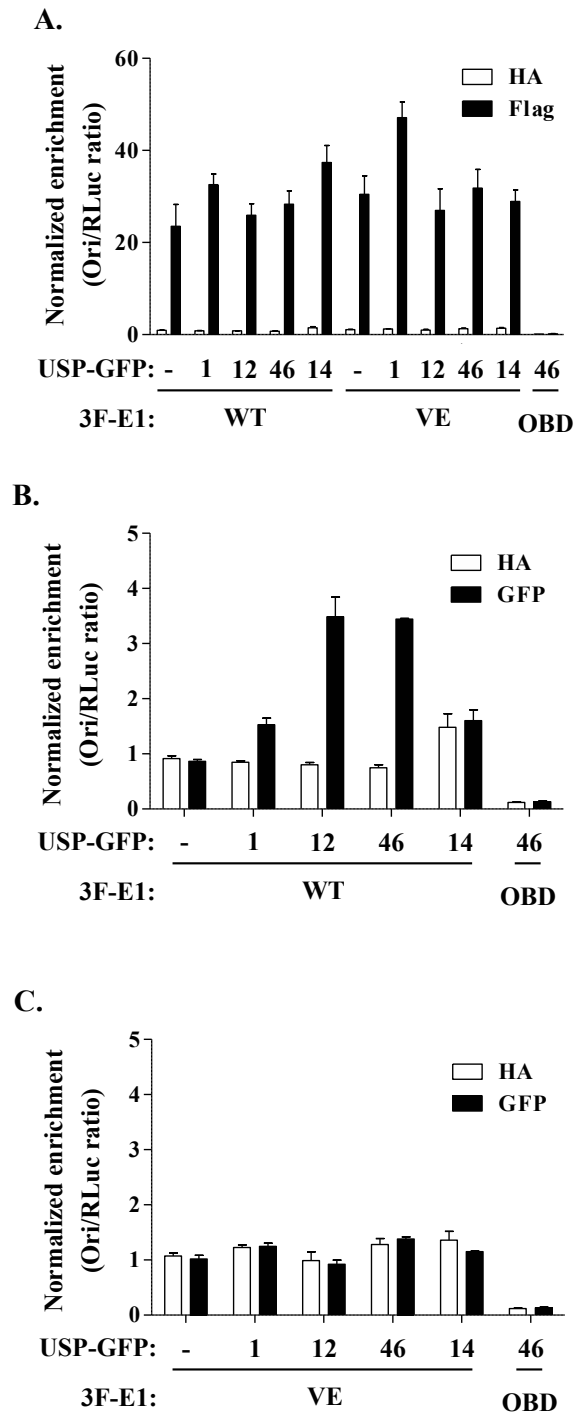


Figure 3.4 HPV E1 recruits USP1, USP12 and USP46 to the viral origin

(A-C) ChIP assays were performed in C33A cells cotransfected with 3F-E1 (WT or VE mutant), RFP-E2, RFP-UAF1, USP-GFP (1, 12, 46 or 14) expression vectors or GFP alone (-), together with a plasmid containing the viral origin and the Rluc vector as an internal control. Equal quantities of cell lysates were immunoprecipitated with the indicated antibodies (HA, Flag or GFP). HA antibodies were used as a negative control. Ori enrichment levels determined by qPCR are shown after normalization to

input DNA, using the internal control pRI (RLuc). Each value represents the average of three replicates, with standard deviations presented as error bars. Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

3.3.4.5 UAF1 and USPs expression is required for cell proliferation

Our previous results then led us to speculate if UAF1-USPs recruitment to the viral origin was important for HPV DNA replication. To evaluate the direct requirement for UAF1 or USP expression during viral DNA synthesis, we wished to determine the effect of depleting these proteins by an RNA interference approach (shRNA) in our luciferase-based transient DNA replication assay. However, a pre-requisite for these studies is that depletion of these proteins does not impair cellular proliferation, as any block in cell cycle progression outside of S-phase would indirectly reduce viral DNA replication. To test the feasibility of these experiments, we screened a panel of shRNAs for those that could efficiently downregulate the expression of USP1, USP12 and USP46 (data not shown) and tested the most active ones for their effect on the proliferation of C33A cells in a colony formation assay. These studies led to the identification of three functional shRNAs against USP1 (USP1-B, -C and -E), one against USP12 and one against USP46, which, unfortunately, all reduced colony formation as compared to the control shRNA (Fig. 3.5A). We also included in this analysis a validated shRNA against UAF1 and, as a control, a negative version of this shRNA containing three point mutations in its UAF1 targeting sequence, therefore rendering it unable to knockdown UAF1. Consistent with the results obtained by depletion of the USPs, down-regulating the expression of UAF1 also impaired colony formation (Fig. 3.5A). This phenotype was reproduced in several other human cell lines (data not shown).

To determine if the deleterious effect of these shRNAs was associated with specific defect in cell cycle progression, they were transfected into C33A cells together with a GFP-expression plasmid to facilitate identification of the transfected cells. Transient knockdown of USPs or UAF1 in cells resulted in an abnormal cell cycle profile with an accumulation in the G2/M phase, especially under UAF1 and USP46 knockdown conditions (Fig. 3.5B-C, and quantified in Table 3.1); these results may in part explain the observed cell growth defect. The milder effect of USP12 knockdown is consistent with its lower growth-inhibitory activity observed in colony formation assays (Fig.

3.5A). Collectively, these data suggest that UAF1, USP1, USP46 and, to a lesser extent, USP12 are required for normal cell cycle progression, most likely to facilitate progression through G2/M. Although these findings revealed an important role for UAF1 and associated USPs in cellular proliferation, they also precluded the use of shRNAs against these proteins to assess their role in HPV DNA replication.

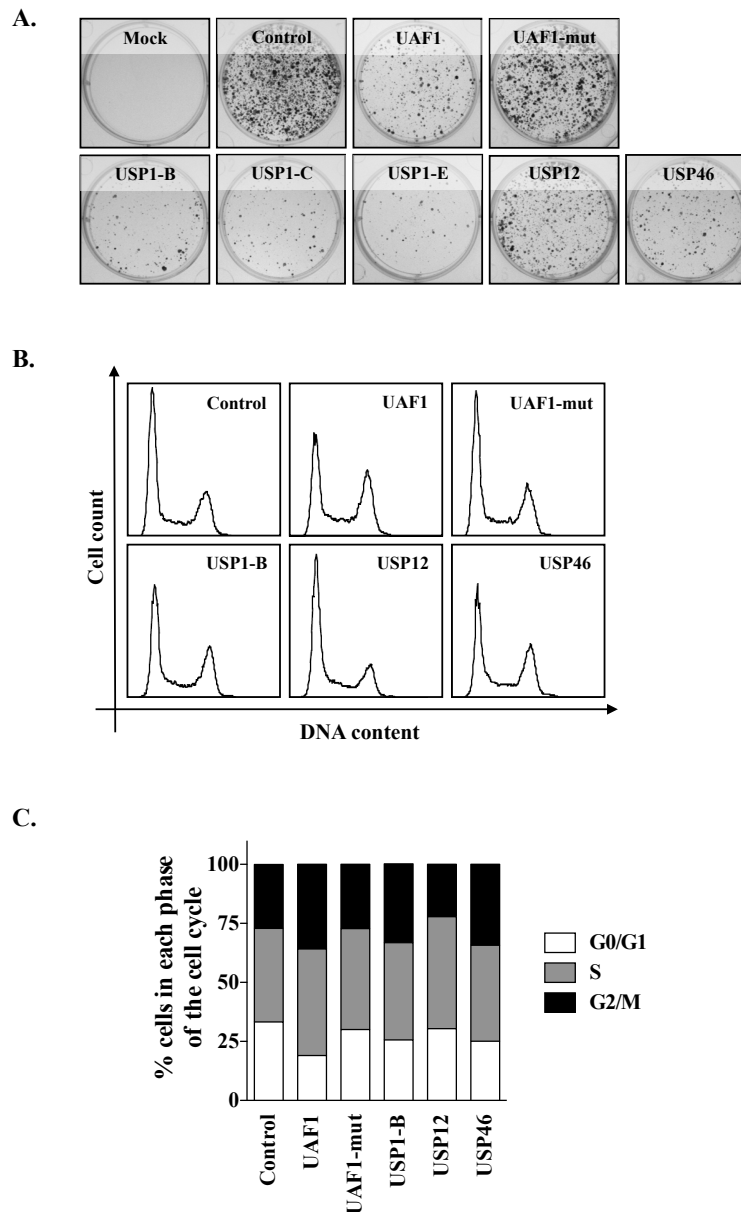


Figure 3.5 shRNA-mediated knockdown of UAF1, USP1, USP12 or USP46 inhibits cell proliferation

(A) Colony formation assay. C33A cells were transfected with the indicated shRNA expression vectors and then selected for approximately 3 weeks in puromycin-containing media. Colonies were fixed with methanol and stained with methylene blue. Data are representative of four independent experiments with similar results. (B) Cell cycle analysis. C33A cells transiently expressing the shRNAs against the indicated targets were trypsinized 72 h posttransfection, their DNA was then stained with Hoechst and analyzed by flow cytometry. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) Cell cycle distribution presented in B was quantified using the ModFit LTTM software and is graphically presented.

Table 3.1 Cell cycle distribution of shRNA-expressing cells

shRNA	% cells		
	G0/G1	S	G2/M
Control	33.3	39.6	27.1
UAF1	19.0	45.2	35.8
UAF1-mut	30.0	42.8	27.2
USP1-B	25.6	41.2	33.4
USP12	30.4	47.4	22.2
USP46	25.1	40.6	34.3

3.3.4.6 USPs enzymatic activity is required for efficient HPV DNA replication

To overcome the problem brought about by UAF1 or USPs knockdown, we aimed to specifically inhibit USPs functions without affecting cell proliferation. USPs are cysteine proteases with a well-defined structural organization, including a Cys box that contains the catalytic cysteine required for its deubiquitinase activity. Primary sequence alignment of the three USPs is presented in Fig. 3.6A, where the Cys box is highlighted in black and the catalytic cysteine is indicated by an arrow. These cysteines were mutated to serines in the expression vectors encoding the USPs, as this mutation has previously been shown to inactivate their enzymatic activity (8, 37, 40, 48). We thus hypothesized that overexpression of catalytically inactive USP1 (C90S), USP12 (C48S) and USP46 (C44S) might be a good approach to probe the function of these enzymes in HPV DNA replication. The catalytically inactive (CI) USPs, or USPs-CI, displayed appropriate expression levels at the expected molecular weight (Fig. 3.6B). We then tested the effect of their overexpression on cell proliferation. First, we observed that none of the USPs-CI could induce visible effects on the colony formation capacity of the C33A cells (Fig. 3.6C), unlike what we had seen using the shRNAs. Consistent with this result, no significant effect on the cell cycle profile was apparent in cells transiently overexpressing the individual USPs-CI as compared to GFP vector alone (Fig 3.6D-E; note that this analysis was performed with fusions of the inactive USPs to GFP, rather than RFP, because the increased brightness of GFP makes it a better reagent for flow-cytometry). We therefore envisioned USP-CI overexpression as a potential and valuable

tool to specifically study the requirement or the USPs catalytic activities during HPV life cycle without disrupting cell proliferation.

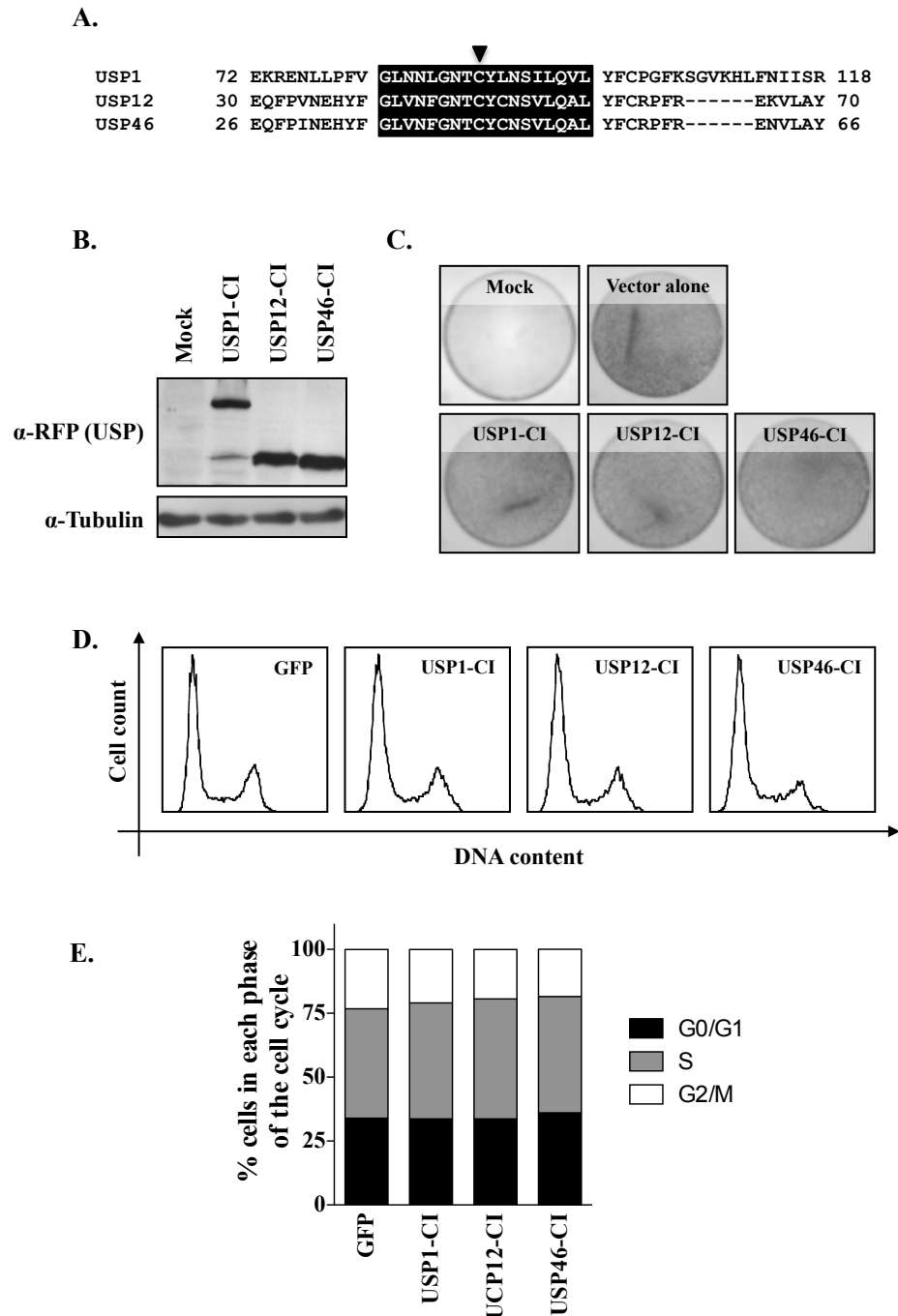


Figure 3.6 Overexpression of catalytically inactive versions of USP1, USP12 or USP46 does not inhibit cell proliferation

(A) Primary sequence alignment of a short region of USP1, USP12 and USP46. The conserved cysteine boxes and the catalytic cysteines, that were mutated to serine residues in the catalytically inactive (CI) variants, are indicated by a black rectangle and an arrow, respectively. (B) Anti-RFP Western blot showing the relative expression of the different USP-CI constructs. β -Tubulin was used as a loading control. (C) Colony formation assay. C33A cells were transfected with the indicated vectors encoding the

USPs-CI and then selected for approximately 3 weeks in G418-containing media. Colonies were fixed with methanol and stained with methylene blue. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (D) Cell cycle analysis. C33A cells transiently expressing the USPs-CI were trypsinized 48 h posttransfection, their DNA was then stained with Hoechst and analyzed by flow cytometry. (E) Cell cycle distribution presented in D was quantified using the ModFit LT™ software and is graphically presented.

To determine the involvement of the USPs in DNA replication, increasing amounts of each USP-CI were transfected in a luciferase-based HPV31 DNA replication assay (14). We reasoned that overexpression of the catalytically inactive USPs would compete for the recruitment of active endogenous USPs on the viral DNA and thus would inhibit their activities at the replisome. Strikingly, all three USPs-CI inhibited HPV DNA replication in a dose-dependent manner and with various potencies (inhibition efficiency: USP1-CI > USP46-CI > USP12-CI) (Fig. 3.7A). Interestingly, USP1-CI showed the highest inhibitory activity, even if its expression was lower (Fig. 3.6B), and reduced replication levels to about 30% of control levels. Under the same conditions, USP12-CI and USP46-CI inhibited DNA replication by about 40% and 60%, respectively. To validate that this inhibition was directed against viral DNA replication *per se*, and was not due to collateral effects on luciferase expression, the luciferase assay was repeated in the same conditions with the exception of a luciferase expression plasmid lacking the HPV origin. As such, the luciferase signal originating from this assay is independent from viral DNA replication and only reflects overall cellular fitness in regard to the expression of the CMV-driven reporter. As expected, expression of the various USPs-CI had no effect on the capacity of the cells to express luciferase (Fig. 3.7B). In order to confirm that the inhibition presented above was specific to E1-UAF1-mediated recruitment of the USPs-CI, we performed an additional control with the use of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 protein that we previously reported defective in UAF1-binding (11). The effect of the USPs-CI was tested in a BPV DNA replication assay as previously described (18), where replication is expected to be USP-binding independent. As anticipated, none of the USPs-CI had any visible inhibitory effect during BPV DNA replication (Fig. 3.7C). Collectively, these results suggest that the enzymatic activity of USP1, USP12 and/or USP46 facilitates HPV DNA replication.

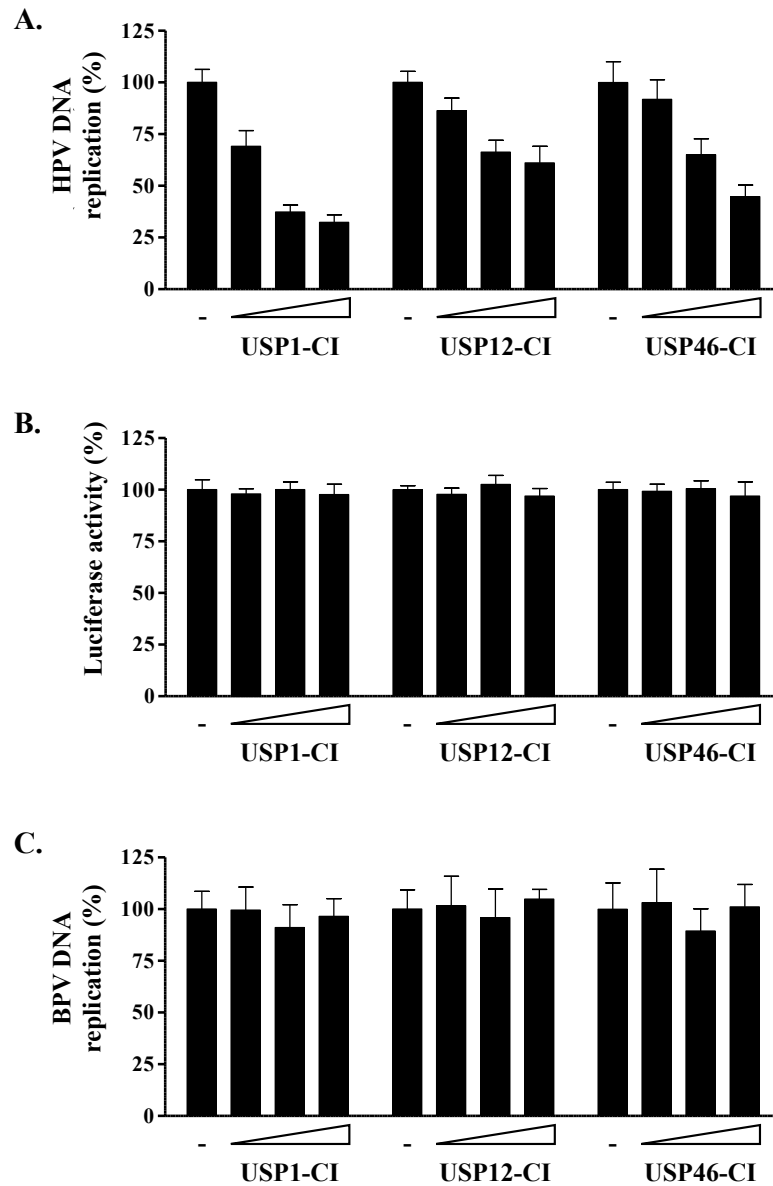


Figure 3.7 USPs-CI specifically inhibit HPV DNA replication

(A) HPV DNA replication levels in cells expressing a gradient of USP1-CI, USP12-CI or USP46-CI (8.75, 37.7 or 75 ng of USP-CI expression vectors). Cells cotransfected with the empty RFP vector were used as a negative control (-). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with the negative control. Each value represents the average of at least three independent experiments, each performed in triplicate, with standard deviations presented as error bars. (B) Effect of USPs-CI on the expression of Fluc. The experiment was performed similarly as in panel (A) using a Fluc reporter plasmid lacking the viral origin. (C) Effect of USPs-CI on BPV DNA replication. The experiment was performed similarly as in panel (A) using a BPV DNA replication assay.

3.3.4.7 Inhibition of HPV DNA replication by catalytically inactive USP1, USP12 and USP46 requires the UAF1-binding site in E1.

From results presented above, we surmised that the catalytically inactive USPs were inhibiting HPV DNA replication by competing with the endogenous enzymes for binding to UAF1. In support of this model, we found that the USP-CI enzymes could indeed bind to UAF1 in coIP experiments similar to those presented in Fig. 1A (data not shown). In an attempt to test this model further, however, we wished to examine the effect of the USP-CI enzymes on HPV DNA replication catalyzed by a mutant E1 lacking the UAF1-binding site. Our previous publication showed that an E1 protein carrying a deletion of its first 40 aa (E1 Δ), and thus lacking the UAF1-binding motif, had a reduced replication capacity, showing approximately 20% of the full-length protein levels (E1 WT) (schematized in Fig. 3.8A) (14, 30). We reasoned that if residual replication activity of E1 Δ is UAF1-USP-binding independent, it should not be affected by USPs-CI overexpression. This assumption was tested by measuring the effect of the USP-CI enzymes on HPV DNA replication catalyzed by E1 WT or E1 Δ , in side-by-side comparisons. As hypothesized, while overexpression of increasing amounts of the individual USP-CI led to a dose-dependent inhibition of HPV E1 WT, little to no inhibition was observed in the context of E1 Δ replication (Fig. 3.8C-D). Altogether, these results support the hypothesis that the catalytic activities of one or many of the USPs (USP1, USP12 and USP46) are required for HPV DNA replication, and the E1-encoded UAF1-binding peptide is necessary for proper recruitment and function of these USPs.

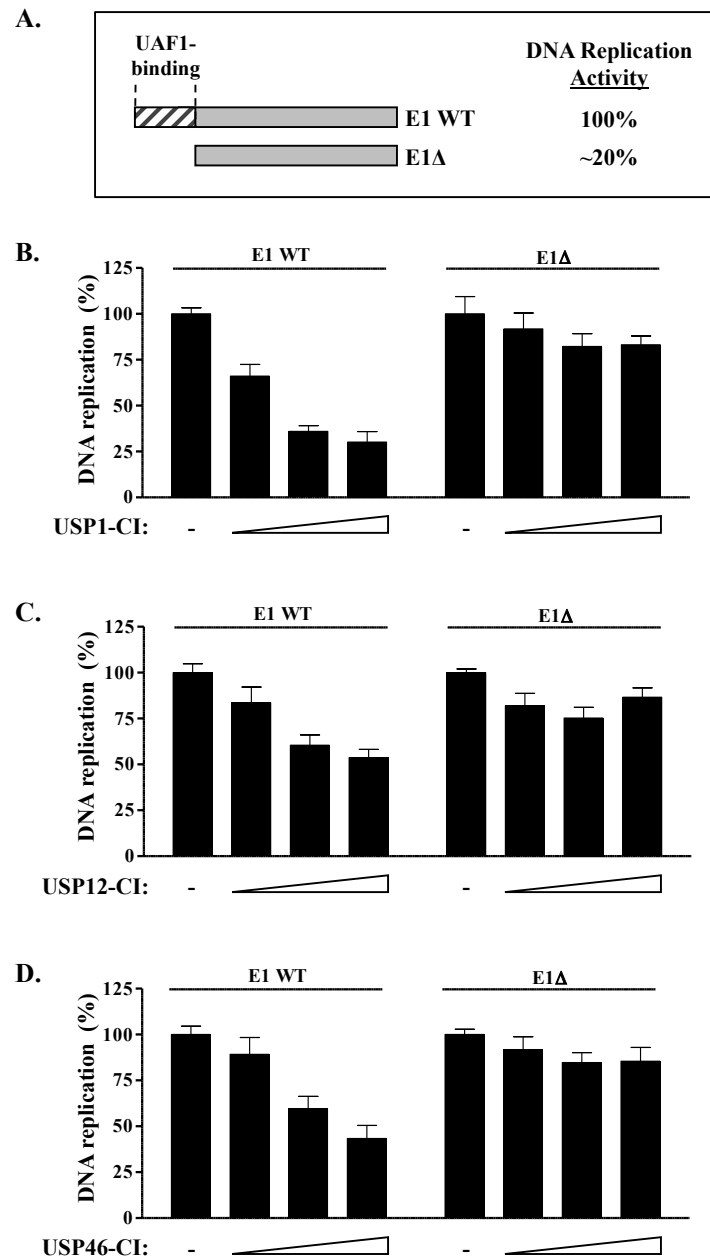


Figure 3.8 USP-CI-mediated inhibition of HPV DNA replication is UAF1-binding dependent

(A) Schematic representation of HPV31 E1 full length protein (E1 WT) or of an E1 protein lacking its first 40 aa encoding the UAF1-binding motif (E1Δ). Relative DNA replication activity for these two constructs is indicated to the right. (B-D) Effect of USPs-CI overexpression on HPV DNA replication using E1 WT or E1Δ. The effect of the three USP-CI proteins was tested: USP1-CI (B), USP12-CI (C) or USP46-CI (D). A gradient of USP-CI (8.75, 37.7 or 75 ng of USP-CI expression vector) was transfected in the replication assay. Cells cotransfected with the empty RFP vector were used as a negative control (-). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with the negative control. Each

value represents the average of three independent experiments, each performed in triplicate, with standard deviations presented as error bars.

3.3.5 Discussion

We previously reported that the interaction of HPV E1 with the cellular protein UAF1 is required for optimal transient HPV DNA replication and long-term maintenance of the viral episome in undifferentiated keratinocytes (11, 30). UAF1 has no known enzymatic activity but was previously found to interact with the DUBs USP1, USP12 and USP 46 (8, 9), findings that we have independently confirmed in this study in C33A cells. Our results indicate that HPV E1 interacts simultaneously with UAF1 and any of the USPs used in this study: USP1, USP12 or USP46. Similarly, we observed that USP12 and USP46, which like UAF1 are located predominantly in the cytoplasm, can be relocalized to the nucleus by E1, provided that the UAF1-binding site on E1 is intact. ChIP experiments further demonstrated that USP1, USP12 and USP46 are recruited to the viral DNA by E1 in a UAF1-binding motif-dependent manner. Collectively, these lines of evidence indicate that UAF1 and the USPs are loaded *in vivo* on the viral DNA, presumably through the assembly of an E1-UAF1-USP ternary complex. As for the architecture of these complexes, we surmise that UAF1 act as a bridge between E1 and the USPs since mutation of the UAF1-binding site in E1 abolishes its interaction with USP1, USP12 and USP46. It is however difficult to completely rule out the possibility that the same binding site in E1 could be used to separately interact with UAF1 and the USPs ; sequential or reverse co-immunoprecipitation would be a useful mean to evaluate this possibility. The fact that UAF1 and the USPs interact directly *in vivo*, however, supports the model that a single E1 molecule associates simultaneously with a UAF1-USP heterodimer.

To address the role of these deubiquitinase complexes in HPV DNA replication, we opted to downregulate their expression by RNA interference and, in separate experiments, to antagonize their function by overexpression of catalytically inactive enzymes. We observed that shRNA-mediated depletion of USP1, USP12 or USP46 is deleterious to cellular proliferation and/or survival, similarly to what we obtained by depleting UAF1. This effect is consistent with the previous observations that UAF1 or

USP1 knockout mutations are embryonically or perinatally lethal in mice, respectively (27, 38). However, overexpression of catalytically inactive versions of the USPs was well tolerated in cells. We find intriguing that depletion of any of the USPs leads to a phenotype more severe than the one obtained by simply inactivating them. A possibility remains that the USPs mediate deubiquitinase-independent activities, left unaffected by mutating the catalytic site. It is also possible that the endogenous USPs, still expressed in USP-CI expressing cells, are sufficient to attenuate the detrimental effects of USP-CI on cells. Regardless of the explanation, the fact that USPs-CI overexpression did not affect cellular functions such as viability, proliferation or cell cycle progression made them useful tools to investigate the roles of USP1, USP12 and USP46 in transient HPV DNA replication. Strikingly, overproduction of catalytically inactive versions of the USPs strongly inhibited HPV DNA replication, but not replication mediated by E1 proteins unable to interact with UAF1-USPs, such as BPV E1 or HPV E1 lacking its UAF1-binding motif (E1 Δ). Interestingly, the maximal effect of USP-CI on HPV DNA replication reached approximately 70% of inhibition. This is consistent with previous evidences using E1 mutant proteins defective for UAF1-interaction or competition with a UAF1-binding peptide where we reached a similar reduction of viral DNA replication, without ever reaching 100% inhibition (11, 30). These results suggested that the effect of the USP-CI enzymes was mediated through their association with UAF1 bound at the N-terminus of E1. Accordingly, we observed that the low levels of DNA replication supported by E1 Δ , which lacks the UAF1-binding site, were resistant to USP-CI inhibition. Collectively, these findings provided strong evidence that one or more UAF1-USP deubiquitinase complex is actively involved in HPV DNA replication.

We repeatedly observed that USP-CI-mediated inhibition of HPV DNA replication occurred with variable potencies depending on the nature of the USP. Intriguingly, USP1-CI is the most potent inhibitor of HPV DNA replication even though it displayed the lowest protein expression as compared to USP12 and USP46. This may be the result of USP1 localization to the nucleus, since it encodes its own NLS (19), while USP12 and USP46 are found in the cytoplasm at basal state (Fig. 3.4B). USP1-CI possibly accumulates to higher levels in the nucleus, where HPV DNA synthesis occurs, and therefore inhibits replication more efficiently. Alternatively, it is well established that USP1 is a very unstable enzyme regulated by auto-cleavage and, accordingly, that

mutation of its catalytic cysteine to serine (as done in this study) greatly increases its steady-stage accumulation (22). As such, the more stable USP1-CI may be particularly efficient at competing with the low levels of endogenous enzyme. Finally, it is also possible that USP1 is the preferred interaction partner of E1 *in vivo*, as compared to USP12 and USP46, and would signify that USP1 is more relevant to HPV DNA replication. To investigate this possibility, we tested the recently described USP1 inhibitor, pimozide, which is reported to selectively inhibit USP1 but not the other USPs (5). Unfortunately, addition of pimozide in the transient HPV DNA replication assay (even at high doses) did not lead to any significant inhibition of viral DNA replication (data not shown). However, pimozide elicited only modest *in vitro* inhibitory potential of USP1 with an IC₅₀ in the micromolar range (5) and could explain the absence of an effect in our cell-based assay.

It is striking that overexpression of any of the USPs-CI led to inhibition of HPV DNA replication, even though we do not infer that all three USPs are equally functionally relevant during HPV life cycle. Our assays were performed under overexpression conditions and it is well established that USP1-, USP12- or USP46-binding to UAF1 is mutually exclusive (8). Hence, it is not surprising that overexpression of any of the USPs would exclude the *bona fide* USP(s) from the viral replisome, those being required for HPV DNA replication *in vivo*. We wished to identify which of the USPs is enriched endogenously on the viral episome and whose activity is required, but we were limited in our studies by the lack of USP antibodies that are specific enough for ChIP or immunofluorescence experiments. Moreover, HPV DNA replication occurs during the S-phase of the cell cycle and we previously showed that interfering with cellular proliferation using small molecule inhibitors non-specifically affects viral DNA replication (14). Therefore, shRNA-mediated depletion of the USPs, which gave rise to alterations in the cell cycle profile, would likely indirectly affect HPV DNA replication and thus limits the potential of this approach to study the role of the USPs during HPV life cycle.

Although the exact mechanism by which UAF1-USP complexes facilitate HPV DNA replication remains uncertain, we can discuss some possibilities based on our current knowledge of the endogenous functions of the USPs. The three USPs have been involved in the regulation of the stability of various proteins, including the glutamate

receptor (GLR-1), the inhibitors of DNA binding (ID) and the phosphatase PHLPP1 (4, 29, 31, 50), in both proteasome-independent and -dependent manners. On the basis of these observations, it is tempting to speculate that one of these UAF1-USP complexes is recruited to the viral origin in order to modulate the stability of replisome components. The viral helicase E1 itself would be a good candidate to act in such a regulatory mechanism that would determine the abundance of the active E1 hexamers and/or could facilitate unloading of the E1 monomers after one round of replication. It has been previously shown that polyubiquitination and instability of BPV E1 is induced during replication (in the presence of the ori and E2), suggesting that it plays a regulatory role during or at the end of replication (33, 35). A similar ubiquitination-dependent regulatory mechanism has previously been described for the eukaryotic DNA helicase MCM2-7, whose MCM-3 and -7 subunits are polyubiquitinated and degraded by the proteasome (3, 6). This process is thought to be required for accurate and timely assembly of the cellular replisome and for preventing new rounds of replication. However, similar evidences of HPV E1 ubiquitination remain to be discovered. It is also possible that the substrate(s) recognized by UAF1-USP during HPV DNA replication is one of the other host factors enriched at the origin. Notably, cellular factors such as PCNA, FANCD2 and histones H2A or H2B have been reported as substrates of the UAF1-USP complexes (22, 24, 28). The nature of the DUB substrates and the endogenously relevant USP(s) implicated during HPV life cycle remain to be clearly assessed and is the subject of ongoing investigations.

In this study, we have provided evidence that the cellular deubiquitinating enzymes USP1, USP12 and/or USP46 facilitate HPV DNA replication. As such, our findings add to a growing body of literature on the requirement for DUB activities during the life cycle of many viruses. Some viruses encode their own DUB enzymes, such as HSV-1 UL36, while others hijack cellular DUBs for their own purposes, such as the recruitment of USP7 by EBV EBNA-1 (reviewed in (23)). Many recent studies have evaluated the feasibility and therapeutic potential of inhibiting various cellular DUB activities, which possibly represent the most druggable components to date within the ubiquitin proteasome system (reviewed in (15)). The present work further underlines the interest of targeting DUBs as a new and promising antiviral approach.

3.3.6 Acknowledgements

We thank Fanny Bergeron-Labrecque for the preliminary mapping experiments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). ML was supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a CIHR Frederick Banting and Charles Best doctoral scholarship award. We thank all members of the Archambault laboratory for critical reading of the manuscript.

3.3.7 References

1. Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272:137-150.
2. Androphy, E. J., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325:70-73.
3. Buchsbaum, S., C. Morris, V. Bochar, and P. Jalinot. 2007. Human INT6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle. *Oncogene* 26:5132-5144.
4. Zhiqiang, Z., Y. Qinghui, Z. Yongqiang, Z. Jian, Z. Xin, M. Haiying, and G. Yuepeng. 2012. USP1 regulates AKT phosphorylation by modulating the stability of PHLPP1 in lung cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 138:1231-1238.
5. Chen, J., T. S. Dexheimer, Y. Ai, Q. Liang, M. A. Villamil, J. Inglese, D. J. Maloney, A. Jadhav, A. Simeonov, and Z. Zhuang. 2011. Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chemistry & biology* 18:1390-1400.

6. Cheng, I. H., L. A. Roberts, and B. K. Tye. 2002. Mcm3 is polyubiquitinated during mitosis before establishment of the pre-replication complex. *J Biol Chem* 277:41706-41714.
7. Clower, R. V., J. C. Fisk, and T. Melendy. 2006. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 80:1584-1587.
8. Cohn, M. A., Y. Kee, W. Haas, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2009. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* 284:5343-5351.
9. Cohn, M. A., P. Kowal, K. Yang, W. Haas, T. T. Huang, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2007. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* 28:786-797.
10. Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang. 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.
11. Cote-Martin, A., C. Moody, A. Fradet-Turcotte, C. M. D'Abramo, M. Lehoux, S. Joubert, G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault. 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.
12. Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525-541.
13. Fradet-Turcotte, A., F. Bergeron-Labrecque, C. A. Moody, M. Lehoux, L. A. Laimins, and J. Archambault. 2011. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J Virol* 85:8996-9012.
14. Fradet-Turcotte, A., G. Morin, M. Lehoux, P. A. Bullock, and J. Archambault. 2010. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* 399:65-76.

15. Fraile, J. M., V. Quesada, D. Rodriguez, J. M. Freije, and C. Lopez-Otin. 2012. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 31:2373-2388.
16. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 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.
17. Frattini, M. G., and L. A. Laimins. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204:799-804.
18. Gagnon, D., H. Senechal, C. M. D'Abramo, J. Alvarez, A. A. McBride, and J. Archambault. 2013. Genetic analysis of the E2 transactivation domain dimerization interface from bovine papillomavirus type 1. *Virology* 439:132-139.
19. Garcia-Santisteban, I., K. Zorroza, and J. A. Rodriguez. 2012. Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex. *PloS one* 7:e38570.
20. Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello, and T. Melendy. 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.
21. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16:83-97.
22. Huang, T. T., S. M. Nijman, K. D. Mirchandani, P. J. Galardy, M. A. Cohn, W. Haas, S. P. Gygi, H. L. Ploegh, R. Bernards, and A. D. D'Andrea. 2006. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nature cell biology* 8:339-347.
23. Isaacson, M. K., and H. L. Ploegh. 2009. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. *Cell host & microbe* 5:559-570.
24. Joo, H. Y., A. Jones, C. Yang, L. Zhai, A. D. t. Smith, Z. Zhang, M. B. Chandrasekharan, Z. W. Sun, M. B. Renfrow, Y. Wang, C. Chang, and H. Wang.

2011. Regulation of histone H2A and H2B deubiquitination and *Xenopus* development by USP12 and USP46. *J Biol Chem* 286:7190-7201.
25. Kadaja, M., T. Silla, E. Ustav, and M. Ustav. 2009. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384:360-368.
26. Kanga, S., D. Bernard, A. M. Mager-Heckel, Z. Erpapazoglou, F. Mattioli, T. K. Sixma, S. Leon, D. Urban-Grimal, I. Tarassov, and R. Haguenaer-Tsapis. 2012. A deubiquitylating complex required for neosynthesis of a yeast mitochondrial ATP synthase subunit. *PloS one* 7:e38071.
27. Kim, J. M., K. Parmar, M. Huang, D. M. Weinstock, C. A. Ruit, J. L. Kutok, and A. D. D'Andrea. 2009. Inactivation of murine *Usp1* results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Developmental cell* 16:314-320.
28. Kohler, A., E. Zimmerman, M. Schneider, E. Hurt, and N. Zheng. 2010. Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell* 141:606-617.
29. Kowalski, J. R., C. L. Dahlberg, and P. Juo. 2011. The deubiquitinating enzyme USP-46 negatively regulates the degradation of glutamate receptors to control their abundance in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:1341-1354.
30. Lehoux, M., A. Fradet-Turcotte, M. Lussier-Price, J. G. Omichinski, and J. Archambault. 2012. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. *J Virol* 86:3486-3500.
31. Li, X., P. D. Stevens, H. Yang, P. Gulhati, W. Wang, B. M. Evers, and T. Gao. 2013. The deubiquitination enzyme USP46 functions as a tumor suppressor by controlling PHLPP-dependent attenuation of Akt signaling in colon cancer. *Oncogene* 32:471-478.
32. Loo, Y. M., and T. Melendy. 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78:1605-1615.

33. Malcles, M. H., N. Cueille, F. Mechali, O. Coux, and C. Bonne-Andrea. 2002. Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* 76:11350-11358.
34. Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, and M. A. Romanos. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 72:7407-7419.
35. Mechali, F., C. Y. Hsu, A. Castro, T. Lorca, and C. Bonne-Andrea. 2004. Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol* 78:2615-2619.
36. Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, and M. R. Botchan. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699.
37. Nijman, S. M., T. T. Huang, A. M. Dirac, T. R. Brummelkamp, R. M. Kerkhoven, A. D. D'Andrea, and R. Bernards. 2005. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* 17:331-339.
38. Park, E., J. M. Kim, B. Primack, D. M. Weinstock, L. A. Moreau, K. Parmar, and A. D. D'Andrea. 2013. Inactivation of Uaf1 causes Defective Homologous Recombination and Early Embryonic Lethality in Mice. *Mol Cell Biol*.
39. Park, P., W. Copeland, L. Yang, T. Wang, M. R. Botchan, and I. J. Mohr. 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.
40. Zhang, W., Q. B. Tian, Q. K. Li, J. M. Wang, C. N. Wang, T. Liu, D. W. Liu, and M. W. Wang. 2011. Lysine 92 amino acid residue of USP46, a gene associated with 'behavioral despair' in mice, influences the deubiquitinating enzyme activity. *PloS one* 6:e26297.
41. Yang, K., G. L. Moldovan, P. Vinciguerra, J. Murai, S. Takeda, and A. D. D'Andrea. 2011. Regulation of the Fanconi anemia pathway by a SUMO-like delivery network. *Genes Dev* 25:1847-1858.

42. Sanchez-Pulido, L., D. Devos, Z. R. Sung, and M. Calonje. 2008. RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC genomics* 9:308.
43. Sanders, C. M., and A. Stenlund. 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.
44. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Molecular cell* 20:377-389.
45. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* 79:8661-8664.
46. Sowa, M. E., E. J. Bennett, S. P. Gygi, and J. W. Harper. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 138:389-403.
47. Sun, Y., H. Han, and D. J. McCance. 1998. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79 (Pt 7):1651-1658.
48. Villamil, M. A., J. Chen, Q. Liang, and Z. Zhuang. 2012. A noncanonical cysteine protease USP1 is activated through active site modulation by USP1-associated factor 1. *Biochemistry* 51:2829-2839.
49. Villamil, M. A., Q. Liang, J. Chen, Y. S. Choi, S. Hou, K. H. Lee, and Z. Zhuang. 2012. Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1. *Biochemistry* 51:9112-9123.
50. Williams, S. A., H. L. Maecker, D. M. French, J. Liu, A. Gregg, L. B. Silverstein, T. C. Cao, R. A. Carano, and V. M. Dixit. 2011. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell* 146:918-930.
51. Wilson, V. G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* 24:275-290.

4 Le recrutement artificiel de UAF1 par une protéine chimérique PHLPP1-E1 promeut la réplication de l'ADN du VPH

Artificial recruitment of UAF1 by a PHLPP1-E1 chimeric protein enhances human papillomavirus DNA replication

Michaël Lehoux et Jacques Archambault

Cet article est en préparation

4.1 Mise en contexte de l'article

L'objectif de cette étude était d'identifier un ou des partenaires d'interaction endogènes avec UAF1 contenant un motif de liaison à UAF1 bien délimité. Nous souhaitons caractériser un tel peptide de liaison à UAF1 et déterminer l'effet de son expression ectopique sur la réplication de l'ADN viral. Finalement, le but de ces travaux était de déterminer si la génération de protéines chimériques constituées de la fusion de ce peptide avec un variant de la protéine E1 déficient pour l'interaction avec UAF1 suffisait à restaurer son activité de réplication. Un tel résultat constituerait une excellente preuve de concept que le domaine N40 de E1 sert essentiellement de module de recrutement du complexe UAF1-USP et permettrait de valider si sa fonction enzymatique est importante pour le cycle réplcatif du VPH.

4.2 Contribution des auteurs

J'ai effectué toutes les expériences présentées dans ce manuscrit, sauf pour la Figure 4.1A qui a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr Benoît Coulombe et son assistante de recherche Annie Bouchard. Les résultats de la Figure 4.3 ont été obtenus en collaboration avec Matthieu Rousseau, un étudiant de premier cycle qui était sous ma supervision. J'ai aussi écrit le manuscrit.

Dr Jacques Archambault a supervisé le projet et apporté des commentaires constructifs pour la réalisation et l'analyse des expériences.

4.3 Texte de l'article

4.3.1 Abstract

The human papillomaviruses (HPVs) E1 protein is a DNA helicase essential for the replication of the viral genome. Many regulatory motifs of E1 are contained within its N-terminus, a region absolutely required for replication *in vivo*. We previously highlighted an important element comprised in this domain as a binding motif for the host protein p80/UAF1. Mutations within this UAF1-binding region, N40, greatly impaired HPV DNA replication. Similarly, overexpression of the N40 peptide alone competed for E1-UAF1 interaction and reduced viral DNA replication. In the present study, we identified PHLPP1 as a novel cellular UAF1-binding protein harboring a UAF1-binding peptide similar to the one of E1. E1-binding to UAF1 inhibited PHLPP1 recruitment, suggesting that E1 and PHLPP1 interaction with UAF1 are mutually exclusive. A PHLPP1-derived and UAF1-binding peptide, P1, was sufficient to interact with UAF1 and USP46, and prevent E1 from recruiting these proteins. As expected, P1 inhibited HPV DNA replication in a UAF1-binding specific fashion. Moreover, we found that P1 fusion to a deletion mutant of E1 lacking its N40 region was sufficient to completely restore E1 capacity to interact with UAF1 and relocalize it to nuclear foci. These PHLPP1-E1 chimeras rescued HPV DNA replication capacity, a phenomenon requiring the enzymatic activity of the USPs. Overall, this study suggests that one of the main functions of the N40 domain of E1 is to bind UAF1 in order to recruit the active USPs to the viral replisome.

4.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are now well recognized as the etiological agents of cervical cancers as well as many other anogenital and oropharyngeal cancers. Advances have been made towards understanding mechanisms of HPV-induced carcinogenesis, particularly through the modulation of cellular functions by the viral oncogenes E6 and E7. However, it remains elusive how HPV DNA is replicated and maintained in human keratinocytes to favor viral persistence, a prerequisite for oncogenesis (12, 18).

HPV DNA replication is initiated by the binding of the viral protein E2 to the origin of replication contained within the HPV genome. The interaction of E2 with the viral E1 protein then favors its enrichment on the viral episome and its assembly as an active double hexameric DNA helicase. HPV E1 can be subdivided into three main functional domains (reviewed in (2, 9)). The helicase-ATPase activity is encoded within its C-terminal region, while its origin-binding domain (OBD) is located in the central part of E1. The N-terminal region is not necessary for HPV DNA replication in cell-free systems, but is strictly required for replication *in vivo*, suggesting that it plays a role in regulating E1 activities (1, 26). Important functional elements located within the N-terminus have been identified in the past few years. E1 contains a highly conserved domain, referred to as the shuttling module, which consists of a nuclear localization signal (NLS), a nuclear export signal (NES), a cyclin-binding motif (CBM) as well as a variable number of Cdk2 phosphorylation sites. Altogether, these sequences regulate the nucleocytoplasmic shuttling of E1 in a phospho-dependent manner (10, 14). While E1 needs to be imported within the nucleus to carry out viral DNA synthesis, E1 export also seems to be required for the maintenance of the viral episome over cell passages in undifferentiated keratinocytes (14). E1 nuclear accumulation was further shown to induce a DNA damage response and a cell proliferation defect, which could be alleviated by nuclear export. The nucleocytoplasmic shuttling of E1 is thought to provide a fine regulatory mechanism to allow efficient viral DNA replication while preventing the cells from undergoing cell cycle arrest due to nuclear over-accumulation of the viral helicase and its associated DNA damage response (13, 24).

Novel regulatory elements located within the N-terminus of E1 have also been recently reported. First, E1 contains a caspase cleavage site that is required during viral genome amplification upon the induction of keratinocytes differentiation. Secondly, we found an amphipathic helix of unknown function, but structurally similar to those encoded in the transactivation domains of p53 and herpes simplex virus VP16; this helix is required for optimal HPV DNA replication (11, 19, 22, 27). Finally, we also reported the presence of a highly conserved motif in anogenital HPVs, required for the interaction with the cellular protein p80/UAF1 (USP1-associated factor 1) and important to HPV DNA replication and episomal maintenance (7, 20). While the endogenous function of UAF1 is not clearly understood, it was shown to be required for the enzymatic activities

of the deubiquitinating enzymes USP1, USP12 and USP46 (5, 6). Since UAF1 does not encode for enzymatic functions, it likely relies on protein-protein interactions to carry out its function in normal cells and during HPV infection.

Our prior research prompted us to search for novel UAF1 interaction partners in human cells and to identify and characterize endogenous UAF1-binding peptides (UBP) in an attempt to translate those findings to HPV biology. Using affinity chromatography and mass spectrometry, we found UAF1 to be endogenously associated with the phosphatase PHLPP1. We also observed that the UAF1-PHLPP1 and UAF1-E1 interactions were mutually exclusive and exploited a similar UBP. The PHLPP1-derived and UBP-encoding P1 peptide was fully competent for both UAF1 and USP46 binding. Moreover, P1 overexpression competed for the UAF1-E1 interaction and inhibited HPV DNA replication. Fusion of P1 with a truncated E1 protein, E1 Δ , defective for UAF1-binding restored its capacity to interact with UAF1 and USP46, and to relocalize UAF1 to nuclear foci. The P1-E1 Δ chimera significantly increased E1 Δ -mediated HPV DNA replication, a rescue that was abolished by interfering with UAF1-binding through P1 mutation or by overexpressing catalytically inactive versions of the USPs. These results provide evidence that E1 UBP mainly functions as a UAF1-USP interaction module that is required for viral genome replication.

4.3.3 Materials and methods

Plasmid construction and mutagenesis. The TAP-UAF1 fusion was generated by cloning the UAF1 ORF into the pMzi vector (23) between Sall and NotI sites. The plasmids used to express 3F-UAF1 and its truncations were previously described (20). GFP-UAF1 was constructed by inserting the UAF1 ORF between the EcoRV and KpnI sites of the pGFP2-C2 plasmid (Biosignal Packard-Perkin-Elmer). The plasmids encoding GFP-E1, YFP-E1 (7, 13) or codon-optimized 3F-E1 (p31E1), 3F-E2 (p31E2) and RFP-E2 (15, 20) from HPV31 were previously described. The expression plasmid for 3F-E1 Δ was previously described (C40, (22)). USP1, USP46, PHLPP1 and PHLPP2 ORFs were obtained from Life Technologies. Expression vectors for RFP-USP1 and -USP46 were generated by introducing PCR-amplified fragments between the XhoI and XbaI sites of the RFP plasmid (7). Catalytically inactive variants of USP1 and USP46 were generated by introducing the C90S and C44S amino acid substitutions,

respectively, by site-directed mutagenesis. PHLPP1 and PHLPP2 were fused to GFP by subcloning their respective ORFs between sites SacI and BamHI of the pGFP2-N1 plasmid (Biosignal Packard-Perkin-Elmer). Full-length PHLPP1 or its derived domains were fused to HA by PCR amplification and cloning between EcoRV and Sall sites of the HA plasmid. The HA vector was made by substituting the 3F epitope of pCMV-3Tag-1a (Stratagene) by the HA epitope. The N40-YFP and P1-YFP peptide expression vectors were generated by PCR amplification and were cloned between the BamHI and AgeI sites of pVenus-N1, as previously described (20). The P1 peptide containing the VE amino acid substitution was generated by site-directed mutagenesis. The vectors to express 3F-PHLPP1-E1 chimeric proteins were generated by subcloning the P1 peptides (WT or VE) between the BamHI and XmaI sites of the p31E1 plasmid. All DNA constructs were verified by sequencing. Primer sequences and additional details on the construction of these plasmids can be made available upon request.

Antibodies and Western blotting. Mouse monoclonal antibodies from Sigma-Aldrich were used to detect 3xFlag-tagged proteins (M2-Flag antibody, catalog no. F1804) and β -tubulin (catalog no. T4026). The mixture of two mouse monoclonal antibodies against GFP was purchased from Roche (catalog no. 11814460001) and the mouse monoclonal antibody against RFP was from Abcam (catalog no. AB65856). The HA antibody was purchased from Covance (HA.11 catalog no. MMS-101P). Rabbit polyclonal antibodies against UAF1 were raised by injecting rabbits (Open Biosystems) with a purified C-terminal fragment of UAF1, as described elsewhere (20). The PHLPP1 (catalog no. A300-660A) and USP46 (catalog no. HPA007288) antibodies were purchased from Bethyl laboratories and Sigma-Aldrich, respectively. For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and were detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, either sheep anti-mouse IgG or donkey anti-rabbit IgG (both from GE Healthcare, catalog no. NA931 and no. NA934V, respectively), and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare). When mentioned, protein abundance was quantified by densitometry measurements using a ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) and a standard curve of serial dilutions of cell lysates to validate detection linearity.

Cell culture and transfections. The human cervical carcinoma cell line C33A was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10%

FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml of penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Transfection of C33A was performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

Protein purification and mass spectrometry analysis. Tandem affinity purification was performed essentially as described (7). The UAF1 complexes were isolated from EcR-293 derived cell lines that were induced for 24 h with 3 µM ponasterone A (Life Technologies). Whole cell extracts were prepared from ~7-8 g of cells and pulled down with IgG sepharose beads (GE Healthcare). The proteins were eluted overnight with tobacco etch virus (TEV) protease (Life Technologies) (30 U/g of cells) and bound to calmodulin sepharose beads (Stratagene). Final elution was performed in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM imidazole, 1 mM Mg acetate, 2 mM EGTA and 10 mM β-mercaptoethanol. Proteins were resolved on 4-15% gradient SDS-PAGE, after which silver-stained gel slices were sent for mass spectrometry analysis. Tryptic peptides were identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with microcapillary reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to a 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 used to interrogate the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database or Uniref protein database.

Coimmunoprecipitation (coIP). C33A cells were grown on 100-mm plates and transfected with the indicated DNA. Cells were harvested 48 h posttransfection in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and the following protease inhibitors: 10 µg/ml antipain, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin A and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Cleared cellular extracts were then immunoprecipitated for 3 h with 40 µl protein G-sepharose (GE Healthcare), conjugated to 1 µg of anti-Flag or anti-GFP antibodies. The resin was washed 3 times with TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) and the bound proteins were analyzed by Western blotting.

Luciferase transient HPV DNA replication assay. The HPV DNA replication assay were performed as previously described (15). Briefly, C33A cells were plated at a density of 25,000 cells/well in white flat-bottom 96-well plates and were transfected

24 h later with a mix of four plasmids: an origin-containing plasmid with a firefly luciferase reporter *in cis* (pFLORI31), a Renilla luciferase plasmid as an internal control (pRL) and the indicated quantities of E1 and E2 expression vectors. For all experiments, the total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 100 ng with the YFP or RFP vector as carrier DNA. Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) 48 h posttransfection.

Confocal fluorescence microscopy. C33A cells were plated at a density of 6×10^5 cells/well on cover slips and were transfected 24 h later with the indicated plasmids. 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and their DNA was stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies catalog no. D1306). Slides were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were collected with a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope and analyzed using the Zen 2009 LE software.

Cell cycle analysis. Cell cycle profiles were obtained by staining live cells 48 h posttransfection with 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoescht and 50 μM verapamil. Acquisitions were done using a BD LSR flow cytometer, gated on the GFP-positive population. Data analysis was performed using the FlowJo (v.8.1) software.

Colony formation assay. C33A cells ($\sim 1.2 \times 10^6$) were transfected with 1.5 μg of the indicated plasmids in a 6-well plate. 24 h posttransfection, cells were trypsinized and plated on a new plate at a 1/15 dilution in fresh medium. 24 h later, media was replaced for a bleomycin-containing media (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then was changed every 3-4 days for about 3 weeks or until fully-resistant colonies were selected. Colonies were fixed in cold methanol for 10 min and stained for 2 min at room temperature with methylene blue (1% w/v in 60% Methanol/H₂O).

4.3.4 Results

4.3.4.1 UAF1 interacts *in vivo* with PHLPP1 and PHLPP2

We previously demonstrated that the E1-UAF1 interaction is required for HPV31 DNA replication (7, 15, 20). To better understand UAF1 function during the HPV life cycle, we aimed to find endogenous UAF1-binding proteins and/or substrates. The identification and characterization of novel endogenous UAF1-binding peptides would provide a useful tool to investigate UAF1 function during viral DNA replication. To do so, tandem affinity purification (TAP) of UAF1 was performed and interacting proteins were identified by mass spectrometry. We used a TAP strategy, relying on gentle and hypotonic washes, to favor the isolation of native protein complexes. The phosphatase PHLPP1 (Pleckstrin homology [PH] domain and Leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1) was one of the major interaction partners identified and was recovered with good spectral counts, Mascot score and percentage peptide coverage (Fig. 4.1A). PHLPP1 was recently identified as a novel member of the PP2C-family of phosphatases and shares high sequence homology with another isoform, PHLPP2 (4, 17). The UAF1-PHLPP1 interaction was previously inferred from a large interactome dataset but has never been specifically verified (25). The interaction between PHLPP1 and UAF1 was validated through coIP experiments (Fig. 4.1B). Briefly, UAF1 was immunoprecipitated from C33A cells expressing 3xFlag(3F)-tagged UAF1 and PHLPP1-GFP, using anti-Flag antibodies. PHLPP1 was successfully identified as a *bona fide* binding partner of UAF1. Likewise, an interaction between UAF1 and the close homolog PHLPP2 was also detected (Fig. 4.1B), thus suggesting that UAF1-binding is a shared feature of the PHLPP family. Since PHLPP1 is the prototypical member of this group of phosphatases, we focused our studies on PHLPP1.

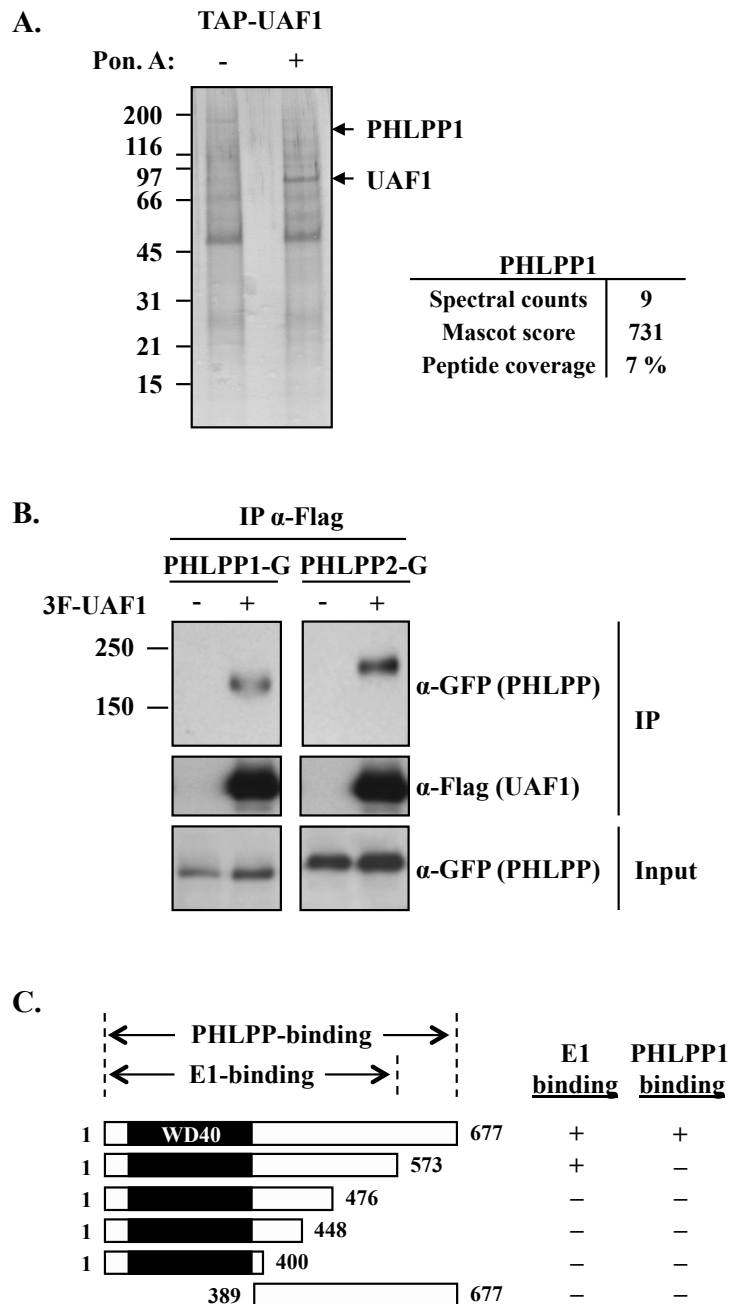


Figure 4.1 Identification of cellular proteins interacting with UAF1

(A) EcR-293 stable cell lines expressing TAP-UAF1 under the control of an ecdysone-inducible promoter were subjected to tandem affinity purification after a 24 h induction with (+) or without (-) 3 μ M ponasterone A (Pon. A), an ecdysone analogue. Purified complexes were separated by SDS-PAGE and stained with silver nitrate, after which gel slices were excised and sent for LC-MS/MS analysis. One of the major identified proteins, PHLPP1, is indicated to the right and spectral counts, Mascot score and peptide coverage are also shown. (B) CoIP of 3F-UAF1 with GFP-tagged PHLPP1 (PHLPP1-G) or PHLPP2 (PHLPP2-G). C33A cells were cotransfected with the indicated expression vectors and harvested 48 h

posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-GFP (for PHLPP) and anti-Flag (for UAF1) antibodies. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least two independent experiments with similar results. (C) Schematic representation of the UAF1 truncations used for mapping experiments. Summary of mapping results for interaction with E1 and PHLPP1 are summarized to the right. The WD40 repeats of UAF1 are represented by black boxes.

4.3.4.2 HPV E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 are mutually exclusive

We found that PHLPP1 interaction with UAF1 requires full-length UAF1 (data not shown, summarized in Fig. 4.1C). Indeed, none of the tested UAF1 truncations successfully associated with PHLPP1. We previously showed that UAF1-binding to E1 requires the first 573 amino acids (aa) of UAF1 (20), demonstrating that E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 use an extensive and overlapping binding surface on UAF1 (Fig. 4.1C). This also indicates that both E1 and PHLPP1 encode a region required for UAF1-binding, referred to as the UAF1-binding peptide (UBP) herein. In order to determine whether these interactions were occurring simultaneously or were mutually exclusive, we investigated if PHLPP1 and E1 would compete for binding to UAF1. Briefly, UAF1 was immunoprecipitated from cells transfected with a constant quantity of 3F-UAF1 along with an increasing quantity of YFP-E1, using anti-Flag antibodies. In the absence of E1, UAF1 efficiently interacted with endogenous PHLPP1 (Fig. 4.2A). However, we found that E1 excluded PHLPP1 from the complex with increasing E1 expression. Note that total PHLPP1 levels in the extracts also decreased in presence of E1, possibly reflecting the increased instability of PHLPP1 when excluded from the UAF1 deubiquitase complex. Quantification of relative enrichment of PHLPP1 in the immunoprecipitate did however reveal a clear competition between E1- and PHLPP1-binding to UAF1. In contrast, overexpression of an E1 protein harboring the VE aa substitution, rendering it defective for UAF1-binding (7), greatly reduced its capacity to exclude PHLPP1 from the complex. Mutation of VE did not however abolish completely the inhibitory capacity of E1, perhaps because it retains a weak UAF1-binding capacity. Overall, these results suggest that the UAF1-E1 and UAF1-PHLPP1 interactions are mutually exclusive.

To validate this observation, we investigated if a short 40 aa long UAF1-binding peptide derived from E1, N40, previously showed to be sufficient for competing the E1-UAF1 interaction (20), would also be inhibitory to UAF1-PHLPP1 binding. Increasing amounts of this N40 peptide were coexpressed along with a constant quantity of 3F-UAF1. As expected, the N40 WT peptide competed with endogenous PHLPP1 for UAF1-binding in a dose-dependent manner (Fig. 4.2B). Conversely, overexpression of the mutant peptide, N40 VE, defective for UAF1 interaction, had no effect on the assembly of the UAF1-PHLPP1 complex. Altogether, these results suggest that E1 and PHLPP1 form distinct binary complexes with UAF1 that are mutually exclusive. We also predict from results in the literature and our own data that these complexes also include the UAF1-associated USP deubiquitinases, USP1, USP12 or USP46 (illustrated in Fig. 4.2C) (Lehoux et al, personal communication, (21, 29)).

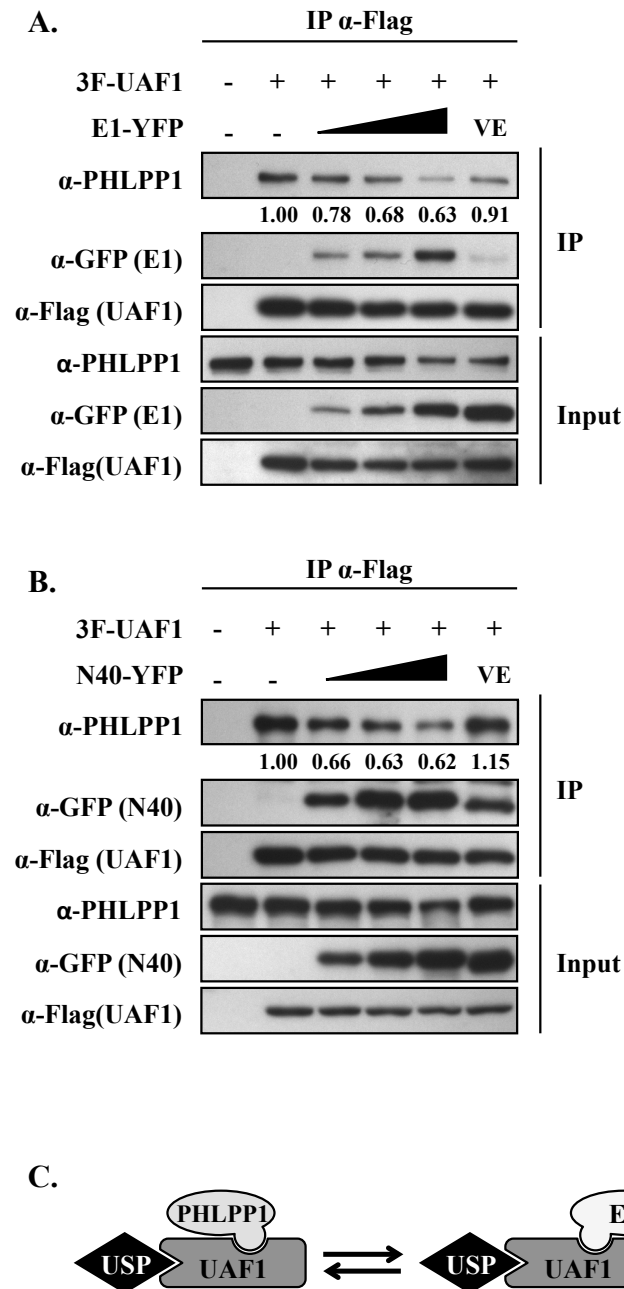


Figure 4.2 HPV E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 are mutually exclusive

(A) Inhibitory effect of full-length E1 on the interaction of UAF1 with endogenous PHLPP1. C33A cells were transfected with the UAF1 expression vector and increasing amounts of the E1 WT expression plasmid and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibodies. The E1 VE mutant protein was also tested as a negative control at the highest level of expression vector. The immunoprecipitates were analyzed using anti-PHLPP1, anti-GFP (for E1) and anti-Flag (for UAF1) antibodies. Cell extract input is shown below. Chemiluminescence signal was quantified using a ChemiDoc XRS+ and relative PHLPP1 enrichment ratios (IP vs Input) are indicated under the blot. Data are representative of at least three independent

experiments with similar results. (B) Inhibitory effect of N40 on the interaction of UAF1 with endogenous PHLPP1. Coimmunoprecipitation experiment was performed as in (A) using an increasing quantity of N40 WT expression plasmid (instead of E1). The VE mutant peptide was used as a negative control. The immunoprecipitates were analyzed using anti-PHLPP1, anti-GFP (for N40) and anti-Flag (for UAF1) antibodies. Cell extract input is shown below. A densitometric analysis was performed as in A and relative enrichment of PHLPP1 is indicated under the blot. Data are representative of at least two independent experiments with similar results. (C) Schematic representation showing the mutually exclusive interaction of E1 or PHLPP1 with UAF1. E1 and PHLPP1 are thought to assemble as ternary complexes with UAF1 and its associated USPs (USP1, USP12 or USP46).

4.3.4.3 PHLPP1 encodes a UAF1-binding peptide similar to that of HPV E1

PHLPP1 contains diverse structural and functional motifs that have been extensively described elsewhere (3). The protein can be subdivided into four main regions: a Pleckstrin homology (PH) domain, a leucine-rich repeat (LRR) region, a PP2C phosphatase domain and a C-terminal extension encoding a PDZ-binding domain at its very end (residues TPL). To determine which region of PHLPP1 is required for UAF1-binding, we made use of a panel of PHLPP1 domain constructs (Fig. 4.3A) and tested for their capacity to interact with UAF1 in coIP experiments. The C-terminal region was found to be required for UAF1-binding, while none of the other domains interacted with UAF1 (data not shown; summarized in Fig. 4.3A). Moreover, the interaction did not require the PDZ-binding region and deleting the C-terminal TPL residues (1-1202 construct) did not reduce binding. The C-terminal domain does not contain any known structural elements. This prompted us to map more finely UAF1-interaction on PHLPP1 by introducing deletions within the C-terminus of PHLPP1. UAF1 was immunoprecipitated in cells cotransfected with 3F-UAF1 and YFP-tagged PHLPP1 deletion constructs (Fig. 4.3B). Truncations lacking residues downstream of aa 1027 or upstream of aa 1126 had a reduced UAF1-binding capacity. We extrapolated from these mapping studies that aa 1027-1126 of PHLPP1 constitute the minimal peptide, which we refer to as P1, competent for optimal UAF1-binding (Fig. 4.3C).

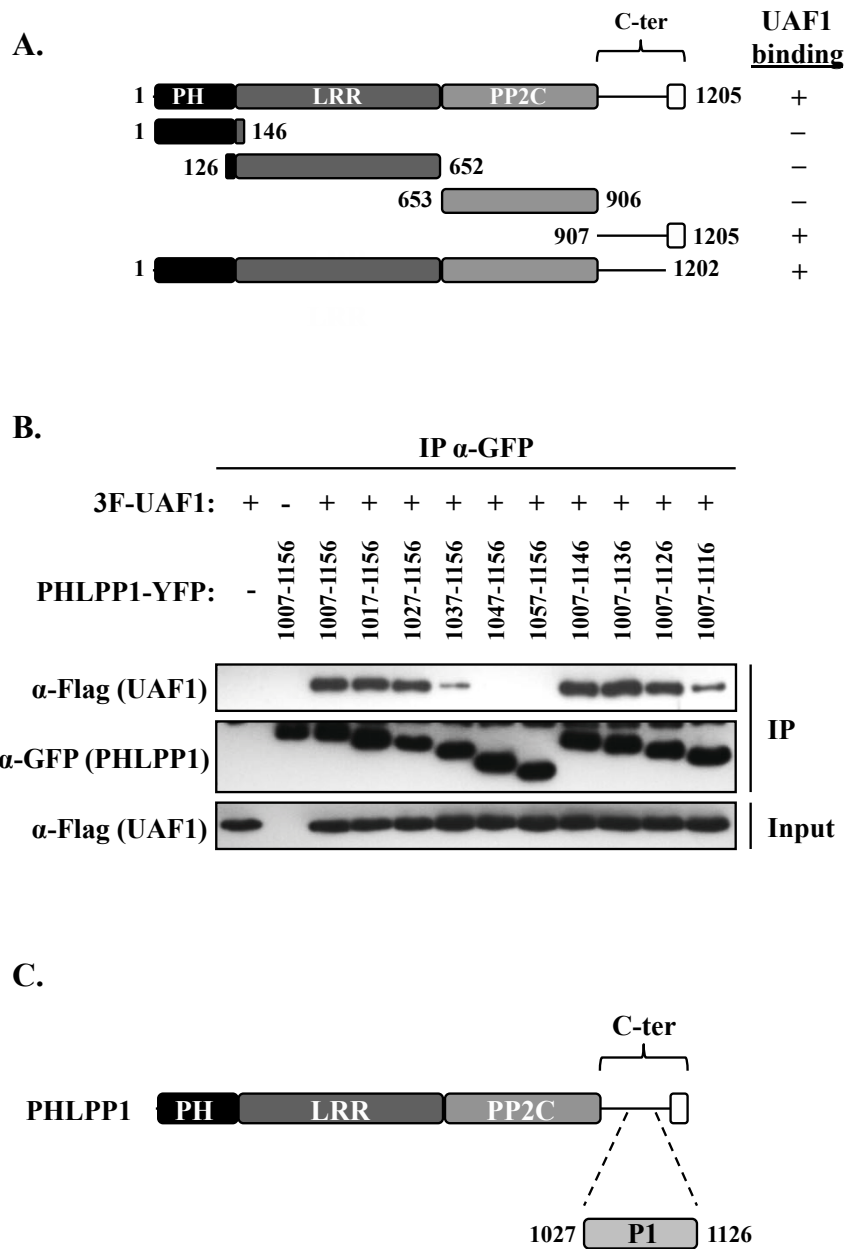


Figure 4.3 PHLPP1 contains a UAF1-binding peptide between amino acids 1027-1126

(A) Schematic representation of the PHLPP1 truncations used for mapping experiments. Known structural domains are represented in boxes: Pleckstrin homology domain (PH), Leucine-rich region (LRR), PP2C phosphatase domain (PP2C) and the C-terminal extension. The PDZ-binding residues TPL at the very end of the protein are represented as an empty white box. Mapping results for interaction with UAF1 are summarized to the right. (B) Coimmunoprecipitation of PHLPP1 truncations derived from the C-terminal domain. C33A cells were cotransfected with the indicated UAF1 and PHLPP1 expression

vectors and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-Flag (for UAF1) and anti-GFP (for PHLPP1) antibodies. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least two independent experiments with similar results. (C) Schematic representation of the location of the minimal UAF1-binding peptide, P1, within PHLPP1.

The comparison of PHLPP1- and E1-derived UBPs, P1 and N40 respectively, revealed that they share many common features. First, both UBPs are highly acidic, with a pI of 4.4 and 3.1 for P1 and N40, respectively, and contains in their C-terminus several aspartic and glutamic acid residues. Second, the two peptides share a region of high sequence homology (Fig. 4.4A). Some aa that were previously shown in N40 to be essential for UAF1 interaction are also conserved in P1, notably the V1051/E1052 residues (indicated with arrows in Fig. 4.4A). The peptide P1 was first tested to assess if it was indeed sufficient to interact *in vivo* with UAF1. To do so, P1 was immunoprecipitated from C33A cells expressing P1-YFP using anti-GFP antibodies. As expected, P1 WT interacted with endogenous UAF1, while YFP alone was unable to do so (Fig. 4.4B). In addition, endogenous USP46 associated with the P1-UAF1 complex, in support with the hypothesis that P1, and by extension PHLPP1, assembles endogenously with the UAF1-USP deubiquitinating complex. The association of PHLPP1 with USP1 and USP46 has recently been described (21, 29) and we propose here that the formation of these complexes requires the interaction with UAF1 that acts as a bridging subunit. We then verified if the substitution of the VE residues to alanines, similar to a mutant form of peptide N40, would abolish the interaction with UAF1. As expected, the peptide P1 VE was defective for UAF1 and USP46 interaction. This data supports the notion that PHLPP1 interacts endogenously with UAF1 and USP46, and that the PHLPP1-USP46 interaction requires UAF1-binding. This is also similar to E1, which interacts as a ternary complex with UAF1 and any of the associated USPs (USP1, USP12 or USP46), again highlighting the similarities between E1- and PHLPP1-associated complexes.

Next, we investigated if P1 overexpression would compete with the E1-UAF1 interaction, similarly to what was observed with N40. Expression of an increasing quantity of P1 WT led to inhibition of UAF1-binding to E1 in a dose-dependent manner (Fig. 4.4C). As expected, inhibition of USP46 interaction also accompanied P1-mediated

exclusion of UAF1 from the E1-associated complex. Conversely, overexpression of P1 VE at the highest concentration tested had no effect on E1 capacity to interact with UAF1-USP46. This is again in agreement with the model that PHLPP1- and E1- interaction with the UAF1-USP complex are mutually exclusive. This data demonstrates that peptide P1 behaves similarly to N40 and is an effective inhibitor of the E1-UAF1-USP ternary complex assembly (Fig. 4.4D).

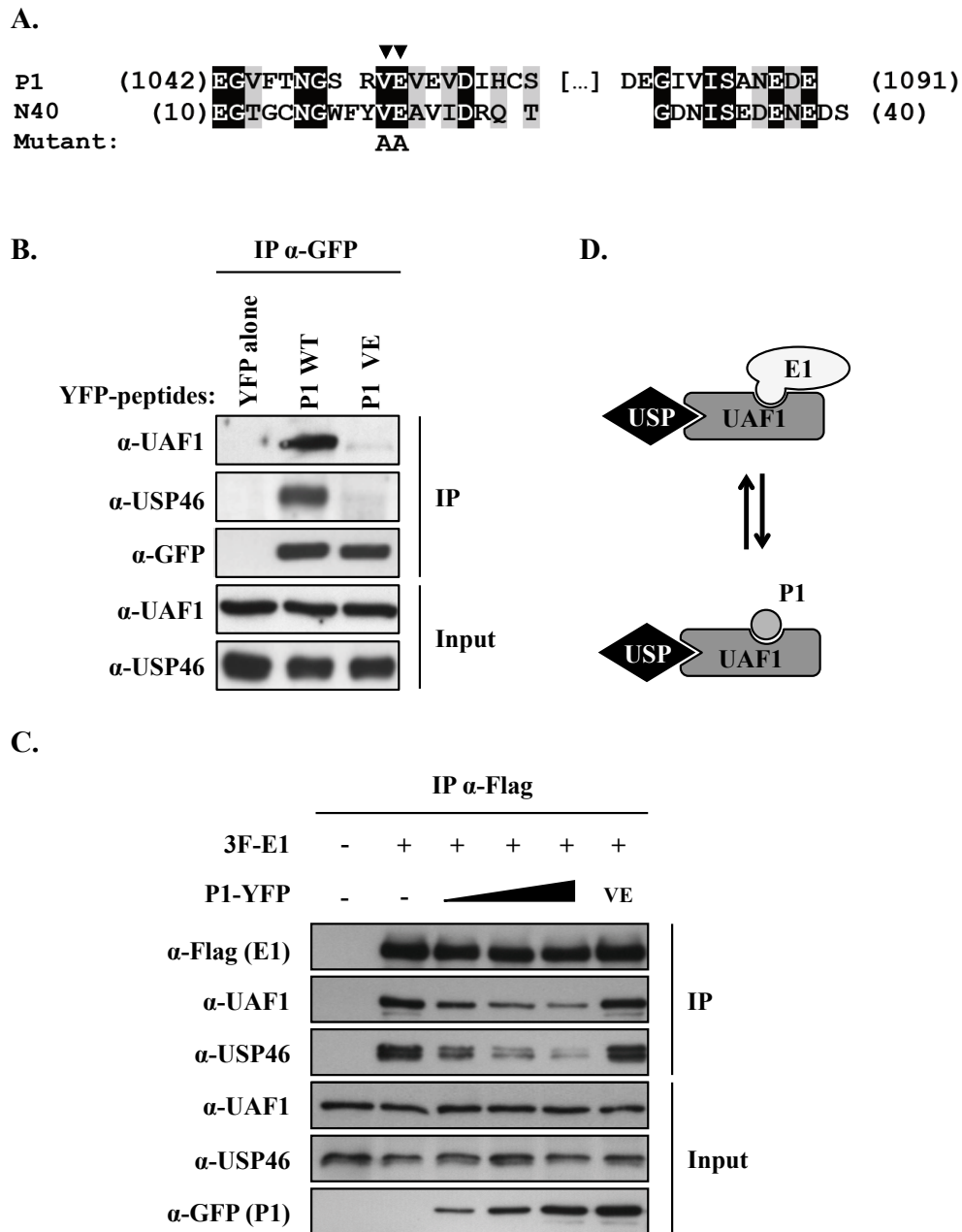


Figure 4.4 The PHLPP1-derived peptide P1 is sufficient for interaction with UAF1 and USP46

(A) Primary sequence alignment of the UAF1-binding peptides derived from PHLPP1 (P1) and E1 (N40). Identical residues and conservative variations are indicated by black and grey boxes, respectively. The residues VE, indicated by arrows, are those mutated to alanines in the UAF1-binding mutant peptides. (B) Coimmunoprecipitation of the peptide P1, either WT or VE, and of UAF1-USP46. C33A cells were transfected with the indicated peptide-YFP expression plasmids and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-UAF1, anti-USP46 and anti-GFP (for peptides) antibodies.

Cell extract input is shown below. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) Inhibitory effect of the peptide P1 on the interaction of E1 with endogenous UAF1 and USP46. C33A cells were transfected with E1 expression vectors and increasing amounts of P1 WT expression plasmid and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibodies. The mutant peptide P1 VE was also tested as a negative control at the highest quantity of expression vector. The immunoprecipitates were analyzed using anti-Flag (for E1), anti-UAF1, anti-USP46 and anti-GFP (for P1) antibodies. Cell extract input is shown below. (D) Schematic representation illustrating the competitive interaction of P1 and E1 for UAF1-USP-binding. Data are representative of at least three independent experiments with similar results.

4.3.4.4 The peptide P1 inhibits HPV DNA replication

Inhibition of the E1-UAF1 interaction through N40 overexpression was previously shown to interfere with HPV DNA replication. This prompted us to investigate if peptide P1 would also inhibit viral DNA replication. We first noted that N40 expression was 3.2-fold higher than P1, as quantified by densitometry (Fig. 4.5A). P1 WT was then overexpressed in our previously described luciferase-based HPV DNA replication assay (15). A reduction of approximately 50% of viral DNA replication was observed (Fig. 4.5B). Conversely, overexpression of the mutant peptide P1 VE had no significant effect on HPV DNA replication. In comparison, a 70% decrease of HPV DNA replication was detected when using the N40 peptide. The different inhibitory potential of the two peptides, P1 and N40, likely reflects their different expression levels. In support of this, a variable inhibitory potential was obtained when using a constant amount of peptide expression vector and varying the amount of E1 plasmid, reflecting peptide abundance relative to E1 (Fig. 4.5C). The highly expressed N40 peptide exhibited very efficient inhibition even when using higher E1 quantities (low peptide:E1 ratio). As for P1, the percentage of inhibition increased as the peptide:E1 ratio raised, again in agreement with the proposition that our mechanism of inhibition is a competitive one that is dependent on the relative abundance of the peptide and of E1.

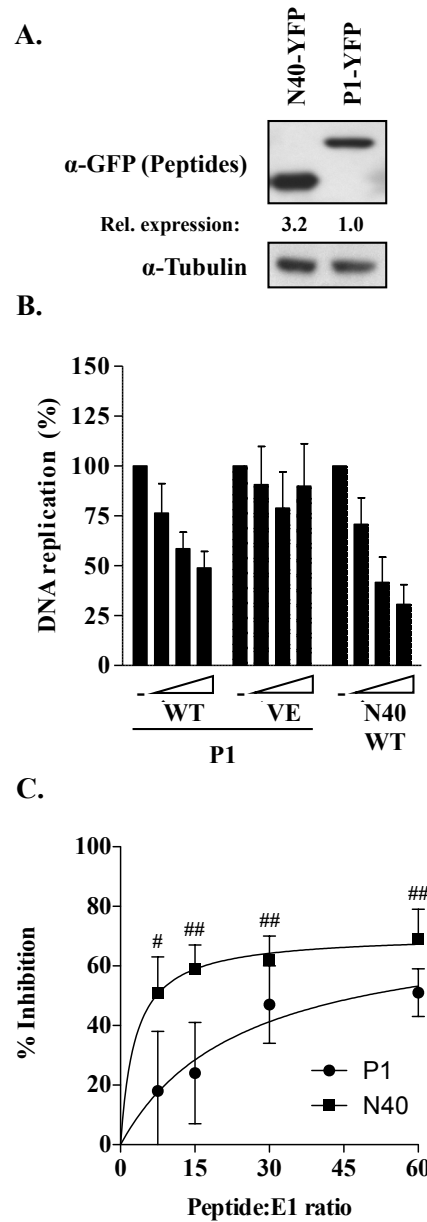


Figure 4.5 The peptide P1 inhibits HPV DNA replication

(A) Expression levels of the peptides N40 and P1 was determined by Western blotting. Chemiluminescence signal was quantified using a ChemiDoc XRS+ and relative expression ratios (indicated under the blot) were determined using a standard curve of known whole-cell extract dilutions. (B) HPV DNA replication levels in cells expressing a gradient of P1 WT, P1 VE or N40 WT (25, 50 or 75 ng of peptide expression vectors). Cells cotransfected with the empty YFP vector were used as a negative control (-). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with the negative control. Each value represents the average of three independent experiments, each performed in triplicate, with standard deviations presented as error bars. (C) HPV DNA replication assays were

performed similarly as in (B) with a constant quantity of peptide (75ng) and varying quantities of E1 expression vectors (1.25, 2.5, 5 or 10 ng). The data is presented as the percentage of peptide-mediated inhibition of DNA replication in relation to the relative amount of peptide and E1 expression vectors (Peptide:E1 ratio). Each value represents the average of three independent experiments, each performed in triplicate, with standard deviations presented as error bars. An unpaired two-tailed Student's t test was used to compare differences between N40 and P1 for each peptide:E1 ratio value (# $p < 0.005$, ## $p < 0.001$).

As a control for the specificity of P1-mediated inhibition of HPV DNA replication, the effect of P1 was tested in two control luciferase assays. Since any indirect effect on reporter gene expression would lead to a non-specific inhibition phenotype, we first tested if P1 would affect the expression of CMV promoter-driven luciferase. Our results revealed that P1 had no effect on the expression of the Firefly luciferase reporter gene (Fig. 4.6A). Secondly, the effect of P1 was tested on the replication signal brought about by an E1 molecule lacking its first 40 aa (E1 Δ), and thus lacking its UBP. E1 Δ -mediated DNA replication is suboptimal, but its residual DNA synthesis activity is thought to occur in a UAF1-binding independent fashion. As expected, P1 overexpression did not affect the replication of E1 Δ , confirming that the effect of P1 is specific to UAF1-binding inhibition (Fig. 4.6B). Finally, it is well known that HPV DNA replication occurs during the S-phase of the cell cycle. As such, interfering with cellular DNA synthesis or cell cycle progression could also indirectly impact HPV DNA replication. To rule out any effect of P1 on cell proliferation, its effect was verified in colony formation assays. P1 overexpression was well tolerated in C33A cells and had no long-term effect on cellular viability and/or proliferation, as determined by the absence of an effect on colony formation capacity (Fig. 4.6C). We also tested the effect of transient overexpression of P1 on cell cycle distribution and observed no alteration on the cell cycle profile as compared to YFP alone-expressing cells (Fig. 4.6D-E). Note that only GFP-positive cells were analyzed (i.e. gated) in these experiments. Altogether, these results suggest that P1 specifically inhibits HPV DNA replication in a manner that is similar to the E1-derived peptide N40.

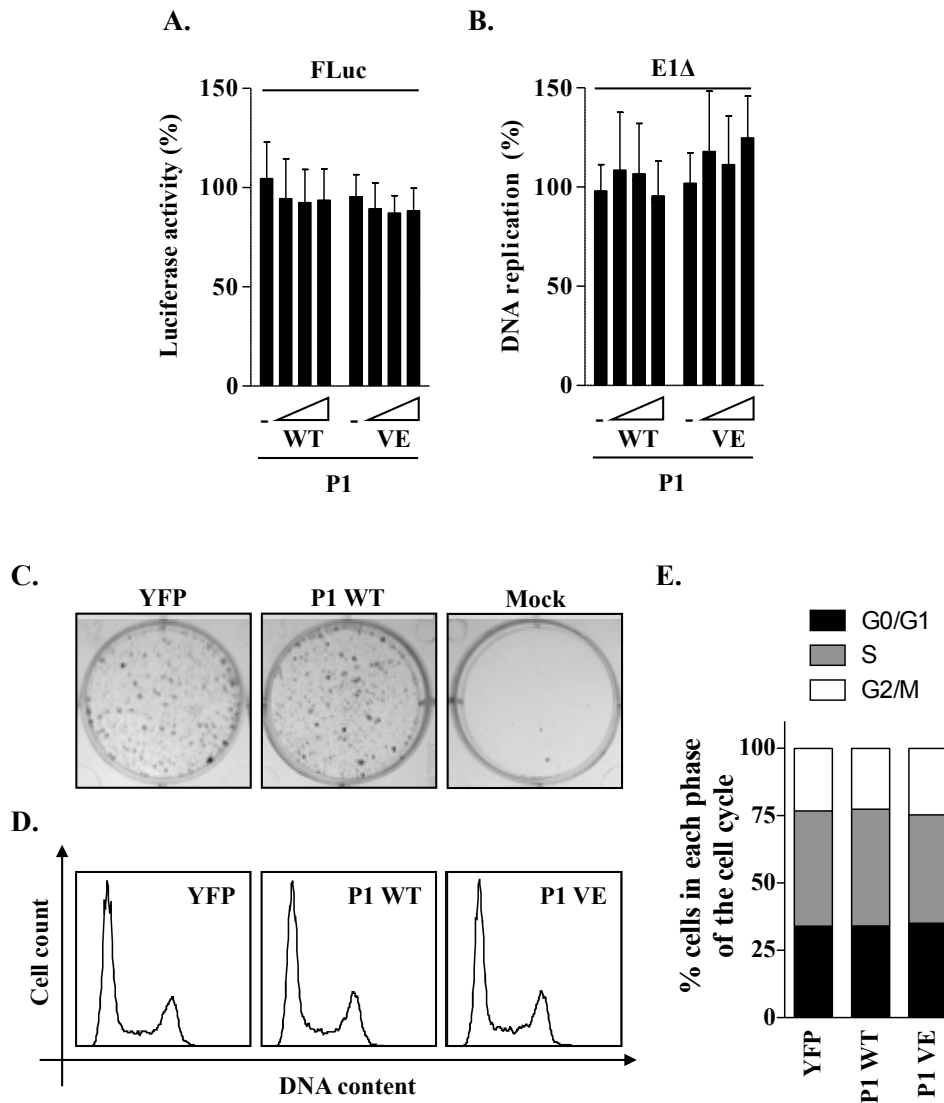


Figure 4.6 P1 expression does not affect cellular proliferation.

(A) Effect of P1-YFP (WT or VE) expression on the expression of cytomegalovirus (CMV)-FLuc. An expression plasmid for YFP alone was used as a negative control (-). Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (B) Effect of P1 on HPV DNA replication mediated by the E1 Δ protein, lacking its UAF1-binding motif. HPV DNA replication assay was performed using a constant amount of the E1 Δ expression plasmid and an increasing quantity of P1 (WT or VE) expression plasmid. YFP-alone was used as a negative control (-). Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) Colony formation assay. C33A cells were transfected with the indicated vectors encoding the peptides and then selected in bleomycin-containing media. Colonies were fixed in methanol and stained with methylene blue. Data are representative of at least two independent experiments with similar results. (D) Cell cycle analysis. C33A cells transiently expressing the P1-YFP fusions were trypsinized 48 h posttransfection and their DNA stained with Hoechst and

analyzed by flow cytometry. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (E) Cell cycle distribution presented in D was quantified using the ModFit LT™ software and is graphically presented.

4.3.4.5 PHLPP1-E1 chimera interacts with UAF1-USP46

We reasoned that if P1 is sufficient for the interaction with UAF1, it could functionally rescue an E1 protein lacking its N-terminal UBP (E1Δ). To test this, we used the E1Δ construct and fused it N-terminally to P1 WT or VE (Fig. 4.7A). We next verified if the chimeric PHLPP1-E1 (P1-E1Δ) protein reconstituted the capacity of E1 to interact with UAF1 and USP46. In order to do so, E1 was immunoprecipitated from C33A cells transfected with vectors encoding the 3F-E1 constructs (E1 WT, E1Δ, P1_{WT}-E1Δ or P1_{VE}-E1Δ) using anti-Flag antibodies. As shown in Fig. 4.7B, E1 WT interacted with endogenous UAF1 and USP46, while truncated E1Δ failed to do so. Strikingly, the chimera P1_{WT}-E1Δ completely restored the capacity of E1Δ to interact with UAF1 and USP46. This suggests that P1 is functionally equivalent to N40 in regard to UAF1 and USP46 interaction. While the P1_{WT}-E1Δ chimera did recruit UAF1 and USP46, introduction of the VE aa substitution (P1_{VE}-E1Δ) greatly reduced its interaction with UAF1 and USP46. Nonetheless, the P1_{VE}-E1Δ chimera still partially interacted with UAF1-USP46. Moreover, the fusion of P1 to E1Δ did not generally interfere with E1 function and/or folding, since it was still as competent as full-length E1 to interact with E2 in coIP experiments (Fig. 4.7C).

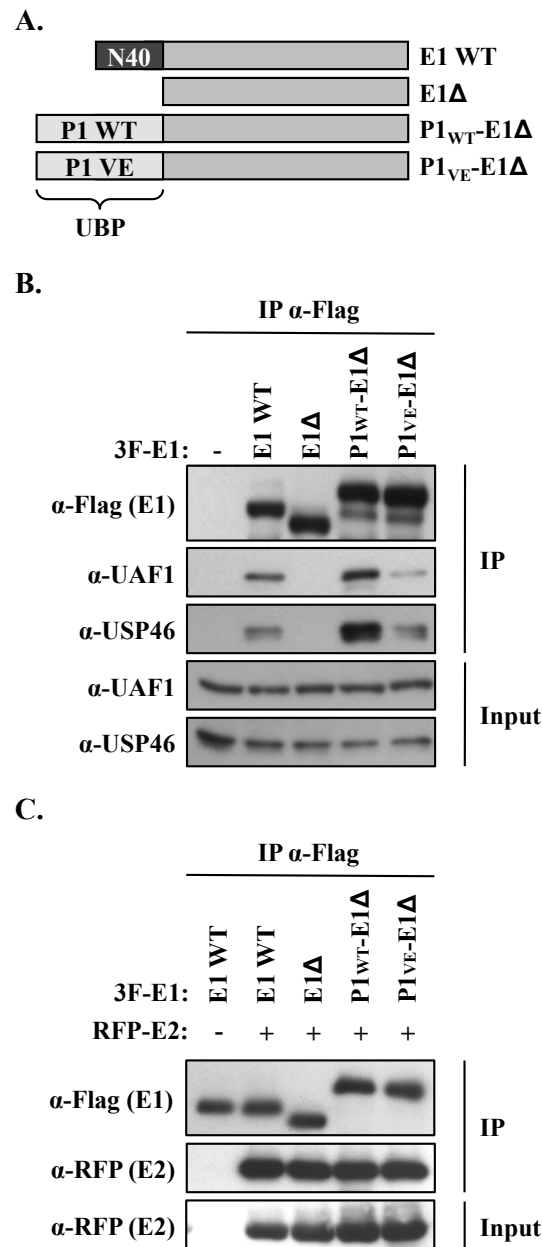


Figure 4.7 P1-E1 Δ chimeras restore the capacity of E1 Δ to interact with UAF1 and USP46.

(A) Schematic representation illustrating the various E1 constructs. The E1 Δ construct was generated by deleting E1 UBPs, N40, which is indicated in black. E1 chimeric proteins were generated by fusing the PHLPP1-derived P1 peptide, either WT or VE, to the E1 Δ protein. All the constructs were cloned as N-terminal fusions to the 3F epitope. (B) Coimmunoprecipitation of the chimeras with endogenous UAF1 and USP46. C33A cells were transfected with the indicated E1 expression plasmids and harvested 48 h posttransfection, and whole-cell extracts were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag antibodies. The immunoprecipitates were analyzed using anti-Flag (for E1), anti-UAF1 and anti-

USP46 antibodies. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least three independent experiments with similar results. (C) Coimmunoprecipitation of the chimeras with HPV E2. Coimmunoprecipitation experiments were performed as in (B) in presence of cotransfected RFP-E2. The immunoprecipitates were analyzed using anti-Flag (for E1) and anti-RFP (for E2) antibodies. Cell extract input is shown below. Data are representative of at least two independent experiments with similar results.

The E1-UAF1 interaction, in the presence of E2, is known to lead to the recruitment of UAF1 from the cytoplasm to nuclear foci, which are thought to be the sites of viral DNA synthesis (20). To verify if P1_{WT}-E1 Δ chimeric proteins would behave similarly to E1 WT in replication conditions, we tested the capacity of the fusion proteins to relocalize UAF1 by fluorescence microscopy. The subcellular localization of UAF1 was assessed by confocal microscopy in cells cotransfected with the different E1 constructs, UAF1-GFP and RFP-E2. As expected, UAF1 was diffusely localized throughout the cell (pancellular) in the absence of E1 (Fig. 4.8A and quantified in Fig. 4.8B). When E1 WT was expressed, UAF1 accumulated to the nucleus and predominantly within nuclear foci colocalizing with E2. In contrast, UAF1 failed to be relocalized to the nucleus in E1 Δ -expressing cells and had pancellular localization, consistent with the fact that this truncated E1 is defective for UAF1-binding. The P1_{WT}-E1 Δ protein completely rescued the ability of E1 Δ to recruit UAF1 within E2-containing nuclear foci. Conversely, P1_{VE}-E1 Δ was not as efficient in relocalizing UAF1 as the P1_{WT}-E1 Δ chimera, since UAF1 was localized equally in the cytoplasm and in the nucleoplasm, and mainly absent from the nuclear foci (only ~10%). The partial defect of the P1_{VE}-E1 Δ chimera is consistent with the fact that it partially retains its capacity to interact with UAF1, as shown in Fig. 4.7B. Altogether, these data suggest that P1 fusion to E1 is sufficient for UAF1 and USP interactions, and recruitment of UAF1 into E1-E2 foci.

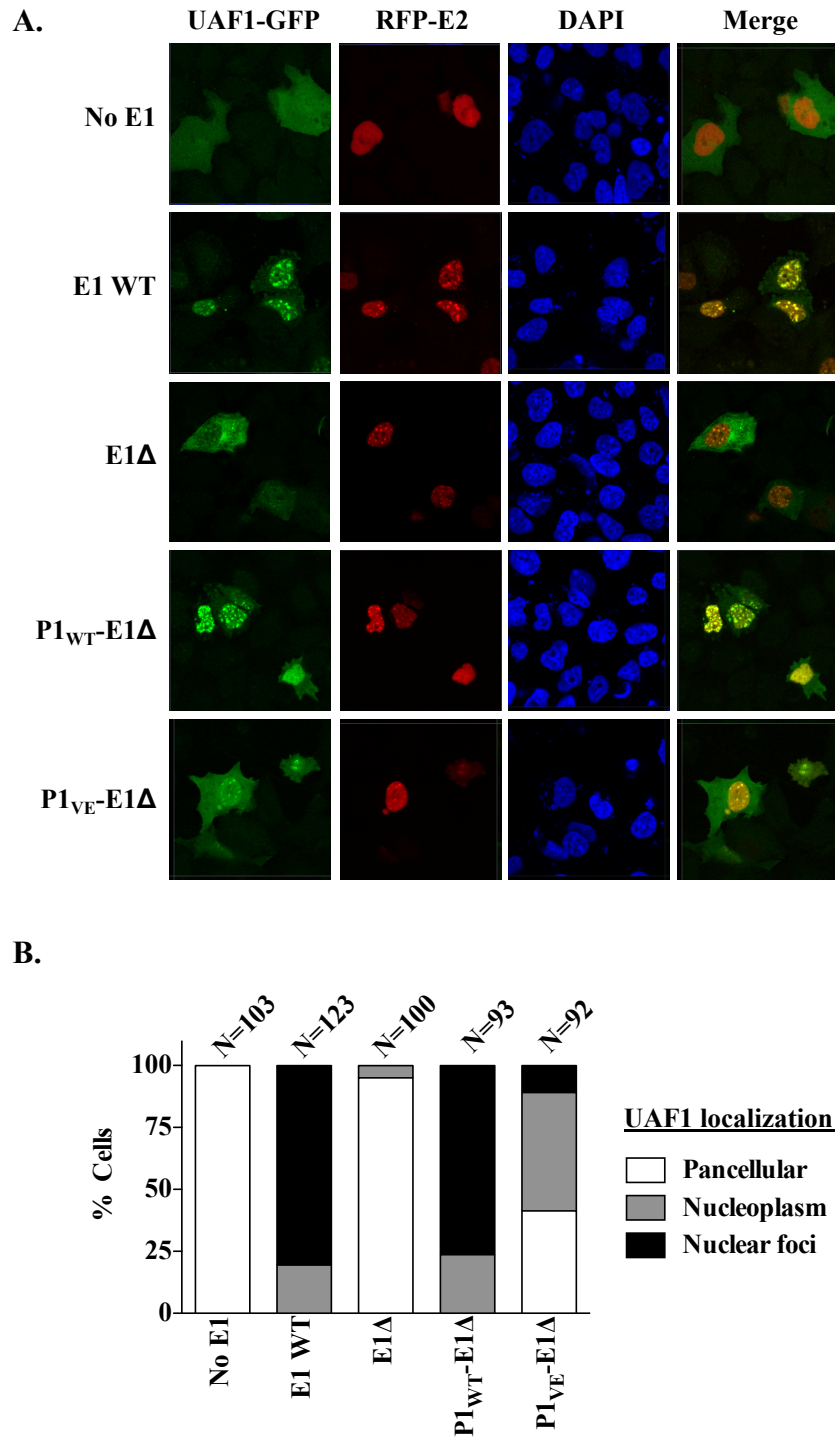


Figure 4.8 P1-E1Δ chimeras recruits UAF1 to nuclear foci.

(A) Fluorescence confocal microscopy showing the subcellular localization of UAF1-GFP and RFP-E2, when coexpressed with the E1 constructs described in Fig. 4.7A. Nuclei were stained with DAPI. (B) Subcellular localization of UAF1-GFP, as observed in (A), was quantified and categorized as pancellular, localized diffusely in the nucleoplasm or in nuclear foci. Only cells positive for both UAF1

and E2 were counted. The number of counted cells is indicated above the graph and is representative of three independent experiments.

4.3.4.6 The PHLPP1-E1 chimera facilitates HPV DNA replication

The results described above suggest that P1 is functionally similar to E1 N40 in regard to its capacity to bind UAF1. We reasoned that if the function of N40 during the HPV life cycle were to essentially recruit the UAF1-USP complex to the viral DNA, the fusion of the peptide P1 to E1 Δ could rescue viral DNA replication. We performed a luciferase-based HPV DNA replication assay using increasing quantities of plasmids encoding E1 Δ or the P1-E1 Δ chimeras. To better illustrate the extent of the replication activity of these E1 proteins, the replication signal is reported as a percentage of the usual E1 WT levels (Fig. 4.9A). As previously published, E1 Δ -mediated replication increased in a dose-dependent manner and reached a plateau at approximately 20% of E1 WT activity. Strikingly, fusion of P1 WT to E1 Δ led to an important rescue of its replication capacity, with a maximal replication of about 45% of E1 WT levels. This is in agreement with the hypothesis that artificial recruitment of UAF1 through the fusion of an ectopic UBP to E1 Δ is sufficient to restore UAF1-binding and rescue HPV DNA replication. Importantly, the VE aa substitution greatly reduced the capacity of the chimera to rescue HPV DNA replication. The replication levels of P1_{VE}-E1 Δ reached a plateau at approximately 30% of E1 WT levels. The magnitude of the rescue phenotype correlated with the capacity of the chimeric proteins to interact with UAF1 and relocalize it to nuclear foci. Specifically, P1_{VE}-E1 Δ partially retained its interaction with UAF1 and exhibited an intermediate phenotype in UAF1 foci formation experiments. Similarly, P1_{VE}-E1 Δ had an intermediate replication activity as compared to P1_{WT}-E1 Δ and E1 Δ .

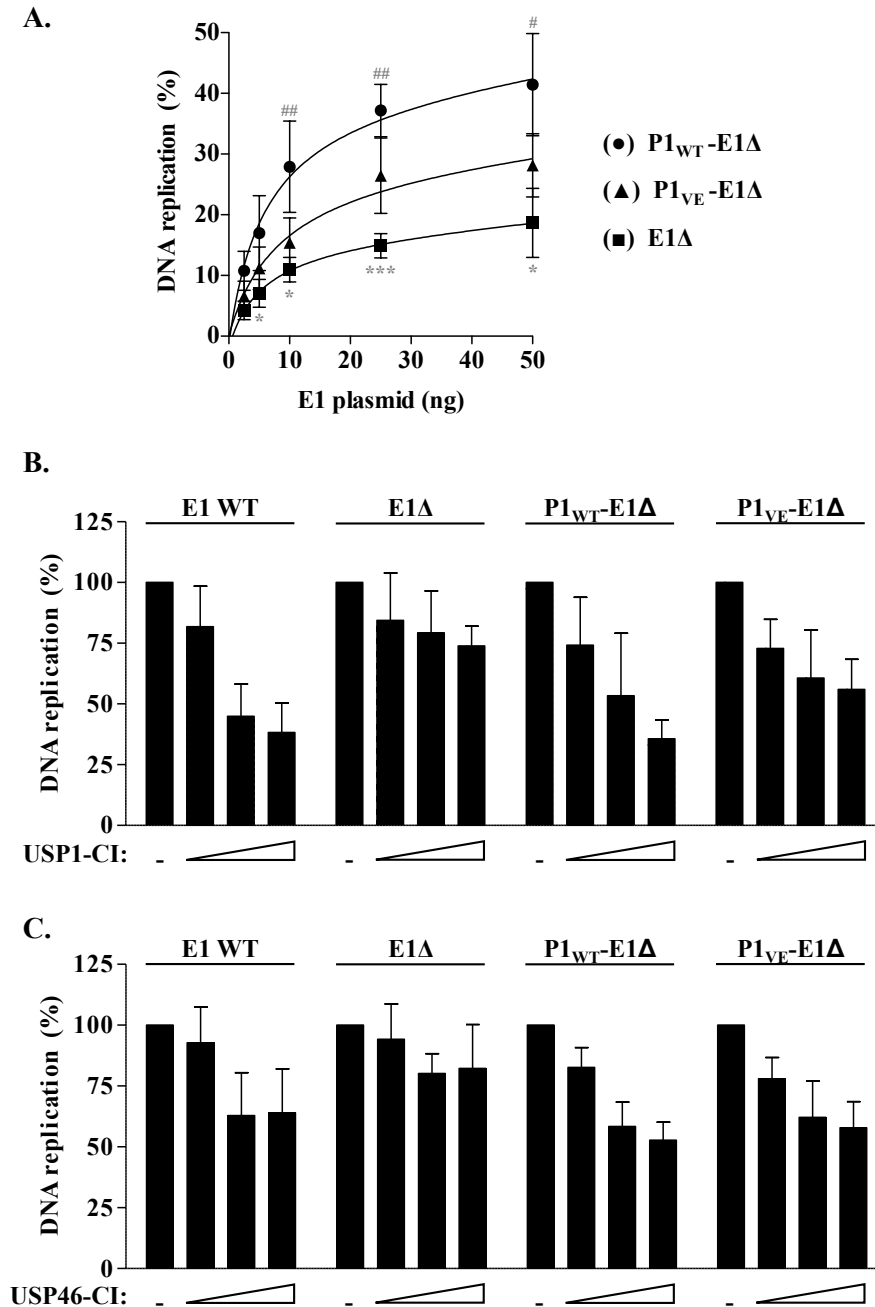


Figure 4.9 P1 fusion to E1Δ facilitates HPV DNA replication in a UAF1-dependent manner

(A) DNA replication activities of different E1 constructs using a gradient of E1 expression vectors (2.5, 5, 20, 25 and 50 ng). Replication activity is reported as a percentage of the maximal signal obtained with E1 WT (not shown). An unpaired two-tailed Student's t test was used to compare differences between E1Δ and P1_{VE}-E1Δ (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005) or E1Δ and P1_{WT}-E1Δ (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.005). (B-C) HPV DNA replication levels of the different E1 proteins in cells expressing a gradient of USP1-CI (B) or USP46-CI (C). Cells cotransfected with the empty RFP vector were used as a

negative control (-). DNA replication activity is reported as a percentage of the signal obtained with the negative control. For A-C, each value represents the average of three independent experiments, each performed in triplicate, with standard deviations presented as error bars.

To further validate that the rescue phenotype of the chimeric P1_{WT}-E1 Δ is UAF1-binding dependent, we aimed to inhibit UAF1 function and observe its effect on the replication capacity of the fusion proteins. In another study, we showed that an important role of UAF1 during HPV DNA replication is to recruit deubiquitinating enzymes to the viral replisome, namely USP1, USP12 and/or USP46. Overexpression of catalytically inactive versions of any of these USPs (or catalytically inactive [USP-CI]) was also found to lead to a reduction of HPV DNA replication. This prompted us to test if P1_{WT}-E1 Δ -mediated replication would be sensitive to overexpression of the USPs-CI, as would be expected if the rescue phenotype were brought about by the recruitment of the UAF1-USP complex. To do so, we repeated the HPV DNA replication assay using the various E1 constructs in combination with increasing amounts of USP1-CI or USP46-CI, the two most potent inhibitors. As expected, E1 WT-mediated DNA replication was inhibited by approximately 65% by USP1-CI and 35% by USP46-CI (Fig. 4.9B-C). E1 Δ was only marginally affected by USP1-CI and USP46-CI overexpression. Similarly to E1 WT, P1_{WT}-E1 Δ -mediated DNA replication was inhibited by USP1-CI and USP46-CI overexpression. The P1_{VE}-E1 Δ protein was also partially affected by overexpression of USP1-CI or USP46-CI, in agreement with the fact that it partially recruits the UAF1-USP complex. In the case of USP1-CI, however, this inhibition was significantly weaker than with P1_{WT}-E1 Δ , an observation consistent with the fact that the VE mutation reduces the efficiency of USP recruitment. A statistical analysis of these results is provided in Table 4.1. Overall, these results support the notion that the rescued replication activity of P1_{WT}-E1 Δ is UAF1-binding dependent and requires the activity of the USPs.

Table 4.1 Statistical analysis of inhibitory activity of USP-CI

	USP1-CI	USP46-CI
E1 WT vs E1Δ	p < 0.001	p < 0.05
P1WT-E1Δ vs E1Δ	p < 0.001	p < 0.01
P1VE-E1Δ vs E1Δ	p < 0.05	p < 0.01
E1 WT vs P1WT-E1Δ	n.s.	n.s.
P1VE-E1Δ vs P1WT-E1Δ	p < 0.01	n.s.

An unpaired two-tailed Student's t test was used to evaluate differences between various constructs at the the highest dose of USP-CI, as presented in figure 4.9B-C

4.3.5 Discussion

The HPV E1-UAF1 interaction is essential for optimal viral DNA replication and is mediated through a short N-terminal UAF1-binding peptide (UBP), referred to as N40 (7, 20). We presented in another study that the E1-UAF1 interaction leads to the recruitment of a deubiquitinase complex containing a subset of ubiquitin-specific proteases (USPs), namely USP1, USP12 and USP46, whose enzymatic activities are required for HPV DNA replication (Lehoux et al., personal communication). Here, we present the discovery of a novel family of UAF1-binding proteins named PHLPP that encode, like E1, their own UBP. A large-scale proteomic study previously detected these UAF1-PHLPP interactions in HEK cells, but never directly validated them (25). This PHLPP family of phosphatases comprises the two isoforms PHLPP1 and PHLPP2 that have been recently shown to dephosphorylate a common set of substrates, such as the kinases Akt and PKC (3). They have been implicated as tumor suppressor molecules important for the control of proliferation and survival in normal and cancer cells. Interestingly, some recent reports implicated the enzymes USP1 and USP46 as regulators of PHLPP1 stability (21, 29).

In the present paper, we show that E1 and PHLPP1 interactions with UAF1 are mutually exclusive. A PHLPP1-derived peptide comprising the aa 1027-1126 and encoding the minimal UBP, referred to as P1, is sufficient to interact with UAF1 and USP46. Our data also suggest that the PHLPP1-USP46 interaction occurs through binding with UAF1 as a ternary complex. This is inconsistent with another study that implicated aa 1139-1172 of PHLPP1 as the minimal USP46-binding region (21); here, the binding domain was extrapolated from deletion analysis, but binding with the

minimal peptide was not confirmed. While the results presented by Li et al. are convincing, introduction of truncations within proteins can sometimes lead to aberrant folding and loss of function that could explain why we have mapped UAF1-USP46-binding to a similar region and confirmed the interaction to occur slightly upstream of what was previously found. To further validate that P1 is the minimal UBP, we have introduced in P1 the corresponding aa substitution previously identified in N40 (VE mutation), and known to abrogate UAF1-binding, and observed that P1 VE failed to bind efficiently to UAF1 and to USP46. As expected, overexpression of P1 competed with the E1-UAF1 interaction, and as a result, inhibited HPV DNA replication. Moreover, P1 overexpression affects specifically HPV DNA replication, since it does not impair cell proliferation or expression of the luciferase reporter alone.

In addition, construction of a PHLPP1-E1 chimeric protein (P1_{WT}-E1 Δ), by swapping the UBPs of E1 and PHLPP1, rescued the capacity of a truncated E1 molecule to interact with UAF1 and USP46. We thus demonstrate that E1 and PHLPP1 UBPs are functionally equivalent in regard to UAF1 interaction and recruitment of the associated USPs. Moreover, P1_{WT}-E1 Δ had a restored capacity to relocalize UAF1 into E1-E2-containing nuclear foci. Interestingly, P1_{VE}-E1 Δ showed an intermediate phenotype with residual interaction with UAF1-USP46 in coIP experiments and, accordingly, a partial ability to relocalize UAF1 into nuclear foci. This is also consistent with the previous observation that E1 VE mutant proteins still retain weak UAF1-binding (20). Strikingly, fusion of P1 WT to E1 Δ partially rescued E1 Δ -mediated HPV DNA replication, while P1_{VE}-E1 Δ possessed an intermediate replication phenotype. The fact that a PHLPP1-derived peptide restores E1 Δ capacity to recruit UAF1-USP and simultaneously rescues its DNA replication activity suggests that N40 and P1 are functionally similar. This strengthens the hypothesis that N40 essentially functions as a UAF1-USP recruiting module. This is also supported by the fact that the increased viral DNA replication activity of the P1_{WT}-E1 Δ chimera is specific to its capacity to interact with UAF1-USP, since the VE mutation that abrogates its interaction with UAF1 or overexpression of catalytically inactive USPs both reduced DNA replication levels. It is surprising that P1 fusion to E1 Δ does not completely rescue HPV DNA replication, since our present data demonstrates that the chimera likely interacts efficiently with UAF1-USP46. It is possible that the E1-UAF1 interaction is normally finely regulated by elements

contained within N40. For instance, USP1-binding to UAF1 has been shown to rely on the phosphorylation of key residues within USP1, in a cell cycle-dependent fashion (8, 28). Fusion of P1 with E1 may lead to the loss of subtle and yet unknown regulatory mechanisms of UAF1-USP functions during HPV life cycle. Additionally, we do not exclude the possibility that other, and UAF1-independent, E1 regulatory elements are encoded within the N40 region and thus lacking in the P1-E1 Δ chimera.

Nevertheless, we suggest that an important aspect of N40 function is to mediate the assembly of the E1-UAF1-USP complex. The fact that E1 can substitute for PHLPP1 in the UAF1-USP complex, a deubiquitinase complex suggested to regulate PHLPP1 polyubiquitination status and stability, is interesting and supports the idea that E1 itself could be a substrate of the UAF1-associated USPs. Overall, this study provides a proof of concept that the E1-UAF1 interaction is important during HPV life cycle, such that the artificial recruitment of UAF1 through the fusion with an ectopic UBP is sufficient to facilitate viral DNA replication. Our study also confirms that one of the main functions of the E1 N40 domain is to recruit the UAF1-USP complex and highlights the importance of the deubiquitinase activity during HPV life cycle. Finally, it provides additional evidence that the E1-UAF1 interaction is a *bona fide* therapeutic target whose inhibition would lead to reduced viral DNA replication.

4.3.6 Acknowledgements

We thank Matthieu Rousseau, Julien Leconte and Fanny Bergeron-Labrecque for the PHLPP1 truncation constructs. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). ML was supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a CIHR Frederick Banting and Charles Best doctoral scholarship award. We thank all members of the Archambault laboratory for critical reading of the manuscript.

4.3.7 References

1. Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272:137-150.

2. Bergvall, M., T. Melendy, and J. Archambault. 2013. The E1 proteins. *Virology* 445:35-56.
3. Brognard, J., and A. C. Newton. 2008. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19:223-230.
4. Brognard, J., E. Sierrecki, T. Gao, and A. C. Newton. 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* 25:917-931.
5. Cohn, M. A., Y. Kee, W. Haas, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2009. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* 284:5343-5351.
6. Cohn, M. A., P. Kowal, K. Yang, W. Haas, T. T. Huang, S. P. Gygi, and A. D. D'Andrea. 2007. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* 28:786-797.
7. Cote-Martin, A., C. Moody, A. Fradet-Turcotte, C. M. D'Abramo, M. Lehoux, S. Joubert, G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault. 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.
8. Cotto-Rios, X. M., M. J. Jones, and T. T. Huang. 2011. Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle. *Cell cycle* 10:4009-4016.
9. D'Abramo, C. M., A. Fradet-Turcotte, and J. Archambault. 2011. Human papillomavirus DNA replication: Insights into the structure and regulation of a eukaryotic DNA replisome, p. 217-239. In E. K. Gaston (ed.), *Small DNA Tumour Viruses*. Horizon Scientific Press.
10. Deng, W., B. Y. Lin, G. Jin, C. G. Wheeler, T. Ma, J. W. Harper, T. R. Broker, and L. T. Chow. 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 78:13954-13965.
11. Di Lello, P., L. M. Jenkins, T. N. Jones, B. D. Nguyen, T. Hara, H. Yamaguchi, J. D. Dikeakos, E. Appella, P. Legault, and J. G. Omichinski. 2006. Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53. *Molecular cell* 22:731-740.

12. Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525-541.
13. Fradet-Turcotte, A., F. Bergeron-Labrecque, C. A. Moody, M. Lehoux, L. A. Laimins, and J. Archambault. 2011. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J Virol* 85:8996-9012.
14. Fradet-Turcotte, A., C. Moody, L. A. Laimins, and J. Archambault. 2010. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol* 84:11747-11760.
15. Fradet-Turcotte, A., G. Morin, M. Lehoux, P. A. Bullock, and J. Archambault. 2010. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* 399:65-76.
16. Gagnon, D., H. Senechal, C. M. D'Abramo, J. Alvarez, A. A. McBride, and J. Archambault. 2013. Genetic analysis of the E2 transactivation domain dimerization interface from bovine papillomavirus type 1. *Virology* 439:132-139.
17. Gao, T., F. Furnari, and A. C. Newton. 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* 18:13-24.
18. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16:83-97.
19. Jonker, H. R., R. W. Wechselberger, R. Boelens, G. E. Folkers, and R. Kaptein. 2005. Structural properties of the promiscuous VP16 activation domain. *Biochemistry* 44:827-839.
20. Lehoux, M., A. Fradet-Turcotte, M. Lussier-Price, J. G. Omichinski, and J. Archambault. 2012. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. *J Virol* 86:3486-3500.
21. Li, X., P. D. Stevens, H. Yang, P. Gulhati, W. Wang, B. M. Evers, and T. Gao. 2013. The deubiquitination enzyme USP46 functions as a tumor suppressor by controlling PHLPP-dependent attenuation of Akt signaling in colon cancer. *Oncogene* 32:471-478.

22. Morin, G., A. Fradet-Turcotte, P. Di Lello, F. Bergeron-Labrecque, J. G. Omichinski, and J. Archambault. 2011. A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol* 85:5287-5300.
23. Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17:1030-1032.
24. Sakakibara, N., R. Mitra, and A. A. McBride. 2011. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol* 85:8981-8995.
25. Sowa, M. E., E. J. Bennett, S. P. Gygi, and J. W. Harper. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 138:389-403.
26. Sun, Y., H. Han, and D. J. McCance. 1998. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* 79 (Pt 7):1651-1658.
27. Uesugi, M., O. Nyanguile, H. Lu, A. J. Levine, and G. L. Verdine. 1997. Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* 277:1310-1313.
28. Villamil, M. A., Q. Liang, J. Chen, Y. S. Choi, S. Hou, K. H. Lee, and Z. Zhuang. 2012. Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1. *Biochemistry* 51:9112-9123.
29. Zhiqiang, Z., Y. Qinghui, Z. Yongqiang, Z. Jian, Z. Xin, M. Haiying, and G. Yuepeng. 2012. USP1 regulates AKT phosphorylation by modulating the stability of PHLPP1 in lung cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 138:1231-1238.

5 Discussion

Le domaine N-terminal de E1 est essentiel pour la réplication de l'ADN du VPH *in vivo*, mais pas *in vitro*, suggérant un rôle dans la régulation de l'hélicase. Les quarante premiers aa de E1 (N40) sont hautement conservés chez les VPH anogénitaux, sont importants pour le maintien du génome viral et sont essentiels pour la liaison à la protéine cellulaire UAF1. L'objectif des travaux présentés dans cette thèse était de valider directement l'importance de la protéine UAF1 au cours du cycle du VPH et de la réplication de son ADN plus particulièrement. Ces études avaient aussi pour but d'investiguer la ou les fonctions de UAF1 requises au cours du cycle réplcatif du VPH en s'intéressant plus spécifiquement à l'interactome de E1-UAF1. Les résultats présentés dans la section 2 illustrent que le défaut des protéines E1 contenant des substitutions d'aa les rendant défectives pour l'interaction avec UAF1 est intrinsèque. Ces mutations n'affectent pas la localisation de E1 ou sa capacité à s'assembler à l'ori. L'importance de la liaison à UAF1 a été clairement établie par l'observation que la surexpression du peptide N40 suffisait à interférer avec l'interaction E1-UAF1 et, incidemment, inhiber la réplication de l'ADN viral. Nous avons constaté que UAF1 s'associe physiquement à l'origine virale et est relocalisé dans des foyers nucléaires typiques de sites de synthèse d'ADN viral, d'une manière dépendante de l'interaction avec E1.

Les travaux présentés dans les sections 3 et 4 nous ont permis de mieux comprendre la fonction de UAF1 par l'étude d'enzymes cellulaires qui s'y associent. Dans la section 3, nous avons décrit l'existence dans les cellules du col utérin de complexes binaires entre UAF1 et trois DUB : USP1, USP12 et USP46. Nous avons aussi découvert que E1 s'associe simultanément avec UAF1 et n'importe lequel de ces USP, et que ces derniers sont relocalisés au noyau par E1 et s'associent à l'ADN viral. Nous avons aussi déterminé que l'activité catalytique de ces USP est importante lors de la réplication de l'ADN viral. Finalement, nos travaux ont permis l'identification de la protéine PHLPP1 comme un autre partenaire d'interaction cellulaire de UAF1. PHLPP1 possède un motif de liaison à UAF1 similaire à celui de E1. La fusion de ce peptide à une version tronquée de E1 n'interagissant plus avec UAF1 reconstitue partiellement son activité de réplication, de manière dépendante du recrutement des USP actifs. Ces

données soutiennent que le rôle du domaine N-terminal de E1 est principalement de recruter UAF1 et ses DUB associées, dont l'activité est importante pour la réplication de l'ADN viral.

5.1 Réplication de l'ADN du VPH : interaction E1-UAF1

Nos travaux antérieurs suggèrent que l'interaction E1-UAF1 est importante pour une réplication optimale de l'ADN viral (Cote-Martin et al., 2008). Cette interprétation est essentiellement basée sur l'utilisation de substitutions d'aa dans E1 qui rendent la protéine défective pour l'interaction avec UAF1. Les résultats de la section 2 montrent que la surexpression de ces mutants de E1 ne permet pas de compenser le défaut de réplication et ne mène pas à des niveaux de réplication similaires à la protéine de type sauvage ; la réplication plafonne à 25-60% des niveaux WT. Ces études démontrent que le défaut de ces protéines est intrinsèque, indépendant du niveau d'expression de E1 et n'affecte pas la localisation de la protéine. Aussi, l'importance du défaut de réplication de ces mutants corrèle avec la gravité du défaut d'interaction avec UAF1. Par exemple, le mutant VI possède une capacité d'interaction résiduelle avec UAF1 et atteint des niveaux de réplication de 50-60%. Au contraire, l'interaction du mutant WF avec UAF1 est pratiquement indétectable et montre le défaut de réplication le plus important (25-35%).

L'introduction de substitutions dans la séquence primaire d'une protéine peut parfois mener à des aberrations dans son repliement ou encore à la perte de certaines fonctions inconnues contenues dans cette région. Les travaux présentés dans la section 2 se sont donc concentrés sur l'élaboration d'une stratégie pour inhiber l'interaction E1-UAF1 dans un contexte où les protéines virales sont de type sauvage. La déplétion de UAF1 par interférence par l'ARN s'est avérée néfaste pour la prolifération et la survie cellulaire, tel que présenté en section 3. La réplication du VPH exploite la machinerie cellulaire de réplication de l'ADN et tout traitement menant à une altération du cycle cellulaire peut vraisemblablement mener à une inhibition collatérale de la réplication de l'ADN viral. Ce phénomène est illustré par l'effet négatif qu'ont des inhibiteurs du cycle cellulaire sur la réplication de l'ADN du VPH (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010). Nous avons de ce fait cherché une approche alternative pour inhiber l'interaction avec UAF1 sans toutefois affecter la prolifération cellulaire. Le fait que le motif de liaison à

UAF1 est contenu dans un court motif N-terminal de E1 nous a permis de dériver un peptide de E1, le peptide N40, encodant les 40 premiers résidus de E1 et conservant sa capacité à lier UAF1. L'introduction des substitutions d'aa en alanine préalablement caractérisées abolit également la capacité du peptide N40 à lier UAF1. La surexpression du peptide N40 mène à une inhibition dose-dépendante de la réplication de l'ADN viral, et ce, sans affecter la survie cellulaire, la progression du cycle cellulaire ou la synthèse d'ADN par la cellule. De plus, les peptides mutants (WF, VE ou VI) n'ont pas d'effet sur la réplication de l'ADN viral, suggérant que le potentiel inhibiteur du peptide est dépendant de sa capacité à lier UAF1.

UAF1 est relocalisé du cytoplasme au noyau en présence de E1, un phénomène dépendant du NLS de E1 (Cote-Martin et al., 2008). Ce mécanisme de translocation nucléaire de UAF1 est similaire à celui identifié pour USP1 qui, grâce à ses propres NLS, relocalise UAF1 au noyau (Garcia-Santisteban et al., 2012). Nos travaux présentés à la section 2 ont permis d'étudier la localisation de UAF1 dans un contexte similaire à celui de la réplication de l'ADN viral. En présence de E1 et E2, nous avons déterminé que UAF1 était non seulement relocalisé au noyau, mais qu'il s'assemblait aussi dans des foyers nucléaires contenant E1. Ces compartiments nucléaires ont précédemment été décrits comme des sites de réplication active de l'ADN viral colocalisant avec de multiples protéines de l'hôte impliquées dans la synthèse de l'ADN et montrant également une incorporation active de nucléotides (section 1.3.4). En outre, nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont déterminé que UAF1 est physiquement associé à l'ADN viral. Cette relocalisation à l'origine dépend également de l'intégrité du motif de liaison à UAF1 contenu dans le N-terminal de E1. La surexpression du peptide N40 suffit aussi à exclure UAF1 du réplisome viral. Nous avons toutefois observé que l'inhibition de l'interaction E1-UAF1, soit par l'introduction de mutations dans E1 ou par la surexpression du peptide N40, n'affecte pas l'assemblage de E1 sur l'origine virale. Ces données suggèrent que l'interaction E1-UAF1 n'est pas requise pour la liaison de E1 à l'ADN. En comparaison, l'introduction de substitutions dans le domaine OBD ou ATPase empêche la formation du pré-réplisome (ori-E1-E2) sur le génome viral. L'importance du domaine ATPase pour l'association à l'ori suggère que les expériences de CHIP détectent principalement la forme oligomérisée de E1, dont l'assemblage est dépendant de l'ATP. Ceci est cohérent avec l'observation antérieure

que la liaison de E1 à l'ori, *in vitro*, requiert un domaine ATPase fonctionnel (Titolo et al., 2000). Ainsi, on peut conclure que l'interaction E1-UAF1 n'est pas requise pour l'hexamérisation de l'hélicase virale, puisque l'inhibition de l'interaction n'affecte pas la liaison de E1 à l'ori, tel que détecté par ChIP. La fonction de UAF1 au cours du cycle viral est donc vraisemblablement requise à une étape post-assemblage du pré-réplisome E1-E2-Ori et postérieure à l'oligomérisation de E1.

5.2 Relation structure-fonction du motif de liaison à UAF1

Dans l'objectif de mieux comprendre la fonction de UAF1 au cours du cycle viral, le domaine de liaison à UAF1 (UBP, *UAF1-binding peptide*) a été étudié en soi. Il est à noter que la région minimale de E1 du VPH31 requise pour l'interaction avec UAF1 est contenue à l'intérieur des résidus 10-40. La plupart de nos travaux utilisent toutefois un peptide légèrement plus long (1-40). Des analyses *in silico* de la structure secondaire prédisent qu'une bonne partie du domaine N-terminal est intrinsèquement désordonné (Morin et al., 2011). Des peptides dérivés du N-terminal de E1 ont été purifiés et leur structure caractérisée par résonance magnétique nucléaire (RMN) bidimensionnelle (voir section 2). Le peptide N40 a été analysé, ainsi qu'un peptide un peu plus long incluant les aa 1-83 (N83). La dispersion très limitée des déplacements chimiques, conjointement avec la presque parfaite superposition des spectres RMN des peptides N40 et N83, suggère que ces peptides sont non-structurés en solution. En outre, des analyses approfondies de l'effet Overhauser ont été effectuées. L'effet Overhauser représente l'interaction magnétique dipôle-dipôle entre deux noyaux avoisinant. Cet effet étant relatif à la proximité entre deux noyaux, il est possible de calculer les distances internucléaires et d'inférer si le peptide adopte une structure secondaire favorisant ces noyaux proximaux. Ces analyses ont établi que le domaine N-terminal ne présente aucun effet Overhauser à moyen ou long terme, soutenant l'hypothèse que cette région est intrinsèquement désordonnée. Nous avons déjà démontré que le peptide N83 est prédit pour contenir une hélice amphipathique similaire à celle de p53 et de VP16 (Morin et al., 2011). L'hélice de ces deux dernières protéines se replie suite à la liaison à leur partenaire d'interaction, la sous-unité Tfb1 du facteur général de transcription TFIID. Il est probable que le domaine N-terminal de E1, qui est désordonné en solution, adopte

une structure secondaire suite à sa liaison à d'autres protéines, comme UAF1, par un mécanisme de repliement induit par la liaison (*fold-upon binding*).

Une autre particularité intéressante du domaine N40 est sa charge négative élevée. La présence d'un nombre important de résidus aspartate et glutamate (composition en résidus D+E > 21%) lui confère un point isoélectrique très bas (pI = 3,1). Notons également que le domaine de liaison à UAF1 encodé dans PHLPP1, P1, possède lui aussi une charge négative importante avec un pI de 4,4. En plus de partager des homologies de séquence, les prédictions de désordre suggèrent que les UBPs dérivés de E1 et de PHLPP1 partagent de grandes similitudes structurales (voir Figure 4.4 et 5.1). Les deux peptides sont prédits pour être principalement désordonnés avec un court domaine structuré qui englobe les résidus essentiels pour l'interaction avec UAF1. Les études structurales démontrent que cette région du N40 n'est néanmoins pas repliée en solution. Ces deux UBP semblent donc appartenir à la famille des peptides intrinsèquement désordonnés qui pourraient se replier suite à la liaison à UAF1.

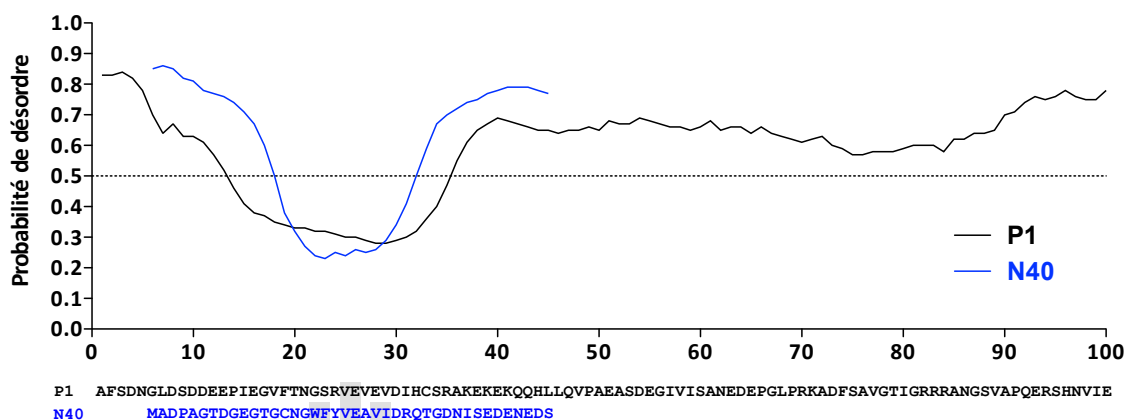


Figure 5.1 Prédiction de désordre des peptides UBP

Graphique indiquant l'indice de désordre de chaque résidu des peptides P1 et N40 obtenu à l'aide de l'algorithme metaPrDOS. Un indice supérieur à 0,5 (ligne pointillée) indique un résidu considéré comme désordonné. La séquence primaire de chaque peptide est indiquée sous le graphique. Les substitutions connues pour abolir l'interaction avec UAF1 sont indiquées par un rectangle gris. Les deux séquences sont positionnées pour aligner les résidus VE de chaque peptide.

L'analyse *in silico* du peptide permet aussi d'identifier certains sites de phosphorylation présomptifs à l'intérieur du N40. Selon les prédictions, la sérine S33 est

celle dont la phosphorylation est la plus probable et elle se situe dans un site consensus de phosphorylation par CKII (SxxD/E). Puisqu'il a déjà été établi que la phosphorylation de USP1 est requise pour son association avec UAF1, nous avons vérifié si la phosphorylation de S33 était nécessaire pour la réplication de l'ADN. Nos travaux ont démontré que la substitution de ce résidu en alanine n'affecte pas la réplication de l'ADN viral (voir Figure 5.2), et ne reconstitue donc pas le défaut des variants de E1 défectifs pour l'interaction avec UAF1. La phosphorylation de S33 n'est de ce fait pas requise pour la réplication transitoire de l'ADN viral, suggérant que cette modification n'affecte pas l'interaction de E1 avec UAF1. L'existence d'autres modifications post-traductionnelles à l'intérieur de l'UBP de E1 demeure un sujet à investiguer.

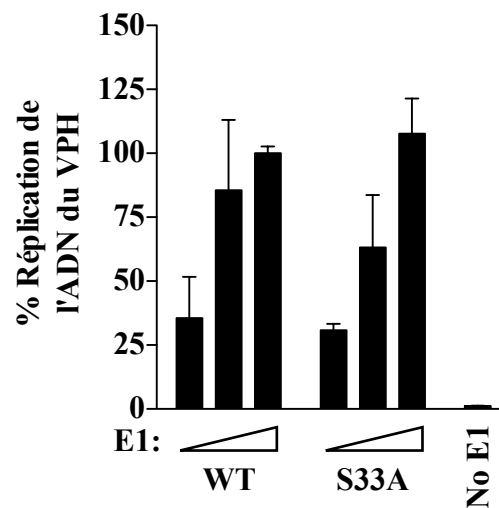


Figure 5.2 Effet de la substitution S33A sur la réplication de l'ADN viral

Le site présumé de phosphorylation par CKII, S33, n'est pas requis pour la réplication transitoire de l'ADN viral. Un gradient des plasmides encodant les protéines E1, WT ou S33A, a été transfecté dans les C33A, conjointement avec les vecteurs encodant E2, l'ori et la Rluc. Les signaux de la luciférase ont été mesurés 72 h post-transfection à l'aide de l'essai Dual-Glo luciférase assay de Promega. Chaque point représente la moyenne et l'écart-type de deux expériences indépendantes, effectuées chaque fois en triplicata. Ces expériences ont été réalisées par Michaël Lehoux et Claudia M D'abramo.

Finalement, un autre élément particulier du domaine N-terminal de E1 est la présence d'un site de clivage par les caspases 3 et 7 (DxxD). Tel que mentionné précédemment, l'intégrité de ce site et l'activation des caspases ne sont pas requis pour

la réplication transitoire de l'ADN viral ou pour le maintien du génome (Moody et al., 2007; Morin et al., 2011). Par contre, le clivage du N-terminal par les caspases est essentiel pour l'amplification du génome viral. Le clivage par les caspases lors de la différenciation mène à la perte des 49 aa N-terminaux de E1, incluant l'UBP. On peut en conclure que la liaison à UAF1 n'est pas requise pour l'amplification, une possibilité qui est cohérente avec l'observation que les génomes mutants (WF, VE ou VI) sont défectifs pour le maintien de l'épisome, mais parviennent à amplifier efficacement l'ADN viral suite à l'induction de la différenciation (Cote-Martin et al., 2008). Ainsi, lors de la transition entre l'étape de maintien et d'amplification du génome, il y a aussi transition entre un mécanisme de réplication dépendant de la liaison à UAF1 à un autre qui est indépendant de cette interaction. Ce fait peut être expliqué par deux hypothèses, soient : 1) la liaison à UAF1 est non-essentielle pour l'amplification ou 2) la liaison à UAF1 est nuisible à l'amplification du génome. La mutation du site de clivage ou l'inhibition des caspases, occasionnant la rétention de l'UBP, inhibent l'amplification du génome, pouvant soutenir la deuxième hypothèse. Il est toutefois envisageable que d'autres éléments contenus dans les 49 résidus N-terminaux soient néfastes à la réplication. Ceci est d'ailleurs illustré par le fait que la délétion des 71 premiers acides aminés de E1 du VPH11 augmente sa capacité à lier l'ADN *in vitro* (Titolo et al., 2000). La liaison différentielle de UAF1 en fonction de l'étape du cycle viral fournit certaines pistes quant à sa fonction lors de la réplication virale ; ces modèles sont discutés dans les pages suivantes.

5.3 Recrutement d'un complexe à activité déubiquitinase

Les travaux présentés précédemment démontrent que UAF1 est recruté à l'origine via le domaine N40 de E1, un domaine intrinsèquement désordonné. Il est possible que le domaine N40 puisse interagir avec de multiples partenaires de manière simultanée ou mutuellement exclusive. Ceci est particulièrement commun pour les virus qui doivent concentrer leurs fonctions dans un génome de taille réduite et encodent souvent des protéines hautement multifonctionnelles. De plus, la littérature sur les domaines intrinsèquement désordonnés suggère qu'ils sont souvent apparus au cours de l'évolution afin de permettre l'interaction avec divers partenaires grâce à leur flexibilité conformationnelle.

UAF1 ne possède aucun domaine catalytique *per se* et accomplit probablement sa fonction via l'interaction avec d'autres protéines. Afin d'élucider si l'interaction E1-UAF1 est réellement pertinente fonctionnellement, les partenaires d'interaction de UAF1 ont donc été investigués. Des interactions ont été détectées entre UAF1 et les DUB USP1, USP12 et USP46, et ont été présentées dans la section 3. Également, une interaction entre UAF1 et la phosphatase PHLPP1 a été décrite dans la section 4. L'ensemble de ces interactions a été cartographié dans nos travaux, ou par d'autres laboratoires (Cohn et al., 2007), et les domaines impliqués sont résumés dans la Figure 5.3. Sommairement, toutes les interactions requièrent une région assez longue de UAF1, possiblement parce que la structure tertiaire de cette protéine est complexe et est facilement altérée par l'introduction de troncations. Cependant, tous les partenaires de UAF1 requièrent au moins le domaine N-terminal incluant les motifs WD40. La structure *β -propeller* de UAF1 est donc vraisemblablement une plate-forme d'interaction avec l'ensemble des protéines associées. La liaison de UAF1 avec les USP est conservée dans l'évolution chez tous les eucaryotes jusqu'à *S. cerevisiae*. Les protéines Duf1, Ubp9 et Ubp13 sont respectivement les orthologues chez la levure de UAF1, USP12 et USP46. Aucune protéine homologue à USP1 ne semble exister, ce qui est cohérent avec l'inexistence de la voie de l'anémie de Fanconi dans cet organisme. En outre, il existe un orthologue de PHLPP1, nommé Cyr1, qui possède une activité phosphatase combinée à une fonction adénylate cyclase (Brognard & Newton, 2008). Aucune interaction de Cyr1, physique ou épistatique, n'a toutefois été détectée avec Duf1 ou les DUB.

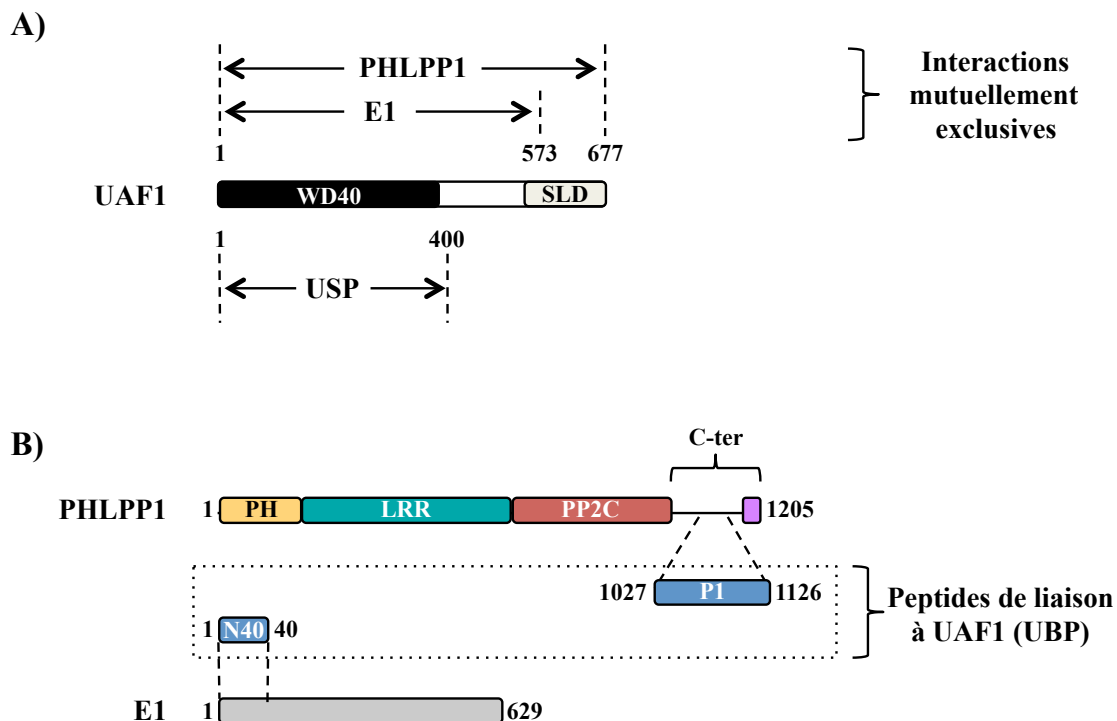


Figure 5.3 Identification des domaines requis pour les interactions entre UAF1 et ses partenaires

A) Représentation des domaines de UAF1 requis pour l'interaction avec E1, PHLPP1 et les USP (USP1, USP12 et USP46). Les interactions E1-UAF1 et PHLPP1-UAF1 sont mutuellement exclusives. B) Localisation des peptides de liaison à UAF1 (UBP), N40 et P1, à l'intérieur des protéines E1 et PHLPP1, respectivement. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Les interactions E1-UAF1 et PHLPP1-E1 sont mutuellement exclusives, établissant que PHLPP1 n'est pas recruté par E1 au réplisome viral. Nous nous sommes donc principalement intéressés aux interactions de UAF1 avec les DUB. E1 et UAF1 peuvent s'assembler avec n'importe lequel des trois USP. Des substitutions discrètes d'acides aminés dans E1 affectent simultanément sa capacité à lier UAF1 et les USP. UAF1 et les trois USP sont connues pour interagir directement sous forme complexes binaires de façon endogène. Certaines données non publiées montrent aussi que la surexpression de UAF1 facilite l'interaction E1-USP, suggérant que UAF1 joue le rôle d'une protéine adaptatrice pour l'assemblage de ce complexe. Toutes ces données supportent un modèle selon lequel E1 s'associe avec UAF1 et les USP sous forme d'un complexe ternaire. De plus, l'interaction avec E1 induit la relocalisation de USP12 et USP46 du cytoplasme au

noyau, argumentant en faveur de l'existence de ce complexe *in vivo*. Des expériences supplémentaires seront utiles afin de complètement valider l'existence de ce complexe ternaire, par opposition la possibilité que des complexes binaires E1-UAF1 et E1-USP puissent exister. Des co-immunoprécipitations inverses ou séquentielles seraient utiles à cette fin.

L'interaction E1-USP conduit aussi au recrutement des USP sur l'origine virale, un processus qui est dépendant de la capacité de E1 à interagir avec UAF1. La surexpression de versions catalytiquement inactives de n'importe lequel des USP mène à une inhibition dose-dépendante de la réplication de l'ADN viral. Au contraire, ces USP-CI n'ont pas d'effet sur la réplication de l'ADN par des protéines E1 défectives pour l'interaction avec UAF1, soit possédant une délétion de l'UBP (E1 Δ , aa 40-629) ou issue du VPB1. En outre, l'inhibition de la réplication observée avec les USP-CI rappelle le niveau de réduction de la réplication observé lors de la mutation ou la délétion de l'UBP de E1 (environ 70% d'inhibition). Ainsi, l'inactivation des USP reconstitue le défaut de réplication observé avec les variants de la protéine E1 incapables d'interagir avec UAF1. Ce phénotype non additif suggère que UAF1 et les USP travaillent de concert. Ce résultat supporte l'hypothèse que la fonction principale de UAF1, et du domaine N40 de E1, est de recruter les USP actifs à l'origine virale.

Nos tentatives d'inactiver la fonction des USP en utilisant une approche d'interférence par l'ARN se sont avérées infructueuses. Effectivement, les cellules exprimant des shRNA contre USP1, USP12 ou USP46 montrent des défauts de prolifération et de survie cellulaire. Un phénotype similaire est obtenu lors de la régulation négative de UAF1. Il n'est pas surprenant d'observer un tel effet lors de l'inactivation de UAF1 ou de USP1, puisque des souris transgéniques possédant une délétion pour l'un de ces gènes meurent à l'état embryonnaire ou périnatal. La disparité observée entre l'effet de la surexpression des USP-CI et des shRNA est toutefois intrigante. Une possibilité est que ces USP accomplissent des fonctions biologiques qui sont indépendantes de leur activité enzymatique et qui ne sont donc pas neutralisées par la mutation de la cystéine catalytique, mais qui sont abolies par la diminution de l'expression par shRNA. Un tel mécanisme est connu pour certaines DUB dont OTUB1 qui régule négativement l'ubiquitination de la chromatine en réponse aux bris de l'ADN db de manière indépendante de son activité catalytique (Nakada et al., 2010).

Une autre explication est que la surexpression des DUB mutantes ne génère pas un effet dominant négatif à l'égard de toutes leurs fonctions. Il est envisageable que la mutation du site catalytique et/ou la fusion à la RFP empêchent les USP de former certains complexes ou de parvenir à une localisation subcellulaire particulière requise pour certaines de leurs activités. Ainsi, ces protéines de fusion seraient moins efficaces pour compétitionner certaines activités des USP endogènes. Finalement, il est possible que les USP endogènes toujours présents dans les cellules exprimant les USP-CI, mais absents dans le contexte des shRNA, suffisent à atténuer l'effet négatif sur la prolifération et la survie cellulaire.

L'efficacité d'inhibition de chacun des USP-CI est variable en fonction de la nature de l'USP. La surexpression de USP1-CI s'est avérée la plus efficace pour inhiber la réplication de l'ADN viral. Étonnamment, c'est aussi la construction la moins bien exprimée. Parmi les trois USP, c'est cependant la seule protéine connue à encoder un NLS et à être naturellement localisée au noyau, le compartiment cellulaire où la duplication de l'ADN du VPH se produit. Cette caractéristique pourrait expliquer son potentiel inhibiteur supérieur. Parmi les trois USP, celui ou ceux qui sont véritablement pertinents pour le cycle réplcatif du virus restent à déterminer. L'inexistence d'inhibiteurs efficaces contre les USP et le manque de spécificité des anticorps présentement disponibles commercialement limitent nos recherches dans cette direction.

L'interaction E1-UAF1 semble clairement importante pour la réplication optimale de l'ADN viral, mais n'est pas strictement essentielle. L'inhibition totale de l'interaction par la délétion des 40 aa N-terminaux de E1 réduit la réplication à environ 30% sans toutefois complètement l'abolir. Une réduction identique de la réplication est observée lors de l'utilisation des USP-CI. Aussi, les génomes contenant les mutations de liaison à UAF1 dans l'ORF de E1 sont défectifs pour le maintien de l'épisome, mais parviennent tout de même à amplifier l'ADN lorsque les kératinocytes entrent en différenciation (Cote-Martin et al., 2008). Ce phénotype suggère que UAF1 ne joue pas un rôle obligatoire pour la réplication virale, comme c'est le cas pour les ADN polymérase par exemple, mais augmente de manière importante l'efficacité de la synthèse de l'ADN soit en promouvant directement l'activité réplcative ou en inhibant des mécanismes cellulaires de restriction. Ces possibilités sont discutées en détails dans les prochaines

pages. Globalement, ces travaux démontrent que l'activité des DUB associées à UAF1 est requise pour la réplication optimale de l'ADN viral.

5.4 Étude d'un UBP dérivé de PHLPP1

Les études protéomiques présentées dans la section 4 ont permis l'identification de PHLPP1 comme partenaire d'interaction de UAF1. Il a été démontré précédemment que PHLPP1, comme E1, s'associe à USP1, USP12 et USP46 (Gangula & Maddika, 2013; Li et al., 2013; Zhiqiang et al., 2012). Nous démontrons dans cette thèse que ces interactions dépendent de UAF1 probablement via la formation d'un complexe ternaire E1-UAF1-USP. Des résultats complémentaires présentés dans l'annexe 1 établissent qu'un complexe ternaire similaire avec PHLPP1 existe et requiert UAF1 comme protéine adaptatrice. Ces travaux ont aussi mené à la découverte du domaine contenu dans PHLPP1 nécessaire pour l'interaction avec UAF1. Ce nouvel UBP, nommé P1, est homologue au peptide N40 dans sa séquence primaire, ses propriétés physicochimiques et sa structure secondaire prédite (voir section 5.2). Ces similitudes, et le fait que PHLPP1 forme un complexe ternaire avec UAF1 et les USP, argumentent aussi en faveur de l'existence *in vivo* d'un complexe ternaire E1-UAF1-USP. Le peptide P1 s'est avéré un outil avantageux pour étudier la fonction de UAF1, et de ses DUB associées, au cours du cycle viral.

En parfaite cohérence avec les similitudes des peptides N40 et P1, les interactions de E1 et de PHLPP1 avec UAF1 sont mutuellement exclusives. La surexpression du peptide P1 mène à l'inhibition spécifique et dose-dépendante de la réplication de l'ADN viral. Ce phénotype est en tout point identique à celui observé lors de l'expression de N40 (section 2). Aussi, la substitution dans P1 des résidus VE en alanines abolit sa capacité à interagir avec UAF1 et annule son potentiel inhibiteur de la réplication. Puisque le peptide P1 est suffisant pour permettre l'interaction avec UAF1 et les USP, nous avons utilisé ce peptide pour générer des protéines chimériques avec des variants de E1 possédant un délétion du N40 (E1 Δ), défectifs pour l'interaction avec UAF1 et pour la réplication du génome viral. La fusion du peptide P1 à E1 Δ restaure complètement la capacité de ces protéines à lier UAF1 et USP46, ainsi qu'à recruter UAF1 dans les foyers nucléaires. De surcroît, ces chimères ont une activité de

réplication améliorée en comparaison aux protéines tronquées, suggérant que le recrutement artificiel du complexe UAF1-USP remplace partiellement la fonction du domaine N40. En faveur de cet argument, l'introduction de la substitution VE dans le peptide P1 de la chimère réduit son activité de réplication. Les protéines chimériques développent aussi une sensibilité à l'expression des USP-CI lors de la réplication de l'ADN, suggérant que leur activité augmentée dépend de la fonction des USP.

Nonobstant une excellente capacité d'interaction de la protéine chimérique avec UAF1 et USP46, la restauration de l'activité de réplication n'est que partielle. Ce résultat suggère que le peptide P1 n'imité pas parfaitement la fonction de N40. Une possibilité, déjà mentionnée précédemment, est que le peptide N40 accomplit des fonctions additionnelles indépendantes du recrutement de UAF1. La nature intrinsèquement désordonnée de ce motif permet aux régions N-terminales des différents monomères de E1 constituant le double hexamère d'exister sous forme d'un ensemble de conformations dynamiques, un contexte permettant au N40 de posséder une élasticité dans ses fonctions ou interactions potentielles. Il est également possible que l'interaction E1-UAF1 soit normalement transitoire et/ou dynamique lors de la réplication et que la régulation de cette interaction nécessite une modulation fine par d'autres éléments encodés dans le N40, via des modifications post-traductionnelles par exemple. Donc, la substitution du N40 par un UBP liant constitutivement UAF1 mène peut-être à la perte de cette subtilité dans la régulation de l'interaction.

Globalement, les résultats présentés dans la section 4 suggèrent que les peptides P1 et N40 sont fonctionnellement équivalents en ce qui a trait à leur capacité de recruter le complexe UAF1-USP. De plus, ces données soutiennent que la fonction du N40 est essentiellement de recruter ces USP sur l'ADN viral.

5.5 Fonction du complexe E1-UAF1-USP

L'importance pour la réplication de l'ADN viral de l'interaction E1-UAF1 et de l'activité des DUB associées a été clairement démontrée dans cette thèse. D'autre part, l'activité phosphatase de PHLPP1, pouvant aussi s'associer à UAF1, ne semble pas être requise pour la réplication de l'ADN viral. En effet, l'interaction E1-UAF1 est incompatible avec l'interaction PHLPP1-UAF1, donc PHLPP1 n'est vraisemblablement

pas associé à la machinerie de réplication de l'ADN viral. Nous avons aussi envisagé la possibilité que l'interaction E1-UAF1 puisse plutôt servir à exclure PHLPP1 du réplisome, une phosphatase qui pourrait représenter un facteur de restriction de la réplication virale. Cette possibilité est peu plausible, étant donnée la localisation cytoplasmique de PHLPP1 qui est incompatible avec un effet sur la réplication virale se déroulant dans le noyau (Annexe 2A). En outre, la surexpression de la protéine PHLPP1 ne montre aucun effet inhibiteur sur la réplication de l'ADN viral (Annexe 2B). Finalement, le faible niveau d'expression de E1 dans les cellules basales qui maintiennent l'épisome est peu conciliable avec une fonction de séquestration d'un facteur cellulaire.

Le mécanisme exact par lequel ce complexe de déubiquitination contribue à la réplication de l'ADN au cours du maintien du génome viral demeure néanmoins incertain. Les travaux présentés dans cette thèse, lorsque mis en contexte avec les données connues dans la littérature, soulèvent deux questions principales :

1) Quelle fonction du complexe UAF1-USP est requise lors de la réplication transitoire de l'ADN et le maintien du génome viral ? Autrement dit, quelle est la nature des substrats de ces DUB, qui sont probablement localisés proximale à l'origine de réplication ?

2) À quelle fin le motif UBP doit-il être clivé par les caspases pour permettre la transition du maintien à l'amplification du génome ? La principale, sinon la seule, fonction connue du domaine UBP étant le recrutement de UAF1-USP, il est possible de spéculer que l'évincement de ce complexe est l'une des résultantes principales de cet événement de clivage.

Certaines possibilités et modèles sont proposés pour répondre à ces questions dans les pages suivantes et sont résumés dans la Figure 5.4.

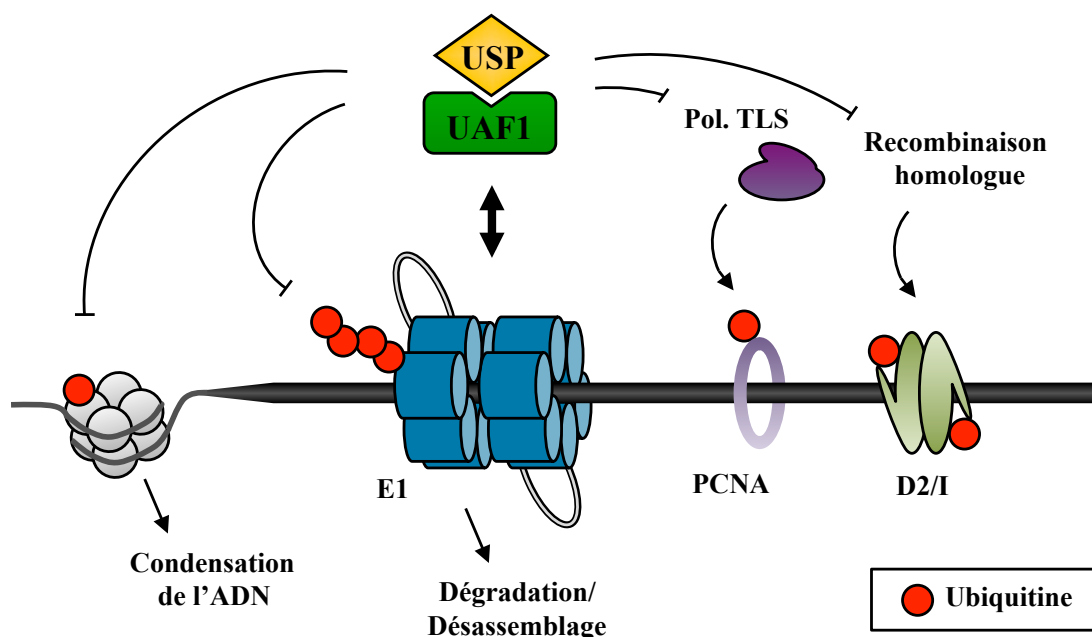


Figure 5.4 Fonction du complexe E1-UAF1-USP (modèle)

Modèle illustrant différents substrats potentiels du complexe UAF1-USP sur l'ADN viral. L'hélicase E1 pourrait être un substrat de UAF1-USP et permettre d'inhiber la dégradation de E1 et de réguler le désassemblage du double hexamère (centre, modèle 1). USP12 et USP46 sont connus pour déubiquitiner les histones H2A et H2B. La forme monoubiquitinée des histones induit souvent une condensation de la chromatine qui pourrait constituer un obstacle à la progression de la fourche de réplication (à gauche, modèle 2). Finalement, le complexe UAF1-USP1 pourrait inhiber le recrutement des polymérase translésionnelles (pol. TLS) et de la machinerie de recombinaison homologue via la déubiquitination de PCNA et FANCD2/FANCI (D2/I), respectivement. L'inactivation de ces voies de réponse aux dommages à l'ADN pourrait être nécessaire pour atténuer les effets antiprolifératifs sur la cellule infectée induits par E1, et ainsi promouvoir le maintien de l'épisome viral qui requiert un cycle cellulaire normal (à droite, modèle 3).

5.5.1 Modèle 1 : Stabilisation du réplisome viral

L'une des fonctions les plus connues de l'ubiquitination consiste en la polyubiquitination de type K48 d'une protéine pour son ciblage et sa dégradation par le protéasome. La littérature abonde d'exemples où des DUB sont impliquées dans la réversion de cette modification et la stabilisation des protéines en question. USP1, USP12 et USP46 ont récemment été proposés être engagés dans de tels processus de stabilisation. Les protéines ID sont par exemple stabilisées par le complexe UAF1-USP1 et la protéine PHLPP1 est stabilisée par les trois USP associés à UAF1. Le fait que

PHLPP1 soit déubiquitiné et stabilisé par le complexe UAF1-USP est intéressant. Les interactions mutuellement exclusives de E1 et de PHLPP1 avec UAF1, ainsi que l'homologie des UBP contenus dans ces deux protéines, suggèrent que ces protéines forment un complexe ternaire similaire avec UAF1 et les USP. On peut prédire que si E1 remplace la position naturellement occupée par PHLPP1 dans le complexe de déubiquitination, la protéine virale puisse être en soi un substrat des USP.

L'ubiquitination de E1 du VPH et la régulation de sa stabilité par le protéasome n'ont jamais été observées. Un tel processus est toutefois connu pour E1 du VPB1. En effet, l'hélicase virale du bovin est polyubiquitinée, possiblement par APC, et dégradée par le protéasome lorsqu'en présence de E2 et de l'origine (Malcles et al., 2002; Mechali et al., 2004). Ceci suggère que l'abondance de E1 est régulée par l'ubiquitination dans le contexte de la réplication de l'ADN viral pour le VPB1. Notons que la modulation de la stabilité de E1 du VPB1 doit néanmoins être indépendante de UAF1, puisque l'interaction avec ce facteur est limitée aux protéines E1 issues des génotypes anogénitaux humains. D'autres hélicases à ADN sont régulées par des mécanismes similaires. Notamment, certaines sous-unités de l'hélicase cellulaire MCM sont dégradées par le protéasome. La sous-unité MCM7 est polyubiquitinée sur la chromatine lors de la phase S, un processus présumé contrôler le désassemblage graduel des complexes MCM au fil de la progression des fourches de réplication (Buchsbaum et al., 2007). La régulation du chargement et du déchargement de l'hélicase cellulaire est essentielle à la réplication et à la stabilité génomique. Par exemple, la protéine INT6 inhibe la dégradation de MCM7 et évite le désassemblage prématuré de l'hélicase pouvant induire un arrêt de la fourche de réplication et des dommages à l'ADN. MCM3 est une autre sous-unité de l'hélicase cellulaire à être polyubiquitinée et dégradée par le protéasome (Cheng et al., 2002). Contrairement à MCM7, MCM3 est polyubiquitiné immédiatement suite à sa synthèse et non pas dans le contexte de l'hexamère, suggérant que l'ubiquitination de cette sous-unité sert à réguler en amont l'assemblage de l'hélicase et non son déchargement de l'ADN. Les DUB régulent aussi la fonction de l'hélicase cellulaire. MCM forme un complexe ternaire avec USP7 et MCM-BP, et ces derniers sont requis pour le désassemblage de MCM (Jagannathan et al., 2014; Jagannathan et al., 2012; Nishiyama et al., 2011). La déplétion de USP7 occasionne une augmentation de l'abondance de l'hélicase sur l'ADN, un phénomène associé à un

ralentissement de la prolifération cellulaire. Des incidences d'ubiquitination non-dégradative de l'hélicase cellulaire MCM ont aussi déjà été détectées et seraient également envisageables pour E1 (Kim et al., 2011).

L'ubiquitination potentielle de E1 du VPH pourrait servir à réguler l'activité de l'hélicase virale à une étape post-initiation de la réplication, par exemple pour le contrôle du désassemblage du double hexamère. On sait aussi que l'abondance de E1 lors du maintien est très faible, reflétant une expression réduite et/ou une instabilité élevée. Le maintien, qui requiert l'interaction avec UAF1, pourrait donc nécessiter la stabilisation de E1 suite à son oligomérisation afin d'assurer un niveau minimal de réplication de l'ADN et d'éviter le désassemblage de l'hélicase suite à son licenciement. Le clivage du domaine N40 par les caspases lors de l'amplification du génome suggère que la déubiquitination de E1 serait alors non-requise. Ceci pourrait être expliqué par le niveau d'expression supérieur de E1, induite par l'activation du promoteur tardif. Son *turnover* serait alors plus élevé, puisque non stabilisé par les USP, et E1 pourrait augmenter le nombre d'événements de ré-initiation favorisant une réplication maximale du génome.

Le recrutement du complexe UAF1-USP pourrait aussi être impliqué dans la stabilisation d'autres composantes du réplisome, soit des protéines cellulaire ou virales. La protéine virale E2 est aussi présente à l'ori lors de l'assemblage du pré-réplisome et doit être évincée pour permettre l'oligomérisation de l'hélicase et l'initiation de la réplication. E2 est une protéine instable (demi-vie d'environ 60 min) dont l'abondance est régulée par la polyubiquitination (Gagnon et al., 2009). Il est possible que la dégradation de E2 par le protéasome puisse moduler le licenciement du réplisome et qu'une dégradation inopportune de E2 soit néfaste pour la synthèse d'ADN. Nos expériences préliminaires ne semblent toutefois pas indiquer d'effet de UAF1 sur le niveau d'expression de E2 (résultats non présentés), mais davantage de travaux sont requis pour formellement exclure cette possibilité.

L'hypothèse d'un rôle de UAF1 dans la régulation de la stabilité est intéressante dans une perspective plus globale. L'existence de motifs favorisant l'instabilité, ou « dégrons », a été rapportée à l'intérieur de plusieurs protéines. Ces régions sont souvent impliquées dans le recrutement des E3 ubiquitine-ligases responsables de la

polyubiquitination de la protéine en question. Nous rapportons ici que le motif UBP pourrait jouer un rôle contraire et agir comme un module de recrutement d'un complexe de stabilisation UAF1-USP. Dans ce modèle, c'est la protéine UAF1 qui joue un rôle de cofacteur pour l'activité des USP, mais aussi de sous-unités d'échafaudage requises pour la reconnaissance du substrat à déubiquitiner. L'architecture de ce complexe est très similaire à celle observée dans le cas des E3 ubiquitine-ligases de type SCF où les protéines F-box jouent un rôle homologue à UAF1 et recrutent le substrat via leur domaine WD40 (voir Figure 5.5).

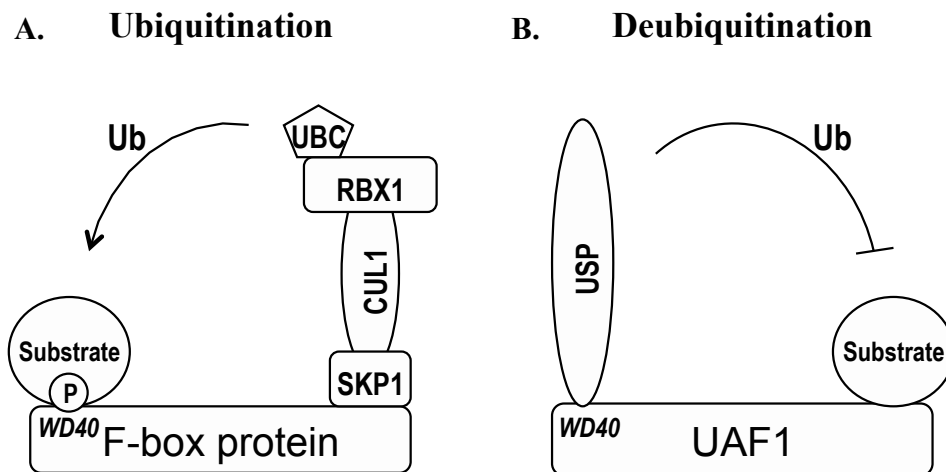


Figure 5.5 Modèle de UAF1 agissant comme une sous-unité de reconnaissance de substrats

(A) Représentation schématique de β -TrCP, la E3 ubiquitine-ligase prototypique de la famille SCF. La sous-unité F-box est une protéine d'échafaudage qui relie les composantes E3 ubiquitine-ligase (SKP1, CUL1, RBX1 and UBC) au substrat, lui-même reconnu par le domaine WD40 d'une manière phospho (P)-dépendante. (B) Représentation schématique du complexe UAF1-USP. UAF1 lie simultanément une sous-unité déubiquitinase (USP1, USP12 ou USP46) via son domaine WD40 et un substrat ubiquitiné, tel PHLPP1 et possiblement VPH E1.

5.5.2 Modèle 2 : Remodelage de la chromatine

Les complexes UAF1-USP12 et UAF1-USP46 sont importants pour la déubiquitination des histones H2A et H2B monoubiquitinés (Joo et al., 2011). La déubiquitination de H2A et H2B induit un changement de topologie de la chromatine qui, dans certains contextes, peut favoriser l'ouverture de la chromatine (Weake &

Workman, 2008). Le recrutement des complexes UAF1-USP à l'origine virale pourrait donc servir à moduler l'état d'ubiquitination des nucléosomes voisins de la fourche de réplication et induire un remodelage de la chromatine favorable à la réplication de l'ADN du VPH. Il est d'ailleurs connu que la déubiquitination de H2A et H2B est importante pour la progression de la fourche de réplication cellulaire. Ainsi, la déplétion de USP3, une DUB connue pour déubiquitiner ces histones, induit un stress réplicatif, des bris db de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire (Nicassio et al., 2007). Un tel mécanisme a été proposé pour la réplication latente de l'ADN de EBV qui recrute USP7 à son origine. La liaison de USP7 à la protéine initiateur EBNA1, l'homologue de E1 du VPH, augmente l'affinité de cette dernière pour l'ADN et favorise la déubiquitination de H2B sur l'ADN viral (Sarkari et al., 2009). Le remodelage de la chromatine du génome du VPH est aussi requis pour assurer une réplication optimale. L'interaction de la protéine E1 avec certains facteurs chromatinien, l'histone H1 et l'enzyme hSNF5, est d'ailleurs importante pour la réplication de l'ADN viral (Lee et al., 1999; Swindle & Engler, 1998). Peu d'information existe à ce jour sur les mécanismes de régulation de la chromatine qui sont utiles à la réplication du VPH ou à l'expression de ses gènes. Le recrutement du complexe UAF1-USP, qui peut être considéré comme un complexe de remodelage de la chromatine, est une piste intéressante à étudier. Il serait aussi pertinent d'investiguer la distinction, du point de vue de la topologie chromatinienne, entre l'étape de maintien et d'amplification du génome. Le recrutement de UAF1 étant éliminé par le clivage dépendant des caspases lors de la différenciation cellulaire, il serait pertinent de vérifier l'existence de différences dans l'état de la chromatine lors de la transition vers la phase d'amplification du génome.

5.5.3 Modèle 3 : Régulation des voies de réponse aux dommages à l'ADN

La réponse aux dommages à l'ADN est activée suite à la détection de lésions de l'ADN ou d'un stress de la fourche de réplication (Deans & West, 2011; Soutoglou & Misteli, 2008). Différentes voies peuvent être activées afin de solutionner le problème qui sinon peut occasionner des aberrations génomiques irréversibles, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'une de ces voies, celle de l'anémie de Fanconi, passe par la monoubiquitination de FANCD2 qui survient naturellement au cours de la phase S et en

réponse à certains dommages à l'ADN dont les lésions de réticulation inter-brin (ICL, *interstrand crosslink lesions*). Le recrutement de FANCD2 à l'ADN se fait de manière dépendante de la réplication, lors de la détection d'une perturbation de la fourche de réplication (Deans & West, 2011). Ces dommages sont ensuite modifiés par la nucléase FAN1, ou d'autres nucléases, qui est présumée convertir la lésion de réticulation en un dommage de type cassure db. Le complexe MRN détecte le dommage et, conjointement avec l'induction de ATM, active la machinerie de recombinaison homologue. Cette activation s'accompagne de l'association de BRCA1 et de la recombinaison RAD51. La voie de l'anémie de Fanconi favorise ainsi la réparation par la recombinaison homologue (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010) et permet une réparation de grande fidélité, contrairement à la recombinaison non-homologue par jonction des extrémités (NHEJ, *non-homologous end joining*) (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010). Parallèlement, le stress répliatif peut causer la monoubiquitination de PCNA et induire le recrutement des polymérases translésionnelles dont l'activité est potentiellement mutagénique (Moldovan et al., 2007).

Le complexe UAF1-USP1 est connu pour réguler négativement les voies de réponse aux dommages à l'ADN de l'anémie de Fanconi et de la synthèse translésionnelle de l'ADN. La réversion de l'ubiquitination de PCNA et de FANCD2 est une réaction catalysée par le complexe UAF1-USP1, établissant une régulation coordonnée des voies de recombinaison homologue et de synthèse translésionnelle (Nakanishi et al., 2005; Yang et al., 2011). D'ailleurs, les souris transgéniques possédant une délétion du gène UAF1 ou USP1 montrent non seulement une hypersensibilité aux génotoxines, mais aussi des défauts de recombinaison méiotique lors de la spermatogénèse, menant à la stérilité de l'animal. La déplétion du complexe UAF1-USP1 mène donc à une inactivation de la voie de l'anémie de Fanconi et à l'inhibition de la recombinaison homologue caractérisée par une activation constitutive de FANCD2 et sa séquestration sur la chromatine. La délétion chez la souris de FANCD2 *per se* occasionne un défaut identique à la délétion de UAF1 ou USP1 (Garcia-Higuera et al., 2001; Houghtaling et al., 2003; Murai et al., 2011).

La simple surexpression de E1 est suffisante pour induire une activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN qui est concomitante avec une inhibition de la

prolifération cellulaire (résumé dans la section 1.3.4) (Fradet-Turcotte et al., 2011; Sakakibara et al., 2011). Pourtant, le maintien de l'épisome viral se fait de manière coordonnée avec le cycle cellulaire et requiert la division active des cellules basales. Un arrêt du cycle cellulaire serait donc incompatible avec le cycle réplcatif du VPH. On observe que l'activation de la réponse aux dommages est minimale dans les cellules infectées non différenciées et n'est exacerbée que lors de la différenciation et de l'entrée dans la phase d'amplification du génome. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'atténuation de la réponse aux dommages dans les cellules maintenant l'épisome. Premièrement, l'expression de E1 par le promoteur précoce est très faible dans les cellules basales. Ensuite, Fradet-Turcotte et al. ont démontré que l'export nucléaire de E1 est important pour le maintien de l'épisome et la réduction de la réponse aux dommages (Fradet-Turcotte et al., 2011; Fradet-Turcotte, Moody, et al., 2010). Nous proposons ici un mécanisme supplémentaire impliquant le recrutement de UAF1-USP1 et menant à l'inactivation des facteurs de réponse aux dommages afin de promouvoir la réplication de l'ADN viral. D'autres virus utilisent des mécanismes similaires pour assurer leur réplication. Par exemple, les adénovirus dégradent le complexe MRN qui sinon inhibe leur cycle réplcatif (Carson et al., 2003; Stracker et al., 2002). La nature des facteurs inactivés par le complexe E1-UAF1-USP1 reste à déterminer mais pourrait inclure les substrats connus des USP et impliqués dans la réparation de l'ADN, tels FANCD2, PCNA et les histones H2A (Garcia-Santisteban et al., 2013; Joo et al., 2011; Panier & Durocher, 2009).

La déubiquitination de PCNA par UAF1-USP1 pourrait aussi servir à éviter le recrutement des polymérases translésionnelles, suite à un stress de la fourche de réplication virale, et assurer la duplication fidèle du génome viral. C'est justement un mécanisme employé par EBV qui encode sa propre DUB, BPLF1, et inhibe ainsi l'ubiquitination de PCNA et le recrutement des polymérases translésionnelles (Whitehurst et al., 2012). L'utilité de ce processus pour EBV n'est toutefois pas clairement établie. Si cette hypothèse est fondée, on pourrait s'attendre à ce que l'inhibition de l'activité du complexe UAF1-USP1 favorise le recrutement des polymérases translésionnelles, un aspect qui serait intéressant à investiguer. La réplication de l'ADN du VPH est sensible à certaines toxines affectant la progression de la fourche de réplication telles l'aphidicoline, un inhibiteur des ADN polymérasés α et δ ,

et l'hydroxyurée (Fradet-Turcotte, Morin, et al., 2010; Lehoux et al., 2012). Notons qu'un variant de E1 déficient pour l'interaction avec UAF1 est moins sensible à ces inhibiteurs et indique que ces protéines possèdent des mécanismes de synthèse translésionnelle (voir Annexe 3). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'absence de UAF1 qui permettrait le recrutement des polymérase atypiques par PCNA. Une telle réplication aurait un potentiel mutagénique plus élevé défavorable au cycle viral, un autre élément qu'il serait intéressant de vérifier.

La situation est radicalement différente lors de l'amplification du génome viral où l'inhibition des voies de dommages à l'ADN n'est pas requise. Ceci n'est pas surprenant puisque la réplication devient « aléatoire », c'est-à-dire qu'elle n'est plus synchronisée avec le cycle cellulaire. La différenciation des cellules infectées coïncide aussi avec une activation massive des voies de réparation des dommages, dont la phosphorylation de ATM, Chk2, BRCA1 et NBS1 (Gillespie et al., 2012; Moody & Laimins, 2009). L'activation de ATM est d'ailleurs essentielle à l'amplification du génome viral. Le génome viral colocalise avec plusieurs facteurs de réparation incluant γ H2AX, 53BP1, p-ATM, p-Chk2, RAD51 et BRCA1 (Gillespie et al., 2012; Sakakibara, Chen, Jang, et al., 2013; Sakakibara, Chen, & McBride, 2013). Ces foyers nucléaires contiennent aussi les protéines PCNA et RPA32, suggérant que ce sont des sites actifs de synthèse d'ADN. L'activation de ces voies lors de la transition vers la phase végétative du cycle viral est probablement modulée en partie par la surexpression de E7 qui induit directement l'activation de FANCD2 (Spardy et al., 2007). Les facteurs RAD51 et BRCA1 sont des marqueurs typiques de la recombinaison homologue. Plusieurs études suggèrent que cette voie pourrait être impliquée au cours de la réplication de l'ADN pour l'amplification virale (résumé dans (Sakakibara, Chen, & McBride, 2013)). La détection dans les cellules différenciées de fourches de réplication typiques d'une réplication unidirectionnelle (Burnett et al., 1989; Flores & Lambert, 1997) et la présence d'ADN viral multimérique sont en accord avec cette hypothèse (Dasgupta et al., 1992). Les génomes produits seraient ainsi sous forme concatémérique et nécessiteraient la machinerie de recombinaison homologue pour recirculariser l'ADN viral et permettre son encapsidation. La réplication dépendante de la recombinaison homologue a l'avantage d'être de haute fidélité et ne requiert pas les facteurs de licenciement des origines de réplication normales (Costes & Lambert, 2012; Lydeard et

al., 2010). D'autres virus à ADN sont connus pour nécessiter ces facteurs. La déplétion de RAD51, par exemple, inhibe la réplication de EBV et de SV40 (Boichuk et al., 2010; Kudoh et al., 2009) et la réplication du virus de l'herpes simplex 1 est dépendante de la recombinaison et passe par des intermédiaires concatémériques (Lo Piano et al., 2011; Weller & Coen, 2012). Pour le VPH, la déplétion de NBS1, ou l'inhibition du complexe MRN par l'inhibiteur Mirin, a été rapportée réduire l'amplification du génome viral (communication personnelle de C. Moody, 2013). Il est aussi possible que lors de l'amplification du génome viral, la réplication soutenue de l'ADN induise un plus grand stress sur la fourche répllicative. Le recrutement du complexe MRN, de RAD51 et de FANCD2 assure dans certains contextes l'intégrité du réplisome cellulaire et réduit le stress réplcatif nécessaire à la synthèse efficace du génome (Costes & Lambert, 2012; Schlacher et al., 2012). Ces facteurs pourraient donc protéger la fourche de réplication virale de manière indépendante de la présence de dommages.

Nous proposons que l'activation de la voie de recombinaison homologue est requise pour l'amplification du génome viral et nécessite l'inhibition du complexe UAF1-USP1 qui normalement prévient leur activation. Le complexe UAF1-USP1 est probablement évincé du réplisome viral par l'action des caspases qui clivent le domaine UBP de E1. L'activité des caspases, induite par l'action de E7 et de ATM, et l'intégrité du site de clivage dans E1 sont toutes deux essentielles à l'amplification du génome. Ce mécanisme pourrait permettre l'association à l'ADN viral de facteurs de la machinerie de recombinaison homologue par l'action concertée du complexe MRN et de RAD51 et promouvoir la transition vers un mode de réplication unidirectionnel de l'ADN. Le recrutement de la machinerie de recombinaison homologue pourrait passer par l'ubiquitination de FANCD2 sur l'ADN viral. Paradoxalement, Hoskins et al. ont proposé que l'inactivation de la voie de l'anémie de Fanconi, telle que par la déplétion de FANCD2, augmente la réplication du génome du VPH. Leurs travaux établissent clairement toutefois que l'expression de shRNA contre FANCD2 induit la surexpression de E7 et l'hyperplasie des cellules. Elle mène également à un défaut de différenciation cellulaire caractérisé par un phénotype s'apparentant aux cellules basales avec une expression des marqueurs des cellules souches K14 et Δ Np63. La réplication de l'ADN viral dans ces cellules dédifférenciées s'effectue donc vraisemblablement selon un mode

de réplication synchronisé avec le cycle cellulaire qui expliquerait l'effet néfaste de l'activité de FANCD2.

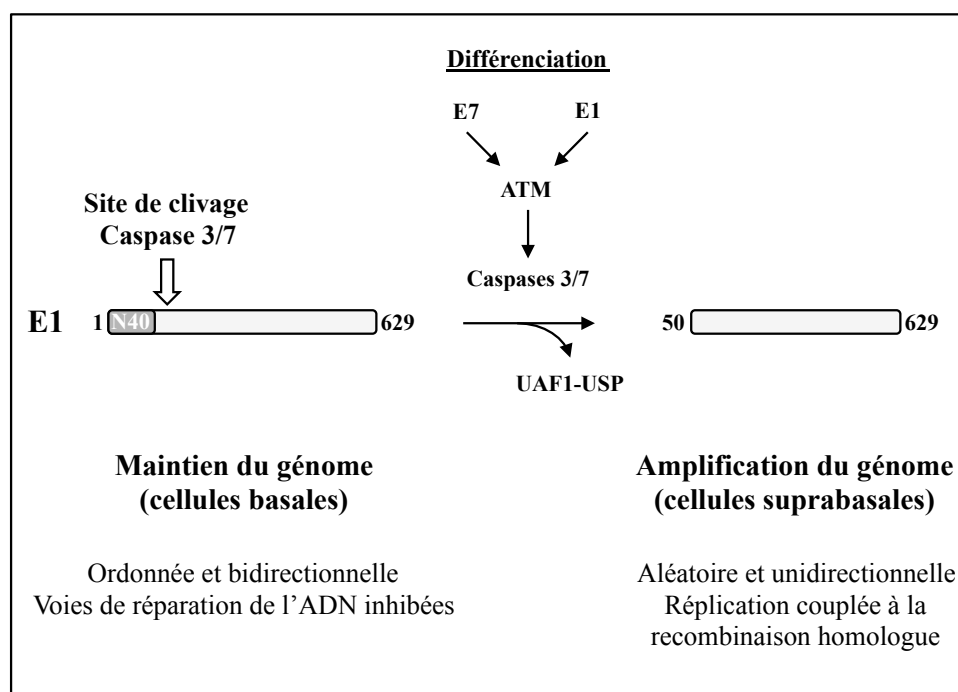


Figure 5.6 Transition d'un mode de réplication bidirectionnel à un mode unidirectionnel (modèle)

Lors du maintien du génome viral dans les cellules basales (gauche), la protéine E1 interagit avec UAF1-USP via son domaine N40 et inhibe la réponse aux dommages à l'ADN qui pourrait interférer avec la progression normale du cycle cellulaire et la synthèse de l'ADN viral. La réplication est alors ordonnée, i.e. synchronisée avec la division cellulaire, et bidirectionnelle. Lors de la différenciation cellulaire, l'activation du promoteur tardif mène à la surexpression de E1 et E7 qui induisent l'activation de ATM. L'activation de la voie ATM favorise l'activation des caspases qui reconnaissent un site consensus de clivage dans E1 et tronquent cette protéine immédiatement après le domaine N40. La perte du domaine N40 mène au relargage du complexe UAF1-USP. L'activation intensifiée des voies de réponse aux dommages à l'ADN et la perte de régulation par UAF1 mènent au recrutement de la machinerie de recombinaison homologue permettant la réplication unidirectionnelle et aléatoire (non dépendante du cycle cellulaire) de l'ADN viral pour l'amplification du génome (à droite).

On peut donc envisager un mécanisme en deux étapes. Lors du maintien du génome viral, l'ADN serait répliqué bidirectionnellement et nécessiterait l'inhibition par UAF1-USP1 des voies de réparation de l'ADN qui inhiberait le cycle cellulaire et/ou entraverait la fidélité de la réplication (Fig. 5.6). Ensuite, lors de la différenciation cellulaire, la surexpression de E1 et de E7 activerait davantage les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les caspases seraient alors activées et induiraient le clivage du domaine N-terminal de E1, ainsi que le relargage du complexe UAF1-USP1, et

enclencheraient ainsi la transition vers un mode de réplication unidirectionnel nécessaire à l'amplification du génome. Ce mode de réplication impliquerait la production de concatémères nécessitant la maturation par la machinerie de recombinaison homologue, dont le recrutement ne serait plus inhibé par la présence de UAF1-USP1.

6 Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que la protéine E1 du VPH contient un motif UBP essentiel à l'interaction avec UAF1 et à la réplication optimale de l'ADN viral. Nos résultats suggèrent aussi que la principale fonction de ce motif, et du recrutement de UAF1, est de promouvoir le recrutement d'un complexe de déubiquitination comportant l'un des trois USP suivants : USP1, USP12 et USP46. E1 s'assemble donc vraisemblablement en un complexe ternaire E1-UAF1-USP sur l'origine virale de réplication. En outre, l'activité enzymatique de ces USP est importante pour la réplication de l'ADN viral. L'inactivation des USP génère un défaut de réplication similaire à l'inhibition de l'interaction E1-UAF1. Inversement, la fusion d'un peptide UBP dérivé de PHLPP1 avec une protéine E1 dépourvue de son N-terminal génère une protéine chimérique compétente pour l'interaction avec UAF1-USP et fonctionnelle pour la relocalisation de UAF1 dans des foyers nucléaires. Ces chimères restaurent aussi de manière importante la capacité de E1 à répliquer l'ADN du VPH. Ces résultats supportent l'hypothèse que le domaine N40 de E1 a pour principale fonction d'agir comme module de recrutement du complexe UAF1-USP, dont l'activité déubiquitinase est requise pour la réplication de l'ADN viral.

Les modèles présentés dans les pages précédentes proposent des mécanismes à l'implication de l'activité UAF1-USP au cours du cycle viral. Ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, mais permettent d'ouvrir de nouvelles avenues de recherche pour les travaux futurs. L'existence de certaines preuves expérimentales nouvelles, démontrant l'importance de l'inhibition des facteurs de réparation de l'ADN lors du maintien du génome et suggérant une réplication dépendante de la recombinaison homologue lors de l'amplification, rend intéressante l'investigation du rôle que pourrait y jouer UAF1. Ces travaux devraient débuter par la validation que la réponse aux dommages à l'ADN est inactivée par UAF1 dans le contexte du cycle viral et que l'activité de recombinaison homologue est requise pour la réplication végétative. La validité de la prémisse stipulant que le clivage par les caspases induit l'évincement du complexe UAF1-USP reste également à valider.

Globalement, nos travaux suggèrent ainsi que l'inhibition du recrutement ou de l'activité des USP associés à E1-UAF1 est une cible thérapeutique prometteuse pour

interférer avec la réplication de l'ADN viral. Cette stratégie antivirale présenterait certainement un intérêt pour le traitement des hyperplasies associées aux VPH à bas-risque, comme les condylomes ou les papillomatoses respiratoires récurrentes, et potentiellement des lésions pré-cancéreuses associées aux génotypes oncogéniques. L'inhibition d'interaction protéine-protéine est devenue au fil des ans une approche thérapeutique intéressante pour le développement d'inhibiteurs pharmacologiques. Le ciblage de l'interaction E1-UAF1 pourrait constituer une stratégie fructueuse. La réduction de la réplication de l'ADN du VPH suite à la surexpression du N40 constitue déjà une preuve de concept que cette avenue pourrait fonctionner. Nous avons établi que la liaison du N40 à UAF1 utilise vraisemblablement un mécanisme de repliement induit par la liaison. Le passage d'un état désordonné à un état structuré est défavorisé d'un point de vue thermodynamique. Le coût entropique élevé de ce genre d'interaction fait souvent en sorte que ces interactions sont de faible affinité ou utilisent des interfaces extensives avec de multiples points de contacts de faible affinité. Ces interactions sont donc souvent considérées comme des cibles idéales avec un fort potentiel à être inhibées (Dyson & Wright, 2005). La faisabilité de l'utilisation des voies de l'ubiquitination comme cibles thérapeutiques a aussi été largement étudiée. Certains inhibiteur de E3 ubiquitine-ligases sont présentement sous études cliniques (Fulda et al., 2012). Le développement d'inhibiteurs contre les DUB est cependant une approche qui en est à ses balbutiements, mais qui démontre un potentiel certain dans des essais pré-cliniques (Edelmann et al., 2011; Mattern et al., 2012).

L'ubiquitination joue un rôle central dans la réparation des dommages à l'ADN et l'inactivation pharmacologique de certaines DUB constitue aussi une approche intéressante pour moduler ces voies (Jackson & Durocher, 2013; Ulrich & Walden, 2010). Le traitement des cancers utilise fréquemment des molécules génotoxiques afin d'induire des dommages à l'ADN et mener à l'apoptose des cellules à division rapide. Ces cellules développent souvent de la résistance aux thérapies par l'exploitation des voies de réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, l'inactivation de certaines DUB qui régulent ces voies pourrait constituer une méthode attirante pour contourner le développement de la chimio-résistance des cellules tumorales. USP1 est un candidat potentiel pour cibler les voies de réparation des dommages à l'ADN et son inhibition sensibilise effectivement les cellules à des agents génotoxiques (Oestergaard et al.,

2007). Certains inhibiteurs de USP1 ont d'ailleurs été identifiés et montrent une action synergique avec l'utilisation de la cisplatine dans le traitement de certaines cellules tumorales du poumon *in vitro* (Chen et al., 2011). D'autres molécules plus efficaces sont présentement en développement et font l'objet d'une protection par un brevet (D'Andrea, 2007; Mistry et al., 2013).

Nos travaux se situent aussi dans un contexte beaucoup plus large et permettent d'élucider certaines caractéristiques de la protéine cellulaire UAF1, dont la fonction endogène demeure mal caractérisée. Bien que nos travaux ne se soient pas beaucoup attardés à la fonction endogène de PHLPP1, nous avons observé que cette phosphatase forme un complexe ternaire avec UAF1 et les USP. La dérégulation de l'expression de PHLPP1 a été observée dans plusieurs cancers et cette phosphatase a été proposée comme étant un nouveau suppresseur de tumeur. Inversement, dans certains contextes pathologiques, dont le diabète et les lésions ischémiques cérébrales et cardiaques, l'activité PHLPP1 mène à une déphosphorylation exagérée de Akt qui est néfaste pour la survie cellulaire (Andreozzi et al., 2011; Aviv & Kirshenbaum, 2010; Chen et al., 2013; Miyamoto et al., 2010). Le développement d'approches pharmacologiques pour inhiber ou augmenter l'activité de PHLPP1, notamment via le ciblage des USP associés à UAF1, présente un intérêt thérapeutique certain qui est le sujet de travaux actuels (Chen et al., 2011; D'Andrea, 2007; Sierrecki et al., 2010). Nos recherches mettent en lumière une meilleure compréhension de l'architecture du complexe PHLPP1-UAF1-USP et fournissent des outils, dont le peptide N40, permettant d'interférer avec l'assemblage de ce complexe. Ce savoir et ces outils seront utiles à l'approfondissement de nos connaissances sur la fonction endogène de PHLPP1 et son potentiel comme cible thérapeutique. En outre, la répllication de l'ADN du VPH, qui dépend de manière exhaustive des facteurs de répllication de l'hôte, constitue un modèle d'étude exceptionnel pour l'investigation de la répllication de l'ADN cellulaire. L'observation que la déplétion de UAF1 ou des USP induit un arrêt du cycle cellulaire est évocateur de l'importance de ces protéines dans les fonctions cellulaires normales. Il sera intéressant de vérifier si le complexe UAF1-USP joue aussi un rôle dans la régulation du réplisome des mammifères.

7 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*(16), 1981-1996.
- Adamo, A., Collis, S. J., Adelman, C. A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J. D., . . . La Volpe, A. (2010). Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. *Mol Cell*, *39*(1), 25-35.
- Alexander, K. A., & Phelps, W. C. (1996). A fluorescence anisotropy study of DNA binding by HPV-11 E2C protein: a hierarchy of E2-binding sites. *Biochemistry*, *35*(30), 9864-9872.
- 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*(1), 137-150.
- Andreozzi, F., Procopio, C., Greco, A., Mannino, G. C., Miele, C., Raciti, G. A., . . . Sesti, G. (2011). Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. *Diabetologia*, *54*(7), 1879-1887.
- Angeletti, P. C., Kim, K., Fernandes, F. J., & Lambert, P. F. (2002). Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol*, *76*(7), 3350-3358.
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M., Marchetti, B., & Campo, M. S. (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*, *119*(9), 2105-2112.
- Ashrafi, G. H., Haghshenas, M. R., Marchetti, B., O'Brien, P. M., & Campo, M. S. (2005). E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer*, *113*(2), 276-283.
- Auborn, K. J., Little, R. D., Platt, T. H., Vaccariello, M. A., & Schildkraut, C. L. (1994). Replicative intermediates of human papillomavirus type 11 in laryngeal papillomas: site of replication initiation and direction of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(15), 7340-7344.
- Auster, A. S., & Joshua-Tor, L. (2004). The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J.Biol.Chem.*, *279*(5), 3733-3742.
- Aviv, Y., & Kirshenbaum, L. A. (2010). Novel phosphatase PHLPP-1 regulates mitochondrial Akt activity and cardiac cell survival. *Circ Res*, *107*(4), 448-450.
- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*, *61*(4), 962-971.
- 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*(6), 1445-1456.

- Bedell, M. A., Hudson, J. B., Golub, T. R., Turyk, M. E., Hosken, M., Wilbanks, G. D., & Laimins, L. A. (1991). Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*, *65*(5), 2254-2260.
- Beer-Romero, P., Glass, S., & Rolfe, M. (1997). Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. *Oncogene*, *14*(5), 595-602.
- Berg, M., & Stenlund, A. (1997). Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.*, *71*(5), 3853-3863.
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 35-56.
- Bian, X. L., Rosas-Acosta, G., Wu, Y. C., & Wilson, V. G. (2006). Nuclear Import of BPV1 E1 Protein Is Mediated By Multiple Alpha Importins And Is Negatively Regulated By Phosphorylation Near A Nuclear Localization Signal. *J Virol*.
- 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*(2), 649-656.
- Bohmer, G., van den Brule, A. J., Brummer, O., Meijer, C. L., & Petry, K. U. (2003). No confirmed case of human papillomavirus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. *Am J Obstet Gynecol*, *189*(1), 118-120.
- Boichuk, S., Hu, L., Hein, J., & Gjoerup, O. V. (2010). Multiple DNA damage signaling and repair pathways deregulated by simian virus 40 large T antigen. *J Virol*, *84*(16), 8007-8020.
- 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*(25), 22297-22303.
- Bonne-Andrea, C., Santucci, S., & Clertant, P. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro. *J Virol*, *69*(5), 3201-3205.
- Bonne-Andrea, C., Santucci, S., Clertant, P., & Tillier, F. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J Virol*, *69*(4), 2341-2350.
- 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*(9), 6805-6815.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., . . . Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, *87*(11), 796-802.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, *106*(3), 761-771.
- 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*(6), 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(1), 73-80.
- Brognard, J., & Newton, A. C. (2008). PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 19(6), 223-230.
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsague, X., Ferrer, E., Bosch, F. X., & de Sanjose, S. (2010). Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, 202(12), 1789-1799.
- 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(2), 262-269.
- Bryan, J. T., & Brown, D. R. (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology*, 281(1), 35-42.
- Buchsbaum, S., Morris, C., Bochar, V., & Jalinot, P. (2007). Human INT6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 26(35), 5132-5144.
- Burnett, S., Zabielski, J., Moreno-Lopez, J., & Pettersson, U. (1989). Evidence for multiple vegetative DNA replication origins and alternative replication mechanisms of bovine papillomavirus type 1. *J Mol Biol*, 206(1), 239-244.
- Burska, U. L., Harle, V. J., Coffey, K., Darby, S., Ramsey, H., O'Neill, D., . . . Robson, C. N. (2013). Deubiquitinating Enzyme Usp12 Is a Novel Co-activator of the Androgen Receptor. *J Biol Chem*, 288(45), 32641-32650.
- Canning, M., Boutell, C., Parkinson, J., & Everett, R. D. (2004). A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *J Biol Chem*, 279(37), 38160-38168.
- Cardozo, T., & Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(9), 739-751.
- Carson, C. T., Schwartz, R. A., Stracker, T. H., Lilley, C. E., Lee, D. V., & Weitzman, M. D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J*, 22(24), 6610-6620.
- Castella, S., Bingham, G., & Sanders, C. M. (2006). Common determinants in DNA melting and helicase-catalysed DNA unwinding by papillomavirus replication protein E1. *Nucleic Acids Res*, 34(10), 3008-3019.
- Castella, S., Burgin, D., & Sanders, C. M. (2006). Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res*, 34(13), 3731-3741.
- Castellsagué, X., de Sanjosé, S., Aguado, T., Louie, K. S., Bruni, L., Munoz, J., . . . Bosch, F. X. (2007). HPV and Cervical cancer in the World - 2007 Report. *Vaccine*, 25(Supplement 3), C1-26.
- Cataldo, F., Peche, L. Y., Klaric, E., Brancolini, C., Myers, M. P., Demarchi, F., & Schneider, C. (2013). CAPNS1 regulates USP1 stability and maintenance of genome integrity. *Mol Cell Biol*, 33(12), 2485-2496.

- Chan, H. M., Smith, L., & La Thangue, N. B. (2001). Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, *20*(43), 6152-6163.
- Chang, Y. E., & Laimins, L. A. (2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol*, *74*(9), 4174-4182.
- Chang, Y. E., Pena, L., Sen, G. C., Park, J. K., & Laimins, L. A. (2002). Long-term effect of interferon on keratinocytes that maintain human papillomavirus type 31. *J Virol*, *76*(17), 8864-8874.
- Chen, B., Van Winkle, J. A., Lyden, P. D., Brown, J. H., & Purcell, N. H. (2013). PHLPP1 gene deletion protects the brain from ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, *33*(2), 196-204.
- Chen, G., & Stenlund, A. (1998). Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J. Virol.*, *72*(4), 2567-2576.
- Chen, G., & Stenlund, A. (2001). The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *J Virol*, *75*(1), 292-302.
- Chen, G., & Stenlund, A. (2002). Sequential and ordered assembly of E1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting. *Mol Cell Biol*, *22*(21), 7712-7720.
- Chen, J., Dexheimer, T. S., Ai, Y., Liang, Q., Villamil, M. A., Inglese, J., . . . Zhuang, Z. (2011). Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chem Biol*, *18*(11), 1390-1400.
- Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., & Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*, *5*(3), 557-567.
- Cheng, I. H., Roberts, L. A., & Tye, B. K. (2002). Mcm3 is polyubiquitinated during mitosis before establishment of the pre-replication complex. *J Biol Chem*, *277*(44), 41706-41714.
- Chesson, H. W., Ekwueme, D. U., Saraiya, M., Watson, M., Lowy, D. R., & Markowitz, L. E. (2012). Estimates of the annual direct medical costs of the prevention and treatment of disease associated with human papillomavirus in the United States. *Vaccine*, *30*(42), 6016-6019.
- 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*(9), 5224-5231.
- Clertant, P., & Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*, *311*(5983), 276-279.
- Clower, R. V., Fisk, J. C., & Melendy, T. (2006). Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol*, *80*(3), 1584-1587.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, *24*(17), 2796-2809.
- Cohn, M. A., Kee, Y., Haas, W., Gygi, S. P., & D'Andrea, A. D. (2009). UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem*, *284*(8), 5343-5351.

- Cohn, M. A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T. T., Gygi, S. P., & D'Andrea, A. D. (2007). A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, *28*(5), 786-797.
- Combita, 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*(1), 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*(5), 2696-2705.
- Costes, A., & Lambert, S. (2012). Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules*, *3*(1), 39-71.
- Cote-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D'Abramo, C. M., Lehoux, M., Joubert, S., . . . 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*(3), 1271-1283.
- Cotto-Rios, X. M., Bekes, M., Chapman, J., Ueberheide, B., & Huang, T. T. (2012). Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. *Cell Rep*, *2*(6), 1475-1484.
- Cotto-Rios, X. M., Jones, M. J., Busino, L., Pagano, M., & Huang, T. T. (2011). APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol*, *194*(2), 177-186.
- Cotto-Rios, X. M., Jones, M. J., & Huang, T. T. (2011). Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle. *Cell Cycle*, *10*(23), 4009-4016.
- Crusius, K., Auvinen, E., & Alonso, A. (1997). Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*, *15*(12), 1437-1444.
- Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaisert, H., & Alonso, A. (1998). The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res*, *241*(1), 76-83.
- Cubie, H. A. (2013). Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, *445*(1-2), 21-34.
- Cueille, N., Nougarede, R., Mechali, F., Philippe, M., & Bonne-Andrea, C. (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol*, *72*(9), 7255-7262.
- Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G., & Christensen, N. D. (2006). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*, *80*(18), 8940-8950.
- D'Abramo, C. M., & Archambault, J. (2011). Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J*, *5*, 80-95.
- D'Abramo, C. M., Fradet-Turcotte, A., & Archambault, J. (2011). Human papillomavirus DNA replication: Insights into the structure and regulation of a

eukaryotic DNA replisome. Dans E. K. Gaston (dir.), *Small DNA Tumour Viruses* (p. 217-239): Horizon Scientific Press.

D'Andrea, A. (2007). USA, Brevet No.

Daling, J. R., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Schwartz, S. M., Shera, K. A., Wurscher, M. A., . . . McDougall, J. K. (2004). Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*, *101*(2), 270-280.

Dasgupta, S., Zabielski, J., Simonsson, M., & Burnett, S. (1992). Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *J Mol Biol*, *228*(1), 1-6.

Day, P. M., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2008). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol*, *82*(24), 12565-12568.

de Martel, C., & Franceschi, S. (2008). Infections and cancer: Established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*.

de Sanjose, S., & Palefsky, J. (2002). Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res*, *89*(2), 201-211.

de Villiers, E. M. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, *445*(1-2), 2-10.

Deans, A. J., & West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(7), 467-480.

Degenhardt, Y. Y., & Silverstein, S. (2001). Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol*, *75*(23), 11791-11802.

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*(20), 10005-10013.

Del Vecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M., & Baker, C. C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol*, *66*(10), 5949-5958.

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*(12), 9343-9349.

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*(2), 378-386.

Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., & Thierry, F. (1995). Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res*, *23*(23), 4777-4784.

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*(19), 10213-10226.

Deng, W., Lin, B. Y., Jin, G., Wheeler, C. G., Ma, T., Harper, J. W., . . . Chow, L. T. (2004). Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol*, *78*(24), 13954-13965.

DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 99-114.

Dixon, E. P., Pahel, G. L., Rocque, W. J., Barnes, J. A., Lobe, D. C., Hanlon, M. H., . . . Phelps, W. C. (2000). The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to

- the origin of replication with low sequence specificity. *Virology*, 270(2), 345-357.
- Dollard, S. C., Chow, L. T., Kreider, J. W., Broker, T. R., Lill, N. L., & Howett, M. K. (1989). Characterization of an HPV type 11 isolate propagated in human foreskin implants in nude mice. *Virology*, 171(1), 294-297.
- Donaldson, M. M., Boner, W., & Morgan, I. M. (2007). TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *J Virol*, 81(8), 4338-4342.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5), 525-541.
- Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445(1-2), 80-98.
- 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(6338), 824-827.
- Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M., & Crawford, L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*, 178(1), 254-262.
- Drobni, P., Mistry, N., McMillan, N., & Evander, M. (2003). Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester labeled papillomavirus virus-like particles fluoresce after internalization and interact with heparan sulfate for binding and entry. *Virology*, 310(1), 163-172.
- Drummond-Barbosa, D. A., Vaillancourt, R. R., Kazlauskas, A., & DiMaio, D. (1995). Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, 15(5), 2570-2581.
- Du, M., Fan, X., Hong, E., & Chen, J. J. (2002). Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(4), 962-969.
- Duensing, S., & Munger, K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*, 62(23), 7075-7082.
- Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., & Gissmann, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*, 66 (Pt 7), 1515-1522.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(3), 197-208.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243(4893), 934-937.
- Edelmann, M. J., Nicholson, B., & Kessler, B. M. (2011). Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases. *Expert Rev Mol Med*, 13, e35.
- Edwards, T. G., Helmus, M. J., Koeller, K., Bashkin, J. K., & Fisher, C. (2013). Human papillomavirus episome stability is reduced by aphidicolin and controlled by DNA damage response pathways. *J Virol*, 87(7), 3979-3989.
- Egawa, K. (2003). Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology*, 207(3), 251-254.

- Egawa, N., Nakahara, T., Ohno, S., Narisawa-Saito, M., Yugawa, T., Fujita, M., . . . Kiyono, T. (2012). The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*, *86*(6), 3276-3283.
- Enemark, E. J., Chen, G., Vaughn, D. E., Stenlund, A., & Joshua-Tor, L. (2000). Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell*, *6*(1), 149-158.
- Enemark, E. J., & Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, *442*(7100), 270-275.
- Enemark, E. J., Stenlund, A., & Joshua-Tor, L. (2002). Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *Embo J*, *21*(6), 1487-1496.
- 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*(3), 2449-2456.
- Faesen, A. C., Luna-Vargas, M. P., Geurink, P. P., Clerici, M., Merckx, R., van Dijk, W. J., . . . Sixma, T. K. (2011). The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chem Biol*, *18*(12), 1550-1561.
- Fakhry, C., D'Souza, G., Sugar, E., Weber, K., Goshu, E., Minkoff, H., . . . Gillison, M. (2006). Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol*, *44*(12), 4479-4485.
- Fan, C. Y., Lee, S., & Cyr, D. M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, *8*(4), 309-316.
- Faucher, A. M., White, P. W., Brochu, C., Grand-Maitre, C., Rancourt, J., & Fazal, G. (2004). Discovery of small-molecule inhibitors of the ATPase activity of human papillomavirus E1 helicase. *J. Med. Chem.*, *47*(1), 18-21.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., & Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol*, *21*(3), 1205-1209.
- 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*(7), 4229-4237.
- 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*(5), 2819-2831.
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., & Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, *91*(2), 221-230.
- 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*, *127*(12), 2893-2917.

- Ferran, M. C., & McBride, A. A. (1998). Transient viral DNA replication and repression of viral transcription are supported by the C-terminal domain of the bovine papillomavirus type 1 E1 protein. *J Virol*, *72*(1), 796-801.
- 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*(18), 9505-9515.
- Fertey, J., Hurst, J., Straub, E., Schenker, A., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2011). Growth Inhibition of HeLa Cells Is a Conserved Feature of High-Risk Human Papillomavirus E8^E2C Proteins and Can Also Be Achieved by an Artificial Repressor Protein. *J Virol*, *85*(6), 2918-2926.
- Filippova, M., Parkhurst, L., & Duerksen-Hughes, P. J. (2004). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*, *279*(24), 25729-25744.
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S., & Duerksen-Hughes, P. J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, *277*(24), 21730-21739.
- Flores, E. R., Allen-Hoffmann, B. L., Lee, D., Sattler, C. A., & Lambert, P. F. (1999). Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology*, *262*(2), 344-354.
- Flores, E. R., & Lambert, P. F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol*, *71*(10), 7167-7179.
- Florin, L., Becker, K. A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., . . . Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein 12. *J Virol*, *80*(13), 6691-6696.
- Flotho, A., & Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*, *82*, 357-385.
- Forman, D., de Martel, C., Lacey, C. J., Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Bruni, L., . . . Franceschi, S. (2012). Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*, *30 Suppl 5*, F12-23.
- Fouts, E. T., Yu, X., Egelman, E. H., & Botchan, M. R. (1999). Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem*, *274*(7), 4447-4458.
- Fradet-Turcotte, A., & Archambault, J. (2007). Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses. *Antivir Ther*, *12*(4), 431-451.
- Fradet-Turcotte, A., Bergeron-Labrecque, F., Moody, C. A., Lehoux, M., Laimins, L. A., & Archambault, J. (2011). Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J Virol*, *85*(17), 8996-9012.
- 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*(2), 190-201.
- Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L. A., & Archambault, J. (2010). Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2

phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol*, 84(22), 11747-11760.

- 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(1), 65-76.
- Frattini, M. G., & Laimins, L. A. (1994a). 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(26), 12398-12402.
- Frattini, M. G., & Laimins, L. A. (1994b). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology*, 204(2), 799-804.
- Frattini, M. G., Lim, H. B., & Laimins, L. A. (1996). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 3062-3067.
- Frisch, M., Fenger, C., van den Brule, A. J., Sorensen, P., Meijer, C. J., Walboomers, J. M., . . . Glimelius, B. (1999). Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res*, 59(3), 753-757.
- Fujiwara, T., Saito, A., Suzuki, M., Shinomiya, H., Suzuki, T., Takahashi, E., . . . Tanaka, K. (1998). Identification and chromosomal assignment of USP1, a novel gene encoding a human ubiquitin-specific protease. *Genomics*, 54(1), 155-158.
- Fukuo, Y., Kishi, T., Kushima, I., Yoshimura, R., Okochi, T., Kitajima, T., . . . Iwata, N. (2011). Possible association between ubiquitin-specific peptidase 46 gene and major depressive disorders in the Japanese population. *J Affect Disord*, 133(1-2), 150-157.
- Fulda, S., Rajalingam, K., & Dikic, I. (2012). Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *EMBO Mol Med*, 4(7), 545-556.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., & Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11(16), 2090-2100.
- 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(9), 4127-4139.
- Gagnon, D., Senechal, H., D'Abramo, C. M., Alvarez, J., McBride, A. A., & Archambault, J. (2013). Genetic analysis of the E2 transactivation domain dimerization interface from bovine papillomavirus type 1. *Virology*, 439(2), 132-139.
- Galloway, D. A., Gewin, L. C., Myers, H., Luo, W., Grandori, C., Katzenellenbogen, R. A., & McDougall, J. K. (2005). Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 209-215.
- Gangula, N. R., & Maddika, S. (2013). WD Repeat Protein WDR48 in Complex with Deubiquitinase USP12 Suppresses Akt-dependent Cell Survival Signaling by Stabilizing PH Domain Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase 1 (PHLPP1). *J Biol Chem*, 288(48), 34545-34554.

- Gao, G., & Luo, H. (2006). The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can J Physiol Pharmacol*, 84(1), 5-14.
- Gao, T., Furnari, F., & Newton, A. C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*, 18(1), 13-24.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., . . . D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*, 7(2), 249-262.
- Garcia-Santisteban, I., Peters, G. J., Giovannetti, E., & Rodriguez, J. A. (2013). USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy. *Mol Cancer*, 12, 91.
- Garcia-Santisteban, I., Zorroza, K., & Rodriguez, J. A. (2012). Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex. *PLoS One*, 7(6), e38570.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., . . . Ustav, E. (2011). Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses. *J Virol*, 85(7), 3315-3329.
- 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(5), 2832-2842.
- Genther Williams, S. M., Disbrow, G. L., Schlegel, R., Lee, D., Threadgill, D. W., & Lambert, P. F. (2005). Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res*, 65(15), 6534-6542.
- Gewin, L., & Galloway, D. A. (2001). E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol*, 75(15), 7198-7201.
- 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(18), 2269-2282.
- Gilbert, D. M., & Cohen, S. N. (1987). Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell*, 50(1), 59-68.
- Gillespie, K. A., Mehta, K. P., Laimins, L. A., & Moody, C. A. (2012). Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *J Virol*, 86(17), 9520-9526.
- Gillette, T. G., Lusky, M., & Borowiec, J. A. (1994). Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91(19), 8846-8850.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., . . . Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(9), 709-720.

- Gillitzer, E., Chen, G., & Stenlund, A. (2000). Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J*, *19*(12), 3069-3079.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, *75*(3), 1565-1570.
- Goldstein, D. J., Andresson, T., Sparkowski, J. J., & Schlegel, R. (1992). The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO J*, *11*(13), 4851-4859.
- Goldstein, D. J., Li, W., Wang, L. M., Heidarani, M. A., Aaronson, S., Shinn, R., . . . Pierce, J. H. (1994). The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation. *J Virol*, *68*(7), 4432-4441.
- Gonzalez, A., Bazaldua-Hernandez, C., West, M., Woytek, K., & Wilson, V. G. (2000). Identification of a short, hydrophilic amino acid sequence critical for origin recognition by the bovine papillomavirus E1 protein. *J Virol*, *74*(1), 245-253.
- Gonzalez, S. L., Stremlau, M., He, X., Basile, J. R., & Munger, K. (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*, *75*(16), 7583-7591.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U., & Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol*, *70*(4), 2339-2349.
- Gunasekharan, V., & Laimins, L. A. (2013). Human papillomaviruses modulate microRNA 145 expression to directly control genome amplification. *J Virol*, *87*(10), 6037-6043.
- 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*(6), 4899-4907.
- Hansen-Hagge, T. E., Janssen, J. W., Hameister, H., Papa, F. R., Zechner, U., Seriu, T., . . . Bartram, C. R. (1998). An evolutionarily conserved gene on human chromosome 5q33-q34, UBH1, encodes a novel deubiquitinating enzyme. *Genomics*, *49*(3), 411-418.
- Harwood, C. A., McGregor, J. M., Proby, C. M., & Breuer, J. (1999). Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *J Clin Pathol*, *52*(4), 249-253.
- 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.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, *8*(12), 3905-3910.

- He, W., Staples, D., Smith, C., & Fisher, C. (2003). Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J Virol*, *77*(19), 10566-10574.
- Hebner, C. M., & Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, *16*(2), 83-97.
- Herber, R., Liem, A., Pitot, H., & Lambert, P. F. (1996). Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol*, *70*(3), 1873-1881.
- Herdman, M. T., Pett, M. R., Roberts, I., Alazawi, W. O., Teschendorff, A. E., Zhang, X. Y., . . . Coleman, N. (2006). Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis*, *27*(11), 2341-2353.
- Hickman, A. B., & Dyda, F. (2005). Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol*, *15*(1), 77-85.
- Hidalgo-Curtis, C., Apperley, J. F., Stark, A., Jeng, M., Gotlib, J., Chase, A., . . . Grand, F. H. (2010). Fusion of PDGFRB to two distinct loci at 3p21 and a third at 12q13 in imatinib-responsive myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*, *148*(2), 268-273.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., & Raj, K. (2006). Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol*, *80*(9), 4431-4439.
- 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*(7), 3938-3948.
- Holt, S. E., & Wilson, V. G. (1995). Mutational analysis of the 18-base-pair inverted repeat element at the bovine papillomavirus origin of replication: identification of critical sequences for E1 binding and in vivo replication. *J Virol*, *69*(10), 6525-6532.
- Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P., & Wu, T. C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc*, *107*(3), 198-217.
- Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M. J., Jones, S. N., Meyn, M. S., & Grompe, M. (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev*, *17*(16), 2021-2035.
- 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*(1), 384-394.
- Hu, Y., Clower, R. V., & Melendy, T. (2006). Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J Virol*, *80*(9), 4363-4371.
- Huang, T. T., Nijman, S. M., Mirchandani, K. D., Galardy, P. J., Cohn, M. A., Haas, W., . . . D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol*, *8*(4), 339-347.
- Hubert, W. G., Kanaya, T., & Laimins, L. A. (1999). DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin. *J Virol*, *73*(3), 1835-1845.
- Hubert, W. G., & Laimins, L. A. (2002). Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional

- and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol*, 76(5), 2263-2273.
- Hubscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, 71, 133-163.
- Hughes, F. J., & Romanos, M. A. (1993a). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*, 21(25), 5817-5823.
- Hughes, F. J., & Romanos, M. A. (1993b). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.*, 21(25), 5817-5823.
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Jin, J., . . . Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol*, 81(18), 9737-9747.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2563-2567.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*, 10(13), 4129-4135.
- 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(10), 6070-6080.
- Hummel, M., Lim, H. B., & Laimins, L. A. (1995). Human papillomavirus type 31b late gene expression is regulated through protein kinase C-mediated changes in RNA processing. *J Virol*, 69(6), 3381-3388.
- Hurlin, P. J., Kaur, P., Smith, P. P., Perez-Reyes, N., Blanton, R. A., & McDougall, J. K. (1991). Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(2), 570-574.
- Imai, S., Kano, M., Nonoyama, K., & Ebihara, S. (2013). Behavioral characteristics of ubiquitin-specific peptidase 46-deficient mice. *PLoS One*, 8(3), e58566.
- Imai, S., Mamiya, T., Tsukada, A., Sakai, Y., Mouri, A., Nabeshima, T., & Ebihara, S. (2012). Ubiquitin-specific peptidase 46 (Usp46) regulates mouse immobile behavior in the tail suspension test through the GABAergic system. *PLoS One*, 7(6), e39084.
- Isaacson, M. K., & Ploegh, H. L. (2009). Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. *Cell Host Microbe*, 5(6), 559-570.
- Jackson, S. P., & Durocher, D. (2013). Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell*, 49(5), 795-807.
- Jagannathan, M., Nguyen, T., Gallo, D., Luthra, N., Brown, G. W., Saridakis, V., & Frappier, L. (2014). A Role for USP7 in DNA Replication. *Mol Cell Biol*, 34(1), 132-145.
- Jagannathan, M., Sakwe, A. M., Nguyen, T., & Frappier, L. (2012). The MCM-associated protein MCM-BP is important for human nuclear morphology. *J Cell Sci*, 125(Pt 1), 133-143.

- Jagu, S., Kwak, K., Garcea, R. L., & Roden, R. B. (2011). Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine*, 28(28), 4478-4486.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M. J. (2008). Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58(2), 71-96.
- Jenkins, O., Earnshaw, D., Sarginson, G., Del Vecchio, A., Tsai, J., Kallender, H., . . . Browne, M. (1996). Characterization of the helicase and ATPase activity of human papillomavirus type 6b E1 protein. *J Gen Virol*, 77 (Pt 8), 1805-1809.
- Johansson, C., & Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol*, 11(4), 239-251.
- 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(5), 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(16), 2101-2111.
- Jones, D. L., Thompson, D. A., & Munger, K. (1997). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*, 239(1), 97-107.
- Joo, H. Y., Jones, A., Yang, C., Zhai, L., Smith, A. D. t., Zhang, Z., . . . Wang, H. (2011). Regulation of histone H2A and H2B deubiquitination and Xenopus development by USP12 and USP46. *J Biol Chem*, 286(9), 7190-7201.
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przywiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., . . . 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(9), 5810-5822.
- Jung, J. U., Lang, S. M., Jun, T., Roberts, T. M., Veillette, A., & Desrosiers, R. C. (1995). Downregulation of Lck-mediated signal transduction by tip of herpesvirus saimiri. *J Virol*, 69(12), 7814-7822.
- Kabsch, K., Mossadegh, N., Kohl, A., Komposch, G., Schenkel, J., Alonso, A., & Tomakidi, P. (2004). The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology*, 47(1), 48-56.
- Kadaja, M., Isok-Paas, H., Laos, T., Ustav, E., & Ustav, M. (2009). Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog*, 5(4), e1000397.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., & Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J*, 26(8), 2180-2191.
- Kamper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., . . . Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*, 80(2), 759-768.
- Kanga, S., Bernard, D., Mager-Heckel, A. M., Erpapazoglou, Z., Mattioli, F., Sixma, T. K., . . . Haguenaer-Tsapis, R. (2012). A deubiquitylating complex required for

neosynthesis of a yeast mitochondrial ATP synthase subunit. *PLoS One*, 7(6), e38071.

- Karanam, B., Jagu, S., Huh, W. K., & Roden, R. B. (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol*, 87(4), 287-299.
- Kaufmann, A. M., Gissmann, L., & Schneider, A. (2012). The worldwide perspective on human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(9), 1400-1401.
- Kee, Y., Yang, K., Cohn, M. A., Haas, W., Gygi, S. P., & D'Andrea, A. D. (2010). WDR20 regulates activity of the USP12 x UAF1 deubiquitinating enzyme complex. *J Biol Chem*, 285(15), 11252-11257.
- Kemp, T. J., Hildesheim, A., Safaeian, M., Dauner, J. G., Pan, Y., Porras, C., . . . Pinto, L. A. (2011). HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine*, 2011-2014.
- Kim, J. M., Parmar, K., Huang, M., Weinstock, D. M., Ruit, C. A., Kutok, J. L., & D'Andrea, A. D. (2009). Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Dev Cell*, 16(2), 314-320.
- Kim, K., & Lambert, P. F. (2002). E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology*, 293(1), 10-14.
- Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., . . . Gygi, S. P. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*, 44(2), 325-340.
- King, L. E., Fisk, J. C., Dornan, E. S., Donaldson, M. M., Melendy, T., & Morgan, I. M. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling. *Virology*, 406(1), 95-102.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., . . . Schiller, J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 67(12), 6929-6936.
- 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(1), 191-198.
- Klumpp, D. J., & Laimins, L. A. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*, 257(1), 239-246.
- Klumpp, D. J., Stubenrauch, F., & Laimins, L. A. (1997). Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication. *J Virol*, 71(11), 8186-8194.
- Knight, G. L., Pugh, A. G., Yates, E., Bell, I., Wilson, R., Moody, C. 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*.
- Kouranti, I., McLean, J. R., Feoktistova, A., Liang, P., Johnson, A. E., Roberts-Galbraith, R. H., & Gould, K. L. (2010). A global census of fission yeast deubiquitinating enzyme localization and interaction networks reveals distinct

- compartmentalization profiles and overlapping functions in endocytosis and polarity. *PLoS Biol*, 8(9).
- Kowalski, A., & Palyga, J. (2012). Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol Int*, 36(11), 981-996.
- Kowalski, J. R., Dahlberg, C. L., & Juo, P. (2011). The deubiquitinating enzyme USP-46 negatively regulates the degradation of glutamate receptors to control their abundance in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 31(4), 1341-1354.
- 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(2), 467-475.
- Kudoh, A., Iwahori, S., Sato, Y., Nakayama, S., Isomura, H., Murata, T., & Tsurumi, T. (2009). Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol*, 83(13), 6641-6651.
- Kuo, S. R., Liu, J. S., Broker, T. R., & Chow, L. T. (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem*, 269(39), 24058-24065.
- Kushima, I., Aleksic, B., Ito, Y., Nakamura, Y., Nakamura, K., Mori, N., . . . Ozaki, N. (2010). Association study of ubiquitin-specific peptidase 46 (USP46) with bipolar disorder and schizophrenia in a Japanese population. *J Hum Genet*, 55(3), 133-136.
- Kusumoto-Matsuo, R., Kanda, T., & Kukimoto, I. (2011). Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes Cells*, 16(1), 23-33.
- Lacey, C. J., Lowndes, C. M., & Shah, K. V. (2006). Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/35-41.
- Lai, C. C., Henningson, C., & DiMaio, D. (1998). Bovine papillomavirus E5 protein induces oligomerization and trans-phosphorylation of the platelet-derived growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26), 15241-15246.
- Lai, C. C., Henningson, C., & DiMaio, D. (2000). Bovine papillomavirus E5 protein induces the formation of signal transduction complexes containing dimeric activated platelet-derived growth factor beta receptor and associated signaling proteins. *J Biol Chem*, 275(13), 9832-9840.
- Larson, D. A., & Derkay, C. S. (2010). Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS*, 118(6-7), 450-454.
- Lee, A. Y., & Chiang, C. M. (2009). Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability. *J Biol Chem*, 284(5), 2778-2786.
- Lee, C., & Laimins, L. A. (2004). Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *J Virol*, 78(22), 12366-12377.
- Lee, D., Kim, H., Lee, Y., & Choe, J. (1997). Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res*, 52(1), 97-108.

- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V., & Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, *399*(6735), 487-491.
- Lee, K. Y., Yang, K., Cohn, M. A., Sikdar, N., D'Andrea, A. D., & Myung, K. (2010). Human ELG1 regulates the level of ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) through Its interactions with PCNA and USP1. *J Biol Chem*, *285*(14), 10362-10369.
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., & Matlashewski, G. (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*, *7*(1), 19-25.
- Lehoux, M., D'Abramo, C. M., & Archambault, J. (2009). Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics*, *12*(5-6), 268-280.
- Lehoux, M., Fradet-Turcotte, A., Lussier-Price, M., Omichinski, J. G., & Archambault, J. (2012). Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. *J Virol*, *86*(7), 3486-3500.
- Leng, X., Ludes-Meyers, J. H., & Wilson, V. G. (1997). Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding and E2 interaction capacity. *J Virol*, *71*(1), 848-852.
- Leng, X., & Wilson, V. G. (1994). Genetically defined nuclear localization signal sequence of bovine papillomavirus E1 protein is necessary and sufficient for the nuclear localization of E1-beta-galactosidase fusion proteins. *J Gen Virol*, *75* (Pt 9), 2463-2467.
- Lentz, M., Zanardi, T., Filzen, R., Carter, J., & Hella, M. (2002). Functional analysis of a carboxyl-terminal phosphorylation mutant of the bovine papillomavirus E1 protein. *J Mol Biol*, *316*(3), 599-609.
- Lentz, M. R. (2002). A carboxyl-terminal serine of the bovine papillomavirus E1 protein is phosphorylated in vivo and in vitro. *Virus Res*, *83*(1-2), 213-219.
- Lentz, M. R., Pak, D., Mohr, I., & Botchan, M. R. (1993). The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site. *J Virol*, *67*(3), 1414-1423.
- Lentz, M. R., Stevens, S. M., Jr., Raynes, J., & Elkhoury, N. (2006). A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virol J*, *3*, 13.
- Li, J. J., & Kelly, T. J. (1984). Simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(22), 6973-6977.
- Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K., & Garcea, R. L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol*, *72*(3), 2160-2167.
- 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*(6), 1207-1221.
- Li, R., & Botchan, M. R. (1994). Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(15), 7051-7055.
- Li, S., Labrecque, S., Gauzzi, M. C., Cuddihy, A. R., Wong, A. H., Pellegrini, S., . . . Koromilas, A. E. (1999). The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein

- physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene*, *18*(42), 5727-5737.
- Li, X., Stevens, P. D., Yang, H., Gulhati, P., Wang, W., Evers, B. M., & Gao, T. (2013). The deubiquitination enzyme USP46 functions as a tumor suppressor by controlling PHLPP-dependent attenuation of Akt signaling in colon cancer. *Oncogene*, *32*(4), 471-478.
- Lin, B. Y., Makhov, A. M., Griffith, J. D., Broker, T. R., & Chow, L. T. (2002). Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol*, *22*(18), 6592-6604.
- 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*(46), 30704-30712.
- Liu, X., & Stenlund, A. (2010). Mutations in Sensor 1 and Walker B in the bovine papillomavirus E1 initiator protein mimic the nucleotide-bound state. *J Virol*, *84*(4), 1912-1919.
- Lo Piano, A., Martinez-Jimenez, M. I., Zecchi, L., & Ayora, S. (2011). Recombination-dependent concatemeric viral DNA replication. *Virus Res*, *160*(1-2), 1-14.
- 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*(7), 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*(10), 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*(4), 1605-1615.
- Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2012). Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer Prev Res (Phila)*, *5*(1), 18-23.
- Lu, J. Z., Sun, Y. N., Rose, R. C., Bonnez, 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*(12), 7131-7139.
- Lusky, M., & Fontane, E. (1991). Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(14), 6363-6367.
- 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*(19), 8895-8899.
- Lydeard, J. R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y. J., Stillman, B., Burgers, P. M., & Haber, J. E. (2010). Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev*, *24*(11), 1133-1144.

- 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 USA*, *96*(2), 382-387.
- Mach, H., Volkin, D. B., Troutman, R. D., Wang, B., Luo, Z., Jansen, K. U., & Shi, L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci*, *95*(10), 2195-2206.
- MacPherson, P., Thorner, L., Parker, L. M., & Botchan, M. (1994). The bovine papilloma virus E1 protein has ATPase activity essential to viral DNA replication and efficient transformation in cells. *Virology*, *204*(1), 403-408.
- Malcles, M. H., Cueille, N., Mechali, F., Coux, O., & Bonne-Andrea, C. (2002). Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol*, *76*(22), 11350-11358.
- Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P., & Romanos, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol*, *72*(9), 7407-7419.
- Matovina, M., Sabol, I., Grubisic, G., Gasperov, N. M., & Grce, M. (2009). Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*, *113*(1), 120-127.
- Mattern, M. R., Wu, J., & Nicholson, B. (2012). Ubiquitin-based anticancer therapy: carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, *1823*(11), 2014-2021.
- Maufort, J. P., Shai, A., Pitot, H. C., & Lambert, P. F. (2010). A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, *70*(7), 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*(13), 6106-6112.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, *62*(6), 670-684.
- McBride, A. A., Byrne, J. C., & Howley, P. M. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(2), 510-514.
- McIntosh, P. B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D. J., . . . Doorbar, J. (2010). E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*, *123*(Pt 16), 2810-2822.
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Munger, K. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*, *143*(2), 195-208.
- McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H., & Evander, M. (1999). Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*, *261*(2), 271-279.
- 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*(19), 9530-9543.

- McShan, G. D., & Wilson, V. G. (1997). Casein kinase II phosphorylates bovine papillomavirus type 1 E1 in vitro at a conserved motif. *J Gen Virol*, 78 (Pt 1), 171-177.
- McShan, G. D., & Wilson, V. G. (2000). Contribution of bovine papillomavirus type 1 E1 protein residue 48 to replication function. *J Gen Virol*, 81(Pt 8), 1995-2004.
- Mechali, F., Hsu, C. Y., Castro, A., Lorca, T., & Bonne-Andrea, C. (2004). Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol*, 78(5), 2615-2619.
- Melendy, T., Sedman, J., & Stenlund, A. (1995). Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol*, 69(12), 7857-7867.
- Mendoza, R., Gandhi, L., & Botchan, M. R. (1995). E1 recognition sequences in the bovine papillomavirus type 1 origin of DNA replication: interaction between half sites of the inverted repeats. *J Virol*, 69(6), 3789-3798.
- Mesplede, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Senechal, H., Coutlee, F., & Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *J Virol*, 86(1), 94-107.
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., & Weissman, A. M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 3), 531-537.
- Meyers, C., Frattini, M. G., Hudson, J. B., & Laimins, L. A. (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science*, 257(5072), 971-973.
- Meyers, C., Mayer, T. J., & Ozburn, M. A. (1997). Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol*, 71(10), 7381-7386.
- Mistry, H., Hsieh, G., Buhrlage, S. J., Huang, M., Park, E., Cuny, G. D., . . . Parmar, K. (2013). Small-Molecule Inhibitors of USP1 Target ID1 Degradation in Leukemic Cells. *Mol Cancer Ther*.
- Miyamoto, S., Purcell, N. H., Smith, J. M., Gao, T., Whittaker, R., Huang, K., . . . Brown, J. H. (2010). PHLPP-1 negatively regulates Akt activity and survival in the heart. *Circ Res*, 107(4), 476-484.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., & Botchan, M. R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250(4988), 1694-1699.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4), 665-679.
- Moody, C. A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., & Laimins, L. A. (2007). Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), 19541-19546.
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2009). Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000605.
- Moretti, J., Chastagner, P., Liang, C. C., Cohn, M. A., Israel, A., & Brou, C. (2012). The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling

- acting on notch receptor trafficking toward degradation. *J Biol Chem*, 287(35), 29429-29441.
- Morgan, I. M., & Taylor, E. R. (2005). Detection and quantitation of HPV DNA replication by Southern blotting and real-time PCR. *Methods Mol Med*, 119, 349-362.
- Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J. G., & Archambault, J. (2011). A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J Virol*, 85(11), 5287-5300.
- Moscufo, N., Sverdrup, F., Breiding, D. E., & Androphy, E. J. (1999). Two distinct regions of the BPV1 E1 replication protein interact with the activation domain of E2. *Virus Res*, 65(2), 141-154.
- Muller, F., & Sapp, M. (1996). Domains of the E1 protein of human papillomavirus type 33 involved in binding to the E2 protein. *Virology*, 219(1), 247-256.
- Muller, F., Seo, Y. S., & Hurwitz, J. (1994). Replication of bovine papillomavirus type 1 origin-containing DNA in crude extracts and with purified proteins. *J Biol Chem*, 269(25), 17086-17094.
- Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63(10), 4417-4421.
- Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*, 8(13), 4099-4105.
- Murai, J., Yang, K., Dejsuphong, D., Hirota, K., Takeda, S., & D'Andrea, A. D. (2011). The USP1/UAF1 complex promotes double-strand break repair through homologous recombination. *Mol Cell Biol*, 31(12), 2462-2469.
- Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y. C., . . . Durocher, D. (2010). Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature*, 466(7309), 941-946.
- Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., & Lambert, P. F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol*, 79(20), 13150-13165.
- Nakanishi, K., Yang, Y. G., Pierce, A. J., Taniguchi, T., Digweed, M., D'Andrea, A. D., . . . Jasin, M. (2005). Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4), 1110-1115.
- 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(12), 6957-6964.
- Nicassio, F., Corrado, N., Vissers, J. H., Areces, L. B., Bergink, S., Marteijn, J. A., . . . Citterio, E. (2007). Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol*, 17(22), 1972-1977.
- Nijman, S. M., Huang, T. T., Dirac, A. M., Brummelkamp, T. R., Kerkhoven, R. M., D'Andrea, A. D., & Bernards, R. (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, 17(3), 331-339.

- Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., & Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, *123*(5), 773-786.
- Nindl, I., & Rosl, F. (2008). Molecular Concepts of Virus Infections Causing Skin Cancer in Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*.
- Nishiyama, A., Frappier, L., & Mechali, M. (2011). MCM-BP regulates unloading of the MCM2-7 helicase in late S phase. *Genes Dev*, *25*(2), 165-175.
- Nomaguchi, M., Fujita, M., & Adachi, A. (2008). Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect*, *10*(9), 960-967.
- Oestergaard, V. H., Langevin, F., Kuiken, H. J., Pace, P., Niedzwiedz, W., Simpson, L. J., . . . Patel, K. J. (2007). Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair. *Mol Cell*, *28*(5), 798-809.
- Oh, S. T., Kyo, S., & Laimins, L. A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol*, *75*(12), 5559-5566.
- Ouhoumane, N., Goggin, P., & Louchini, R. (2013). *Les infections au virus du papillome humain (VPH) et le portrait des cancers associés à ces infections au Québec*. Québec: Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). 105p.
- Ozbun, M. A., & Meyers, C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, *71*(7), 5161-5172.
- Ozbun, M. A., & Meyers, C. (1998a). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*, *248*(2), 218-230.
- Ozbun, M. A., & Meyers, C. (1998b). Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, *72*(4), 2715-2722.
- Pace, P., Mosedale, G., Hodkinson, M. R., Rosado, I. V., Sivasubramaniam, M., & Patel, K. J. (2010). Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science*, *329*(5988), 219-223.
- Pan, H., & Griep, A. E. (1995). Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev*, *9*(17), 2157-2169.
- Panier, S., & Durocher, D. (2009). Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, *8*(4), 436-443.
- Papanicolaou, G. N. (1942). A New Procedure for Staining Vaginal Smears. *Science*, *95*(2469), 438-439.
- 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*(6), 867-876.
- Park, E., Kim, J. M., Primack, B., Weinstock, D. M., Moreau, L. A., Parmar, K., & D'Andrea, A. D. (2013). Inactivation of uaf1 causes defective homologous recombination and early embryonic lethality in mice. *Mol Cell Biol*, *33*(22), 4360-4370.

- Park, J., Cho, N. H., Choi, J. K., Feng, P., Choe, J., & Jung, J. U. (2003). Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol*, *77*(16), 9041-9051.
- Park, J., Lee, B. S., Choi, J. K., Means, R. E., Choe, J., & Jung, J. U. (2002). Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity*, *17*(2), 221-233.
- Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., Hwang, E. S., Namkoong, S. E., & Um, S. J. (2000). Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*, *275*(10), 6764-6769.
- 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*(18), 8700-8704.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, *55*(2), 74-108.
- Parmar, K., Kim, J., Sykes, S. M., Shimamura, A., Stuckert, P., Zhu, K., . . . D'Andrea, A. (2010). Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. *Stem Cells*, *28*(7), 1186-1195.
- Partridge, J. M., & Koutsky, L. A. (2006). Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis*, *6*(1), 21-31.
- Patel, H., Wagner, M., Singhal, P., & Kothari, S. (2013). Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis*, *13*, 39.
- Patel, S. S., & Donmez, I. (2006). Mechanisms of helicases. *J Biol Chem*, *281*(27), 18265-18268.
- Peh, W. L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X., & Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol*, *78*(4), 2142-2151.
- Perea, S. E., Massimi, P., & Banks, L. (2000). Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. *Int J Mol Med*, *5*(6), 661-666.
- Pett, M. R., Alazawi, W. O., Roberts, I., Downen, S., Smith, D. I., Stanley, M. A., & Coleman, N. (2004). Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*, *64*(4), 1359-1368.
- Petti, L., Nilson, L. A., & DiMaio, D. (1991). Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J*, *10*(4), 845-855.
- Piatkov, K. I., Colnaghi, L., Bekes, M., Varshavsky, A., & Huang, T. T. (2012). The auto-generated fragment of the Usp1 deubiquitylase is a physiological substrate of the N-end rule pathway. *Mol Cell*, *48*(6), 926-933.
- 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), 1-11.

- Pim, D., & Banks, L. (2010). Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *Apmis*, *118*(6-7), 471-493.
- Pim, D., Collins, M., & Banks, L. (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, *7*(1), 27-32.
- Pim, D., Massimi, P., & Banks, L. (1997). Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene*, *15*(3), 257-264.
- Pittayakhajonwut, D., & Angeletti, P. C. (2008). Analysis of cis-elements that facilitate extrachromosomal persistence of human papillomavirus genomes. *Virology*, *374*(2), 304-314.
- Pittayakhajonwut, D., & Angeletti, P. C. (2010). Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. *Virol J*, *7*, 123.
- Pray, T. R., & Laimins, L. A. (1995). Differentiation-dependent expression of E1--E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology*, *206*(1), 679-685.
- Qian, K., Pietila, T., Ronty, M., Michon, F., Frilander, M. J., Ritari, J., . . . Auvinen, E. (2013). Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs. *PLoS One*, *8*(7), e70202.
- Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Yan, L., Da Silva, D. M., . . . Kast, W. M. (2013). The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*, *87*(11), 6062-6072.
- Raj, K., & Stanley, M. A. (1995). The ATP-binding and ATPase activities of human papillomavirus type 16 E1 are significantly weakened by the absence of prolines in its ATP-binding domain. *J Gen Virol*, *76* (Pt 12), 2949-2956.
- Rangasamy, D., & Wilson, V. G. (2000). Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem*, *275*(39), 30487-30495.
- Ravnan, J. B., Gilbert, D. M., Ten Hagen, K. G., & Cohen, S. N. (1992). Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *J Virol*, *66*(12), 6946-6952.
- Reinson, T., Toots, M., Kadaja, M., Pipitch, R., Allik, M., Ustav, E., & Ustav, M. (2013). Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification. *J Virol*, *87*(2), 951-964.
- Remm, M., Remm, A., & Ustav, M. (1999). Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J Virol*, *73*(4), 3062-3070.
- 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*(5), 1522-1527.
- Riley, R. R., Duensing, S., Brake, T., Munger, K., Lambert, P. F., & Arbeit, J. M. (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, *63*(16), 4862-4871.

- Roberts, J. M., & Weintraub, H. (1988). Cis-acting negative control of DNA replication in eukaryotic cells. *Cell*, *52*(3), 397-404.
- Roberts, J. N., Buck, C. B., Thompson, C. D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P. L., . . . Schiller, J. T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med*, *13*(7), 857-861.
- Roberts, S., Ashmole, I., Gibson, L. J., Rookes, S. M., Barton, G. J., & Gallimore, P. H. (1994). Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol*, *68*(10), 6432-6445.
- Roberts, S., Ashmole, I., Rookes, S. M., & Gallimore, P. H. (1997). Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*, *71*(5), 3554-3562.
- Rocque, W. J., Porter, D. J., Barnes, J. A., Dixon, E. P., Lobe, D. C., Su, J. L., . . . Phelps, W. C. (2000). Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif*, *18*(2), 148-159.
- Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 138-168.
- Romanczuk, H., Thierry, F., & Howley, P. M. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol*, *64*(6), 2849-2859.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M., & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, *12*(13), 2061-2072.
- Rosas-Acosta, G., Langereis, M. A., Deyrieux, A., & Wilson, V. G. (2005). Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology*, *331*(1), 190-203.
- Rosas-Acosta, G., & Wilson, V. G. (2008). Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein. *Virology*, *373*(1), 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*(2), 651-660.
- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2012). The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett*, *586*(17), 2732-2739.
- Saikia, P., Fensterl, V., & Sen, G. C. (2010). The inhibitory action of P56 on select functions of E1 mediates interferon's effect on human papillomavirus DNA replication. *J Virol*, *84*(24), 13036-13039.
- Sakakibara, N., Chen, D., Jang, M. K., Kang, D. W., Luecke, H. F., Wu, S. Y., . . . McBride, A. A. (2013). Brd4 Is Displaced from HPV Replication Factories as They Expand and Amplify Viral DNA. *PLoS Pathog*, *9*(11), e1003777.
- Sakakibara, N., Chen, D., & McBride, A. A. (2013). Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathog*, *9*(7), e1003321.

- Sakakibara, N., Mitra, R., & McBride, A. A. (2011). The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol*, *85*(17), 8981-8995.
- Sanchez, I. E., Dellarole, M., Gaston, K., & de Prat Gay, G. (2008). Comprehensive comparison of the interaction of the E2 master regulator with its cognate target DNA sites in 73 human papillomavirus types by sequence statistics. *Nucleic Acids Res*, *36*(3), 756-769.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z. R., & Calonje, M. (2008). RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics*, *9*, 308.
- Sanders, C. M., Kovalevskiy, O. V., Sizov, D., Lebedev, A. A., Isupov, M. N., & Antson, A. A. (2007). Papillomavirus E1 helicase assembly maintains an asymmetric state in the absence of DNA and nucleotide cofactors. *Nucleic Acids Res*, *35*(19), 6451-6457.
- 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*(23), 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*(5), 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*(26), 23689-23699.
- Santucci, S., Bonne-Andrea, C., & Clertant, P. (1995). Bovine papillomavirus type 1 E1 ATPase activity does not depend on binding to DNA nor to viral E2 protein. *J Gen Virol*, *76* (Pt 5), 1129-1140.
- Sapp, M., & Day, P. M. (2009). Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*, *384*(2), 400-409.
- Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J. R., & Streeck, R. E. (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol*, *72*(7), 6186-6189.
- Sarafi, T. R., & McBride, A. A. (1995). Domains of the BPV-1 E1 replication protein required for origin-specific DNA binding and interaction with the E2 transactivator. *Virology*, *211*(2), 385-396.
- Sarikas, A., Hartmann, T., & Pan, Z. Q. (2011). The cullin protein family. *Genome Biol*, *12*(4), 220.
- Sarkari, F., Sanchez-Alcaraz, T., Wang, S., Holowaty, M. N., Sheng, Y., & Frappier, L. (2009). EBNA1-mediated recruitment of a histone H2B deubiquitylating complex to the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *PLoS Pathog*, *5*(10), e1000624.
- Schaal, T. D., Mallet, W. G., McMinn, D. L., Nguyen, N. V., Sopko, M. M., John, S., & Parekh, B. S. (2003). Inhibition of human papilloma virus E2 DNA binding protein by covalently linked polyamides. *Nucleic Acids Res.*, *31*(4), 1282-1291.
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., . . . Burk, R. D. (2010). A population-based prospective study of carcinogenic

- human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*, 70(8), 3159-3169.
- Schlacher, K., Wu, H., & Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell*, 22(1), 106-116.
- Schoop, V. M., Mirancea, N., & Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 112(3), 343-353.
- Schuck, S., Ruse, C., & Stenlund, A. (2013). CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol*, 87(13), 7668-7679.
- Schuck, S., & Stenlund, A. (2005a). Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell*, 20(3), 377-389.
- Schuck, S., & Stenlund, A. (2005b). Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol*, 79(13), 8661-8664.
- Schwartzman, J. B., Adolph, S., Martin-Parras, L., & Schildkraut, C. L. (1990). Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of bovine papillomavirus type 1 DNA. *Mol Cell Biol*, 10(6), 3078-3086.
- Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 445(1-2), 187-196.
- 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(24), 6218-6228.
- Sedman, J., & Stenlund, A. (1996). The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure. *Embo J*, 15(18), 5085-5092.
- Sedman, J., & Stenlund, A. (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol*, 72(8), 6893-6897.
- Sedman, T., Sedman, J., & Stenlund, A. (1997). Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol*, 71(4), 2887-2896.
- Sekaric, P., Cherry, J. J., & Androphy, E. J. (2008). Binding of human papillomavirus type 16 E6 to E6AP is not required for activation of hTERT. *J Virol*, 82(1), 71-76.
- 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(1), 10-17.
- Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H. Y., Phillips, B., & Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90(7), 2865-2869.
- 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(2), 702-706.

- Sexton, C. J., Williams, A. T., Topley, P., Shaw, R. J., Lovegrove, C., Leigh, I., & Stables, J. N. (1995). Development and characterization of a novel xenograft model permissive for human papillomavirus DNA amplification and late gene expression. *J Gen Virol*, 76 (Pt 12), 3107-3112.
- 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(4), 1626-1635.
- Shamanin, V., zur Hausen, H., Lavergne, D., Proby, C. M., Leigh, I. M., Neumann, C., . . . de Villiers, E. M. (1996). Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst*, 88(12), 802-811.
- Sierecki, E., Sinko, W., McCammon, J. A., & Newton, A. C. (2010). Discovery of small molecule inhibitors of the PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP) by chemical and virtual screening. *J Med Chem*, 53(19), 6899-6911.
- Skowrya, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., & Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 91(2), 209-219.
- Smith, J. L., Campos, S. K., Wandinger-Ness, A., & Ozbun, M. A. (2008). Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J Virol*, 82(19), 9505-9512.
- Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., . . . Elledge, S. J. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*, 129(2), 289-301.
- Song, S., Pitot, H. C., & Lambert, P. F. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*, 73(7), 5887-5893.
- Soutoglou, E., & Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science*, 320(5882), 1507-1510.
- Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2009). Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, 138(2), 389-403.
- Spalholz, B. A., McBride, A. A., Sarafi, T., & Quintero, J. (1993). Binding of bovine papillomavirus E1 to the origin is not sufficient for DNA replication. *Virology*, 193(1), 201-212.
- Spanos, W. C., Hoover, A., Harris, G. F., Wu, S., Strand, G. L., Anderson, M. E., . . . Lee, J. H. (2008). The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol*, 82(5), 2493-2500.
- Sparby, 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(23), 13265-13270.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., & Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type

16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One*, 3(10), e3313.

- Stanley, M. A., Browne, H. M., Appleby, M., & Minson, A. C. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer*, 43(4), 672-676.
- 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(1), 50-58.
- Stenlund, A. (2003). E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *Embo J*, 22(4), 954-963.
- Stern, P. L., van der Burg, S. H., Hampson, I. N., Broker, T. R., Fiander, A., Lacey, C. J., . . . Einstein, M. H. (2012). Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F71-82.
- 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(1), 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.
- Storrs, C. H., & Silverstein, S. J. (2007). PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol*, 81(8), 4080-4090.
- Stracker, T. H., Carson, C. T., & Weitzman, M. D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature*, 418(6895), 348-352.
- Straight, S. W., Herman, B., & McCance, D. J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol*, 69(5), 3185-3192.
- Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J., & McCance, D. J. (1993). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*, 67(8), 4521-4532.
- 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(3), 1178-1186.
- Stubenrauch, F., Lim, H. B., & Laimins, L. A. (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol*, 72(2), 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(10), 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(9), 4139-4149.
- Sun, Y., Han, H., & McCance, D. J. (1998). Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol*, 79 (Pt 7), 1651-1658.

- Sun, Y. N., Lu, J. Z., & McCance, D. J. (1996). Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology*, 216(1), 219-222.
- Supryniewicz, F. A., Disbrow, G. L., Simic, V., & Schlegel, R. (2005). Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16? *Virology*, 332(1), 102-113.
- Supryniewicz, F. A., Krawczyk, E., Hebert, J. D., Sudarshan, S. R., Simic, V., Kamonjoh, C. M., & Schlegel, R. (2010). The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. *J Virol*, 84(20), 10619-10629.
- 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(2), 1319-1323.
- Swindle, C. S., & Engler, J. A. (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol*, 72(3), 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(2), 1001-1009.
- Syrjanen, S. (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S59-66.
- Syrjanen, S. (2007). Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med*, 356(19), 1993-1995.
- Szarewski, A. (2010). HPV vaccine: Cervarix. *Expert Opin Biol Ther*, 10(3), 477-487.
- Taichman, L. B., Reilly, S. S., & LaPorta, R. F. (1983). The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J Invest Dermatol*, 81(1 Suppl), 137s-140s.
- 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(24), 3311-3321.
- Thomas, M., & Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 17(23), 2943-2954.
- Thomas, M., & Banks, L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*, 80 (Pt 6), 1513-1517.
- Thompson, D. A., Zacny, V., Belinsky, G. S., Classon, M., Jones, D. L., Schlegel, R., & Munger, K. (2001). The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*, 20(28), 3629-3640.
- Thorland, E. C., Myers, S. L., Gostout, B. S., & Smith, D. I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22(8), 1225-1237.
- Thorner, L. K., Lim, D. A., & Botchan, M. R. (1993). DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol*, 67(10), 6000-6014.
- 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(9), 5178-5191.

- Titolo, S., Pelletier, A., Pulichino, A. M., Brault, K., Wardrop, E., White, P. W., . . . 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(16), 7349-7361.
- Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P. W., . . . 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(7), 5282-5293.
- Tomaic, V., Gardiol, D., Massimi, P., Ozbun, M., Myers, M., & Banks, L. (2008). Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene*.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., & Alonso, A. (2000). Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, 79(6), 407-412.
- Tomida, S., Mamiya, T., Sakamaki, H., Miura, M., Aosaki, T., Masuda, M., . . . Ebihara, S. (2009). Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nat Genet*, 41(6), 688-695.
- Tong, X., & Howley, P. M. (1997). The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4412-4417.
- Traut, H. F., & Papanicolaou, G. N. (1943). Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med*, 59(2), 121-122.
- Ulrich, H. D., & Walden, H. (2010). Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7), 479-489.
- 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(2), 449-457.
- 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 Knaap, J. A., Kumar, B. R., Moshkin, Y. M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A. J., . . . Verrijzer, C. P. (2005). GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell*, 17(5), 695-707.
- Vande Pol, S. B., Brown, M. C., & Turner, C. E. (1998). Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*, 16(1), 43-52.
- Vande Pol, S. B., & Klingelutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 445(1-2), 115-137.
- Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C., & Schlegel, R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 75(9), 4467-4472.
- Veldman, T., Liu, X., Yuan, H., & Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the

- telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8211-8216.
- Ventii, K. H., & Wilkinson, K. D. (2008). Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J*, 414(2), 161-175.
- Villamil, M. A., Chen, J., Liang, Q., & Zhuang, Z. (2012). A noncanonical cysteine protease USP1 is activated through active site modulation by USP1-associated factor 1. *Biochemistry*, 51(13), 2829-2839.
- Villamil, M. A., Liang, Q., Chen, J., Choi, Y. S., Hou, S., Lee, K. H., & Zhuang, Z. (2012). Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1. *Biochemistry*, 51(45), 9112-9123.
- Villamil, M. A., Liang, Q., & Zhuang, Z. (2013). The WD40-repeat protein-containing deubiquitinase complex: catalysis, regulation, and potential for therapeutic intervention. *Cell Biochem Biophys*, 67(1), 111-126.
- Vogt, M., Butz, K., Dymalla, S., Semzow, J., & Hoppe-Seyler, F. (2006). Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*, 25(29), 4009-4015.
- Vugmeyster, Y., Borodovsky, A., Maurice, M. M., Maehr, R., Furman, M. H., & Ploegh, H. L. (2002). The ubiquitin-proteasome pathway in thymocyte apoptosis: caspase-dependent processing of the deubiquitinating enzyme USP7 (HAUSP). *Mol Immunol*, 39(7-8), 431-441.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., . . . Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1), 12-19.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(6), 430-440.
- Wang, J. W., & Roden, R. B. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1-2), 175-186.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., . . . Doorbar, J. (2004). Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol*, 78(2), 821-833.
- Wang, X., Helfer, C. M., Pancholi, N., Bradner, J. E., & You, J. (2013). Recruitment of Brd4 to the human papillomavirus type 16 DNA replication complex is essential for replication of viral DNA. *J Virol*, 87(7), 3871-3884.
- Wang, Y., Coulombe, R., Cameron, D. R., Thauvette, L., Massariol, M. J., Amon, L. M., . . . 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(8), 6976-6985.
- Weake, V. M., & Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*, 29(6), 653-663.
- Welchman, R. L., Gordon, C., & Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 599-609.
- Weller, S. K., & Coen, D. M. (2012). Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a013011.

- Wentzensen, N., Vinokurova, S., & von Knebel Doeberitz, M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*, 64(11), 3878-3884.
- West, M., Flanery, D., Woytek, K., Rangasamy, D., & Wilson, V. G. (2001). Functional mapping of the DNA binding domain of bovine papillomavirus E1 protein. *J Virol*, 75(24), 11948-11960.
- West, M., & Wilson, V. G. (2002). Hydrophobic residue contributions to sequence-specific DNA binding by the bovine papillomavirus helicase E1. *Virology*, 296(1), 52-61.
- Wetherill, L. F., Holmes, K. K., Verow, M., Muller, M., Howell, G., Harris, M., . . . Macdonald, A. (2012). High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J Virol*, 86(9), 5341-5351.
- White, A. E., Livanos, E. M., & Tlsty, T. D. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev*, 8(6), 666-677.
- White, P. W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., . . . 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(25), 22426-22438.
- White, P. W., Titolo, S., Brault, K., Thauvette, L., Pelletier, A., Welchner, E., . . . Archambault, J. (2003). Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists of the E1-E2 protein interaction. *J.Biol.Chem.*, 278(29), 26765-26772.
- Whitehurst, C. B., Vaziri, C., Shackelford, J., & Pagano, J. S. (2012). Epstein-Barr virus BPLF1 deubiquitinates PCNA and attenuates polymerase eta recruitment to DNA damage sites. *J Virol*, 86(15), 8097-8106.
- Williams, S. A., Maecker, H. L., French, D. M., Liu, J., Gregg, A., Silverstein, L. B., . . . Dixit, V. M. (2011). USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell*, 146(6), 918-930.
- 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(11), 6732-6740.
- Wilson, R., Ryan, G. B., Knight, G. L., Laimins, L. A., & Roberts, S. (2007). The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology*, 362(2), 453-460.
- Woodworth, C. D., Doniger, J., & DiPaolo, J. A. (1989). immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J Virol*, 63(1), 159-164.
- 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(17), 2383-2396.
- Wu, Y. (2012). Unwinding and rewinding: double faces of helicase? *J Nucleic Acids*, 2012, 140601.

- Yang, K., Moldovan, G. L., Vinciguerra, P., Murai, J., Takeda, S., & D'Andrea, A. D. (2011). Regulation of the Fanconi anemia pathway by a SUMO-like delivery network. *Genes Dev*, *25*(17), 1847-1858.
- Yang, L., Li, R., Mohr, I. J., Clark, R., & Botchan, M. R. (1991). Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature*, *353*(6345), 628-632.
- 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*(11), 5086-5090.
- Yardimci, H., Loveland, A. B., Habuchi, S., van Oijen, A. M., & Walter, J. C. (2010). Uncoupling of sister replisomes during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell*, *40*(5), 834-840.
- Yardimci, H., Wang, X., Loveland, A. B., Tappin, I., Rudner, D. Z., Hurwitz, J., . . . Walter, J. C. (2012). Bypass of a protein barrier by a replicative DNA helicase. *Nature*, *492*(7428), 205-209.
- Yasugi, T., Benson, J. D., Sakai, H., Vidal, M., & Howley, P. M. (1997). Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins. *J Virol*, *71*(2), 891-899.
- Yasugi, T., & Howley, P. M. (1996). Identification of the structural and functional human homolog of the yeast ubiquitin conjugating enzyme UBC9. *Nucleic Acids Res*, *24*(11), 2005-2010.
- 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*(8), 5942-5951.
- Ye, Y., Scheel, H., Hofmann, K., & Komander, D. (2009). Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. *Mol Biosyst*, *5*(12), 1797-1808.
- Yoakim, C., Ogilvie, W. W., Goudreau, N., Naud, J., Hache, B., O'Meara, J. A., . . . White, P. W. (2003). Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-Origin DNA complex. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, *13*(15), 2539-2541.
- 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*(3), 668-673.
- Yu, J. H., Lin, B. Y., Deng, W., Broker, T. R., & Chow, L. T. (2007). Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 E1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. *J Virol*, *81*(10), 5066-5078.
- 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*(4), 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*(11), 2323-2330.
- Zhang, B., Chen, W., & Roman, A. (2006). The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(2), 437-442.

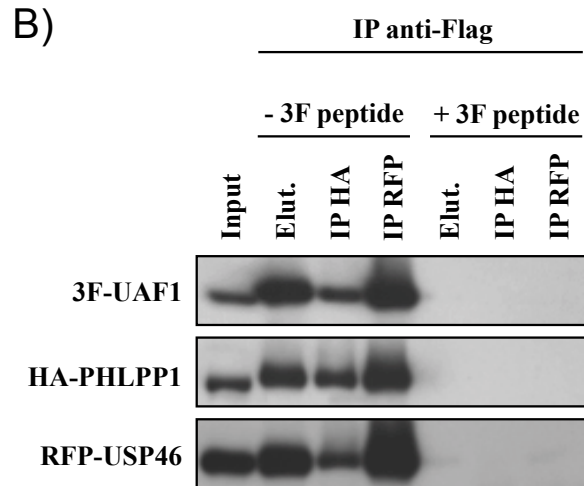
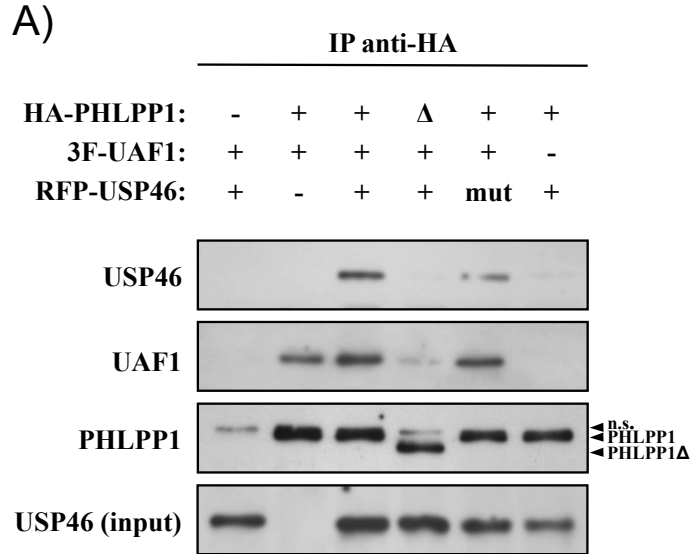
- Zhang, W., Tian, Q. B., Li, Q. K., Wang, J. M., Wang, C. N., Liu, T., . . . Wang, M. W. (2011). Lysine 92 amino acid residue of USP46, a gene associated with 'behavioral despair' in mice, influences the deubiquitinating enzyme activity. *PLoS One*, 6(10), e26297.
- Zheng, Z. M., & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11, 2286-2302.
- Zhiqiang, Z., Qinghui, Y., Yongqiang, Z., Jian, Z., Xin, Z., Haiying, M., & Yuepeng, G. (2012). USP1 regulates AKT phosphorylation by modulating the stability of PHLPP1 in lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(7), 1231-1238.
- Zhou, B., Arnett, D. R., Yu, X., Brewster, A., Sowd, G. A., Xie, C. L., . . . Chen, X. S. (2012). Structural basis for the interaction of a hexameric replicative helicase with the regulatory subunit of human DNA polymerase alpha-primase. *J Biol Chem*, 287(32), 26854-26866.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Davies, H., Crawford, L., Park, D., & Frazer, I. H. (1992). Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology*, 189(2), 592-599.
- Ziegler, K., Bui, T., Frisque, R. J., Grandinetti, A., & Nerurkar, V. R. (2004). A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay. *J Virol Methods*, 122(1), 123-127.
- Zobel, T., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2003). The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8352-8362.
- Zou, N., Lin, B. Y., Duan, F., Lee, K. Y., Jin, G., Guan, 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(8), 3761-3770.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288(2), F55-78.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5), 342-350.

8 Annexes

Note : J'ai planifié et effectué toutes les expériences présentées dans cette section.

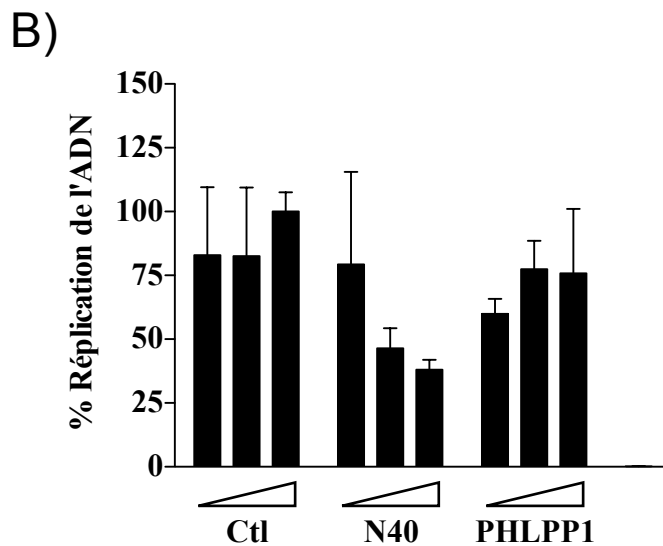
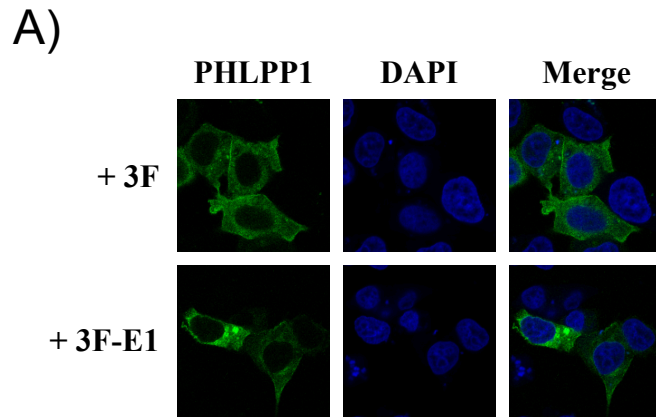
Dr Jacques Archambault a supervisé le projet et apporté des commentaires constructifs pour la réalisation et l'analyse des expériences

Annexe 1



PHLPP1 s'assemble sous forme d'un complexe ternaire avec UAF1 et USP46. A) CoIP de HA-PHLPP1 avec 3F-UAF1 et RFP-USP46. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides indiquées, récoltées 48 h post-transfection et les extraits cellulaires soumis à un immunoprécipitation par l'anticorps anti-HA. Le mutant de PHLPP1 possédant une délétion de son domaine C-terminal (Δ , aa 1-1106) ou la version catalytiquement inactive de USP46 (mut) ont été utilisés comme contrôle. Les immunoprécipités ont été analysés avec des anticorps contre RFP (pour USP46), Flag (pour UAF1) et HA (pour PHLPP1). On constate que l'interaction PHLPP1-USP46 est dépendante de UAF1, puisqu'elle est abolie par la délétion du domaine C-terminal de PHLPP1 impliqué dans la liaison à UAF1 ou en absence de UAF1 co-transfecté. De plus, l'activité catalytique de USP46 n'est pas requise pour l'interaction. B) CoIP séquentielle du complexe ternaire. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides encodant 3F-UAF1, HA-PHLPP1 et RFP-USP46, et récoltées 48 h post-transfection. En premier lieu, UAF1 a été immunoprécipité en utilisant un anticorps contre Flag, en présence ou en absence d'une solution bloquante contenant le peptide 3F comme contrôle de spécificité. Les immunoprécipités ont ensuite été élués par trois éluations successives avec le peptide 3F. Les éluats combinés ont ensuite été soumis à une deuxième immunoprécipitation en utilisant soit un anticorps contre HA (pour PHLPP1) ou contre RFP (USP46). Dans tous les cas où le peptide 3F a été omis, les trois protéines ont été retrouvées co-enrichies dans l'immunoprécipité final. Globalement, ces données suggèrent que UAF1, PHLPP1 et USP46 forment un complexe ternaire *in vivo*, une association qui requiert UAF1 comme protéine adaptatrice.

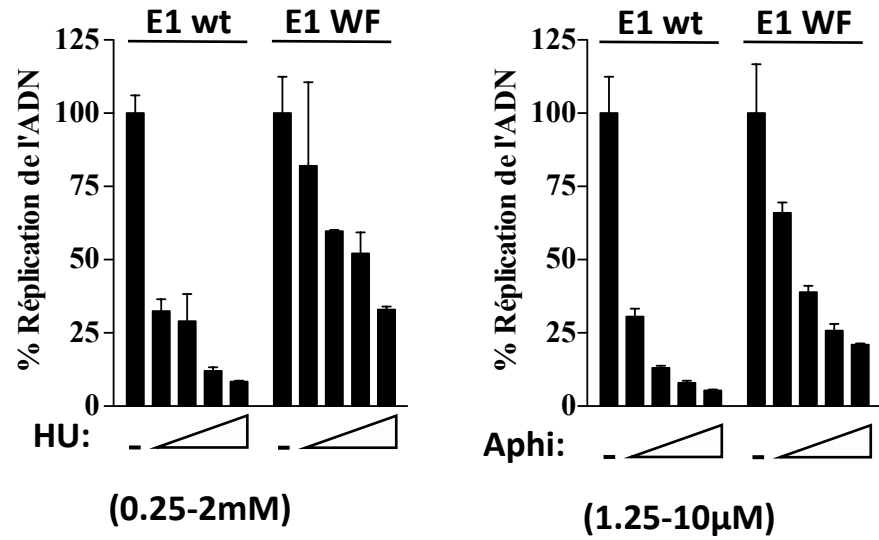
Annexe 2



PHLPP1 n'agit pas comme un facteur de restriction de la réplication de l'ADN viral.

A) Localisation subcellulaire de PHLPP1-GFP en présence (+3F-E1) ou en absence (+3F) de E1. Les noyaux sont colorés au DAPI. B) Effet de la surexpression d'un gradient d'un vecteur YFP (Ctl), du peptide N40 ou de la protéine PHLPP1 sur la réplication transitoire de l'ADN viral. Seule la surexpression de N40 induit une inhibition dose-dépendante de l'activité de réplication.

Annexe 3



Sensibilité de la réplication de l'ADN aux inhibiteurs de la fourche de réplication. Essai de réplication de l'ADN du VPH en présence d'un gradient d'hydroxyurée (HU) ou d'aphidicoline (Aphi). Les cellules ont été transfectées avec les vecteurs encodant E1, WT ou WF, et les plasmides encodant E2 et l'origine de réplication. L'activité de réplication est représentée sous la forme d'un pourcentage du signal obtenu en absence d'inhibiteur (-).

9 Curriculum Vitae

Academic training

Ph.D. in Biochemistry 2007 -

...

Université de Montréal - Laboratory of Dr. Jacques Archambault (IRCM)

B.Sc. in Biochemistry 2003-
2006

Université de Sherbrooke

Professionnal experiences

Administrator of the Bio-Rad Supply Center (IRCM) 2012-2013

École supérieure de biotechnologie de Strasbourg

▪ Internship in the laboratory of Dr. Gilles Travé fall 2010

Boehringer Ingelheim Canada Ltd.

▪ Internship in the laboratory of Dr. Lisette Lagacé summer 2006

▪ Internship in the laboratory of Mr. Steve Titolo fall 2005

Merck Frosst Canada

▪ Internship in the laboratory of Dr. Chidambaram Ramachandran winter 2005

Institut de pharmacologie de Sherbrooke (CHUS)

▪ Internship in the laboratory of Dr Richard Leduc summer 2004

Laboratory techniques

- Molecular biology: PCR, RT-qPCR, DNA and RNA handling, protein purification, CHIP
- Cellular biology: Cell culture (bacterias and eukaryotes), immunofluorescence and confocal microscopy, flow cytometry
- Anal. biochemistry: Fluorescence polarization, mass spectrometry (MALDI-TOF), fluorometry, luminometry, spectrophotometry, isotopic labelling, western blotting
- Chromatography: FPLC, HPLC, SDS-PAGE

Scholarships and awards

Scholarships – Ph.D.

- Université de Montréal – FES (Award for end of Ph.D. studies) september 1st – april 30, 2013
- CIHR (F. Banting et C. Best doctoral award) may 1st, 2009 - april 30, 2012
- FRSQ (International internship award) september 6 - december 5, 2010
- FRSQ (Scholarship for doctoral training) april 1st, 2009 (declined)
- U. de Montréal (Scholarship for the fast-track M.Sc. to Ph.D program) september 1st, 2008

Sholarships - M.Sc.

- CIHR (F. Banting et C. Best master's award) sept. 1st, 2008 – april 30, 2009
- FRSQ (Scholarship for master's training) april 1st, 2008 – august 31, 2008
- Université de Montréal - FES (Excellence scholarship) december 5, 2007

Scholarships - B.Sc.

- NSERC (Undergraduate student research award) mai 1st, 2006 – 31 august, 2006
- NSERC (Undergraduate student research award) january 1st, 2005 – april 30, 2005
- FRSQ (Scholarship – Introductory to health science research) may 1st, 2004 – august 31, 2004

Awards

- Simon-Pierre Noël Award (Award for oral presentation – Simon-Pierre Noël competition) March 2012
- Université de Montréal - Médecine (Award for poster – IRCM research day) June 2009
- Université de Sherbrooke (Mention of excellence) February 2007
- Faculty of medicine of l'Université de Sherbrooke (François Lamy Award) October 2006
- Scientific day, department of biochemistry of U. de Sherbrooke (1st prize - poster) Sept. 2006
- Fondation de l'Université de Sherbrooke (J.A. Bombardier Award) October 2004
- Université de Sherbrooke (Admission scholarship) Sept. 2003

Publications

Papers

Lehoux M and Archambault J. (**In preparation**). Artificial recruitment of UAF1 by a PHLPP1-E1 chimeric protein enhances human papillomavirus DNA replication. *J Virol*.

Lehoux M*, Gagnon D*, and Archambault J. (2014). E1-mediated recruitment of a p80/UAF1-USP deubiquitinase complex facilitates human papillomavirus DNA replication. *J Virol*.

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, Lussier-Price M, Omichinski JG, Archambault J. 2012. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by an E1-Derived p80/UAF1-binding Peptide. *J Virol*. 86 (7):3486-500.

Fradet-Turcotte A, Bergeron-Labrecque F, Moody CA, Lehoux M, Laimins LA, and Archambault J. 2011. Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-Phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *J. Virol*. 85(17) : 8996-9012.

Fradet-Turcotte A, Morin G, Lehoux M, Bullock PA, and Archambault J. 2010. Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology*. 399(1) : 65-76.

Lehoux M., D'Abramo C.M., and Archambault J. 2009. Molecular mechanisms of HPV-induced carcinogenesis (Review). *Public Health Genomics*. 12(5-6) : 268-280.

Côté-Martin A, Moody CA, Fradet-Turcotte A, D'abramo C, Lehoux M, Joubert S, Poirier G, Laimins LA, Coulombe B, and Archambault J. (2008) The Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with the WD Repeat Protein p80 to Promote Maintenance of the Viral Genome in Keratinocytes. *J. Virol.* 82(3) :1271-83.

Book chapters

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, and Archambault J. 2013. "Methods to assess the nucleocytoplasmic shuttling of the HPV E1 helicase and its effects on cellular proliferation and induction of a DNA damage response" in *Cervical cancer* vol. 1. Humana press. **In press.**

Conferences

Lehoux M, Gagnon D, and Archambault J. 2013. E1-mediated recruitment of a UAF1-USP12/46 deubiquitinase complex facilitates human papillomavirus DNA replication. *DNA Tumor Virus Meeting*, Birmingham, UK (July 22-27)

Lehoux M. 2013. p80/UAF1 : Rôle dans la réplication de l'ADN du virus du papillome humain et la prolifération cellulaire. *Symposium du dép. de biochimie de l'U. de Sherbrooke*, Sherbrooke, Canada (April 12). Sous invitation

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, Lussier-Price M, Omichinski JG, and Archambault J. 2012. Inhibition de la réplication de l'ADN du virus du papillome humain par un peptide dérivé de E1 contenant le site de liaison à p80/UAF1. *Rencontre Louis-Philippe-Bouthillier*. St-Adèle, Canada (May 11-12)

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, Lussier-Price M, Omichinski JG, and Archambault J. 2012. Inhibition de la réplication de l'ADN du virus du papillome humain par un peptide contenant le domaine de liaison de l'helicase virale E1 au facteur cellulaire p80/UAF1. *Concours Simon-Pierre Noël*, Montreal, Canada (March 8)

Lehoux M, Morin G, Fradet-Turcotte A, Di Lello P, Bergeron-Labrecque F, Omichinski JG, and Archambault J. 2011. The N-terminal region of HPV31 E1 contains an intrinsically disordered domain, encompassing a binding site for p80/UAF1, that is required for HPV DNA replication. *DNA Tumor Virus Meeting*, Trieste, Italy (July 19-24)

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, and Archambault J. 2010. Interaction of the HPV E1 helicase with the WD-repeat protein p80 is required for efficient viral DNA replication. *IIIèmes Journées Scientifiques de l'Association Francophone pour l'étude des Infections à Papillomavirus et Polyomavirus (AFIIP)*, Sedan, France (september 29-october 1)

Lehoux M, Fradet-Turcotte A, and Archambault J. 2010. Interaction of the HPV E1 helicase with the WD-repeat protein p80 is required for efficient viral DNA replication. *DNA Tumor Virus Meeting*, Madison, USA (July 13-18)

Lehoux M, and Archambault J. 2010. Interaction of the HPV E1 helicase with the WD-repeat protein p80 is required for efficient viral DNA replication. *27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop*. Montréal, Canada (July 3-8)

Lehoux M, and Archambault J. 2010. Interaction of the HPV E1 helicase with the WD-repeat protein p80 is required for efficient viral DNA replication. Journée de la recherche de l'IRCM, Montréal, Canada (May 31)

Lehoux M (on behalf of Archambault J). 2010. Molecular biology of human papillomaviruses and mechanisms of viral carcinogenesis. National Symposium on Infectious Agents & Cancer, Toronto, Canada (March 11-12)

Lehoux M, D'Abramo CM, Bouchard A, Coulombe B, and Archambault J. 2009. Human papillomavirus E1 helicase interacts with several deubiquitinating enzymes through the WD repeat protein P80. DNA Tumor Virus Meeting, Oxford, UK (July 14-19)

Posters

Fradet-Turcotte A, Moody CA, Bergeron-Labrecques F, Lehoux M, G, Laimins LA, Archambault J. 2011. Nuclear export of the human papillomavirus E1 helicase is required for viral genome maintenance and to alleviate the detrimental effect of E1 on cell cycle progression. ASM Conference on Viral Genome Replication, Banff, Canada (February 6-9)

Lehoux M, and Archambault J. 2010. Interaction of the HPV E1 helicase with the WD-repeat protein p80 is required for efficient viral DNA replication. Rencontre Louis-Philippe-Bouthillier. St-Adèle, Canada (May 7-8)

Lehoux M, D'abramo CM, Bouchard A, Coulombe B, and Archambault J. 2009. Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with Several Deubiquitinating Enzymes through the WD Repeat Protein P80. Présentation par affiche (26) Journée de la recherche de l'IRCM, Montréal, Canada (June 8)

Côté-Martin A, Moody CA, Fradet-Turcotte A, D'Abramo CM, Lehoux M, Joubert S, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, and Archambault J. 2008. Identification of the WD repeat protein p80 as a novel cellular target of the human papillomavirus E1 helicase. Présentation par affiche (6). 2nd IRCM Meeting on Systems biology: Molecular Networks, Montreal, Quebec, Canada (March 11-12)

Côté-Martin A, Moody CA, Fradet-Turcotte A, D'Abramo CM, Lehoux M, Joubert S, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, and Archambault J. 2008. Identification of the WD repeat protein p80 as a novel cellular target of the human papillomavirus E1 helicase. Présentation par affiche (51A). Manipulation of Nuclear Processes by DNA Viruses, Charleston, South Carolina, USA (March 2-5)

Lehoux M. 2006. Construction of a Luciferase Reporter HCV JFH1 Virus. Poster presentation. 2e journée scientifique du premier cycle universitaire de la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada (September)

Longpré J-M, Désilets A, Parenta A, Lehoux M, and Leduc R. 2005. Caractérisation de la spécificité protéolytique de la matriptase à l'aide de substrats fluorogéniques et inhibition de l'activité de la matriptase par des variants de l'eglin c. Présentation par affiche. Journée de la recherche 2005. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada