

Université de Montréal

**Identification du rôle et des modifications post-
traductionnelles modulant l'export nucléaire de l'hélicase
virale E1 au cours du cycle de réplication du virus du
papillome humain**

par

Amélie Fradet-Turcotte

Université de Montréal

Faculté de médecine

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

Avril, 2011

© Amélie Fradet-Turcotte, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Identification du rôle et des modifications post-traductionnelles modulant l'export nucléaire
de l'hélicase virale E1 au cours du cycle de réplication du virus du papillome humain

Présentée par :
Amélie Fradet-Turcotte

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Léa Brakier-Gingras, président-rapporteur
Dr Jacques Archambault, directeur de recherche
Dr Éric Lécuyer, membre du jury
Dr Martin Bisailon, examinateur externe
Dr André Tremblay, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les virus du papillome humain (VPH) sont de petits virus à ADN double brin infectant les épithéliums de la peau et des muqueuses. La réplication nécessaire au maintien de leur génome dans les cellules infectées dépend des protéines virales E1 et E2. Au cours de la réplication, E1 est recrutée à l'origine de réplication par E2 afin d'être assemblée en doubles hexamères capables de dérouler l'ADN. E1 contient un domaine C-terminal responsable de l'activité ATPase/hélicase, un domaine central de liaison à l'origine et une région N-terminale régulant la réplication *in vivo*. Cette région contient des signaux de localisation et d'export nucléaire qui modulent le transport intracellulaire de E1. Chez le virus du papillome bovin (VPB), il a été proposé que ce transport est régulé par la sumoylation de E1. Finalement, la région N-terminale de E1 contient un motif de liaison aux cyclines permettant son interaction avec la cycline E/A-Cdk2. La phosphorylation de E1 par cette dernière régule différemment l'export nucléaire des protéines E1 du VPB et du VPH.

Dans la première partie de cette étude, nous avons démontré que bien que la protéine E1 des VPH interagisse avec Ubc9, l'enzyme de conjugaison de la voie de sumoylation, cette voie n'est pas requise pour son accumulation au noyau. **Dans la seconde partie**, nous avons déterminé que l'accumulation nucléaire de E1 est plutôt régulée pas sa phosphorylation. En fait, nous avons démontré que l'export nucléaire de E1 est inhibé par la phosphorylation de sérines conservées de la région N-terminale de E1 par Cdk2. Puis, nous avons établi que l'export nucléaire de E1 n'est pas nécessaire à l'amplification du génome dans les kératinocytes différenciés mais qu'il est requis pour le maintien du génome dans les kératinocytes non différenciés. En particulier, nous avons découvert que l'accumulation nucléaire de E1 inhibe la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase S et que cet effet anti-prolifératif est contrecarré par l'export de E1 au cytoplasme. **Dans la troisième partie** de cette étude, nous avons démontré que l'arrêt cellulaire induit par E1 dépend de sa liaison à l'ADN et à l'ATP, et qu'il est accompagné par l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de

ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*). Ces deux événements semblent toutefois distincts puisque la formation d'un complexe E1-E2 réduit l'activation de la voie de réponse aux dommages par E1 sans toutefois prévenir l'arrêt de cycle cellulaire. Finalement, nous avons démontré que la réplication transitoire de l'ADN viral peut avoir lieu dans des cellules arrêtées en phase S, indépendamment de l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et de la kinase ATM.

Globalement, nos résultats démontrent que l'export nucléaire de E1 est régulé par sa phosphorylation et non par sa sumoylation. Ils démontrent également que l'export nucléaire de E1 est essentiel au maintien du génome dans les kératinocytes, possiblement parce qu'il prévient l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN en limitant l'accumulation de E1 au noyau.

Mots-clés : Papillomavirus, hélicase E1, sumoylation, phosphorylation, export nucléaire, réplication de l'ADN, arrêt en phase S, réponse aux dommages à l'ADN

Abstract

Human papillomaviruses (HPV) are small double-stranded DNA viruses that infect the differentiating epithelium of the skin and the mucosa. HPV rely on two viral proteins, E1 and E2, to replicate and maintain their genome in the nucleus of infected cells. During replication, the E1 helicase is recruited to the origin of replication by E2 and is assembled into a double-hexamer that unwinds DNA ahead of the replication fork. E1 is comprised of a C-terminal enzymatic domain with ATPase/helicase activity, a central origin-binding domain and a N-terminal regulatory region that is required for viral DNA replication *in vivo*. The latter region of E1 contains a nuclear localization signal and a nuclear export signal that regulate its shuttling between the nucleus and cytoplasm. For bovine papillomavirus (BPV) E1, this shuttling was suggested to be controlled by the sumoylation of E1. In addition to the NES and NLS, the N-terminal region of E1 contains a conserved cyclin-binding motif that is required for the interaction of E1 with cyclin E/A-Cdk2. Cdk2 phosphorylation of E1 has been reported to control the nuclear export of E1 from BPV and HPV, albeit differently.

In the first part of this study, we showed that although HPV E1 interacts with Ubc9, the conjugating enzyme of the sumoylation pathway, this pathway is not required for its accumulation in the nucleus. **In the second part**, we found that the nuclear accumulation of E1 is, instead, regulated by phosphorylation. Specifically, we found that Cdk2-dependent phosphorylation of conserved serines in the E1 N-terminal region inhibits the nuclear export of HPV E1. Furthermore, we reported that nuclear export is not essential to amplify the viral genome in differentiating keratinocytes but that it is required for its long-term maintenance in undifferentiated keratinocytes. Importantly, we found that the nuclear accumulation of E1 induces a S-phase arrest that is detrimental to cellular proliferation and that this anti-proliferative effect can be counteracted by the export of E1 from the nucleus to the cytoplasm. **In the last part** of this study, we showed that this arrest is dependent on the DNA- and ATP-binding activities of E1. Furthermore, we found that the cell cycle arrest induced by E1 is accompanied by the activation of a DNA damage

response (DDR) dependent on the ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) pathway. However, these two events seem to be distinct since complex formation with E2 reduces the ability of E1 to induce a DDR but does not prevent cell cycle arrest. Importantly, we demonstrated that transient viral DNA replication still occurs in S-phase arrested cells, independently of the induction of a DDR and of the ATM kinase.

Collectively, these data indicate that nuclear export of E1 is regulated by phosphorylation and not by sumoylation. They also revealed that nuclear export of E1 is essential for maintenance of the viral episome in keratinocytes, at least in part to limit its nuclear accumulation and prevent its detrimental effect on cellular proliferation and induction of a DDR.

Keywords : Papillomavirus, helicase E1, sumoylation, phosphorylation, nuclear export, DNA replication, S-phase arrest, DNA damage response

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations en français.....	xviii
Liste des abréviations en anglais	xix
Remerciements	xxiii
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Généralités sur les papillomavirus.....	1
1.1.1 Cycle viral.....	1
1.1.1.1 Attachement, entrée et motilité intracellulaire.....	3
1.1.1.2 Établissement, maintien et amplification de l'épisome viral.....	5
1.1.1.3 Assemblage de la capsid, encapsidation du génome et relâche de nouveaux virions.....	7
1.1.2 Virus : Organisation génomique et protéines virales.....	8
1.1.2.1 Organisation du génome	8
1.1.2.1.1 Longue région de contrôle	12
1.1.2.2 Protéines précoces	15
1.1.2.2.1 Protéine E1	15
1.1.2.2.2 Protéine E2	15
1.1.2.2.3 Protéine E8^E2C	17
1.1.2.2.4 Protéine E7	18
1.1.2.2.5 Protéine E6	21
1.1.2.2.6 Protéine E1^E4	24
1.1.2.2.7 Protéine E5	26
1.1.2.3 Protéines tardives.....	28

1.1.2.3.1 Protéine L1	28
1.1.2.3.2 Protéine L2	29
1.1.3 Classification	30
1.2 Virus du papillome humain	31
1.2.1 Pathologies associées aux VPH anogénitaux.	32
1.2.1.1 VPH à bas risque oncogénique	33
1.2.1.2 VPH à haut risque oncogénique	34
1.2.2. Traitements des pathologies associées à l'infection par le VPH	40
1.2.2.1 Traitement des verrues génitales et des lésions précancéreuses	40
1.2.2.2 Vaccins prophylactiques	41
1.2.2.3 Vaccins thérapeutiques	44
1.2.2.4 Petites molécules inhibitrices	44
1.3 Modèles d'étude de la réplication du génome viral.....	47
1.3.1 Modèles animaux.....	47
1.3.2 Modèles cellulaires.....	48
1.3.2.1 Maintien et amplification.....	48
1.3.2.2 Réplication transitoire.....	50
1.3.3 Modèle <i>in vitro</i>	51
1.4 Réplication de l'ADN viral ; fonctions de la protéine E1 des VPH.....	52
1.4.1 Assemblage du double hexamère de E1 sur l'ADN	54
1.4.1.1. Reconnaissance de l'origine de réplication	56
1.4.1.1.1 Rôle de E2	57
1.4.1.1.2 Liaison de E1 à l'ADN	61
1.4.1.1.2.1 Interactions spécifiques	61
1.4.1.1.2.2 Interactions non spécifiques	67
1.4.1.1.2.3 Influence de la région N-terminale.....	69
1.4.1.2 Assemblage du double hexamère	70
1.4.1.3. Déroulement de l'ADN.....	72
1.4.2 Régulation de la réplication de l'ADN viral.....	78

1.4.2.1 Interaction de E1 avec des protéines cellulaires	78
1.4.2.1.1 Protéines du réplisome.....	78
1.4.2.1.1.1 Polymérase α -primase	80
1.4.2.1.1.2 RPA	80
1.4.2.1.1.3 Topoisomérase I	81
1.4.2.1.2 p80	81
1.4.2.1.3 p56	83
1.4.2.1.4 Hsp40 et Hsp70	84
1.4.2.1.5 hSNF5 et H1	85
1.4.2.1.6 E1-BP.....	86
1.4.2.2 Clivage d'une portion de la région N-terminale de E1 par les caspases-3 et -7	86
1.4.2.3 Conservation d'une hélice amphipathique dans la région N-terminale de E1	87
1.4.2.4 Motif de localisation et d'export nucléaire de E1.....	88
1.4.2.5 Modifications post-traductionnelles de E1	93
1.4.2.5.1 Phosphorylation de E1 par les complexes Cycline/Cdk.....	93
1.4.2.5.2 Phosphorylation de E1 par d'autres kinases	100
1.4.2.5.2.1 MAPK.....	100
1.4.2.5.2.2 CK2.....	101
1.4.2.5.3 Sumoylation de E1 par Ubc9.....	102
1.4.2.5.4 Ubiquitination de E1	105
1.5 Réplication de l'épisome à travers le cycle viral	106
1.5.1 Mode de réplication de l'ADN spécifique à chaque phase du cycle viral.....	107
1.5.1.1 Établissement.....	107
1.5.1.2 Maintien.....	108
1.5.1.3 Amplification.....	109
1.5.2 Modes de réplication de l'ADN du VPH.....	110
1.5.2.1 Réplication : ordonnée vs aléatoire.....	110

1.5.2.2 Bidirectionnelle vs unidirectionnelle.....	111
1.5.3 Rôle de la voie de réponse aux dommages à l'ADN au cours de la réplication de l'ADN viral.....	113
1.5.3.1 Mécanisme d'activation des réponses aux dommages à l'ADN	114
1.5.3.2 Activation d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM au cours du cycle viral	117
1.6 But du projet de recherche.....	119
Chapitre 2 - Caractérisation de mutants de l'hélicase E1 des papillomavirus incapables d'interagir avec l'enzyme de conjugaison de SUMO, Ubc9	120
2.1 Mise en contexte de l'article.....	121
2.2 Contribution des auteurs.....	121
2.3 Texte de l'article.....	122
2.3.1 Abstract.....	122
2.3.2 Introduction	122
2.3.3 Results and discussion.....	125
2.3.3.1 HPV11 E1 binds to human Ubc9 in vitro through a region required for its oligomerization.....	125
2.3.3.2 HPV11 E1 interacts with human Ubc9 in the yeast two-hybrid system...	127
2.3.3.3 Effect of single amino acid substitutions in HPV11 E1 on its interaction with Ubc9 in vitro and in yeast.....	129
2.3.3.4 Nuclear accumulation of HPV11 E1 is not affected by substitutions that weaken Ubc9 binding and by inhibition of the SUMO pathway.....	132
2.3.3.5 Mutant HPV16 E1 proteins that are defective for interaction with Ubc9 also localize to the nucleus.....	137
2.3.3.6 The S330R substitution in the HPV16 E1 OBD reduces its affinity for DNA.....	139
2.3.3.7 Nuclear accumulation of BPV E1 is independent of the SUMO pathway and of lysine 514 in C33A cells.....	141

2.3.3.8 Lysine 559 in HPV11 E1 is not essential for transient HPV DNA replication	144
2.3.4 Concluding remarks.....	146
2.3.5 Materials and methods.....	149
2.3.6 Acknowledgements	152
2.3.7 References	152
2.3.8 Supplementary data	160
2.3.8.1 Supplementary materials and methods	165
Chapitre 3 - L'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31 est régulé par Cdk2 et est requis pour le maintien du génome viral	166
3.1 Mise en contexte de l'article.....	167
3.2 Contribution des auteurs.....	167
3.3 Texte de l'article.....	168
3.3.1 Abstract.....	168
3.3.2 Introduction	168
3.3.3 Materials and methods.....	171
3.3.4 Results	175
3.3.4.1 A conserved CBM in HPV31 E1 inhibits its CRM1-dependent nuclear export.....	177
3.3.4.2 Serines 92 and 106 of HPV31 E1 are essential for its nuclear accumulation.	181
3.3.4.3 Evidence that HPV31 E1 is phosphorylated on serines 92 and 106 by Cdk2.	184
3.3.4.4 Cytoplasmic E1 mutants can be relocalized to the nucleus by E2 and are able to support transient viral DNA replication.....	186
3.3.4.5 Nuclear export of HPV31 E1 is inhibited by phosphomimetic substitution of S92 and S106 and is dispensable for transient viral DNA replication.	189
3.3.4.6 Nuclear export of HPV31 E1 is required for viral genome maintenance in HFKs.....	192

3.3.4.7 E1 interferes with cell cycle progression.....	194
3.3.4.8 Nuclear export of E1 alleviates its detrimental effect on S-phase progression.....	198
3.3.5 Discussion.....	201
3.3.6 Acknowledgments	205
3.3.7 References	206
Chapitre 4 - L'accumulation nucléaire de la protéine E1 des papillomavirus bloque la progression de la phase S et active une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM	215
4.1 Mise en contexte de l'article.....	216
4.2 Contribution des auteurs.....	216
4.3 Texte de l'article.....	218
4.3.1 Abstract.....	218
4.3.2 Introduction	218
4.3.3 Materials and methods.....	221
4.3.4 Results	226
4.3.4.1 The ability to arrest S-phase progression is a conserved feature of papillomavirus E1.....	226
4.3.4.2 The origin-binding and helicase domains of E1 are necessary and sufficient to inhibit cellular proliferation.....	229
4.3.4.3 The origin-binding and ATPase activities of E1 are required for arresting S-phase progression.....	231
4.3.4.4 E1 inhibits the proliferation of different cell lines.....	236
4.3.4.5 E1 arrests cells in early S-phase.	238
4.3.4.6 E1 induces a DNA damage response and activates the ATM pathway....	241
4.3.4.7 γ H2AX foci are induced in cells containing low levels of nuclear E1.....	244
4.3.4.8 The E1-induced DDR is attenuated by E2.....	246
4.3.4.9 Cells expressing E1 and E2 are arrested in very early S-phase.....	249

4.3.4.10 Transient HPV DNA replication neither requires nor is affected by a DDR.....	252
4.3.4.11 Keratinocytes expressing an NES-defective E1 mutant genome show increased levels of γ H2AX.....	255
4.3.5 Discussion.....	256
4.3.5.1 Induction of a cell cycle arrest and activation of a DDR by E1.....	257
4.3.5.2 Possible mechanisms by which E1 blocks cell cycle progression.....	259
4.3.5.3 Possible mechanisms by which E1 induces a DDR.....	259
4.3.5.4 Activation of an ATM-dependent DDR is not required for the replication activity of E1.....	260
4.3.6 Acknowledgements	262
4.3.7 References	263
4.3.8 Supplementary data	275
Chapitre 5 - Discussion.....	285
5.1. Régulation de l'export de E1 au cytoplasme.....	286
5.1.1 Sumoylation.....	286
5.1.1.1 Transport nucléo-cytoplasmique de E1	286
5.1.1.2 Interaction de E1 avec Ubc9.....	288
5.1.2 Phosphorylation.....	289
5.1.2.1 Phosphorylation de sérines localisées dans la région N-terminale de E1.....	289
5.1.2.2 Phosphorylation d'une thréonine localisée dans l'OBD de E1.....	291
5.2 L'export nucléaire prévient les fonctions anti-prolifératives de E1	294
Chapitre 6 - Conclusions et perspectives.....	298
6.1 Interaction de E1 avec Ubc9.....	298
6.2 Transport intracellulaire	300
6.3 Arrêt de la progression du cycle cellulaire et activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM	302
Bibliographie	305

Annexe 1 - Alignement du module de transport de la protéine E1 de différents papillomavirus	I
Annexe 2 - Tableau de tous les mutants de E1 présentés dans la thèse	III
Annexe 3 - Rôle de la région N-terminale dans la liaison de E1 à l'ADN.....	XII
Annexe 4 - Rôle de l'acide amine T316 dans l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31	XVI
Annexe 5 - Développement d'un essai quantitatif et à haut-débit de la replication de l'ADN des papillomavirus et des polyomavirus.....	XXVIII
Annexe 6 - Revue de littérature sur le développement d'agents antiviraux contre le virus du papillome humain	XLII

Liste des tableaux

Table 3.1. Intracellular localization of EYFP-31E1 proteins	180
Table 3.2. Intracellular localization of EYFP-31E1 proteins in the presence of WT or E39Q E2.....	188
Table 3.3. Cell cycle distribution of EYFP-expressing cells.....	197
Table 4.1. Cell cycle distribution of GFP- and EYFP-expressing C33A cells.....	234
Table 4.2. Cell cycle distribution of GFP- and EYFP-expressing C33A cells released from mimosine blocks.....	235
Table 4.3. Cell cycle distribution of EYFP-expressing C33A, HeLa and U2OS cells	238
Supplementary Table 4.1. Activation of γ H2AX by E1 from different papillomaviruses.	284

Liste des figures

Figure 1.1. Cycle de réplication du papillomavirus (PV).....	2
Figure 1.2. Arrangement des gènes viraux et des sites de liaison spécifique de la longue région de contrôle (LCR) dans l'épisome du VPH 31.....	9
Figure 1.3. Transcrits exprimés à partir du génome du VPH 31.....	11
Figure 1.4. Fonctions principales des oncogènes viraux E6 et E7.....	23
Figure 1.5. Morphologie de l'épithélium associée aux différents stades de progression de la carcinogénicité du virus du papillome humain.....	37
Figure 1.6. Modèle d'assemblage et de régulation du complexe de réplication de l'ADN des eucaryotes.....	54
Figure 1.7. Représentation schématique de la protéine E1 du VPH 31.....	55
Figure 1.8. Assemblage du double hexamère de E1 à l'origine de réplication.....	60
Figure 1.9. Structures intermédiaires de l'assemblage du double hexamère de E1.....	63
Figure 1.10. Essai de liaison à l'ADN basé sur la polarisation de la fluorescence.....	66
Figure 1.11. Structure du domaine hélicase de la protéine E1.....	77
Figure 1.12. Progression de la fourche de réplication au cours de l'élongation de l'ADN chez les eucaryotes.....	79
Figure. 1.13. Contrôle du transport nucléo-cytoplasmique chez les eucaryotes.....	90
Figure 1.14. Séquence modulant la localisation nucléaire des VPH à haut et à bas risque oncogénique.....	92
Figure 1.15. Contrôle de la progression du cycle cellulaire par la formation de complexes cycline/Cdk spécifiques.....	95
Figure 1.16. Sites présomptifs de phosphorylation par les complexes cycline E-A/Cdk2 à travers le VPH et le VPB.....	98
Figure 1.17. Voie de sumoylation chez les eucaryotes.....	103
Figure 1.18. Réplication bidirectionnelle et unidirectionnelle de l'ADN viral.....	112
Figure 1.19. Activation de ATM et ATR et de leurs effecteurs.....	115
Figure 2.1. Interaction of HPV11 E1 with Ubc9 in vitro.....	126

Figure 2.2. Interaction of HPV11 E1 with Ubc9 in the yeast two-hybrid system.....	128
Figure 2.3. Amino acid substitutions affecting the interaction of HPV11 E1 with Ubc9..	131
Figure 2.4. Intracellular localization of wild-type and mutant HPV11 E1.....	135
Figure 2.5. Effect of the Gam1 protein on PML sumoylation and intracellular localization of PML and HPV11 E1.	136
Figure 2.6. Intracellular localization of wild-type and mutant HPV16 E1.....	138
Figure 2.7. Effect of the S330R and S331R substitutions on the DNA-binding activity of the HPV16 and HPV11 E1 OBD, respectively.	141
Figure 2.8. K559 and K514 are not essential for the intracellular localization of HPV11 and BPV E1, respectively, in C33A cells.....	143
Figure 2.9. K559 is not essential for the replication activity of HPV11 E1.....	145
Supplementary Figure 2.1. Expression of Gal4-DBD fusion proteins in yeast.....	160
Supplementary Figure 2.2. Expression of GFP fusion proteins used in this study.	161
Supplementary Figure 2.3. Effect of a dominant negative Ubc9 on PML sumoylation and intracellular localization in C33A cells.	162
Supplementary Figure 2.4. Effect of shRNA-mediated depletion of Ubc9 on PML localization in C33A cells.....	163
Supplementary Figure 2.5. Sumoylation of HPV11 E1, BPV E1 and PML in C33A cells.	164
Figure 3.1. Mutation of the major donor splicing site in the HPV31 E1 open reading frame increases expression of full-length EYFP-31E1.....	176
Figure 3.2. Nuclear export of HPV31 E1 is regulated by Cdk2 activity.....	179
Figure 3.3. Serines 92 and 106 of HPV31 E1 are essential for its nuclear accumulation..	183
Figure 3.4. Evidence that HPV31 E1 is phosphorylated on serines 92 and 106 by Cdk2..	185
Figure 3.5. Cytoplasmic E1 proteins are relocalized to the nucleus by E2 and are able to support transient viral DNA replication.	187
Figure 3.6. Nuclear export of HPV31 E1 is inhibited by phosphomimetic substitution of S92 and S106 and is dispensable for transient viral DNA replication.	191
Figure 3.7. Nuclear export of HPV31 E1 is required for genome maintenance in HFKs..	194

Figure 3.8. HPV31 E1 impairs cell cycle progression in S-phase.....	195
Figure 3.9. Nuclear export of E1 alleviates its detrimental effect on S-phase progression.	200
Figure 3.10. Sequence alignment of the E1 N-terminal regions from different HPV types.	202
Figure 4.1. E1 from different papillomavirus types inhibit cellular proliferation.....	228
Figure 4.2. The OBD and ATPase/helicase domain of E1 are both required for its antiproliferative activity.	231
Figure 4.3. Point mutations in the origin-binding and ATPase domains of E1 abolish its anti-proliferative activity.	234
Figure 4.4. E1 inhibits cellular proliferation in p53-positive and -negative cell lines.	237
Figure 4.5. E1 arrests cell cycle progression in early S-phase.	240
Figure 4.6. Expression of E1 induces a DNA damage response and activates the ATM pathway.....	244
Figure 4.7. γ H2AX staining is punctuated in cells that accumulate low levels of E1 in their nucleus.....	246
Figure 4.8. E2 and the viral origin reduce the E1-induced DDR.	249
Figure 4.9. E2 and the viral origin modulate the cell cycle arrest induced by E1.....	251
Figure 4.10. Effect of increasing amounts of E2 and the origin on E1-catalyzed DNA replication.	254
Figure 4.11. γ H2AX activation in keratinocytes immortalized with a wild type or E1 NES mutant genome.	256
Supplementary Figure 4.1. Nuclear accumulation and expression levels of E1 fragments.	275
Supplementary Figure 4.2. The anti-proliferative activity of HPV16 E1 is abolished by mutation of its ATPase domain.	276
Supplementary Figure 4.3. The ability of E1 to induce a DDR is conserved in HPV31, -16, -11 and BPV E1 and independent of E6, E7 and p53.....	277

Supplementary Figure 4.4. Increased expression of E1 over time correlates with an increased activation of γ H2AX.....	278
Supplementary Figure 4.5. Activation of γ H2AX by E1 requires both its origin-binding and ATPase activities.....	279
Supplementary Figure 4.6. E1 does not activate Chk1.....	280
Supplementary Figure 4.7. E2 and the viral origin do not affect the progression of the cell cycle.....	281
Supplementary Figure 4.8. SV40 Large T antigen does not inhibit cellular proliferation and induces only low-levels of γ H2AX.	282
Supplementary Figure 4.9. E1 inhibits the proliferation of ATM-deficient cells.	283
Figure 5.1. L'inhibition de la voie de sumoylation par Gam1 n'affecte pas l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 11 dans les C33A.....	287
Figure 6.1. Modèle des rôles potentiels de l'interaction de E1 avec Ubc9.	299
Figure 6.2. Contrôle du transport nucléo-cytoplasmique de E1.....	301
Figure 6.3. Modèle du rôle de l'accumulation nucléaire de E1 dans la réplication virale.	303

Liste des abréviations en français

ADN: Acide désoxyribonucléique
ADN pol α : ADN polymérase α -primase
ADN pol δ : ADN polymérase δ
ADN pol ε : ADN polymérase ε
ARN: Acide ribonucléique
ARNt : ARN de transfert
AgT : Antigène grand T (traduit de LTA)
ARNm: ARN messenger
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
EV : Épidermodysplasie verruciforme
GST : Glutathion-S-transférase
HA : Hélice amphipatique (traduit de AH)
ITS : Infection transmise sexuellement
PAp : Site de polyadénylation précoce
PAt : Site de polyadénylation tardif
Pap: Test de Papanicolaou
pb : Paires de bases (longueur d'acide nucléique)
pRb : Protéine du retinoblastome
PV : Papillomavirus
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine (traduis de HIV)
VPB : Virus du papillome bovin (traduit de HPV)
VPH : Virus du papillome humain (traduit de BPV)
VHS : Virus de l'herpes simplex (traduit de HSV)

Liste des abréviations en anglais

AH : Amphipatic Helix
APC : Anaphase-Promoting Complex
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : ATM and Rad3-Related
BPV : Bovine Papillomavirus
Brd4 : BRomoDomain-containing protein 4
CBM : Cyclin-Binding Motif
CDC : Center for Disease Control
CDH6 : ChromoDomain Helicase 6
Cdk : Cyclin-Dependant Kinase
CFS : Common Fragile Site
CIN : Cervical Intra-epithelial Neoplasia
CK2 : Casein-Kinase 2
CKI : CdK Inhibitor
CRPV : Cottontail Rabbit PapillomaVirus
C-terminal : Carboxy-terminal
DBD : DNA-Binding Domain
DDR : DNA Damage Response
E1BP : E1-Binding Protein
E1BS : E1-Binding Site
E2BS : E2-Binding Site
E6-AP : E6-Associated Protein
E. coli : Escherichia coli
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
HDAC : Histone DeACetylases
HFK : Human Foreskin Keratiocytes

HLA : Human Leukocyte Antigen
HPV : Human PapillomaVirus
HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan
HSV : Herpes Simplex Virus
IDD : Intrinsically Disorder Domain
IARC : International Agency for Research on Cancer
LCR : Long Control Region
LEEP : Loop Electrosurgical Excision Procedure
LLETZ : Large Loop Excision of the Transformation Zone
LTA : Latge T Antigen
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAR : Matrix Nuclear Attachment
MME : Minichromosome Maintenance Element
MRN : MRE11-RAD50-NBS1
NES : Nuclear Export Signal
NCI : National Cancer Institute
ND10 : Nuclear Domain 10
NLS : Nuclear Localization Signal
N-terminal : Amino-terminal
OBD : Origin-Binding Domain
ORF : Open Reading Frame
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDZ : PSD95/Dlg/ZO-1
PML : ProMyelocytic Leukemia
POD : Promyelocytic leukemia Oncogenic Domains
qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFC : Replication Factor C

RPA : Replication Protein A

SF3 : SuperFamily 3

SIL: Squamous Intra-epithelial Lesion

SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier

SV40: Simian Virus 40

TAD : TransActivation Domain

TBP : TATA-Binding Protein

TERT : TElomerase Reverse Transcriptase

TLR : Toll-Like Receptor

TNF1 : Tumor-Necrosis Factor 1

TRIP13 : Thyroid hormone Receptor Interactor Protein 13

VLP : Virus-Like Particles

*La science ne sert guère qu'à nous donner
une idée de l'étendue de notre ignorance
(Félicité de Lamennais, 1782-1854)*

Remerciements

L'obtention d'un doctorat est une aventure personnelle, cependant celle-ci requiert le support d'un grand nombre de personnes. J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, D^r Jacques Archambault, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir partagé sa passion pour la science. Je le remercie également pour son soutien moral et scientifique. Merci de m'avoir rassuré dans les moments difficiles et de m'avoir poussé dans le dos dans les moments de relâchement. Je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux scientifiques dans plusieurs endroits fantastiques, et ce, même si je n'avais pas de bourse de voyage. De plus, je le remercie de la confiance scientifique qu'il m'a accordée en me demandant de collaborer à la révision d'articles scientifiques ainsi qu'à la rédaction de demandes de fond.

J'aimerais remercier les membres de mon jury, D^r Léa Brakier-Gingras, D^r Martin Bisailon, D^r Éric Lécuyer et D^r André Tremblay pour l'évaluation de ma thèse. De plus, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, D^r Benoit Coulombe et D^r Nikolaus Heveker, pour les critiques, conseils et encouragements qu'ils m'ont donnés tout au long de mes études.

Je tiens ensuite à remercier mes collègues de laboratoire, anciens et actuels, pour leurs conseils scientifiques, leur soutien moral ainsi que pour leur amitié. Plus particulièrement, je tiens à remercier Michaël Lehoux, Hélène Sénéchal, Alexandra Côté-Martin, D^r Claudia d'Abramo, Geneviève Morin et D^r Simon Joubert. La vie à l'IRCM n'aurait pas été aussi fantastique sans vous ! J'aimerais tout spécialement remercier Michaël Lehoux, Geneviève Morin et Fanny Bergeron-Labrecque pour leurs contributions scientifiques et morales au cours des projets présentés au chapitre 4 et à l'annexe 5, ainsi que Michaël et Fanny pour la lecture et la critique de ma thèse. Je remercie le D^r Jimmy Dikeakos pour ses conseils et ses encouragements, et ce, même à distance. Je tiens également à remercier D^r Peter Bullock de Tufts University à Boston, D^r Cary Moody de

North Carolina University à Chapel Hill et D^r Laimonis A. Laimins de Northwestern University à Chicago, avec qui j'ai eu l'honneur de collaborer et qui ont grandement contribué à la réalisation de plusieurs projets, présentés ou non, dans cette thèse. Finalement, je tiens à mentionner que l'obtention de mon doctorat aurait été beaucoup plus ardue en l'absence des personnes incroyables qui s'occupent des plateaux technologiques de l'IRCM : Éric Massicote (Cytofluorométrie), D^r Dominic Filion (Microscopie), D^r Odiles Neyret (Séquençage), ainsi que de Richard Cimon (Équipements spécialisés).

L'obtention d'un doctorat demande aussi un grand support personnel. Ainsi, j'aimerais remercier mon conjoint, Bruno Sauriol, pour son amour, sa compréhension et son support inconditionnel durant les six dernières années. De plus, je ne saurais passer sous silence le support incroyable que j'ai reçu de mes parents, Carole Fradet et Gilles Turcotte, ainsi que de mes beaux-parents, Louise Paquette et Denis Sauriol, tout au long de cette aventure. Je les remercie d'avoir compris mes nombreuses absences et d'avoir été présents pour partager mes joies et mes angoisses. Finalement, j'aimerais remercier mes amis, Michaël Lehoux, Marie-Line Goulet, Marceline Côté, Alexandre Mercier, Audrey Parent, Manishha Patel et Alexandre Orthwein, pour leur soutien moral. Merci pour les merveilleux moments que j'ai passé avec vous et pour ceux qui viendront. Merci de m'avoir écouté et conseillé !

Finalement, j'aimerais remercier le Fond de la Recherche Scientifique du Québec (FRSQ) pour la bourse de trois ans qu'ils m'ont octroyé au cours de mon doctorat.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Généralités sur les papillomavirus

Les papillomavirus (PV) sont de petits virus non enveloppés à ADN double brin qui appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* (Fauquet et al., 2005; Van Regenmortel et al., 2002). D'un point de vue étymologique, les racines latines du mot papillomavirus sont « papilla », qui fait référence à pustule ou bouton, « oma » et « virus », qui réfèrent respectivement à tumeur et poison. Bien que chaque PV soit spécifique à une espèce donnée, tous ont un tropisme pour les kératinocytes, c'est-à-dire les cellules qui composent les épithéliums stratifiés de la peau et des muqueuses. Le déroulement du cycle viral des PV est intimement relié au programme de différenciation de ces kératinocytes au sein de l'épiderme. Au cours de l'infection, les oncogènes viraux induisent une hyperprolifération cellulaire qui est nécessaire à la progression du cycle viral et qui se traduit par l'apparition de lésions dans les couches supérieures de l'épithélium. Lorsque cette hyperprolifération devient incontrôlée, il y a apparition de lésions précancéreuses pouvant mener au développement de cancers tels que le cancer du col de l'utérus.

1.1.1 Cycle viral

Afin d'établir une infection dans l'épiderme de l'hôte, le PV doit d'abord entrer dans la cellule, puis atteindre le noyau pour y répliquer son génome. De façon générale, le génome des PV est établi et maintenu dans les kératinocytes de la couche basale de l'épithélium, tandis que l'expression des oncogènes viraux permet l'amplification du génome viral ainsi que l'expression des gènes tardifs nécessaires à l'assemblage de nouveaux virions dans les kératinocytes en différenciation des couches supérieures (Fig. 1.1). Puisque les PV ne sont pas des virus lytiques, les nouveaux virus sont relâchés au cours de la desquamation naturelle des kératinocytes infectés. Les mécanismes généraux du cycle viral sont abordés dans cette section.

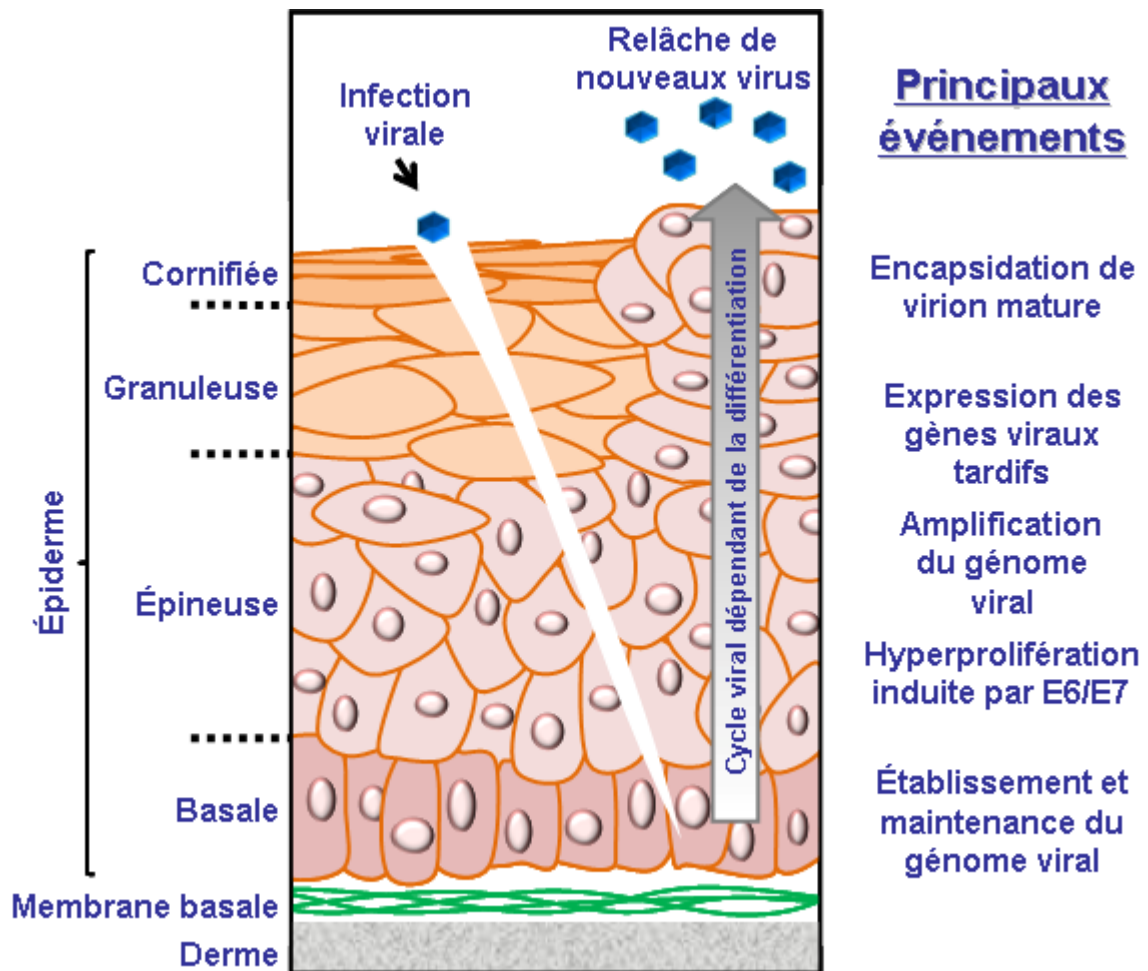


Figure 1.1. Cycle de répllication du papillomavirus (PV).

Représentation schématique du cycle de répllication du papillomavirus à l'intérieur d'un épithélium cutané en différenciation. La section de gauche représente un épithélium normal tandis que la section de droite représente un épithélium infecté par le PV. Les différentes couches de l'épiderme sont identifiées à la gauche de la figure tandis que les événements principaux du cycle du PV sont indiqués à la droite de la figure, vis-à-vis de la couche cellulaire dans laquelle l'événement a lieu. Cette figure a été adaptée à partir de Lehoux et al. (2009) *Public Health Genomics* (Lehoux et al., 2009).

1.1.1.1 Attachement, entrée et motilité intracellulaire

La totalité de l'information génétique des PV est contenue dans un ADN de 8000 paires de base. Puisque le génome des PV n'encode pas de polymérase, sa réplication dépend largement de la machinerie de réplication de l'ADN de la cellule hôte. Le virus établit son génome au sein de cellules en prolifération active. Dans un épithélium normal, seule la couche basale est composée de cellules prolifératives. Celle-ci contient un mélange de cellules souches qui assurent la repopulation de l'épithélium et de cellules dites en « amplification transitoire » qui se détachent de la couche basale pour migrer vers les couches supérieures (épineuse, granuleuse et cornifiée) (Fig. 1.1) (Jones et al., 2007; Kaur and Li, 2000). Au cours de cette migration, la cellule quitte le cycle cellulaire et amorce un programme de différenciation qui la mènera à un état terminalement différencié au niveau la dernière couche de l'épithélium (Regnier et al., 1986; Staiano-Coico et al., 1986). Les kératinocytes (cellules de l'épithélium) doivent leur nom au processus de kératinisation qui accompagne cette différenciation. Bien qu'on ne sache toujours pas quelle (s) cellule (s) de la couche basale est infectée par le PV, il a été proposé que l'infection des cellules souches soit nécessaire à l'établissement d'une infection persistante (Egawa, 2003). Nonobstant le type de cellule qui est infecté, une abrasion microscopique de l'épiderme exposant la couche basale doit être présente afin de permettre aux particules virales de les atteindre (Egawa, 2003). De ce fait, le PV infecte plus facilement certaines zones du corps humain. Par exemple, au niveau de la zone de transformation qui se situe à la jonction entre les épithéliums du col et de l'utérus, la présence d'un moins grand nombre de couches épithéliales permet au virus d'atteindre plus facilement les cellules de la couche basale.

Les particules virales du PV sont composées d'une capsidie icosaédrique non enveloppée d'environ 55 nm (Baker et al., 1991). Bien que tous les détails de l'entrée virale ne soient pas encore connus, différentes études suggèrent que L1, la protéine majeure de la capsidie, serait responsable de l'attachement initial du virus aux glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (HSPG : *Heparan Sulfate Proteoglycan*) de la membrane basale (MB) se situant en dessous de l'épiderme (Fig. 1.1) (Giroglou et al., 2001; Joyce et al., 1999;

Patterson et al., 2005; Roberts et al., 2007; Roden et al., 1994; Schiller et al., 2010). En plus du HSPG, la laminin 5 jouerait possiblement un rôle au cours de ce processus (Culp et al., 2006). Au cours de son attachement à la membrane basale, la capsid subit un changement de conformation qui est nécessaire à son interaction subséquente avec les kératinocytes (Schiller et al., 2010). De manière plus précise, le changement de conformation de la capsid permet l'exposition du domaine N-terminal de la protéine mineure de la capsid, L2, et son clivage par la furin, une proprotéine convertase. L'éjection de la partie N-terminale de L2 par ce clivage permet de révéler un domaine de L1 qui interagit avec un récepteur secondaire spécifique localisé sur les kératinocytes (Richards et al., 2006; Schiller et al., 2010). Bien que l'intégrine $\alpha 6$ soit un candidat possible, l'identité de ce récepteur demeure toujours inconnue (Sapp and Day, 2009).

Suite à leur interaction avec les récepteurs cellulaires, les capsides sont internalisées. Bien que différentes voies d'internalisation de la capsid aient été proposées, le processus d'internalisation des PV est encore un sujet de controverse. Il est possible que le mode d'internalisation varie d'un type de PV à l'autre, cependant, il a été suggéré que le manque d'uniformité des particules virales utilisées au cours de ces études serait à la source de la divergence des résultats obtenus dans les diverses études. De manière générale, ces études démontrent que l'entrée des particules virales dans la cellule hôte requiert soit la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et/ou la voie d'entrée dépendante des cavéoles (résumé dans (Horvath et al., 2010; Schiller et al., 2010)). Indépendamment du mécanisme d'entrée exact utilisé par les PV, tous s'entendent pour dire que son internalisation, qui se déroule sur plusieurs heures, n'est pas caractéristique d'un mécanisme d'internalisation unique. Ainsi, l'internalisation du PV pourrait requérir une combinaison de ces voies.

À la suite de leur entrée dans la cellule, les particules virales sont retrouvées à l'intérieur des endosomes tardifs où une partie de leur capsid est enlevée (Smith et al., 2008). Ensuite, alors que la protéine L1 reste associée à ces endosomes, la protéine L2 et le génome viral migrent vers le noyau cellulaire par un mécanisme encore peu connu (Kamper et al., 2006). L'interaction de L2 avec les microtubules et la dynéine, une protéine qui se

déplace le long des réseaux de microtubules, serait essentielle pour ce processus (Florin et al., 2006). Au noyau, la colocalisation de L2 et de l'ADN viral dans les domaines ND10 (*Nuclear Domain 10*) serait ensuite nécessaire pour la transcription des gènes précoces et pour l'établissement de l'infection (Day et al., 2004; Florin et al., 2002). La protéine PML (*ProMyelocytic Leukemia*) présente dans ces domaines aurait également un rôle à jouer au cours de ces processus (Swindle et al., 1999).

1.1.1.2 Établissement, maintien et amplification de l'épisome viral

La réplication de l'épisome, la forme extrachromosomique du génome viral, est nécessaire pour son établissement et son maintien dans la couche basale ainsi que pour son amplification dans les couches supérieures de l'épithélium. Celle-ci est assurée par deux protéines virales, E1 et E2, en coordination avec la machinerie de réplication de l'ADN cellulaire. Puisque cette thèse porte sur les fonctions de E1, les différents modes de réplication de l'épisome observés au cours du cycle viral ainsi que le rôle des protéines cellulaires au cours de la réplication du PV sont le sujet de la section 1.4 et 1.5 de l'introduction. Dans cette section-ci, ces éléments ne seront que brièvement abordés.

Suivant l'entrée du virus dans les cellules prolifératives de la couche basale, l'expression de protéines virales permet au PV d'établir entre 50 et 100 copies de son episome dans le noyau des cellules infectées (Taichman et al., 1983). Subséquemment, le maintien du génome dans ces cellules repose sur les fonctions de réplication de E1 et E2 ainsi que sur la capacité de E2 à ségréguer l'épisome dans les deux cellules filles créées à la suite de la division de la cellule infectée. Lors de l'infection, l'amplification de l'épisome à plus de 1000 copies dépend à la fois de la différenciation de la cellule hôte et de la disponibilité de sa machinerie de réplication de l'ADN (Bedell et al., 1991). Dans un épithélium non infecté, les kératinocytes quittent normalement le cycle cellulaire au cours de leur différenciation dans les couches supérieures. Puisque la machinerie de réplication est seulement exprimée et active au cours de la phase S du cycle cellulaire, l'action coordonnée des deux oncogènes viraux, E6 et E7, est nécessaire au maintien d'un état

cellulaire propice à la réplication de l'ADN viral dans les kératinocytes différenciés des couches supérieures. De manière plus précise, E7 active l'entrée et le maintien des cellules en phase S tandis que E6 inhibe les voies d'apoptose qui sont induites par les fonctions de E7. Dans des kératinocytes différenciés où la phase S est maintenue par E6 et E7, l'amplification de l'épisome est rendue possible grâce à l'activation du promoteur tardif qui induit la surexpression des protéines E1 et E2 responsables de la réplication de l'ADN viral. L'activation de ce promoteur permet également l'expression des protéines virales E1^E4 et E5. Ces dernières sont requises pour l'amplification du génome, mais leur rôle précis au cours de ce processus est encore indéterminé.

L'ADN du PV est maintenu sous forme épisomale tout au long du cycle viral et c'est sous cette forme qu'il est encapsidé dans de nouveaux virions. Dans les cas de cancers reliés à l'infection par le virus du papillome humain (VPH), il est fréquent de retrouver l'ADN viral intégré dans celui de la cellule hôte. Certaines études suggèrent que cette intégration se ferait au niveau de sites fragiles communs (CFS, *Common Fragile Sites*) du génome cellulaire tandis que d'autres suggèrent que cette intégration est aléatoire (Matovina et al., 2009; Thorland et al., 2003; Wentzensen et al., 2004). Nonobstant l'endroit où se fait l'intégration dans le génome de l'hôte, celle-ci induit fréquemment la destruction du cadre de lecture et la perte d'expression de la protéine virale E2 (Cricca et al., 2009). En plus de ces fonctions de réplication et de ségrégation, E2 agit normalement en tant que répresseur de l'expression des protéines E6 et E7. En son absence, les oncogènes sont inadéquatement surexprimés dans les cellules basales et enclenchent une série de mécanismes moléculaires menant à l'immortalisation et favorisant la transformation cellulaire. L'intégration du génome viral inhibe la réplication des PV et n'est donc pas un événement faisant partie du cycle viral normal. L'implication de la surexpression des protéines virales oncogéniques dans le développement de cancers liés à l'infection par le VPH est discutée à la section 1.2.1.2.

1.1.1.3 Assemblage de la capsid, encapsidation du génome et relâche de nouveaux virions

Tout comme la réplication de l'ADN viral, la formation de nouveaux virions se fait entièrement dans le noyau de la cellule infectée. L'amplification du génome dans les kératinocytes différenciés des couches supérieures de l'épithélium permet l'expression des protéines L1 et L2 ainsi que l'assemblage de nouveaux virions (Frattini et al., 1996; Ruesch et al., 1998). Bien que la compréhension des étapes permettant l'assemblage de L1 en 72 pentamères ait beaucoup progressé depuis le développement de particules virales artificielles comme les VLP (*Virus-Like Particule*) (Section 1.2.2.2), les mécanismes contrôlant la formation d'un réseau complexe de ponts di-sulfure intra- et inter-pentamérique qui servent à stabiliser la capsid sont encore incompris (Sapp and Day, 2009). L'augmentation de la stabilité des VLP dans des tampons composés d'une faible concentration d'agent réducteur, d'un bas pH et d'une grande concentration ionique suggère que l'assemblage de nouveaux virions serait favorisé par un tel environnement (Mach et al., 2006). Suite à la formation de la capsid, l'interaction du génome viral avec la protéine L2 serait essentielle à son encapsidation (Holmgren et al., 2005). De plus, une étude suggère que la protéine E2 faciliterait ce processus (Heino et al., 2000). Les étapes subséquentes et le moment exact auquel survient l'encapsidation demeurent inconnus. Bien qu'il soit possible que d'autres protéines virales ou cellulaires soient incorporées dans la capsid virale au cours de son assemblage, aucune preuve solide ne supporte cette hypothèse pour l'instant. La relâche des nouveaux virus dans l'environnement extracellulaire se fait ensuite par la desquamation naturelle des kératinocytes terminalement différenciés (Bryan and Brown, 2001). La protéine virale E1^{E4} faciliterait ce processus grâce à sa capacité à réorganiser le cytosquelette de kératine des cellules de la couche cornifiée (Bryan and Brown, 2000; Doorbar et al., 1991; McIntosh et al., 2010; Roberts et al., 1994; Roberts et al., 1997). Le temps nécessaire à la réalisation d'un cycle viral complet est estimé à environ trois semaines, soit le temps nécessaire pour permettre la différenciation complète d'un kératinocyte à travers les différentes couches de l'épithélium.

1.1.2 Virus : Organisation génomique et protéines virales

1.1.2.1 Organisation du génome

La totalité de l'information génétique des PV est encodée par un seul brin de leur génome à ADN double brin. Ce petit ADN circulaire de 8 kilobases (Kb) se divise en trois grandes régions soit la région précoce (*Early*, E), la région tardive (*Late*, L) et la longue région de contrôle (*Long Control Region*, LCR). La région E encode de 6 à 7 protéines selon le type de PV (E1, E2, E1^{E4}, E5, E6, E7 et E8^{E2C}) tandis que la région L encode deux protéines structurales (L1 et L2) (Fig. 1.2). L'expression de ces gènes est régulée par deux promoteurs et par deux sites de polyadénylation. Indépendamment de la combinaison promoteur/site de polyadénylation, l'expression des protéines encodées par les ARN messagers (ARNm) polycistroniques des PV est initiée à partir de codons d'initiation unique à chacune des protéines. Comme plusieurs de ces codons d'initiations sont présents à l'intérieur de chaque ARN polycistronique, l'initiation de la traduction des protéines se fait grâce à un balayage de l'ARNm par les ribosomes (Remm et al., 1999). Ainsi, le contrôle de la disponibilité des codons d'initiation constitue un moyen de réguler les niveaux d'expression des gènes viraux. En plus de la disponibilité des codons d'initiations, la liaison de petits ARN inhibiteurs ainsi que l'épissage alternatif modulent l'expression des gènes du PV (Klumpp and Laimins, 1999; Zheng and Baker, 2006).

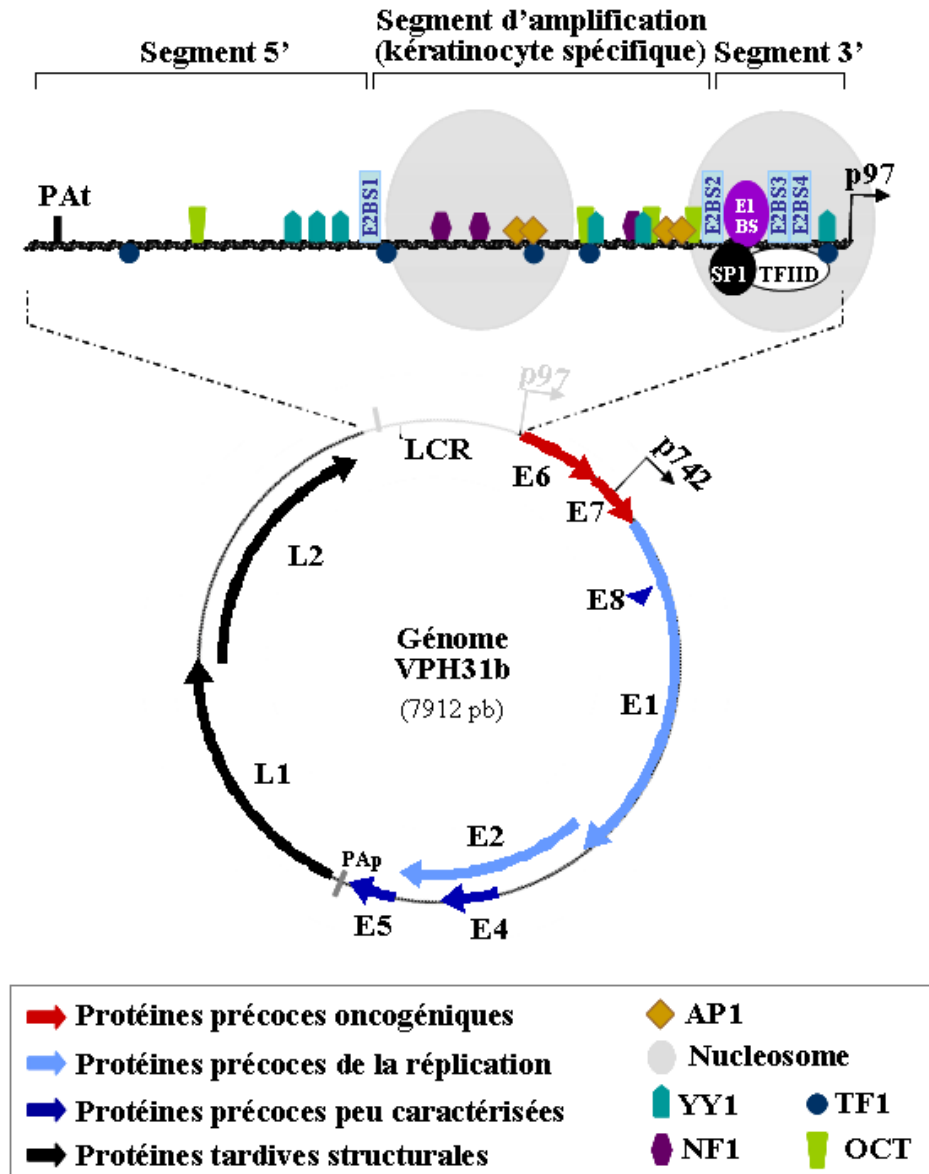


Figure 1.2. Arrangement des gènes viraux et des sites de liaison spécifique de la longue région de contrôle (LCR) dans l'épisome du VPH 31.

Les neuf principaux gènes viraux exprimés à partir de l'épisome du VPH 31 sont indiqués. Les gènes des protéines précoces (E1, E2, E1[^]E4, E8[^]E2C, E5, E6 et E7) sont colorés en bleu pâle lorsque leur rôle principal au cours du cycle viral est de répliquer l'ADN viral, en rouge lorsque leur rôle est d'induire une hyperprolifération cellulaire

(oncogénique) ou en bleu foncé lorsque leur rôle est peu caractérisé. Les promoteurs (p97 et p742) et les sites de polyadénylation précoces et tardifs (PAp et PAt) sont également indiqués. Le LCR est agrandi afin de mettre l'accent sur la multitude de sites de liaison des facteurs cellulaires et viraux localisés dans cette région. Ces facteurs sont identifiés directement dans l'agrandissement ou dans la légende encadrée. Finalement, le nom de chaque section du LCR est indiqué au haut de la figure.

Selon le type de PV étudié, différents promoteurs et transcrits d'ARN ont été identifiés (Zheng and Baker, 2006). Chez le VPH 31, les transcrits précoces composés d'ARNm bicistroniques ou polycistroniques sont transcrits à partir du promoteur précoce localisé dans le LCR (p97) et se terminent tous au site de polyadénylation précoce situé en aval de la séquence de E5 (nucléotide 4138) (Fig. 1.2 et 1.3). Ces transcrits d'ARNm alternativement épissés sont composés de différents agencements des cadres de lecture ouverts des protéines précoces E6, E7, E1, E2, E1[^]E4 et E5 (Fig. 1.3) (Hummel et al., 1992; Hummel et al., 1995; Klumpp et al., 1997). Lorsque les kératinocytes infectés par les PV migrent dans les couches supérieures de l'épithélium, un promoteur tardif localisé dans la séquence du gène E7, p742, est activé (del Mar Pena and Laimins, 2001; Hummel et al., 1992; Hummel et al., 1995; Ozbun and Meyers, 1997, 1998a, b). Les transcrits originaires de ce promoteur débutent à plusieurs sites d'initiation de la transcription regroupés autour du p742 et se terminent soit au site de polyadénylation précoce ou au site de polyadénylation tardif situé en aval de la séquence codante de L1 (nt 7227) (Fig. 1.2). Ainsi, ces transcrits contiennent surtout les cadres de lecture ouverts des protéines E1[^]E4, E5, E8[^]E2C, L1 et L2 (Fig. 1.3).

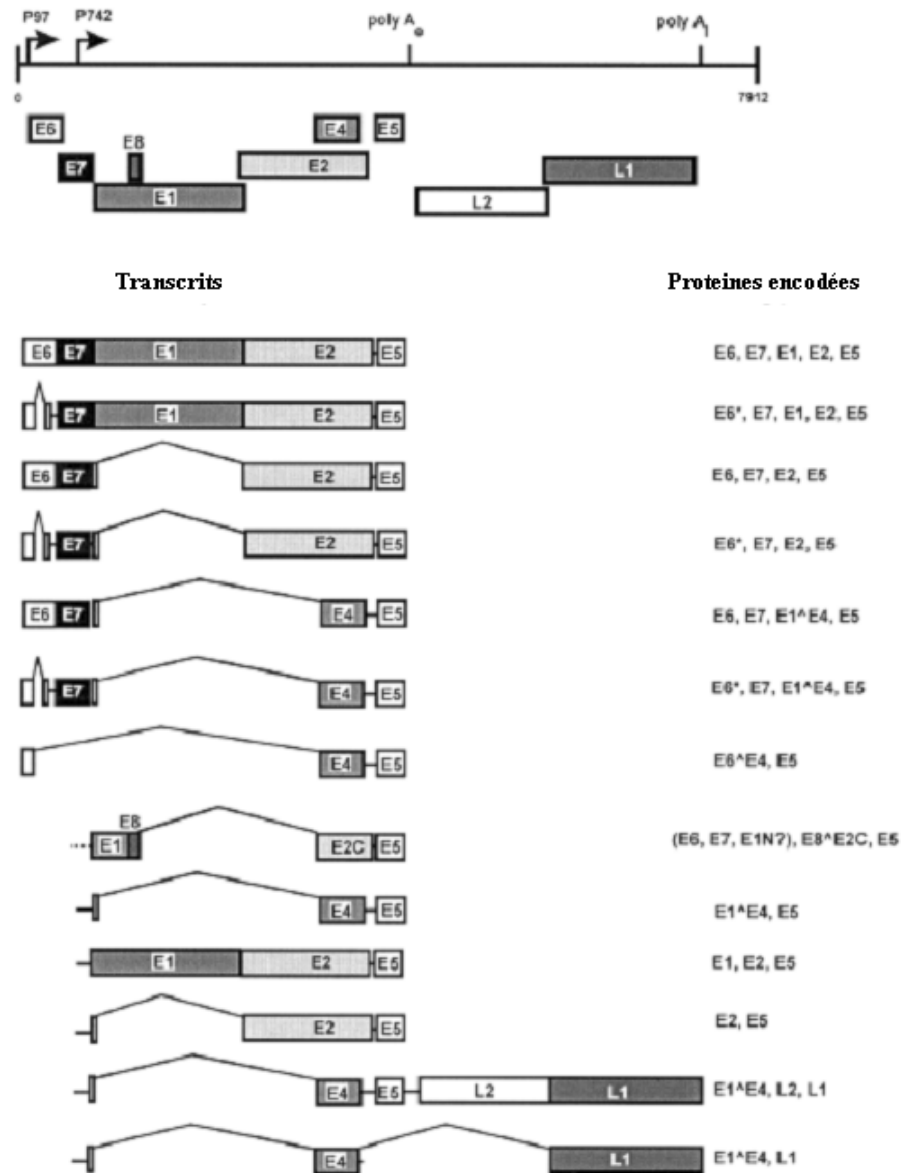


Figure 1.3. Transcrits exprimés à partir du génome du VPH 31.

Le haut de la figure représente le génome du VPH 31 illustré ici sous forme linéaire. Les deux promoteurs ainsi que les deux sites de polyadénylation sont indiqués. Le cadre de lecture ouvert de chaque protéine virale est également indiqué. Les divers transcrits produits à partir du promoteur précoce (p97) ou du promoteur tardif (p742) sont indiqués à gauche tandis que les cadres de lecture ouverts des protéines contenues dans ces

transcrits sont indiqués à droite. Cette figure a été adaptée de Stubenrauch and Laimins (1999) Semin Cancer Biol (Stubenrauch and Laimins, 1999)

Bien que le contrôle de l'activité du promoteur p97 soit de plus en plus compris (Section 1.1.2.1.1), les mécanismes qui activent le promoteur p742 sont peu connus. De manière générale, le modèle suivant est accepté. Au niveau de la couche basale, la liaison de facteurs de répression de la transactivation dans le LCR permettrait de réprimer p97 et de maintenir l'expression des protéines précoces à un faible niveau. Subséquemment, la variation des facteurs intracellulaires induite par la différenciation des kératinocytes dans les couches suprabasales de l'épithélium favoriserait d'abord l'expression des oncogènes E6 et E7 et des protéines de la réplication E1 et E2 à partir du promoteur 97, puis l'expression soutenue de E1, E2, E1[^]E4 et de E5 à partir du promoteur p742 dans les couches plus différenciées de l'épithélium. Finalement, malgré le fait que les cadres de lecture ouverts des protéines structurales L1 et L2 soient retrouvés dans plusieurs transcrits originaires du promoteur tardif, leur épissage alternatif et la disponibilité des ARN de transfert (ARNt) permettant la traduction de leurs codons rares favoriseraient leur expression massive dans les couches les plus supérieures de l'épithélium (Gu et al., 2004; Zheng and Baker, 2006).

1.1.2.1.1 Longue région de contrôle

La longue région de contrôle (LCR) représente environ 10 % du génome et contient différents sites de liaison pour des protéines cellulaires et virales (Fig. 1.2). Cette diversité de sites permet de restreindre la transcription et la réplication de l'ADN viral aux kératinocytes et de moduler ces activités selon le stade de différenciation de ces cellules (Bernard, 2002). La composition du LCR varie entre les PV ainsi qu'entre les VPH cutanés et muqueux. Ainsi, plusieurs des éléments de contrôle retrouvés chez les VPH muqueux sont absents chez les VPH cutanés (de Villiers et al., 2004; Lazarczyk et al., 2009; Reh and Pfister, 1990).

Chez les VPH de type muqueux, le LCR est sous-divisé en trois segments (Fig. 1.2). Le premier segment (5') contient les sites de terminaison et de polyadénylation des protéines tardives ainsi que des sites d'attachement à la matrice nucléaire (MAR, *Matrix Nuclear Attachment*) qui modulent positivement et négativement la transcription du promoteur précoce p97 selon le contexte cellulaire (Bernard, 2002; Stunkel et al., 2000; Tan et al., 1998). Le segment central du LCR sert à amplifier la transcription de manière spécifique dans les cellules épithéliales et est nommé : segment amplificateur (*enhancer*) (Sailaja et al., 1999; Wooldridge and Laimins, 2008). Ce dernier contient plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires tels que NF1-C, CEBP, AP-1 (junB/fra-2), OCT, TEF1, TEF2 ainsi qu'à des récepteurs de glucocorticoïdes et de progestérone (Chen et al., 1996; Cid et al., 1993; Gloss et al., 1987; Hadaschik et al., 2003; Kikuchi et al., 1996; Taniguchi et al., 1993). Le troisième segment (3') du LCR contient l'origine de réplication, le promoteur p97, une boîte TATA importante pour la transcription de gènes à partir du promoteur précoce ainsi que des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions Sp1 et TFIID (Gloss and Bernard, 1990; Tan et al., 2003). L'origine minimale de réplication est constituée de trois sites de liaison pour la protéine virale E2 (E2BS, *E2-Binding Site*), quatre sites de liaison pour la protéine virale initiateur de la réplication E1 (E1BS : *E1-Binding Site*) ainsi que d'une région riche en A-T (Chen and Stenlund, 2001; Holt and Wilson, 1995; Lee et al., 1997; Mendoza et al., 1995; Stubenrauch et al., 1998; Sun et al., 1996; Titolo et al., 2003a; Ustav et al., 1991). L'importance de chacune des séquences spécifiques qui composent l'origine de réplication est discutée dans la section sur la réplication de l'ADN du PV (Section 1.4). En plus d'être un facteur de réplication, E2 est un facteur de transcription et sa liaison dans le LCR module la transcription des gènes à partir de p97. La liaison de E2 aux différents E2BS varie en fonction de sa concentration cellulaire alors que sa capacité à activer ou à réprimer la transcription à partir de p97 dépend du niveau d'occupation des différents E2BS (Romanczuk et al., 1990; Sanchez et al., 2008). Ainsi, plus la concentration cellulaire de E2 est élevée, plus le nombre de sites E2BS occupés augmente, et plus la répression de l'expression de E6 et E7 est forte (Steger and Corbach, 1997). La liaison de E2 aux E2BS est également modulée par l'occupation

des sites de liaison de protéines de l'hôte, tel que Sp1 et TFIID, à proximité de ces sites (Fig. 1.2) (Alexander and Phelps, 1996; Demeret et al., 1997; Romanczuk et al., 1990; Sanchez et al., 2008).

Le dernier segment du LCR (3') contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs cellulaires de transcription YY1 (*Yin Yang 1*) et CDP (*CCAAT-Displacement Protein*). La fonction de ces facteurs est de réprimer l'expression des gènes en augmentant la déacétylation des histones via le recrutement de déacétylases d'histones (HDAC : *Histone DeACetylase*) (Bauknecht et al., 1992; Bauknecht et al., 1995; Bernard, 2002; Lee et al., 1998; May et al., 1994; O'Connor et al., 1996; Shi et al., 1997). Le génome du PV est empaqueté sous forme de chromatine dans la capsid virale (Favre et al., 1977; Swindle and Engler, 1998) et il n'est donc pas étonnant que l'activation des promoteurs viraux soit en partie régulée par les modifications post-traductionnelles des histones situées dans le génome (del Mar Pena and Laimins, 2001; Stunkel and Bernard, 1999; Wooldridge and Laimins, 2008). De ce fait, il a été démontré que la déacétylation et la méthylation des histones localisées dans le segment d'amplification et à proximité du promoteur tardif modulent la transcription en fonction de la différenciation des kératinocytes (Bernard, 2002; del Mar Pena and Laimins, 2001; Wooldridge and Laimins, 2008). Finalement, le niveau de méthylation des nucléotides CpG de l'ADN du génome viral joue également un rôle sur la transcription virale. Spécifiquement, la méthylation de deux cytosines localisées à l'intérieur des E2BS inhibe la liaison de E2 et permet d'augmenter l'expression des gènes viraux (Kalantari et al., 2004; Kim et al., 2003; Sanchez et al., 2008).

Selon le contexte cellulaire, l'occupation alternative des divers sites de liaison retrouvés dans le LCR est à la source du contrôle de la transactivation du promoteur précoce. Ainsi, la forte concentration de YY1 et de CDP retrouvée dans les cellules basales non différenciées assure l'inhibition de l'expression des gènes de E6 et E7 via le promoteur précoce. La différenciation des cellules dans les couches supérieures diminue la concentration de YY1 et CDP, ce qui augmente l'acétylation des nucléosomes liés dans le LCR. Ceci permet d'activer la transcription des gènes viraux par l'ARN polymérase II en

libérant les sites de liaison situés dans le segment activateur ainsi que les sites SP1 et TFIID situés dans le segment 3' (Bernard, 2002).

1.1.2.2 Protéines précoces

1.1.2.2.1 Protéine E1

E1 est une hélicase qui est exprimée par le PV très tôt au cours de l'infection et qui est essentielle à la phase d'initiation et d'élongation de la réplication de l'ADN viral. En effet, la réplication de l'ADN des PV est assurée par la formation d'un double hexamère de E1 à l'origine de réplication. Comme chaque monomère de E1 a très peu d'affinité pour l'ADN, son recrutement à l'origine de réplication virale localisée dans le LCR dépend de son interaction avec la protéine E2. Une fois assemblée en double hexamère, son activité ATPase/hélicase lui permet de dérouler l'ADN en amont de la fourche de réplication. Puisque le contenu de cette thèse porte sur la protéine E1, les détails de sa structure, de son assemblage en doubles hexamères, de ses fonctions et de sa régulation par des facteurs cellulaires ainsi que par des modifications post-traductionnelles sont discutés à la section 1.4.

1.1.2.2.2 Protéine E2

E2 est une protéine d'environ 360 acides aminés (~50 KDa) qui est également produite très tôt au cours de l'infection virale et qui agit en tant que facteur d'initiation de la réplication, de transcription et de ségrégation de l'ADN viral. Cette protéine multifonctionnelle est localisée au noyau et une proportion de celle-ci colocalise avec les domaines ND10 en présence de E1 et de l'origine (Klucevsek et al., 2007; Swindle et al., 1999; Zou et al., 2000). La protéine E2 est composée de deux domaines fonctionnels distincts, dont un domaine N-terminal de transactivation (TAD : *TransActivation Domain*) et un domaine C-terminal lui permettant de lier l'ADN (DBD : *DNA-Binding Domain*) et de se dimériser. Ces deux domaines sont séparés par une région charnière (*hinge*) qui est très peu conservée entre les différents types de PV. Chez le VPH 11, cette région contient une

séquence NLS (*Nuclear Localisation Signal*) nécessaire à l'accumulation nucléaire de E2 (Zou et al., 2000). Ce motif n'est toutefois pas conservé et la localisation nucléaire d'autres types de PV est dépendante de leur domaine C-terminal (Klucevsek et al., 2007).

Le TAD et le DBD sont importants pour toutes les fonctions de E2. Ainsi, au cours de l'initiation de la réplication virale, le TAD de E2 interagit avec la portion C-terminale de E1 tandis que le DBD permet à E2 de lier l'ADN et de dimériser sur des sites de liaison spécifiques, ACCGN₄CGGT, localisés dans le LCR (E2BS) (Fig. 1.2) (Androphy et al., 1987; Bream et al., 1993; Frattini and Laimins, 1994a, b; McBride et al., 1989). Cette interaction est essentielle au recrutement de l'hélicase à l'origine de réplication. Celle-ci inhibe également l'interaction de E1 avec l'ADN non spécifique ainsi que son oligomérisation (Bonne-Andrea et al., 1997). Cette interaction est discutée plus en détail à la section 1.4.

Tel que mentionné précédemment, la protéine E2 peut agir en tant qu'activateur ou répresseur de la transcription selon le contexte cellulaire et son interaction avec les divers E2BS du LCR (section 1.1.2.1.1). Puisque ces fonctions sont régulées par la concentration cellulaire de E2, les facteurs cellulaires qui influencent sa stabilité, tel que Brd4 (*BRomoDomain-containing protein 4*), affectent directement l'activité de transactivation de la protéine virale (Gagnon et al., 2009). En plus d'être modulées par sa concentration cellulaire, les fonctions de transactivation de E2 sont régulées par les différents facteurs de transcription cellulaires qui interagissent avec le TAD de E2. Parmi ceux-ci, on retrouve Brd4, TopBP1 (*TOPoisomerase Binding Protein 1*), CDH6 (*ChromoDomain Helicase DNA-binding domain*) et C/EBP (Boner et al., 2002; Fertey et al., 2010; Gagnon et al., 2009; Hadaschik et al., 2003; Lee and Chiang, 2009; McPhillips et al., 2006; Wu et al., 2006). Tel que mentionné précédemment, la répression de la transactivation à partir du promoteur précoce par E2 est particulièrement importante, car elle restreint l'expression des oncogènes viraux aux couches suprabasales de l'épithélium. Lorsque ce contrôle est perdu, la surexpression des protéines E6 et E7 induit une hyperprolifération cellulaire inappropriée dans les couches basales de l'épithélium, ce qui favorise le développement de tumeurs. En

plus d'interférer avec l'expression des oncogènes viraux, il a été démontré que E2 peut inhiber les fonctions de E6 et de E7 en interagissant directement avec ceux-ci (Gammoh et al., 2006; Gammoh et al., 2009; Grm et al., 2005).

La ségrégation du génome des PV au cours de la division cellulaire dépend de la capacité de E2 à interagir simultanément avec l'ADN mitotique cellulaire et l'ADN viral (Ilves et al., 1999). L'interaction entre E2 et l'ADN viral se fait directement via le DBD de E2 tandis que son interaction avec l'ADN mitotique est indirecte. En effet, celle-ci est rendue possible grâce à l'interaction du TAD de E2 avec des protéines cellulaires capables de lier les chromosomes ou les fuseaux mitotiques. Parmi celles-ci, on retrouve Brd4, TopBP1, ChlR1 (*CHromosome Loss-Related protein 1*) et MKLp2 (*Mitotic Kinesin-Like Protein 2*) (Boner et al., 2002; Donaldson et al., 2007; McPhillips et al., 2006; Parish et al., 2006a; You, 2010; Yu et al., 2007b).

En plus des fonctions de réplication, de transactivation et de ségrégation, certaines études ont démontré que E2 a une activité pro-apoptotique et que cette activité dépend de son accumulation au cytoplasme (Blachon et al., 2005; Blachon and Demeret, 2003). En fait, E2 activerait l'apoptose en interagissant ou en modulant les fonctions de p53, de la caspase-8 et de c-Flip, une protéine anti-apoptotique (*Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein*) (Blachon et al., 2005; Demeret et al., 2003; Massimi et al., 1999; Parish et al., 2006b; Thierry and Demeret, 2008; Wang et al., 2011; Webster et al., 2000). L'importance de cette fonction de E2 au cours du cycle viral reste toutefois inconnue.

1.1.2.2.3 Protéine E8^{E2C}

En plus de E2, certains PV expriment la protéine E8^{E2C}. Cette protéine est produite grâce à la fusion des cadres de lecture ouverts de la protéine E8 et du domaine C-terminal de la protéine E2 au cours de l'épissage alternatif d'ARNm polycistroniques exprimés à partir du promoteur tardif (Fig. 1.2 et 1.3) (Doorbar et al., 1990; Stubenrauch et al., 2000). Cette protéine peut interagir avec les sites de liaison de E2 du LCR, mais elle n'a

pas la capacité d'activer la transcription, d'amorcer la réplication de l'ADN viral ni de ségréguer l'épisome. La fonction principale de E8^{E2C} serait donc de réprimer ces fonctions en entrant en compétition avec E2 pour la liaison des E2BS dans les LCR des VPH de types 16, 18 et 31 (Fertey et al., 2011; Stubenrauch et al., 2007; Stubenrauch et al., 2001; Zobel et al., 2003). De ce fait, il a été démontré que la protéine E8^{E2C} peut efficacement inhiber la croissance des cellules HeLa en inhibant l'expression des protéines E6 et E7 qui sont exprimées à partir de génomes viraux intégrés dans ces cellules (Stubenrauch et al., 2007). Chez le VPH 31, la perte de l'expression de E8^{E2C} induit une augmentation de la réplication transitoire de l'ADN, mais une perte du maintien de l'épisome, supportant l'hypothèse que E8^{E2C} est un modulateur de la réplication (Stubenrauch et al., 2000; Zobel et al., 2003). Dans ces études, il a été suggéré qu'en plus de son domaine de liaison à l'ADN, la région N-terminale de E8^{E2C} serait importante pour cette fonction (Zobel et al., 2003). Chez le VPH 16, le rôle de E8^{E2C} semble différent puisque le maintien de l'épisome du VPH 16 n'est pas influencé par la perte de sa protéine E8^{E2C} (Lace et al., 2008). D'autres études sont nécessaires pour clarifier le rôle de cette protéine dans le cycle viral.

1.1.2.2.4 Protéine E7

La protéine E7 est une petite protéine oncogénique d'environ 100 acides aminés composée de trois régions conservées (*CR, Conserved Region*) : 1) la région N-terminale CR1, 2) une région CR2 centrale contenant le motif L-x-C-x-E qui est nécessaire à son interaction avec pRb et les autres membres de la famille Rb (p107 et p130) et 3) une région CR3 C-terminale contenant deux doigts de zinc (Chan et al., 2001; Munger et al., 1989). Tel que mentionné précédemment, E7 agit de concert avec la protéine E6 pour activer et maintenir la prolifération dans les kératinocytes différenciés (Fig. 1.4). Puisque les fonctions de E6 et E7 sont à la base du potentiel oncogénique des VPH à haut risque, elles sont le sujet de beaucoup d'études et de revues de la littérature. Seules les fonctions principales de ces protéines sont abordées dans cette thèse.

La fonction principale de E7 est de promouvoir l'entrée et le maintien de la cellule en phase S. Normalement, la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S est assurée par la protéine du rétinoblastome pRb ou par ses homologues p107 et p130 (Cobrinik, 2005). En fait, la famille des protéines pRb interagit et inhibe l'activité des facteurs de transcription de la famille E2F au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la transition et la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Cobrinik, 2005). Lorsque la cellule est apte à progresser vers la phase S, la phosphorylation de pRb par les complexes cycline D/Cdk4 ou 6 et cycline E/Cdk2 (*Cyclin Dependant Kinase*, Cdk) induit sa dissociation du complexe pRb/E2F. La relâche de pRb permet aux facteurs d'activation (E2F1-E2F2-E2F3) ou de répression (E2F4-E2F5) d'activer l'expression des gènes indispensables à la synthèse de l'ADN et de réprimer l'expression de gènes nécessaires à la sortie de la phase S (résumé dans (Attwooll et al., 2004)). Afin de promouvoir la progression des cellules en phase S, E7 lie directement les formes hypophosphorylées des protéines de la famille pRb et induit sa dissociation de E2F. En plus de lier les membres de la famille des pRb, la protéine E7 des VPH à haut risque induit la dégradation de pRb par le protéasome, en partie grâce à son assemblage avec un complexe ubiquitine-ligase contenant la cullin 2 (Huh et al., 2007). Bien que les protéines E7 des VPH à bas risque lient les protéines de la famille pRb, seule la dégradation de p107 et p130 par le protéasome a été observée (Pim and Banks, 2010; Zhang et al., 2006). La protéine E7 favorise aussi l'entrée et le maintien de la phase S en activant de façon soutenue l'activité de la cycline E-A/Cdk2. Pour se faire, E7 interagit directement avec les cyclines E et A et augmente l'activité de Cdk2 en inhibant l'activité des protéines inhibitrices, p21 et p27, et en activant la phosphatase CDC25A, nécessaires à l'activation des complexes cycline E-A/Cdk2 (Bartek and Lukas, 2001; McLaughlin-Drubin and Munger, 2009; Moody and Laimins, 2010; Pim and Banks, 2010). Finalement, E7 module l'expression de gènes de la phase S en interagissant directement avec des histones déacétylases de classe I (HDAC1 et HDAC2) et avec E2F6. Dans une cellule non infectée, les HDAC, qui sont associées au complexe pRb/E2F sur les promoteurs des gènes de la phase S, répriment la transactivation en compactant la chromatine via la déacétylation des histones présentes dans le promoteur

(Attwooll et al., 2004). Dans les cellules exprimant E7, il a été démontré que E7 interagit avec les HDAC à travers la protéine Mi2 β , une protéine du complexe de remodelage de la chromatine NURD (*Mi-2/Nucleosome Remodeling and Deacetylase*), et que cette interaction est nécessaire pour augmenter la transcription de E2F2 et réprimer celle du facteur régulateur de l'interféron (IRF-1 : *Interferon Regulated Factor 1*) (Brehm et al., 1999; Longworth et al., 2005; Park et al., 2000). Parmi les protéines faisant partie de la famille E2F, l'activité des facteurs de transcription E2F1 à E2F5 est contrôlée par pRb tandis que le contrôle des répresseurs E2F6 à E2F8 est indépendant de pRb (Attwooll et al., 2004). En liant directement E2F6, E7 lève la répression qu'exerce E2F6 sur les promoteurs des gènes favorisant l'entrée en phase S (McLaughlin-Drubin et al., 2008). Dans certains cas, il a également été proposé que E7 inhiberait l'expression de certains gènes en relocalisant E2F6 (Moody and Laimins, 2010). En plus d'être essentielle à l'entrée et au maintien des cellules en phase S, la liaison de E7 à pRb et aux HDAC serait importante au cours du maintien de l'épisome dans les cellules non différenciées. En effet, lorsque E7 est muté dans son site de liaison à pRb, dans le domaine de liaison au HDAC ou à l'intérieur des doigts de zinc, une perte du maintien de l'épisome est observée (Longworth and Laimins, 2004; McLaughlin-Drubin et al., 2005; Oh et al., 2004; Thomas et al., 1999).

Dans certain cas, l'expression des protéines E6 et E7 favorise le développement de tumeurs. Parmi les fonctions de E7 augmentant son potentiel oncogénique, on retrouve sa capacité à promouvoir l'instabilité génomique (Korzeniewski et al., 2010). Bien que E6 et E7 immortalisent les cellules, ils n'ont pas le pouvoir de les transformer et l'introduction de mutations supplémentaires dans les gènes de la cellule hôte est nécessaire pour le développement de tumeurs. En créant une instabilité génomique, E6 et E7 augmentent la fréquence d'introduction de ces mutations (résumé dans (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)). Plusieurs mécanismes induits par les oncogènes viraux contribuent à l'établissement d'une instabilité génomique. Par exemple, l'augmentation de l'activité de Cdk2 par E7 induit la formation d'un surnombre de centrosomes immatures qui introduisent des erreurs au cours de la ségrégation des chromosomes durant la division

cellulaire (aneuploïdie). La capacité de E7 à interagir avec deux composantes des fuseaux mitotiques, la γ -tubuline et la protéine NuMa (*NUclear Mitotic Apparatus protein 1*), serait également essentielle à l'induction d'aneuploïdie par E7. Finalement, l'interaction de E7 avec la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et sa capacité à induire une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de l'activation de ATM contribuerait également à l'induction d'une instabilité génomique (Moody and Laimins, 2009). Dans le contexte du cycle viral, l'activation de cette voie est nécessaire à l'activation de caspases-3 et -7 dans les kératinocytes différenciés. Mentionnons aussi que l'activation de ces caspases induit un clivage de la région N-terminale de E1 qui est essentiel à l'amplification du génome viral (Section 1.4) (Moody et al., 2007).

1.1.2.2.5 Protéine E6

Avec ses 150 acides aminés, la protéine E6 est à peine plus grosse que la protéine E7. Cette protéine est composée de deux doigts de zinc et, chez les VPH à haut risque oncogénique (Section 1.2), d'un motif de liaison aux domaines PDZ qui est situé dans l'extrémité C-terminale. La fonction majeure de E6 est d'inhiber l'activation de l'apoptose causée par l'hyperprolifération induite par E7 (Fig. 1.4). Par ailleurs, il a été proposé que la protéine E6 serait importante pour le maintien du génome dans les cellules basales, mais seulement en présence de la protéine E7 (Oh et al., 2004; Park and Androphy, 2002; Thomas et al., 1999).

En cas d'une augmentation anormale de la transcription des protéines de la phase S, tel que celle induite par E7, on observe habituellement une induction de la transcription du suppresseur de tumeur p53. Ainsi, la fonction majeure de E6 est d'inhiber les fonctions pro-apoptotiques de p53. Pour se faire, E6 forme un complexe trimérique avec la protéine p53 et l'ubiquitine E3 ligase E6AP (*E6-Associated Protein*). La formation de ce complexe permet l'ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome (Fig. 1.4) (résumé dans (Scheffner and Whitaker, 2003)). E6 inhibe également l'activité transcriptionnelle de p53 en inhibant son interaction avec l'ADN et en inhibant l'activité acétyltransférase des

protéines p300/CBP et ADA3, des composantes du complexe de transactivation qui interagissent et stabilisent p53 (Kumar et al., 2002; Patel et al., 1999; Zimmermann et al., 1999; Zimmermann et al., 2000). En plus d'inhiber les voies de l'apoptose dépendantes de p53, E6 inhibe quatre autres voies pro-apoptotiques. Ainsi, E6 inhibe : 1) l'activation de l'apoptose dépendante de TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) en liant directement TNFR1 et en inhibant la formation du complexe de signalisation de mort cellulaire, 2) l'apoptose dépendante de FAS et TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) en liant à la fois la protéine adaptatrice FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) ainsi que la caspase-8, 3) l'anoïkose (apoptose déclenchée par la perte d'adhésion à la matrice cellulaire) en liant la paxilin, un effecteur de cette voie apoptotique et finalement, 4) l'apoptose dépendante de la mitochondrie en liant la protéine pro-apoptotique BAX et BAK et en induisant la transcription des protéines anti-apoptotiques IAP2 (*Inhibitor of Apoptosis Protein 2*) et survivin (résumé dans (Moody and Laimins, 2010)).

En plus de ces fonctions anti-apoptotiques, la protéine E6 de certains type de PV lie et induit la dégradation de protéines contenant un motif PDZ (*PSD95/Dlg/Zo-1*). Cette interaction, qui se fait via le domaine C-terminal de E6, serait importante pour le maintien de la croissance cellulaire ainsi que pour le maintien de l'épisode dans les cellules non différenciées (Lee and Laimins, 2004). Parmi les protéines contenant un motif PDZ qui interagissent avec E6 et qui sont dégradées par le complexe E6-E6AP, on retrouve les MAGUK (*Membrane Associated GUanylate Kinases*), les homologues humains des protéines Dlg (hDlg, *drosophila Discs LarGe*) et Scribble (hScrib), les MAGI-1, -2 et 3 (*Membrane-Associated Guanylate kinase Inverted*), MUPP1 (*MULTI-PDZ-domain Protein 1*) ainsi que la phosphatase PTPN3 (*Protein-Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor-Type*) (résumé dans (McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)). Comme la plupart de ces protéines cellulaires sont retrouvées dans les régions de contact cellule-cellule et sont impliquées dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire, leur dégradation par E6 influencerait possiblement la polarité de la cellule infectée (Pim and Banks, 2010). Le rôle exact de ces interactions au cours du cycle viral et du processus de transformation cellulaire

est encore peu connu, cependant, une étude réalisée dans des souris transgéniques suggère que la région en doigts de zinc et le motif de liaison aux domaines PDZ contribuent de manière indépendante à l'activité oncogénique de E6 (Shai et al., 2007).

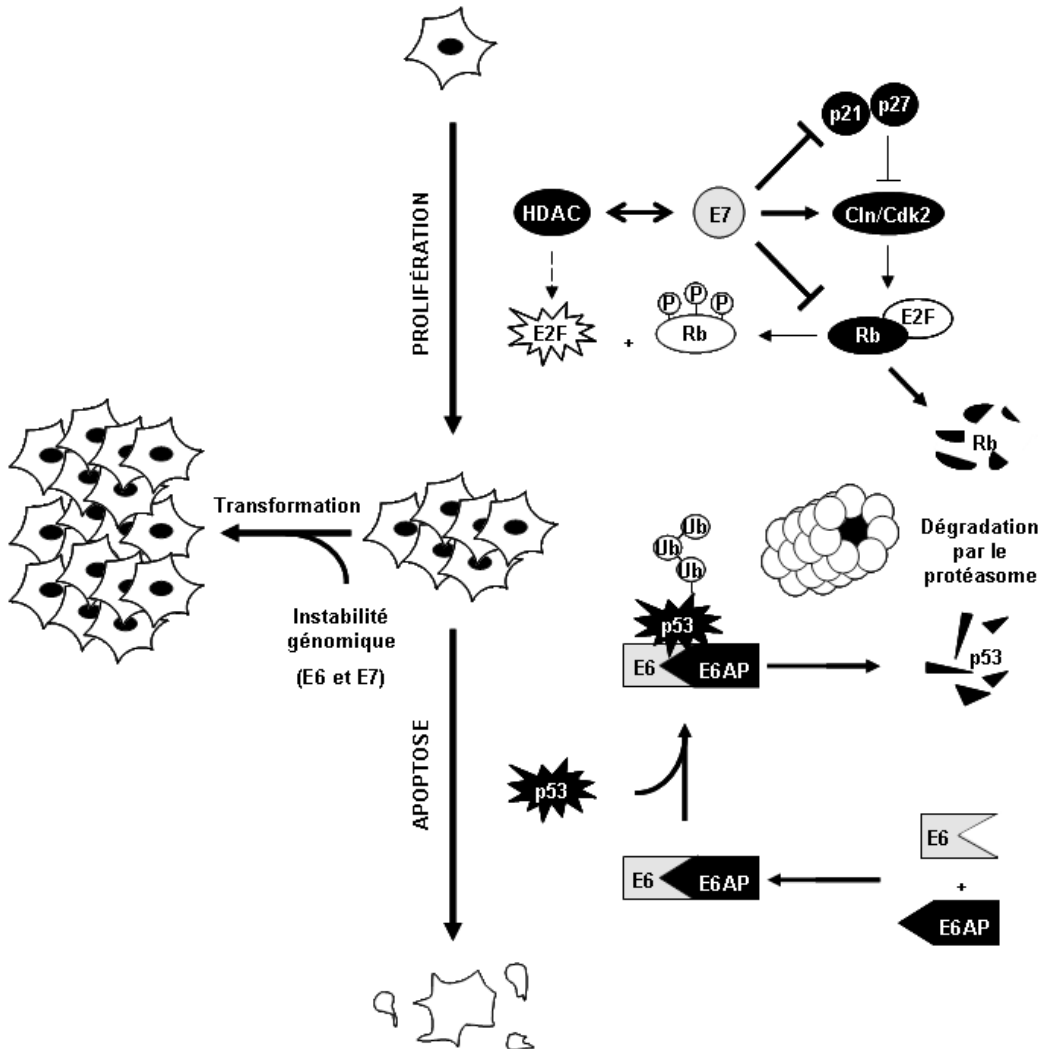


Figure 1.4. Fonctions principales des oncogènes viraux E6 et E7.

Représentation schématique des voies cellulaires modulées par E6 et E7 afin de promouvoir la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose. Lorsque E6 et E7 des VPH oncogéniques sont surexprimées, leur capacité à induire une hyperprolifération cellulaire et d'augmenter l'instabilité génomique favorise la transformation cellulaire. Cette

transformation est associée au développement de tumeurs. Cette figure a été adaptée de Fradet-Turcotte and Archambault (2007) Antivir Ther (Annexe 6 et (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007)).

Enfin, la capacité de E6 à prolonger la longévité cellulaire en augmentant la transcription du gène codant pour la transcriptase inverse de la télomérase (TERT, *TElomerases Reverse Transcriptase*), contribue également au potentiel oncogénique des VPH. Spécifiquement, E6 contribue au maintien de la longueur des télomères en modulant l'activité des facteurs de transcriptions qui lient le promoteur de la protéine TERT et qui favorisent sa transcription. Spécifiquement, E6 active les facteurs de transcription Myc et SP1 et inhibe l'activité de NFX1-91, un facteur nucléaire de la transcription (Moody and Laimins, 2010; Pim and Banks, 2010).

1.1.2.2.6 Protéine E1^{E4}

La protéine E1^{E4} est une protéine de 17 kDa. L'ARNm permettant l'expression de E1^{E4} est le produit d'un épissage de l'ARNm polycistronique entre un site donneur localisé après la séquence encodant les 5 premiers acides aminés de E1 et le site accepteur localisé au début du cadre de lecture de la protéine E4 (Fig. 1.2 et 1.3). Surtout exprimée au cours des étapes tardives du cycle viral, E1^{E4} est la protéine la plus abondante au cours de l'infection. Celle-ci est essentielle à l'amplification de l'épisome et jouerait un rôle au cours de la relâche des virions dans les couches les plus supérieures de l'épithélium (Nakahara et al., 2005; Peh et al., 2004; Pray and Laimins, 1995; Wilson et al., 2005; Wilson et al., 2007). Il a également été proposé que E1^{E4} serait important pour le maintien de l'épisome dans les cellules non différenciées. Le rôle de E1^{E4} dans ce processus est toutefois controversé. En fait, bien que des études aient démontré que la mutation d'un motif riche en leucine L-L-x-L-L de E1^{E4} ou la mutation du motif d'épissage permettant la production de E1^{E4} mènent toutes deux à une perte du maintien de l'épisome (Klumpp et al., 1997; Nakahara et al., 2005), deux autres études ont démontré que les épisomes du VPH 31 et 18 sont bien maintenus en l'absence de la protéine E1^{E4} (Wilson et al., 2005; Wilson et al.,

2007). Le rôle de cette protéine dans le contrôle de la réplication du génome viral reste donc à clarifier.

Le rôle de E1^{E4} au cours de l'amplification du génome est également peu caractérisé. Plusieurs études ont rapporté que E1^{E4} induit un arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G2. En effet, cette protéine virale interagit avec des complexes cycline/Cdk via un motif de liaison aux cyclines (CBM, *Cyclin Binding-Motif*) bipartite localisé dans le domaine N-terminal de E1^{E4} et induit la rétention de la cycline A et B1 au cytoplasme. Cette interaction est nécessaire à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire à la frontière G2/M observé dans les cellules exprimant E1^{E4} (Knight et al., 2011). Bien qu'on ait longtemps cru que de cet arrêt jouait un rôle dans l'amplification du génome, une étude récente démontre que le génome peut être efficacement amplifié dans des cellules exprimant un mutant CBM de E1^{E4} qui est incapable d'arrêter la progression du cycle cellulaire (Knight et al., 2011).

Finalement, plusieurs phénomènes induits par E1^{E4} seraient nécessaires pour l'assemblage et la relâche des virions à la surface de l'épithélium. Tout d'abord, E1^{E4} interagit et induit la destruction du cytosquelette de kératine. L'interaction entre E1^{E4} avec la cytokératine a lieu grâce à au motif L-L-x-L-L situé dans son domaine N-terminal tandis que la destruction du réseau de filaments intermédiaires de kératine est accomplie par son domaine C-terminal (Roberts et al., 1994; Roberts et al., 1997; Wang et al., 2004a). Bien que le mécanisme exact de destruction du réseau de kératine soit inconnu, il a récemment été constaté que E1^{E4} induit la phosphorylation ainsi que l'ubiquitination de la kératine, suggérant que E1^{E4} induit la dégradation de cette protéine (McIntosh et al., 2010). D'autres études rapportent que l'interaction de E1^{E4} avec les mitochondries, via son motif L-L-x-L-L, ainsi que sa capacité à disperser les domaines ND10, via une région riche en proline située au centre de la protéine, contribuerait respectivement à son rôle dans la relâche et l'assemblage de nouveaux virions (Nakahara et al., 2002; Raj et al., 2004).

1.1.2.2.7 Protéine E5

La protéine E5 est une protéine transmembranaire d'approximativement 83 kDa dont la séquence varie beaucoup entre les différents types de PV (DiMaio and Mattoon, 2001). Cette protéine virale contribue à l'amplification du génome dans les kératinocytes en différenciation et est considérée comme un oncogène puisqu'elle potentialise les fonctions de E6 et E7 (Fehrmann et al., 2003; Genther et al., 2003). Une étude suggère également qu'elle serait importante pour le maintien de l'épisome, mais de plus amples recherches seront nécessaires pour déterminer l'implication de E5 dans ce processus (Klumpp et al., 1997).

La nature hydrophobique de E5 lui permet de s'insérer dans la membrane bi-lipidique de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique (RE) et de la membrane plasmique (Conrad et al., 1993). De façon générale, E5 se replie en trois domaines transmembranaires et ses domaines N- et C-terminaux émergent de chaque côté de la membrane (Borzacchiello et al., 2010). Bien que la protéine E5 du virus du papillome bovin (VPB) transforme les cellules dans lesquelles elle est exprimée en activant le récepteur de croissance PDGF β (*Platelet-Derived Growth Factor*), le pouvoir transformant des protéines E5 des VPH est beaucoup plus faible (Suprynowicz et al., 2005). En fait, malgré le fait que la surexpression de E5 mène au développement de tumeurs de la peau et que son expression induise des cancers du col de l'utérus dans les modèles murins (Maufort et al., 2010; Maufort et al., 2007), son rôle oncogénique se situerait plutôt au niveau de l'activation du pouvoir oncogénique des protéines E6 et E7 (Bouvard et al., 1994; Stoppler et al., 1996; Suprynowicz et al., 2005; Valle and Banks, 1995). D'ailleurs, une étude récente suggère que la morphologie de cellules atypiques retrouvées dans les lésions cancéreuses proviendrait de l'action combinée de E6 et de E5 (Krawczyk et al., 2008b). La capacité de E5 à inhiber différentes voies d'apoptose (Kabsch and Alonso, 2002; Kabsch et al., 2004; Oh et al., 2010), à interférer avec la communication intercellulaire en détruisant les jonctions de type gap (Oelze et al., 1995; Tomakidi et al., 2000a), à promouvoir la croissance indépendante de l'ancrage des cellules en stimulant l'activité du récepteur de

croissance EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) et à stimuler l'activité des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) indépendamment de l'activation de EGFR contribuerait à l'augmentation du potentiel oncogène de E6 et E7 (Crusius et al., 1997; Crusius et al., 2000; Leechanachai et al., 1992; Straight et al., 1993; Tomakidi et al., 2000b). En plus de stimuler l'activité de EGFR, E5 interfère avec la dégradation de ce récepteur en inhibant l'acidification des endosomes où il est normalement dégradé (Conrad et al., 1993; Disbrow et al., 2005; Straight et al., 1995). Bien que plusieurs études aient préalablement suggéré que l'interaction de E5 avec une sous-unité de l'ATPase H⁺ vacuolaire était responsable de l'inhibition de l'acidification des endosomes tardifs, une étude récente démontre que E5 interférerait plutôt avec la fusion des endosomes précoces avec les vésicules acides de l'endosome tardif et des lysosomes (Suprynowicz et al., 2010). Finalement, il a été proposé que E5 contribuerait à l'agressivité des cellules immortalisées par E6 et E7 en favorisant la motilité cellulaire et en inhibant l'adhésion cellulaire, deux pertes de fonctions qui favorisent la formation de métastases (cellule tumorale se détachant de la tumeur initiale) (Borzacchiello et al., 2010).

En plus d'avoir des fonctions oncogéniques, E5 permet à la cellule infectée d'échapper à la surveillance du système immunitaire adaptatif et inné. Spécifiquement, il interfère avec la présentation d'antigènes viraux et l'activation des cellules NK (*Natural Killer*) en réduisant l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (CMH I et CMH II) et de CD1d (*Cluster of Differentiation 1d*), une protéine de surface qui active les cellules NK. Cette inhibition se ferait via la séquestration de ces protéines transmembranaires à la membrane de l'appareil de Golgi et du RE (Ashrafi et al., 2006; Campo et al., 2010; Miura et al., 2010; Zhang et al., 2003). La capacité de E5 à inhiber l'acidification des endosomes contribuerait également à ce processus en inhibant la maturation des CMH I (Zhang et al., 2003).

Finalement, il a été démontré que la protéine E5 interagit avec la karyophérine β 3 et avec la protéine Bap31 (*B-cell-Associated Protein 31*) et qu'elle augmente l'expression de la protéine kinase C-delta (PKC : *Protein Kinase C*), de la phosphoinositide-kinase de type

3 ainsi que de deux constituants des radeaux lipidiques : la caveolin-1 et la ganglioside GM1 (Kivi et al., 2008; Regan and Laimins, 2008; Suprynowicz et al., 2008). Ces derniers joueraient possiblement un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire par E5 ainsi que dans l'activation de EGFR. L'importance de ces fonctions au cours du cycle viral demeure toujours inconnue (Krawczyk et al., 2008a).

1.1.2.3 Protéines tardives

1.1.2.3.1 Protéine L1

L1 est une protéine d'environ 530 acides aminés dont la séquence nucléotidique est utilisée pour faire la classification des papillomavirus (Section 1.1.3). L1 est la protéine majeure de la capsid. En fait, 360 protéines L1 s'assemblent en 72 capsomères pour former plus de 80 % de la capsid. Le haut potentiel immunogénique de L1 ainsi que sa capacité à s'auto-assembler en particules similaires au virus, VLP, est à la base de son utilisation pour le développement de vaccins prophylactiques (Section 1.2.2.2). Dans la capsid virale, le domaine C-terminal de la protéine L1 lui permet d'établir une série de ponts disulfure inter- et intra-pentamériques à l'extérieur de la capsid ainsi qu'à l'intérieur des sillons formés à la jonction pentamérique. Parmi les interactions établies par L1, le pont disulfure créé entre la cystéine 428 et la cystéine 175 serait essentiel à l'interaction inter-pentamères (résumé dans (Sapp and Day, 2009)). Bien que la création de ces ponts disulfures ne soit pas essentielle à la formation de la capsid, ils stabilisent fortement le nouveau virion. La formation de ces ponts serait à la source de la longue maturation des PV (Buck et al., 2005).

L'entrée virale est extrêmement dépendante de la protéine L1. En fait, celle-ci est non seulement responsable du premier attachement entre la particule virale et la cellule hôte, mais elle serait également nécessaire à l'interaction entre le virus et son récepteur secondaire, suite au dévoilement d'un autre de ces domaines au cours de l'entrée virale. Finalement, à la suite de son internalisation, la migration de la capsid vers les endosomes

tardifs serait également dépendante de la protéine L1 (Sapp and Day, 2009; Schiller et al., 2010).

1.1.2.3.2 Protéine L2

L2 est la protéine mineure de la capsid, mais les fonctions qui lui sont associées sont très nombreuses (Sapp and Day, 2009). Au sein de la capsid, cette protéine d'un peu moins de 500 acides aminés interagit avec L1 et est localisée au centre de chaque pentamère. L2 joue un rôle de stabilisateur et une grande proportion de la protéine est enfouie à l'intérieur de la capsid. Récemment, il a été démontré que la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines localisées dans la région N-terminale de la protéine L2 est essentielle à l'infectivité du virus (Campos and Ozburn, 2009).

Au cours de l'interaction de la capsid avec l'hôte, la liaison de L2 à la membrane basale serait responsable du changement de conformation qui permet d'exposer son domaine N-terminal. Ce domaine contient une séquence consensus R-x-K/R-R qui, une fois exposée, est reconnue et clivée par une proprotéine convertase cellulaire, la furin, ou via une proprotéine convertase homologue, la PC5/6, une étape requise pour l'infection (Richards et al., 2006). Suite à la décapsidation partielle de la capsid, L2 quitte l'endosome tardif grâce à la déstabilisation de la membrane de l'organelle par une séquence hydrophobe localisée dans son domaine C-terminal (Kamper et al., 2006). Le domaine C-terminal de L2 serait également important pour son interaction avec le génome viral. Les mécanismes exacts utilisés par la protéine pour entrer dans le noyau sont encore inconnus, mais l'interaction de L2 avec deux dynéines (DYLNT1 et DYLNT3) (Schneider et al., 2011), des protéines interagissant avec le réseau de microtubules, suggère que ce réseau est important pour l'import nucléaire de L2. Il est également possible que le signal de localisation nucléaire situé dans le domaine C-terminal de L2 soit nécessaire pour cette activité (Sun et al., 1995). Lorsque la protéine L2 est surexprimée, on la retrouve à l'intérieur de sous-domaines nucléaires appelé ND10 (Day et al., 1998; Lin et al., 2009). En interagissant directement avec L1 et E2, L2 induit leur relocalisation dans des ND10 où

l'on retrouve également l'ADN viral. Ces observations suggèrent que l'assemblage des capsides et l'encapsidation du génome se font dans ces domaines (Day et al., 1998; Sapp and Day, 2009). Finalement, la capacité de L2 à inhiber l'activité de transactivation de E2, tout en préservant son activité de réplication, favoriserait l'encapsidation du génome viral (Heino et al., 2000; Okoye et al., 2005).

1.1.3 Classification

Le premier type de PV a été identifié il y a plus de 35 ans et depuis, près de 200 nouveaux types ont été isolés (Coggin and Zur Hausen, 1979; Orth et al., 1977). Parmi ceux-ci, plus de 120 types ont été isolés chez l'humain, 64 chez les mammifères non humains (ex. : le lapin, le chien, le bœuf, le cheval, etc.), 3 chez les oiseaux et 2 chez les reptiles (Bernard et al., 2010). La classification des PV en genres, espèces, types, sous-types et variants se base sur l'homologie de la séquence du cadre de lecture ouvert de L1, soit la séquence nucléotidique la plus conservée dans le génome viral (de Villiers et al., 2004). Spécifiquement, un nouveau genre est défini si sa séquence L1 a moins de 60 % d'homologie avec des séquences déjà décrites, tandis qu'on retrouve de 60 à 70 % d'homologie entre les séquences L1 d'une même espèce. On définit un nouveau type lorsque sa séquence L1 diffère de plus de 10 % d'autres séquences de son espèce, un nouveau sous-type lorsqu'elle diffère de 2 à 10 % des séquences L1 du même type, et un variant lorsque sa séquence diffère de moins de 2 % des séquences du même sous-type (de Villiers et al., 2004). Lorsque les séquences nucléotidiques des cadres de lecture ouverts d'autres protéines virales telles que celles des protéines E6 et E7 ont été utilisées pour établir la phylogénie des PV, des conclusions similaires à celles obtenues avec la séquence du gène L1 ont été obtenues (Chan et al., 1995; Myers et al., 1994; Van Ranst et al., 1992a; Van Ranst et al., 1992b; Van Ranst et al., 1992c). Puisque les PV d'un même genre peuvent être associés à différentes pathologies et qu'une même pathologie peut être causée par des PV de différents genres, les pathologies associées aux PV ne sont pas utilisées comme critère de classification (de Villiers et al., 2004). Néanmoins, les PV d'une même espèce

sont généralement associés à des pathologies similaires. Par exemple, les VPH de type 2, 27 et 57, qui font partie de l'espèce 2, sont tous associés au développement de verrues de la peau chez l'humain. Les pathologies spécifiquement associées aux différents types de VPH sont décrites dans la prochaine section.

1.2 Virus du papillome humain

Les virus du papillome humain (VPH) sont répartis en cinq grands genres. Les VPH cutanés sont rassemblés dans les genres Beta, Gamma, Mu et Nu, et infectent principalement l'épiderme de la peau (de Villiers et al., 2004). Le genre alpha regroupe presque exclusivement les VPH infectant les épithéliums des muqueuses. Seule l'espèce VPH 2, faisant partie du genre alpha, fait exception à la règle puisque celui-ci est retrouvé dans les verrues cutanées. Les VPH cutanés sont généralement associés au développement de verrues bénignes, telles que les verrues vulgaires, plantaires, filiformes, du boucher et unguéales (Majewski and Jablonska, 1997). Cependant, chez les gens souffrants d'épidermodysplasie verruciforme (EV), une maladie génétique rare caractérisée par une sensibilité anormale de la peau aux VPH (révisé dans (Gewirtzman et al., 2008)), certains types de VPH cutané sont associés au développement de pathologies plus sévères. Les VPH muqueux, quant à eux, sont associés à différentes pathologies et sont sous-classés selon leur potentiel oncogénique en types dits à bas risque ou à haut risque. Ainsi, les VPH muqueux à bas risque sont retrouvés dans des lésions bénignes menant au développement de condylomes. On les retrouve aussi dans les cas de papillomatose laryngo-trachéo-pulmonaire (ou papillomatose laryngée). Cette dernière est une maladie rare, agressive et récidivante qui est transmise de la mère à l'enfant au moment de l'accouchement et qui entraîne une dégradation importante de la fonction respiratoire (révisé dans (Xue et al., 2010)). Les VPH muqueux à haut risque sont, quant à eux, associés avec l'apparition de lésions malignes pouvant mener au développement de différents cancers anogénitaux, tels

que le cancer du col de l'utérus, de l'anus, du pénis, de la vulve et du vagin (révisé dans (zur Hausen, 2009)).

Bien que généralement chaque VPH soit spécifique à une région anatomique donnée (cutanée vs anogénitale), il arrive que certains VPH puissent infecter plusieurs régions différentes. Par exemple, le VPH de type 16 a été retrouvé dans les muqueuses non anogénitales, anogénitales ainsi que dans les épithéliums cutanés. De façon plus détaillée, le VPH de type 16, qui a d'abord été isolé dans un cancer du col de l'utérus, a également été isolé dans certains types de cancers oraux, tels que le cancer du larynx, de l'œsophage et des poumons, ainsi que dans certains types de cancers cutanés, tels que le carcinome épidermoïde péri unguéal (cancer de l'ongle) (Riddell et al., 2011).

1.2.1 Pathologies associées aux VPH anogénitaux.

Plus de 40 types de VPH infectent spécifiquement la région anogénitale (de Villiers et al., 2004). Ils sont transmis au cours de rapports sexuels vaginaux, anaux et oraux. En fait, l'infection au VPH est l'infection transmise sexuellement (ITS) la plus commune aux États-Unis (Weinstock et al., 2004; Wiley and Masongsong, 2006). Environ 75 % des individus sexuellement actifs contractent une infection au VPH au cours de leur vie et l'efficacité du condom contre ce type d'infection n'est que de 60 à 70 % (Habel et al., 1998; Manhart and Koutsky, 2002; Munk et al., 1997; Van Den Eeden et al., 1998). Le *Center for Disease Control (CDC)* estime que plus de 20 millions de personnes sont actuellement infectées par le VPH aux États-Unis et que plus de 6 millions de nouveaux cas sont détectés chaque année (CDC). Au niveau mondial, on estime que plus de 440 millions d'individus sont infectés au VPH (CDC).

L'infection au VPH dure en moyenne de 13 à 16 mois selon le type de VPH, et dans 90 % des cas, l'infection est asymptomatique et complètement éliminée par le système immunitaire de l'hôte à l'intérieur d'une période de deux ans (Brown et al., 2005; Franco et al., 1999; Giuliano et al., 2002; Richardson et al., 2003; Stanley, 2006). Lorsque l'infection

au VPH à haut risque n'est pas enrayée, sa persistance peut mener à l'apparition de lésions malignes variant de lésions précancéreuses mineures à majeures (décrites ci-dessous), et pouvant progresser chez la femme jusqu'au cancer du col de l'utérus (Schlecht et al., 2001). Puisque le système immunitaire inhibe la persistance de l'infection, les patients immunosupprimés (Lawrence et al., 2005; Paternoster et al., 2008; Ulrich et al., 2008) ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Palefsky, 2007; Stanley, 2009) sont plus à risque de développer des pathologies plus graves à la suite d'une infection.

1.2.1.1 VPH à bas risque oncogénique

Le VPH a d'abord été connu sous le nom de « virus des verrues humaines » à la suite de son isolation à partir de verrues génitales par Giuseppe Ciuffo en 1907. Aujourd'hui, on sait que l'un ou l'autre des sous-types de VPH 6 ou 11 est retrouvé dans la totalité des cas de verrues génitales (révisé dans (Lacey, 2005; Lacey et al., 2006)). Bien que le taux de transmission des verrues génitales soit évalué à 65 %, celles-ci sont cliniquement apparentes dans seulement 1 à 2 % de la population active sexuellement (Koutsky, 1997; Lacey, 2005; Lacey et al., 2006; Schiffman et al., 2007). Les types de VPH 6 et 11 sont aussi retrouvés dans la totalité des cas de papillomatose laryngo-trachéo-pulmonaire et, dans de très rares cas, dans des carcinomes de cellules squameuses et des cancers génitaux (tels que le condylome acuminé géant) (Gissmann et al., 1984; Gissmann et al., 1982a; Gissmann et al., 1982b; Gissmann et al., 1983a; Gissmann et al., 1983b; Zachow et al., 1982). Selon différentes études, l'apparition de verrues génitales serait fortement liée aux comportements sexuels, mais contrairement aux néoplasies associées aux infections par les VPH à haut risque, leur apparition serait peu influencée par des facteurs externes, tels que la cigarette et la prise de contraceptifs oraux (Habel et al., 1998; Munk et al., 1997).

Bien que la plupart des infections et pathologies associées aux VPH anogénitaux à bas risque oncogénique ne soient pas mortelles, d'importants coûts sont engendrés par le traitement des verrues génitales et les opérations ablatives nécessaires pour le traitement

des papillomatoses laryngo-trachéo-pulmonaires. Ces coûts ont été respectivement estimés à plus de 200 et 150 millions de dollars aux États-Unis en 2005 (Derkay, 1995; Insinga et al., 2005). En plus de l'apparition d'onguents topiques à base d'imiquimod ou de *Polyphenon*®, l'avènement des vaccins prophylactiques (Section 1.2.2.2) permettra possiblement de réduire de manière significative la prévalence de ces infections de même que les coûts qui y sont rattachés.

1.2.1.2 VPH à haut risque oncogénique

Le lien de cause à effet entre le VPH et le développement du cancer du col de l'utérus a été initialement établi par le Dr zur Hausen, ce qui lui a valu le « prix Nobel de physiologie ou médecine » en 2008 (zur Hausen, 1976). Ce lien cause à effet n'a toutefois pas toujours été si bien accepté.

La première preuve que le cancer cervical consistait en une pathologie transmise sexuellement provient d'une étude réalisée en 1842 par le Dr Rigoni-Stern (Rigoni, 1987). À l'époque, l'analyse du certificat de décès de plusieurs femmes avait permis de déterminer que le cancer du col de l'utérus était détecté chez les femmes mariées et les prostituées, mais pas chez les femmes vierges et les religieuses. Depuis, les avancées scientifiques ont permis de démontrer que l'infection de la région anogénitale par les VPH à haut risque oncogénique est une cause essentielle du développement du cancer du col de l'utérus. Historiquement, trois découvertes majeures ont permis d'établir le rôle de l'infection dans le développement de tumeurs. Tout d'abord, on a découvert que l'expression des protéines virales E6 et E7 des VPH à haut risque était seulement détectée dans les kératinocytes provenant de cancers du col de l'utérus et non dans celles provenant d'un col de l'utérus sain (Schwarz et al., 1985; Yee et al., 1985). Une série de découvertes a ensuite permis de déterminer que l'interaction de ces protéines avec les protéines cellulaires p53 et pRb était suffisante pour immortaliser les kératinocytes et que ces interactions étaient responsables du phénotype néoplasique des cellules du cancer cervical (DiPaolo et al., 1986; Durst et al., 1987; Dyson et al., 1989; Pirisi et al., 1987; von Knebel Doeberitz et al., 1994; von Knebel

Doeberitz et al., 1992; Werness et al., 1990). Finalement, deux études épidémiologiques de grande envergure ont permis de confirmer que l'infection au VPH à haut risque oncogénique est le facteur de risque principal pour le développement du cancer du col de l'utérus (Bosch et al., 1995; Munoz et al., 1992).

Les VPH à haut risque oncogénique sont présents dans plus de 95 % des cancers du col de l'utérus ainsi que dans plusieurs cancers anogénitaux. Une monographie du IARC (*International Agency for Research Cancer*) publiée en 2007 stipule que suffisamment de preuves ont été obtenues chez les humains pour démontrer la carcinogénicité des VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 66 dans le cancer cervical du col de l'utérus (IARC, 2007). D'ailleurs, suite à cette monographie, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a reconnu officiellement le VPH comme un carcinogène. Les VPH sont retrouvés en différentes proportions dans les cancers du col de l'utérus. Ainsi, les VPH de types 16 et 18 sont retrouvés dans plus de 70 % des cancers de ce type, tandis que les VPH de types 31, 33, 35, 45, 52 et 58 sont retrouvés dans environ 20 % d'entre eux. Les VPH de types 35, 59, 56, 51, 39, 73, 68 et 82 sont quant à eux responsables des 5 % restants, avec une proportion variant pour chacun de 0,2 à 2 % des cas de cancer du col de l'utérus (Bosch et al., 2002; Bosch et al., 1992; Munoz et al., 1992; Schiffman et al., 2007). Le lien de causalité entre l'infection au VPH et le développement des cancers anogénitaux autres que le cancer du col de l'utérus n'est pas encore clairement établi. Il est cependant important de noter la présence de VPH à haut risque oncogénique dans 60 à 90 % des cancers de types anaux et vaginaux et dans plus de 50 % des cancers du pénis et de la vulve (Bezerra et al., 2001a; Bezerra et al., 2001b; Frisch et al., 1999; IARC, 2007; Ikenberg et al., 1983; Madsen et al., 2008a; Madsen et al., 2008b; Rubin et al., 2001). De plus, plusieurs études cliniques ont démontré que l'infection au VPH de type 16 est un facteur de risque important pour l'apparition des cancers de la vulve, du vagin, du pénis, de l'anus, des cavités orales ainsi que du cancer de l'oropharynx (IARC, 2007).

L'infection par les VPH à haut risque peut mener à l'apparition de lésions malignes variant de lésions précancéreuses à des lésions de type CIN3 (CIN, *Cervical Intraepithelial*

Neoplasia) (décrites ci-dessous), et peut progresser jusqu'à un cancer invasif (Schlecht et al., 2001). La gravité des lésions retrouvées sur le col de l'utérus est classifiée selon le niveau de dysplasie observé, c'est-à-dire à la proportion de l'épithélium qui est envahie par des cellules non différenciées qui devraient habituellement se retrouver au niveau de la couche basale. Ainsi, la composition cellulaire d'un épithélium varie entre un col de l'utérus sain, un col contenant des lésions intraépithéliales squameuses de bas ou de haut grade (*Squamous Intraepithelial Lesion*, SIL), et un col contenant un cancer invasif (Fig. 1.5). Dans les SIL de bas grade, la dysplasie est confinée au premier tiers de l'épiderme. Cette dysplasie bénigne est appelée CIN1. Les SIL de haut grade sont quant à elles composées des CIN2 et 3 qui sont des dysplasies couvrant respectivement les deux tiers et plus des deux tiers de l'épithélium. Dans certains cas, la dysplasie du CIN3 couvre totalement l'épaisseur de l'épithélium et est considérée comme un carcinome *in situ* (localisé). Les lésions retrouvées sur les autres sites anogénitaux suivent le même type de classification que celle utilisée pour le col de l'utérus. Ainsi, on classe les dysplasies du vagin (*VAginal Intraepithelial Neoplasia*, VAIN), de la vulve (*Vulval Intraepithelial Neoplasia*, VIN), de l'anus (*Anal Intraepithelial Neoplasia*, AIN) et du pénis (*Penile Intraepithelial Neoplasia*, PIN) selon un grade allant de 1 à 3. Comme la présence et la différence entre ces différents grades de lésion ne sont pas aussi faciles à détecter que l'apparition de verrues génitales causées par les VPH à bas risque, la variation de la morphologie de l'épiderme est utilisée comme moyen de détection de dysplasies du col de l'utérus.

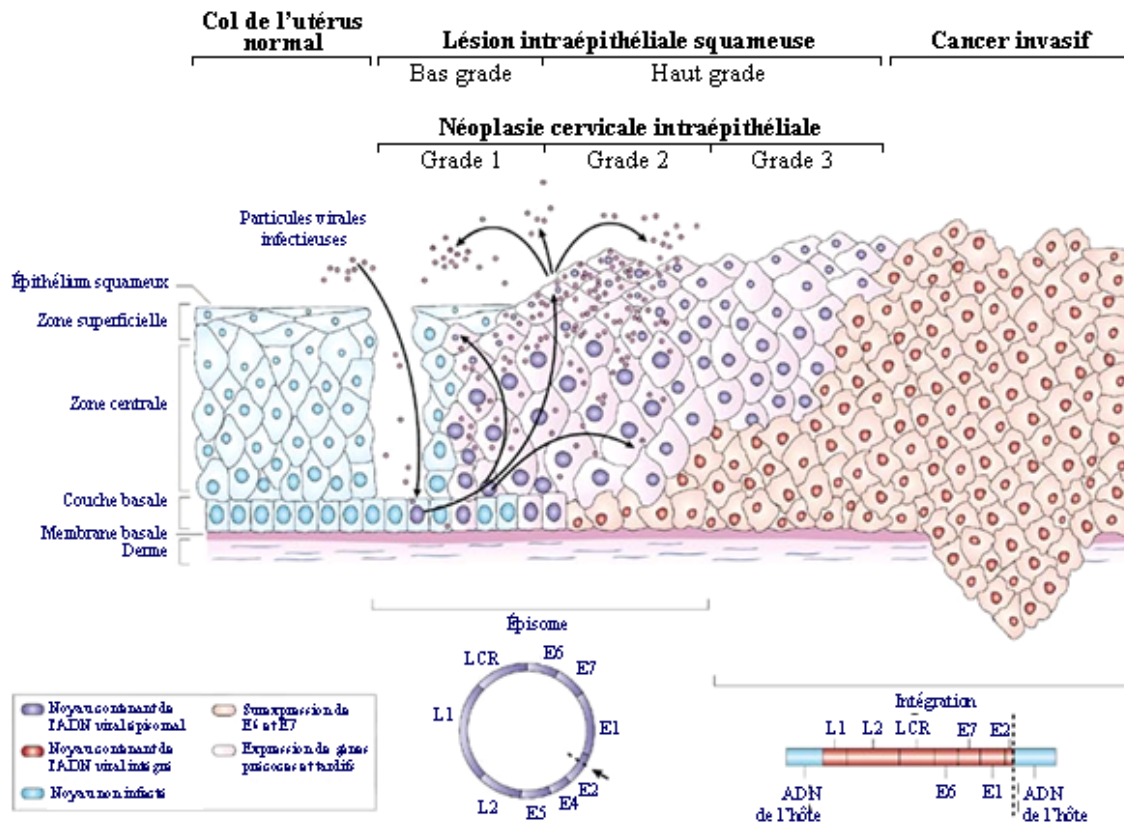


Figure 1.5. Morphologie de l'épithélium associée aux différents stades de progression de la carcinogénicité du virus du papillome humain.

Cette figure représente les différents stades de néoplasie observés dans l'épithélium des muqueuses à la suite d'une infection par le VPH à haut risque oncogénique. Les différents stades de néoplasie sont indiqués au-dessus de l'épithélium. Les noyaux des cellules non infectées sont représentés en bleu, tandis que ceux des cellules maintenant une forme épisomale ou intégrée du génome viral sont respectivement représentés en violet et en rouge. Dans les cellules maintenant l'épisome, l'expression des gènes précoces (E1, E2, E1^E4, E5, E6, E7 et E8^E2C) et tardifs (L1 et L2) est contrôlée à partir de la longue région de contrôle (LCR) et permet la production de nouveaux virions. Dans les cellules où le génome est intégré, la perte de contrôle de l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 induit une hyperprolifération pouvant mener à l'apparition d'un cancer invasif. Cette

figure a été adaptée de Woodman et al. (2007) Nature Reviews Cancer (Woodman et al., 2007).

Dans les pays industrialisés, la présence de cellules anormales est détectée au cours d'un test annuel, le test Papanicolaou, aussi connu sous le nom de test de Pap (Papanicolaou, 1942; Traut and Papanicolaou, 1943). Élaboré au début des années 1940, ce test utilise la microscopie pour déterminer si les cellules recueillies lors d'un frottis du col de l'utérus ont une morphologie normale ou dysplasique, une morphologie dite « koilocytaires » (noyau atypique et formation d'un halo périnucléaire caractéristique de la formation d'une vacuole autour du noyau (Koss and Durfee, 1955)). Selon le *National Cancer Institute* (NCI), plus de 90 % des femmes âgées de 18 ans et plus ont passé un test de Pap depuis 2008, ce qui a permis de diminuer l'incidence du cancer du col de l'utérus de plus de 70 % dans les pays industrialisés. À la suite d'un test de Pap positif, la présence de lésions précancéreuses est confirmée par une inspection visuelle ou par une colposcopie du col de l'utérus préalablement traité avec de l'acide acétique dilué pour colorer en blanc les cellules dysplasiques. Finalement, puisque les analyses visuelles, cytologiques et histologiques des lésions précancéreuses ne permettent pas de déterminer si les cellules dysplasiques sont infectées par le VPH, les techniques de détection d'acides nucléiques viraux (ADN ou ARN) sont utilisées pour confirmer l'infection (révisé dans (IARC, 2007)). Actuellement, les deux techniques les plus utilisées sont la version 2 du *Hybrid CaptureTM*, qui permet de détecter un grand nombre de spécimens, et la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui, contrairement au *Hybrid CaptureTM*, discrimine les types de VPH retrouvés dans les spécimens.

Plusieurs types de facteurs peuvent influencer la progression de la pathologie causée par un VPH à haut risque. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs environnementaux tels que la consommation de cigarettes, l'utilisation prolongée de contraceptifs oraux ainsi qu'un nombre fréquent de grossesses. La progression de la pathologie peut aussi être influencée par la présence d'autres types d'ITS telles que l'infection par le VIH, par le VHS2 (Virus de l'Herpes Simplex) ou par la bactérie *Chlamydia trachomatis*. Tel que

mentionné à la section 1.1.2.2, l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 au cours de l'infection au VPH est nécessaire à l'immortalisation cellulaire. Cependant, elle n'est pas suffisante pour induire le développement d'un cancer. Ainsi, tout facteur favorisant l'accumulation d'altérations génétiques chez le patient infecté par le VPH, par exemple la consommation de cigarettes (contient beaucoup de carcinogènes), favorise la progression de la maladie (Castellsague et al., 2002; IARC, 2007; Munoz et al., 2006; Rajkumar et al., 2011). En plus des facteurs externes favorisant le développement de pathologies sévères, l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte serait aussi un facteur de risque (Collins et al., 2009; Cricca et al., 2009; Daniel et al., 1995; Schwarz et al., 1985). Tel que mentionné précédemment, la surexpression des oncogènes E6 et E7, qui est induite par la destruction du gène E2 au cours de l'intégration, serait à l'origine de cet effet (Fig. 1.5) (Cricca et al., 2009). Dans le même ordre d'idées, la méthylation des E2BS contribuerait également à la progression de la pathologie en empêchant la liaison de E2 à ceux-ci, causant ainsi la dé-répression de la transcription des gènes E6 et E7 (Kim et al., 2003; Sanchez et al., 2008). En accord avec cette hypothèse, des études suggèrent que dans les cas de cancer du col de l'utérus où le cadre de lecture de la protéine E2 n'est pas détruit, le génome viral serait plus méthylé (Bhattacharjee and Sengupta, 2006; Daniel et al., 1995; Kalantari et al., 2004; Schwarz et al., 1985).

Tel que mentionné précédemment, l'utilisation du test de Pap depuis les 50 dernières années a grandement contribué à la réduction des nouveaux cas de cancers cervicaux dans les pays industrialisés. Cependant, plus de 12 000 nouveaux cas de cancers invasifs du col de l'utérus sont encore répertoriés chaque année aux États-Unis et près de 4000 décès y sont associés (ACS, 2010; IARC, 2008). Le taux de mortalité annuel associé à ce type de cancer est encore plus élevé dans les pays en voie de développement où les méthodes de dépistage sont virtuellement absentes. On estime que le nombre de femmes mourant d'un cancer du col de l'utérus s'y élève à plus de 200 000 par année (ACS, 2006; Batson et al., 2006).

1.2.2. Traitements des pathologies associées à l'infection par le VPH

Le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus prévalent et le troisième plus mortel chez les femmes au niveau mondial (IARC, 2007). La plupart des traitements qui sont utilisés pour enrayer les verrues ou les lésions précancéreuses sont basés sur des méthodes de destruction ou d'excision de la région atteinte. Cependant, aucune ne cible directement le VPH. Le but premier de ces ablations est de réduire suffisamment la région infectée pour permettre au système immunitaire d'enrayer l'infection. Depuis quelques années, l'apparition de deux vaccins prophylactiques prévenant soit les infections par les VPH de type 6, 11, 16 et 18, ou seulement par les VPH 16 et 18 nous permet de croire que les pathologies liées aux VPH diminueront grandement au cours des prochaines décennies. L'absence de traitements curatifs ciblant directement l'infection au VPH est tout de même problématique puisque ces vaccins sont inefficaces chez les patients déjà infectés. Le développement de petites molécules inhibitrices ciblant différentes étapes de la réplication de l'ADN viral ou les fonctions des protéines oncogéniques serait donc nécessaire. Les différents types de traitements existants ainsi que ceux qui sont en développement seront abordés dans cette section.

1.2.2.1 Traitement des verrues génitales et des lésions précancéreuses

En présence de pathologies bénignes (ex. : verrues génitales), des traitements cytotoxiques, tels que la cryothérapie, l'électrodessication, l'excision chirurgicale ou des techniques d'ablation au laser, sont utilisés (Zanotti and Belinson, 2002). L'acide trichloridrique et la podophiline, des agents cytotoxiques qui induisent respectivement une coagulation massive des protéines et une inhibition de la progression cellulaire en G2/M, sont également appliqués sur les dysplasies bénignes induites par une infection au VPH. De façon générale, on applique également des immunomodulateurs sur la région à traiter afin d'activer la réponse immunitaire et favoriser l'élimination de l'infection. Parmi les immunomodulateurs les plus utilisés, on retrouve l'imiquimod, un agoniste des récepteurs de type toll-7 (*Toll Like Receptor*, TLR), ainsi que l'interféron (IFN).

En présence de lésions précancéreuses, des traitements similaires sont utilisés. Ainsi, on utilise la cryothérapie, l'électrocautérisation, la vaporisation de dioxyde de carbone ainsi que la thermocoagulation afin de détruire la région de l'épiderme qui est affectée. En plus des techniques d'excision standards utilisant le laser ou le scalpel, des procédures, telles que l'excision par électrode chirurgicale (*Loop Electrosurgical Excision Procedure*, LEEP) et l'excision par électrode chirurgicale de la zone de transformation (*Loop Electrosurgical Excision of the Transformation Zone*, LLETZ), ont été spécifiquement développées pour enlever de très petites portions de l'épithélium de la peau et des muqueuses (Gundersen and Nichols, 1994; Melnikow, 1995; Mooring et al., 2011). De façon générale, l'efficacité de ces traitements dépend grandement de la capacité du chirurgien à enlever la totalité de l'infection, et dans 10 à 20 % des cas, une récurrence de la maladie est observée suite au traitement (Mitchell et al., 1998; van Hamont et al., 2006). Finalement, des techniques de chirurgie radicales, telles que l'ablation du col ou de la totalité de l'utérus (hystérectomie), sont utilisées lorsque la progression de la pathologie est trop avancée.

1.2.2.2 Vaccins prophylactiques

Lors d'une infection virale, le système immunitaire est activé par la détection d'un ADN ou ARN étranger, ou encore par la présence de cellules infectées qui expriment des facteurs de stress et/ou entrent en apoptose. L'infection au VPH ne fait pas exception et induit généralement une séropositivité. Cette dernière est cependant de courte durée et est inefficace contre une infection ultérieure par le même type de VPH (révisé dans (Frazer, 2009)). Deux phénomènes physiques expliquent pourquoi le VPH n'induit pas de fortes réponses immunitaires. Dans un premier temps, les cellules de Langerhans, retrouvées dans la couche épineuse et qui constituent la seule surveillance du système immunitaire dans l'épiderme (système immunitaire inné), ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules de l'épithélium. Deuxièmement, la compartimentation de l'expression des gènes viraux permet d'éviter l'activation de la réponse immunitaire. Ainsi, l'expression des protéines précoces est maintenue à de faibles niveaux dans la couche basale et l'expression

des protéines de la capsid L1 et L2, qui sont les plus immunogéniques, est confinée aux couches supérieures de l'épithélium (Frazer, 2009). Malgré une faible activation du système immunitaire, une élimination naturelle de l'infection par le VPH est observée chez la plupart des individus infectés. Bien que le système immunitaire soit capable d'engendrer une réponse suffisante contre le pathogène, les types de réponses impliqués dans ce processus restent encore peu compris.

Au début des années 1990, il a été démontré qu'une forme recombinante de la protéine majeure de la capsid virale L1 pouvait être utilisée pour former des VLP en solution (Kirnbauer et al., 1993; Zhou et al., 1992). Comme L1 est la protéine virale ayant le plus grand potentiel immunogénique, l'incorporation de plus de 360 exemplaires de L1 dans chaque VLP rend le VLP hautement propice à générer une réponse immunitaire efficace. Trois grandes études cliniques ont d'ailleurs démontré que la vaccination avec les VLP est suffisante pour induire la production d'un grand nombre d'anticorps neutralisants, protégeant du coup l'organisme contre de futures infections par les VPH de même type que ceux des protéines L1 utilisées (Stanley, 2010a). L'avènement de ces VLP est à la source du développement des deux vaccins prophylactiques qui ciblent les types de VPH les plus prévalents dans les verrues génitales et dans le cancer du col de l'utérus (VPH 6, 11, 16 et 18). Gardasil® est un vaccin quadrivalent produit par la compagnie pharmaceutique Merck Frosst et qui protège contre deux types de VPH à bas risque, les VPH 6 et 11, et deux types à haut risque oncogénique, les VPH 16 et 18. Ce vaccin est produit en levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et est administré en même temps qu'une dose de sulfate d'hydroxyphosphate (AAHS) utilisée à titre d'adjuvant. En juin 2006, la *Food and Drug Administration* (FDA) a autorisé l'utilisation du vaccin Gardasil® de façon préventive chez les jeunes femmes âgées de 9 à 26 ans. Ces recommandations ont été acceptées au Canada vers la fin de l'année 2007 et le vaccin quadrivalent est aujourd'hui utilisé au cours de campagnes de vaccination préventives dans les écoles canadiennes (Shefer et al., 2008). Le second vaccin, Cervarix®, est un vaccin bivalent produit par la compagnie GlaxoSmithKline. Il protège contre les VPH de types 16 et 18. Cervarix® est produit dans

des cellules ovariennes d'insectes (Sf9, *Spodoptera frugiperda*) et est administré en même temps que l'adjuvant monophosphoryl lipide A 3-déacétylé (AS04). En octobre 2009, l'*Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) a recommandé son utilisation dans les campagnes de vaccination similaires à ceux décrits pour le vaccin quadrivalent de Merck Frosst. L'utilisation des deux vaccins pour la vaccination préventive des jeunes hommes fait toutefois encore l'objet de plusieurs débats (Giuliano et al., 2010; Partridge et al., 2007; Zimet and Rosenthal, 2010). Jusqu'à maintenant, ces vaccins ont démontré une grande efficacité contre les maladies anogénitales causées par les VPH ciblés et une protection approchant 100 % est observée, même plus de 5 ans après la vaccination (Ault, 2007; Garland et al., 2007; Joura et al., 2007; Villa et al., 2006). De plus, bien que ces deux vaccins aient été conçus à l'origine pour protéger spécifiquement contre l'infection de VPH de certains types, plusieurs études suggèrent maintenant que grâce à la réactivité croisée des anticorps produits à partir des VLP, ces vaccins immuniseraient également contre d'autres types de VPH, tels que les VPH 31 et 45 (Szarewski, 2010). Toutefois, la réactivité croisée des anticorps n'est pas aussi efficace contre les VPH de type 52 et 58 qui représentent plus de 5 % des cas de cancer du col de l'utérus (Kemp et al., 2011; Szarewski, 2010). Des recherches sont donc en cours afin de développer d'autres vaccins qui permettraient de protéger les individus contre un spectre plus large de VPH. Afin d'élargir le spectre de la protection induite par les VLP, les chercheurs se sont tournés vers la protéine L2, la seconde protéine composant la capsid virale du VPH. Bien que cette dernière ait un potentiel immunogénique plus faible que L1, son potentiel de réaction croisée est beaucoup plus élevé. Ainsi, son incorporation dans les VLP de type L1/L2 permettrait d'obtenir une immunisation qui est à la fois efficace et à plus large spectre. L'utilisation de tels VLP, ainsi que la génération de vaccins de type non VLP formés de capsomères de L1 et de peptides de L2 sont actuellement en développement (Jagu et al., 2011; Karanam et al., 2009; Kwak et al., 2010; Stanley, 2010b).

1.2.2.3 Vaccins thérapeutiques

Tel que mentionné précédemment, les vaccins décrits ci-dessus protègent seulement la population non infectée au VPH et ne permettent pas d'éliminer le virus des cellules déjà infectées. Plusieurs vaccins thérapeutiques permettant d'induire une réponse immunitaire contre des protéines virales largement exprimées au cours de l'infection (E1 et E2) ou celles causant des pathologies plus sévères (E6 et E7) sont actuellement en développement. Des vaccins thérapeutiques utilisant des protéines de fusion de E6 et E7 ont été utilisés dans des études cliniques, mais, jusqu'à maintenant, les résultats obtenus se sont révélés peu concluants (Hung et al., 2008; Trimble and Frazer, 2009; Yan et al., 2009). Des études préliminaires suggèrent aussi que les protéines précoces E1 et E2 des VPH auraient un potentiel immunogénique suffisant pour être utilisées dans le développement de vaccins thérapeutiques à ADN. De manière plus précise, des ADN exprimant les protéines E1, E2, E6 et E7 en fusion avec une ubiquitine, ou des protéines E1 et/ou E2 dont la séquence codante a été optimisée afin de favoriser leur expression chez l'humain ont été testés comme vaccins thérapeutiques chez le lapin (*Cottontail Rabbit PapillomaVirus*, CRPV) et le chien (*Canine Oral PapillomaVirus*, COPV) (deux modèles animaux de l'infection au PV) (Brandsma et al., 2007a; Brandsma et al., 2004; Brandsma et al., 2007b; Johnston et al., 2005; Moore et al., 2002). En dépit du fait qu'une protection et une réduction considérable des papillomes aient été observées dans les deux modèles animaux, l'efficacité de ces approches chez l'humain reste inconnue.

1.2.2.4 Petites molécules inhibitrices

Bien qu'encore aujourd'hui, aucune thérapie antivirale ne permette de traiter l'infection au VPH, plusieurs petites molécules sont actuellement évaluées pour leur potentiel inhibiteur contre différentes étapes de la réplication du VPH. L'ensemble des développements dans ce domaine est d'ailleurs le sujet d'une revue de littérature que nous avons publiée en 2007 et qui peut être consultée à l'annexe 6 (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007). En résumé, les petites molécules inhibitrices en développement

ciblent trois événements majeurs du cycle de reproduction des VPH, soit 1) la réplication de l'ADN viral, 2) l'induction de l'hyperprolifération cellulaire (immortalisation) par les oncogènes viraux E6 et E7 dans les couches supérieures de l'épiderme ou 3) l'entrée virale. Un aperçu des sujets abordés dans la revue de littérature de 2007 est présenté dans cette sous-section.

La réplication de l'ADN viral est dépendante de l'interaction de E1 et E2 ainsi que de leur liaison à l'ADN. L'activité enzymatique ATPase de E1 est également essentielle pour la réplication de l'ADN viral (Section 1.4). Diverses petites molécules prévenant l'interaction entre E1 et E2, l'interaction de E1 et E2 avec l'ADN ou encore l'activité enzymatique ATPase de E1 ont donc été développées. Au début des années 2000, la compagnie pharmaceutique *Boehringer Ingelheim* a rapporté que de petites molécules de type indandione lient le domaine N-terminal de la protéine E2 des VPH 6 et 11 et font compétition à la liaison de E1. Le pouvoir inhibiteur de ces petites molécules a été observé autant *in vitro* que dans des essais de réplication transitoire *in vivo* (Section 1.3). Ces molécules inhibent spécifiquement l'interaction E1-E2 des VPH à bas risque, mais pas celle des VPH à haut risque (type 16, 18 et 31). Ceci est possiblement dû au fait que les acides aminés présents dans la pochette de liaison de l'inhibiteur situé dans le TAD de E2 sont peu conservés entre les différents types de VPH à haut risque. Comme l'assemblage d'un complexe de réplication de l'ADN viral dépend aussi de la liaison de E1 et de E2 à l'ADN, de petits polymères d'amides liant les séquences d'ADN spécifiquement liées par ces protéines virales ont été développés. Ainsi, il a été démontré que le polyamide PA1 inhibe la liaison de E2 sur l'ADN, tandis que deux polyamides de type imidazole-pyrrole inhibent celle de E1. Il est cependant important de noter que pour l'instant, le polyamide PA1 est seulement efficace *in vitro* et que des solutions permettant de résoudre l'incapacité du polyamide à se rendre au noyau cellulaire et à inhiber la liaison des protéines virales *in vivo* doivent être élaborées. Le développement d'inhibiteurs prévenant la liaison de E2 à l'ADN est très prometteur puisque de telles molécules permettraient également d'inhiber les deux autres activités de E2 essentielles au cycle viral, soit son activité de transactivation et sa

capacité à ségréger le génome viral au cours de la division cellulaire (Section 1.1.2.2.2). La dernière catégorie d'inhibiteurs de la réplication ayant été développée cible l'activité ATPase de E1. De façon plus détaillée, *Boehringer Ingelheim* a démontré en 2004-2005 que de petites molécules de type acide biphenylsulfonacétique inhibent la capacité du domaine C-terminal de E1 à hydrolyser l'ATP, et donc de dérouler l'ADN en amont de la fourche de réplication (Section 1.4). Puisque le domaine C-terminal de E1 est hautement conservé à travers les différents types de VPH, ces molécules, originellement décrites pour leur pouvoir d'inhibition sur les VPH de type 6 et 11, sont également efficaces contre le VPH de type 18 *in vitro*. L'instabilité de ces molécules, ainsi que leur incapacité à prévenir la réplication de l'ADN viral dans des essais *in vivo*, sont toutefois des problèmes qui devront être résolus au cours du développement de ces inhibiteurs.

L'immortalisation des cellules infectées par le VPH dépend de la capacité de la protéine E6 à lier et à dégrader la protéine cellulaire suppresseur de tumeur p53 (Section 1.1.2.2.5). Puisque la dégradation de p53 par E6 dépend de la liaison entre E6 et l'ubiquitine E3-ligase E6AP, plusieurs efforts ont été déployés pour développer de petites molécules inhibitrices de l'interaction E6-E6AP. L'identification du motif consensus de E6AP permettant sa liaison à E6, la détermination de la structure de ce motif ainsi que l'utilisation exhaustive de techniques de mutagenèse ont permis de développer un modèle pharmacophore et de l'utiliser dans un criblage de petites molécules *in silico*. Ainsi, deux types de molécules ayant respectivement des activités inhibitrices *in vitro* et *in vivo* ont été identifiés et sont actuellement en processus d'optimisation afin de développer de meilleurs inhibiteurs de l'interaction E6-E6AP (et conséquemment, de la dégradation de p53 par E6).

L'entrée du VPH dans les cellules épithéliales est de mieux en mieux comprise (Section 1.1.1.1) et ceci a été grandement facilité par le développement de VLP et de pseudovirus (Buck et al., 2004; Buck et al., 2005), c'est-à-dire de particules virales composées de L1 et de L2 similaires aux VLP, mais contenant de l'ADN viral ou non. L'utilisation de pseudovirus dans des essais de criblage à haut débit a permis de découvrir que le carraghénane (*carrageenan*), un polysaccharide sulfaté similaire au sulfate

d'héparan, inhibe l'attachement du VPH à la cellule hôte en liant spécifiquement la protéine L1 (Buck et al., 2006a; Buck et al., 2006b). Le carraghénane n'est pas spécifique à un type de VPH donné et permet l'inhibition de l'entrée virale des VPH de types 6, 16, 18, 31, 45. Ce composé pourrait potentiellement être utilisé comme microbiocide afin de prévenir la transmission des infections au cours des relations sexuelles.

Finalement, de petites molécules inhibant les fonctions de certaines protéines cellulaires ont également démontré un potentiel inhibiteur contre la carcinogénicité du VPH. Parmi celles-ci, des petites molécules inhibitrices des HDAC, de la Cdk2 et du facteur de transcription Sp1 ont démontré une activité anti-proliférative contre les cellules à l'origine du cancer du col de l'utérus, et dans certains cas, contre le cancer de patients infectés. Le mode d'action spécifique de ces inhibiteurs est inconnu, mais leurs cibles potentielles sont discutées dans la revue présentée en annexe 6 (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007).

1.3 Modèles d'étude de la réplication du génome viral

L'étude des papillomavirus a commencé très tôt dans l'histoire grâce à la découverte des virus du papillome du lapin (CRPV) et du papillome bovin (VPB). Le début des études du VPH a quant à lui eu lieu vers les années 1980 où les premiers virus à haut risque oncogénique ont été identifiés. Le sujet principal de cette thèse est la protéine E1 du VPH. Tel que mentionné précédemment, cette protéine est essentielle à la réplication de l'ADN viral. Ainsi, cette section portera surtout sur les modèles cellulaires couramment utilisés pour faire l'étude des fonctions de réplication de E1.

1.3.1 Modèles animaux

Le développement de pathologies associées à l'infection par les PV peut être étudié dans les modèles animaux du bœuf, du lapin et du chien (Campo, 2002). Les virus

spécifiques VPB, CRPV et COPV doivent être respectivement utilisés au cours de ces études, puisque chaque PV est spécifique à une espèce donnée. Dans tous les cas, l'infection induit l'apparition de verrues et celles-ci peuvent être respectivement observées sur la peau de la vache, sur la peau du lapin ou encore dans la bouche du chien. D'abord utilisés pour faire l'étude du potentiel oncogénique des PV, ces modèles animaux sont maintenant surtout utilisés pour l'étude de la réaction immunitaire contre les PV. D'ailleurs, ceux-ci sont grandement utilisés pour l'investigation de traitements potentiels contre les PV ainsi que pour le développement de vaccins thérapeutiques ciblant les protéines E1 et E2 (Section 1.2). Comme la réplication de l'ADN viral est requise pour le développement de ces pathologies, les fonctions de réplication des protéines E1 et E2 peuvent être étudiées dans ces modèles animaux (Johnston et al., 2005; Moore et al., 2002; Wu et al., 1994). Pour se faire, des mutations sont introduites directement dans les génomes viraux utilisés, au niveau du cadre de lecture ouvert de ces protéines.

1.3.2 Modèles cellulaires

De façon générale, la réplication de l'ADN viral est étudiée dans des modèles cellulaires. Ceux-ci se divisent en trois types : 1) les cellules non différenciées qui permettent de récapituler le maintien du génome viral, 2) les cellules différenciées qui permettent de reproduire l'amplification du génome viral, et 3) les lignées cellulaires immortalisées dans lesquelles une amplification transitoire de l'ADN peut être étudiée.

1.3.2.1 Maintien et amplification

Puisque le cycle du VPH se déroule dans un épithélium en différenciation, l'étude des VPH a été grandement ralentie par l'absence de modèles cellulaires. Ainsi, ce n'est qu'au début des années 1990 que les premiers modèles d'étude sont apparus. Parmi ceux-ci, des modèles basés sur l'utilisation de xénogreffes ont d'abord été employés puis des lignées cellulaires maintenant l'épisode viral ont fait leur apparition (Dollard et al., 1989; Dollard et al., 1992). Ainsi, en 1990-91, Rader et Bedell ont été les premiers à rapporter l'isolation

d'une lignée cellulaire capable de maintenir l'épisode du VPH 31b (Bedell et al., 1991; Rader et al., 1990). Cette lignée, dérivée d'une lésion de type CIN1, est nommée CIN-612 (Bedell et al., 1991; Hummel et al., 1992; Meyers et al., 1992). Subséquemment, des cellules, nommées W12-E, capables de maintenir la forme épisomale du génome du VPH 16 ont été isolées (Jeon et al., 1995; Stanley et al., 1989). Le maintien du génome peut aussi être étudié dans les kératinocytes primaires ainsi que dans des lignées cellulaires immortalisées. Pour ce faire, le génome viral est transfecté dans des kératinocytes primaires extraits de prépuces de nouveau nés (HFK : *Human Foreskin Keratinocytes*) ou dans des lignées de kératinocytes immortalisés de manières spontanées; les NIKS (*Normal Immortalized KeratinocyteS*, d'abord connus sous le nom de cellules BC-1-Ep/SL) et les HaCat (Allen-Hoffmann et al., 2000; Boukamp et al., 1988; Dickson et al., 2000; Fang et al., 2006; Flores et al., 1999; Frattini et al., 1997; Meyers et al., 1992; Meyers et al., 1997; Ozbun, 2002; Schoop et al., 1999; Wang et al., 2009). Finalement, ce type d'essai peut aussi être récapitulé dans les N-Tert, une lignée de kératinocytes immortalisés par une des sous unités de la télomérases (Dickson et al., 2000). Les lignées immortalisées sont surtout avantageuses pour les études réalisées avec les VPH à bas risque qui, contrairement aux VPH à haut risque, ne peuvent pas immortaliser les kératinocytes primaires. Tous les types cellulaires décrits ci-dessus peuvent être utilisées pour étudier l'amplification du génome viral. Pour ce faire, la différenciation de ces types cellulaires doit être induite dans un montage permettant la croissance des cellules à l'interface de l'air et du liquide (culture de type radeau : *raft culture*) ou via leur immersion dans un milieu riche en calcium ou en méthylcellulose (Hummel et al., 1992; Moody et al., 2007; Thomas et al., 2001). Ces cellules différenciées ont les mêmes caractéristiques que des kératinocytes normalement différenciés (Frattini et al., 1997; Green et al., 1977; Ruesch and Laimins, 1998; Ruesch et al., 1998). Finalement, en plus des cellules épithéliales, il a été rapporté que le cycle viral complet peut être récapitulé sans induction de la différenciation dans les trophoblastes (Liu et al., 2001). Ce type cellulaire originaire du placenta est toutefois peu utilisé pour les études du VPH.

1.3.2.2 Réplication transitoire

Le maintien de l'épisome ainsi que son amplification sont deux événements du cycle viral qui dépendent de l'activité de réplication de E1 et E2, et la méthode basée sur l'utilisation de kératinocytes primaires décrite ci-haut est largement utilisée pour étudier ces mécanismes. Cependant, dans ce type de modèle d'étude, le maintien et l'amplification sont également dépendants des activités des autres protéines virales, notamment les protéines E1^{E4}, E5, E6, E7 et E8^{E2C} (Section 1.2). Ainsi, afin d'étudier les fonctions spécifiques des protéines E1 et E2 au cours de la réplication de l'ADN des VPH, plusieurs modèles d'étude de réplication transitoire ont été développés.

La réplication transitoire peut être étudiée dans diverses lignées cellulaires. Ce type d'essai de réplication requiert soit la transfection de vecteurs d'expression des protéines E1 et E2, ainsi que d'un vecteur contenant l'origine de réplication (Annexe 5 et (Frattini and Laimins, 1994b; Morgan and Taylor, 2005)) soit la transfection du génome entier (Cote-Martin et al., 2008; Del Vecchio et al., 1992). Dans ces essais, des lignées cellulaires épithéliales sont surtout utilisées. Parmi celles-ci, on retrouve la lignée cellulaire C33A qui provient d'une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, mais qui ne contient pas d'ADN du VPH, la lignée HeLa qui provient d'un cancer du col de l'utérus et qui contient plusieurs répétitions de l'ADN du VPH 18 intégrées dans son génome cellulaire (Lazo, 1987), et les lignées SiHa et Caski, qui proviennent aussi de cancers du col de l'utérus, mais qui sont respectivement immortalisées par une à deux copies ou par plus de 600 copies du génome du VPH 16 (Baker et al., 1987; Pattillo et al., 1977). En plus de ces lignées, il a récemment été rapporté que les U2OS, des cellules provenant d'un cancer de l'os, sont capables de supporter la réplication de l'ADN des VPH cutanés et muqueux à bas risque oncogénique en plus des VPH à haut risque (Geimanen et al., 2011).

Selon le type d'essai, l'ADN épisomal répliqué est extrait des cellules et quantifié soit par buvardage de type Southern ou par l'utilisation de sondes spécifiques à l'origine dans une analyse qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) (Morgan and Taylor,

2005; Wang et al., 2003). En plus de ce type de détection, nous avons développé une méthode d'analyse de la réplication virale, qui est présentée en annexe 5, et qui quantifie la réplication d'un vecteur contenant l'origine virale sans recourir à l'extraction de l'ADN. Dans cet essai, l'activité de la luciférase exprimée à partir d'une cassette d'expression localisée dans le plasmide contenant l'origine de réplication permet de quantifier rapidement la réplication par luminométrie. Ce mode de détection requiert peu d'étapes et permet l'utilisation de cet essai pour le criblage à haut débit de petites molécules inhibitrices de la réplication virale.

1.3.3 Modèle *in vitro*

En plus des modèles cellulaires, il existe un modèle biochimique qui permet l'étude de la réplication de l'ADN *in vitro*. Celui-ci permet de décortiquer l'importance des protéines virales et cellulaires qui sont nécessaires à la formation d'un complexe de réplication de l'ADN. Ce type de modèle utilise soit des protéines virales produites dans un système de baculovirus recombinant dans les cellules d'insectes, soit des protéines produites par un système de réticulocytes de lapin qui permet de transcrire et de traduire des protéines complètes *in vitro*, soit des protéines produites dans les bactéries (*E. coli*) (Amin et al., 2000; Bream et al., 1993; Kuo et al., 1994; Terenzi et al., 2008). Les protéines cellulaires nécessaires à la réplication sont ensuite fournies par l'ajout d'extraits cellulaires et la quantification de nucléotides radiomarqués intégrés dans l'ADN viral (P^{33} -ATP ou P^{32} -CTP), permet de déterminer les niveaux de réplication (Amin et al., 2000; Titolo et al., 1999).

1.4 Réplication de l'ADN viral ; fonctions de la protéine E1 des VPH

La réplication du matériel génétique des VPH est similaire à celle des cellules eucaryotes. En effet, le double hexamère de E1 qui est formé au cours de la réplication de l'ADN des VPH est similaire à celui qui est formé par les protéines MCM (*Mini-Chromosome Maintenance*) au cours de la réplication de l'ADN des eucaryotes. Chez ces derniers, la réplication de l'ADN dépend de plus de 16 facteurs différents. La réplication est d'abord initiée à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire par la liaison des protéines du complexe de reconnaissance de l'origine (ORC1 à 6, *Origine Replication Complex*) sur l'ADN (Fig. 1.6). Le recrutement des MCM2 à 7, contenant l'activité ATPase/hélicase essentielle au déroulement de l'ADN, est ensuite assuré par les protéines Cdc6 et Cdt1 (Forsburg, 2004). L'assemblage de ce complexe de préinitiation de la réplication (pré-RC, *pre-Replication Complex*) à l'origine de réplication est appelé *licensing* et est négativement régulé par la Geminin (Sclafani and Holzen, 2007). Spécifiquement, la séquestration de Cdt1 par la Geminin au cours de la phase S empêche la reformation des pré-RC et permet d'éviter une réplication excessive de l'ADN (Xouri et al., 2007). Suite à son assemblage, l'activation (*firing*) du pré-RC enclenche la phase d'élongation de la réplication. Cette activation est assurée par des protéines cellulaires telles que les kinases dépendantes des cyclines ou de Dbf4 (Cdk et Ddk), les protéines Cdc45, RecQL4 (Sld2), Treslin/Ticrr (Sld3) et les complexes protéiques GINS (Sld5, Psf1, -2 et -3) et TopBP1/Mus101/Cut5 (Fig. 1.6) (Araki, 2010; Mechali, 2010; Pospiech et al., 2010). Les protéines du réplisome permettent l'ouverture de la double hélice d'ADN, la stabilisation de l'ADN simple brin créé et la duplication de cet ADN simple brin par les polymérase cellulaires. En plus des MCM, le réplisome contient la polymérase α -primase, les polymérase homologues δ et ϵ , le complexe RFC (*Replication Fork Complex*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et RPA (*Replication Protein A*) (Sclafani and Holzen, 2007).

Chez le VPH, le processus d'initiation de la réplication ainsi que la réplication de l'ADN viral ne dépendent que de deux protéines virales, soit E1 et E2 (Chiang et al., 1992b; Del Vecchio et al., 1992; Frattini and Laimins, 1994b; Kuo et al., 1994; Sverdrup and Khan, 1994). De manière plus précise, la protéine E2 sert à recruter les monomères de E1 à l'origine de réplication et favorise la formation du double hexamère de E1 capable de dérouler l'ADN de manière bidirectionnelle. Suite à la formation de ce double hexamère, la réplication de l'ADN viral dépend du recrutement des composantes du réplisome cellulaire (Section 1.4.2.1.1). Contrairement aux eucaryotes supérieurs, où l'initiation de la réplication a lieu à plusieurs endroits de façon simultanée (origines variables), et où aucune séquence spécifique d'initiation n'a clairement été identifiée, le VPH contient une seule origine dont la séquence et la composition sont bien caractérisées (Fig. 1.8A) (Mechali, 2010; Robinson and Bell, 2005).

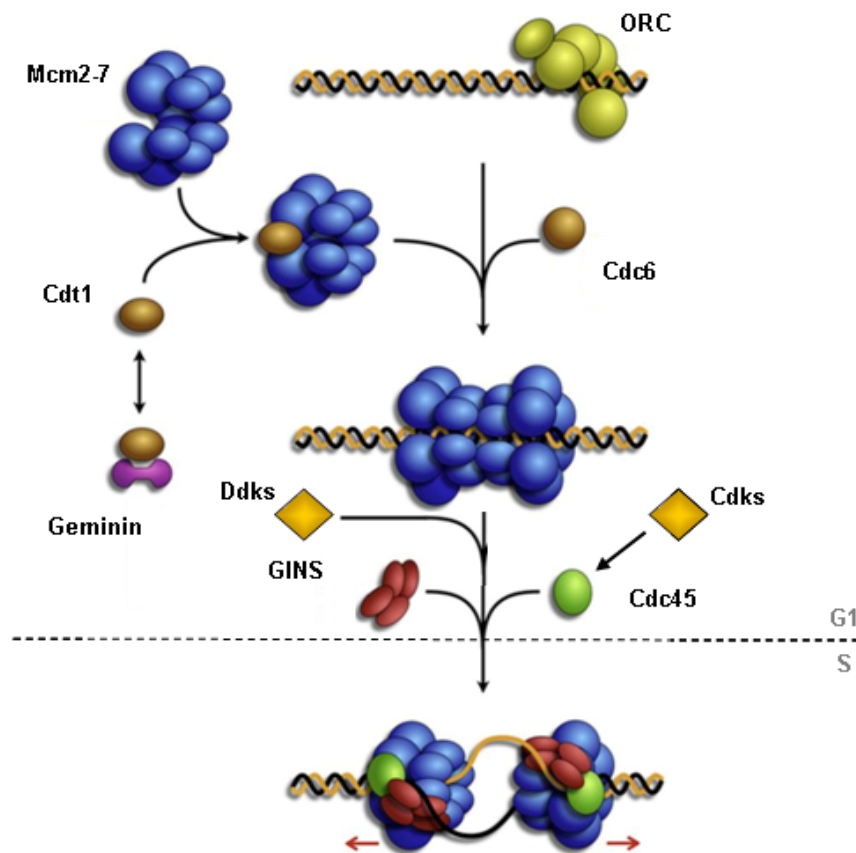


Figure 1.6. Modèle d'assemblage et de régulation du complexe de réplication de l'ADN des eucaryotes.

Au cours de l'assemblage, l'origine de réplication est d'abord liée par le complexe de protéines ORC. Le recrutement des MCM est ensuite rendu possible grâce aux protéines Cdc6 et Cdt1 dont la disponibilité est en partie régulée par la Geminin. Ce complexe est donc paré pour la réplication (licensing). L'activation des protéines Cdk et Ddk à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire est ensuite nécessaire à l'activation du complexe de réplication et au recrutement de composantes telles que le complexe des GINS et la Cdc45. Cette dernière étape est appelée le lancement du complexe de réplication (firing). Cette figure provient de Botchan and Berger (2010) Mol Cell (Botchan and Berger, 2010).

Dans cette section, les mécanismes régulant l'assemblage de E1 en double hexamère ainsi que son interaction avec les protéines du réplisome seront décrits. De plus, les modulations de l'activité de réplication de E1 par différentes protéines cellulaires, ainsi que par ses modifications post-traductionnelles, seront discutées.

1.4.1 Assemblage du double hexamère de E1 sur l'ADN

La protéine initiatrice de la réplication de l'ADN du VPH est l'hélicase E1. Celle-ci contient quatre fonctions principales qui lui permettent d'assurer l'initiation de la réplication et l'élongation de l'ADN : 1) sa capacité à lier l'ADN de manière spécifique et non spécifique; 2) sa capacité à s'auto-oligomériser et à former un double hexamère à l'origine de réplication; 3) son activité ATPase/hélicase permettant l'ouverture et le déroulement de l'ADN et 4) sa capacité à interagir avec les protéines de la machinerie de réplication de l'ADN de l'hôte (Lin et al., 2002; Liu et al., 1995). E1 est une protéine dont la taille varie entre 600 et 650 acides aminés selon le type de VPH, et qui peut être sous-divisée en trois grandes régions fonctionnelles : 1) un domaine de liaison à l'origine de réplication viral (OBD, *Origin-Binding Domain*) qui se situe au centre de la protéine, 2) un domaine C-terminal contenant l'activité enzymatique de la protéine (ATPase/hélicase) et 3) une région N-terminale nécessaire à la réplication de l'ADN *in vivo* (Fig. 1.7). Le domaine

C-terminal et l'OBD contiennent l'activité nécessaire à la réplication de l'ADN *in vitro*, tandis que la région N-terminale contient plusieurs éléments qui régulent l'activité de E1 dans les cellules (Section 1.4.2).

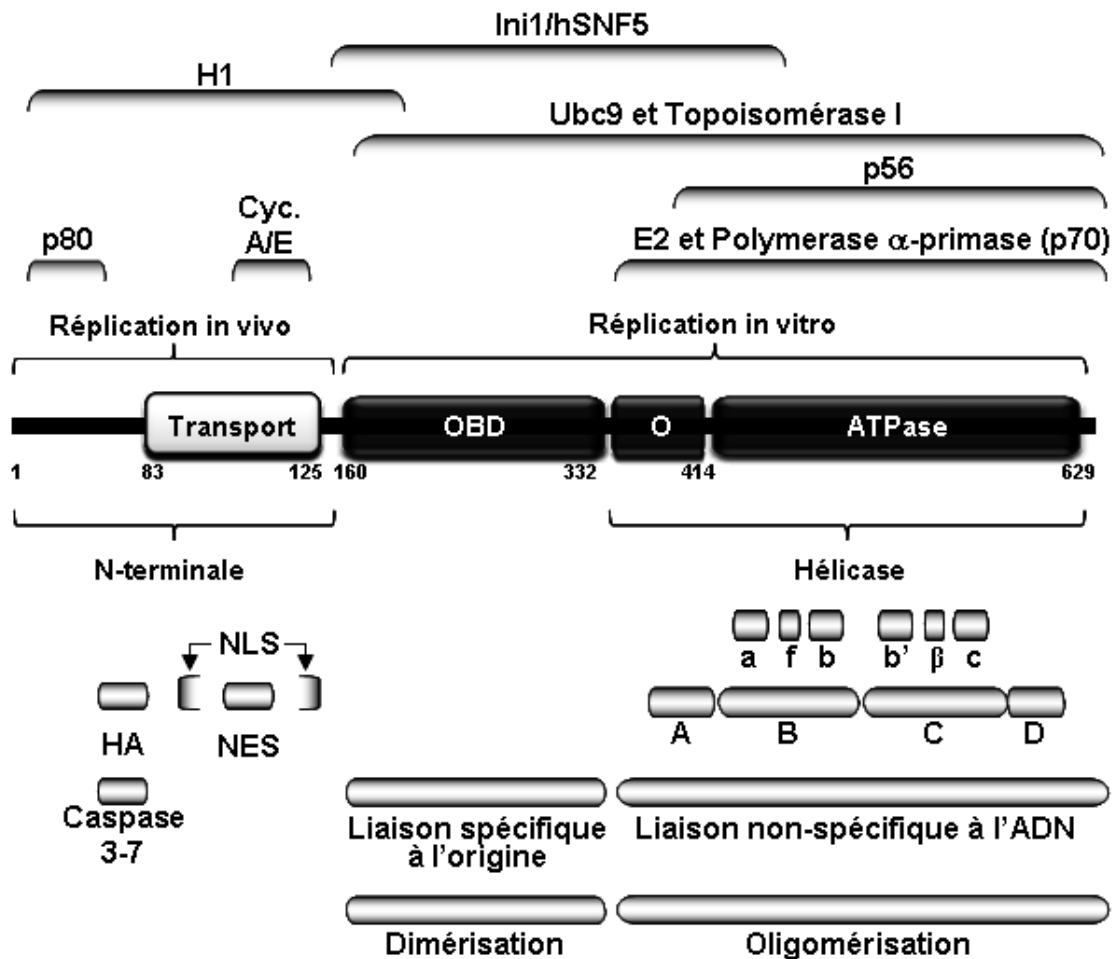


Figure 1.7. Représentation schématique de la protéine E1 du VPH 31.

Les acides aminés délimitant les principales régions fonctionnelles de E1 sont identifiés. Les séquences de E1 permettant la liaison spécifique et non spécifique de l'ADN ainsi que celles requises pour l'oligomérisation de E1 sont identifiées en dessous de la protéine. Les séquences requises pour l'interaction de E1 avec E2 et avec les protéines cellulaires sont identifiées au dessus de la protéine. Les séquences de la région N-terminale essentielles à l'accumulation nucléaire de E1 (séquence de localisation nucléaire (NLS))

bipartite et séquence d'export nucléaire (NES)) sont indiquées. Finalement, les motifs essentiels à l'activité de réplication de E1 sont spécifiquement identifiés : l'hélice amphipatique (HA), le site de clivage par les caspases (caspase-3/-7), les séquences d'homologie avec l'antigène grand T de SV40 (A-D) et les motifs a, f, b, b', β et c représentant respectivement le Walker A, le motif FWL, le Walker B, le motif B', le β -hairpin et le motif C (définis à la section 1.4.1.3).

Dans cette section, les rôles joués par E1 et E2 au cours de la reconnaissance de l'origine, de la formation du double hexamère et du déroulement de l'ADN seront décrits. Les fonctions des protéines des VPH à bas risque de type 11 et à haut risque de type 31 seront principalement décrites, puisque ces types de VPH ont été utilisés au cours des études présentées dans cette thèse. Dans certains cas, les études faites avec la protéine E1 du VPB seront citées, d'abord parce que la majorité des études des protéines des papillomavirus ont débuté avec ce type de virus, puis parce que la protéine E1 du VPB est la seule dont le domaine C-terminal a pu être cristallisé jusqu'à maintenant (Chen et al., 1982; Enemark and Joshua-Tor, 2006). À titre de comparaison, des études faites avec l'antigène grand T (AgT) de SV40, une hélicase virale hautement similaire à E1, seront parfois citées. Finalement, les mutations seront décrites en utilisant la numérotation des acides aminés des protéines E1 et E2 du VPH 31 afin d'alléger le texte. Un tableau indiquant toutes les mutations décrites dans cette thèse ainsi que le type de PV dans lequel elles ont été identifiées pour la première fois peut être consulté à l'annexe 2.

1.4.1.1. Reconnaissance de l'origine de réplication

Tel que mentionné précédemment, la réplication de l'ADN du VPH est promue par une origine de réplication spécifique localisée dans la longue région de contrôle (LCR) (Fig. 1.2). Au cours des années 1990, des études *in vivo* et *in vitro* ont permis de révéler que la réplication de l'ADN du VPH est dépendante de cette origine et qu'en son absence, le double hexamère capable de dérouler l'ADN de manière bidirectionnelle n'est pas assemblé (Fouts et al., 1999; Kuo et al., 1994; Lu et al., 1993; Russell and Botchan, 1995).

Localisée entre les nucléotides 7850 et 66 du génome du VPH 31, l'origine minimale de réplication couvre environ 120 paires de bases et contient des séquences nucléotidiques qui sont spécifiquement reconnues par E1 et par E2. Cette région contient également une séquence riche en adénosine et en thymidine (AT) nécessaire à l'ouverture de l'ADN (Fig. 1.2 et 1.8A) (Chiang et al., 1992a; Lu et al., 1993; Russell and Botchan, 1995; Sun et al., 1996). L'importance de chacune de ces séquences au cours de l'assemblage du double hexamère de E1 sera discutée dans les sections suivantes.

1.4.1.1.1 Rôle de E2

L'interaction de la protéine E1 pleine longueur avec l'ADN est très peu spécifique (Dixon et al., 2000; Frattini and Laimins, 1994a; Liu et al., 1995). Cette liaison résulte de la participation de deux domaines de E1 : 1) son OBD qui interagit spécifiquement avec des séquences localisées dans l'origine de réplication et 2) son domaine C-terminal qui interagit non spécifiquement avec l'ADN. Bien que la liaison non spécifique à l'ADN soit nécessaire à l'assemblage du double hexamère, elle doit d'abord être inhibée afin de permettre l'interaction spécifique de E1 avec l'origine de réplication. Cette inhibition est assurée par la liaison du domaine de transactivation de E2 (TAD) au niveau du domaine C-terminal de E1 (Fig. 1.8B). Le recrutement de E1 à l'origine est assuré par le domaine de liaison à l'ADN de E2 (DBD) qui interagit et dimérise sur les E2BS juxtaposant les sites de liaison de E1 (E1BS) dans l'origine (Fig. 1.8A) (Chao et al., 1999). Quatre de ces sites, tous composés d'une région palindromique de 12 paires de bases répétées 5'-ACCGN₄CGGT-3', sont retrouvés dans le LCR (Fig. 1.2) (Alexander and Phelps, 1996; Androphy et al., 1987). Cependant, seulement trois d'entre eux sont essentiels au maintien de l'épisome chez le VPH 31 (E2BS1, E2BS3 et E2BS4) (Stubenrauch et al., 1998). Par ailleurs, bien que le E2BS3 soit suffisant à l'assemblage de doubles hexamères *in vitro* et à la réplication transitoire de l'ADN *in vivo*, ces deux activités sont grandement favorisées par la présence d'une combinaison des sites 2 et 3 ou 3 et 4 (Fig. 1.8A) (Chiang et al., 1992a; Dixon et al., 2000; Gillette et al., 1994; Lim et al., 1998; Lu et al., 1993; Russell and Botchan, 1995; Sverdrup and Khan, 1995; Titolo et al., 1999).

De façon générale, E2 interagit avec les acides aminés 332-629 du domaine C-terminal de E1, et masque une série d'interfaces de E1 totalisant 940 Å (Fig. 1.7 et 1.9A) (Abbate et al., 2004; Masterson et al., 1998; Sun et al., 1998; Titolo et al., 1999; Yasugi et al., 1997a; Zou et al., 1998). Ainsi, E2 inhibe la capacité de E1 à lier non spécifiquement l'ADN, à s'oligomériser de même qu'à dérouler l'ADN, des fonctions qui sont toutes assurées par le domaine C-terminal de E1 (Berg and Stenlund, 1997; Bonne-Andrea et al., 1997; Lin et al., 2002; Sedman and Stenlund, 1995). L'interaction entre E1 et E2 est médiée par la surface interne du domaine à hélice du TAD de E2, c'est-à-dire la surface opposée à celle du TAD qui contient les acides aminés importants pour les fonctions de transactivation de E2 (Fig. 1.9A) (Abbate et al., 2006; Senechal et al., 2007; Storey et al., 1995). Ainsi, les fonctions distinctes des deux surfaces du TAD de E2 permettent la séparation des fonctions de réplication et de transactivation de E2 (Cooper et al., 1998; Sakai et al., 1996). Parmi les liens moléculaires spécifiques médiant l'interaction entre E1 et E2, un lien ionique entre le glutamate 39 (E39) localisé dans l'hélice α centrale du TAD de E2 et l'arginine 427 de E1 est particulièrement important (Abbate et al., 2004). Lorsque celui-ci est détruit par la substitution du glutamate de E2 en alanine ou en glutamine (E39A/Q), une diminution drastique de l'activité de réplication de l'ADN est observée *in vivo* (Annexe 5 et (Abbate et al., 2004; Cooper et al., 1998; Sakai et al., 1996; Wang et al., 2004b)). Outre E39, l'incapacité des mutants de E2 L15A (leucine 15), Y19A (tyrosine 19) et S98A (sérine 98) à promouvoir l'assemblage d'un complexe E1-E2 sur l'origine suggère que ces acides aminés sont impliqués dans l'interaction E1-E2. En plus d'être inapte à promouvoir l'assemblage du double hexamère *in vitro*, le mutant de E2 Y19A est incapable de supporter la réplication transitoire du VPH 31 *in vivo* (Annexe 5 et (Wang et al., 2004b)). Cette observation souligne encore une fois l'importance de l'interaction entre E1 et E2 au cours de la réplication de l'ADN. Finalement, des études faites avec les protéines du VPB démontrent que la protéine E1 interagit surtout avec les formes hypophosphorylées de la protéine E2 et qu'une forme non phosphorylable de E2 réplique l'ADN aussi bien que la protéine de type sauvage (Lehman et al., 1997; Lusky et al., 1994; Voitenleitner and Botchan, 2002). Du côté de la protéine E1, l'intégrité de la boucle P de son domaine

ATPase serait essentielle à la formation du complexe E1-E2 (Fig. 1.9A) (Section 1.4.1.3) (Titolo et al., 1999).

En plus d'interférer avec la liaison non spécifique de E1 à l'ADN, la liaison de E2 inhibe l'activité ATPase de E1 en diminuant son affinité pour l'ATP et empêche l'oligomérisation de E1 par encombrement stérique (Abbate et al., 2004; White et al., 2001). Cette dernière activité de E2 serait induite par l'encombrement de l'espace nécessaire à la liaison d'autres monomères de E1 par le domaine de feuillets β du TAD de E2 (Fig. 1.9A) (Abbate et al., 2004). Puisque l'oligomérisation de E1, ainsi que l'interaction de son domaine C-terminal avec l'ADN, sont essentiels à la formation d'un double hexamère actif, E2 doit être évincé du complexe au cours de son assemblage (Abbate et al., 2004; Lin et al., 2002; Liu et al., 1995; Lusky et al., 1994). Bien que les détails moléculaires de cette expulsion ne soient pas connus, il a été proposé que la stabilisation de l'interaction entre E1 et l'ADN induite par la liaison de l'ATP dans le domaine C-terminal de E1 causerait un changement de conformation qui mènerait à une réduction de son affinité pour E2 (VPH 11 et 18) (Abbate et al., 2004; Lusky et al., 1994; Sanders and Stenlund, 1998; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001). Chez le VPB E1, l'hydrolyse de cette ATP est nécessaire pour induire une relâche complète de E2 (Lusky et al., 1994; Sanders and Stenlund, 1998, 2000, 2001).

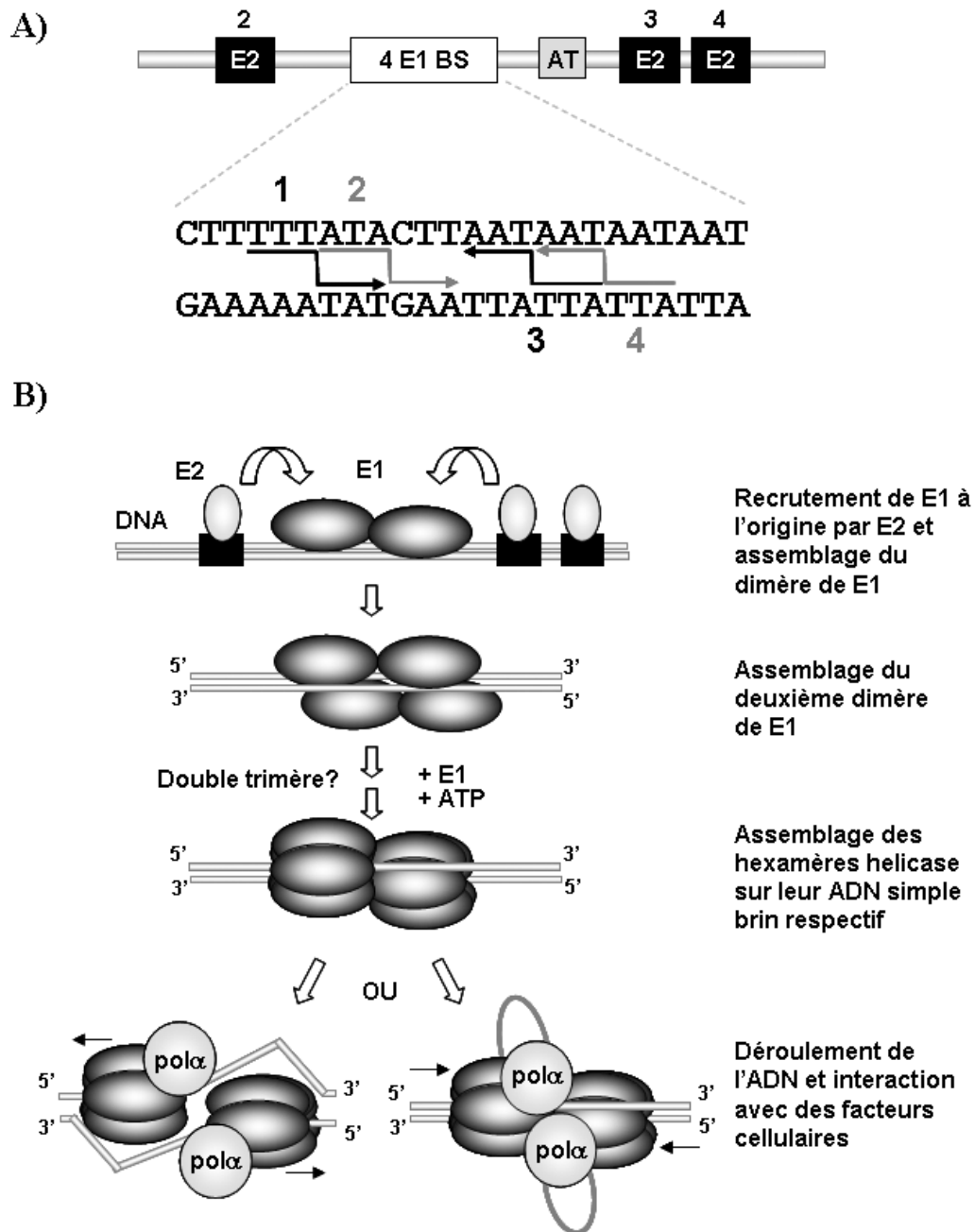


Figure 1.8. Assemblage du double hexamère de E1 à l'origine de réplication.

(A) Représentation schématique de l'origine minimale de réplication du VPH. Les sites de liaison de la protéine E2 (E2BS) favorisant la réplication (2, 3 et 4) sont représentés par des boîtes noires. Le site contenant la région riche en adénines et en

thymines (AT) est représenté par une boîte grise. La région contenant les quatre sites de liaison de la protéine E1 est représentée en blanc. La séquence nucléotidique de cette dernière section est agrandie. Les sites de liaison de E1 (E1BS) 2 et 4 sur lesquels se forme le premier dimère sont représentés par des flèches grises tandis que ceux où est formé le second dimère sont représentés par des flèches noires. (B) Étapes de l'assemblage du double hexamère de E1 sur l'ADN. La description de chacune des étapes est écrite à la droite de chacune d'elles. Cette figure a été adaptée à partir de Fradet-Turcotte et al. (2007) Antivir Ther (Annexe 6 et (Fradet-Turcotte and Archambault, 2007)).

1.4.1.1.2 Liaison de E1 à l'ADN

1.4.1.1.2.1 Interactions spécifiques

Bien que le recrutement de E1 à l'origine dépende de son interaction avec E2, la formation d'un complexe stable de E1-E2 à l'origine dépend de l'interaction entre E1 et l'ADN (Liu et al., 1995; Titolo et al., 1999). La liaison spécifique de E1 à l'ADN se fait via son domaine de liaison à l'origine (OBD) (Fig. 1.7) (Sun et al., 1998; Titolo et al., 2000). Contrairement à la séquence primaire variable de l'OBD du VPH, du VPB et de l'AgT de SV40, les structures secondaires et la structure tertiaire de ces protéines sont fortement conservées. Ainsi, le centre de l'OBD est composé de cinq feuilletts β anti-parallèles entourés de cinq hélices α . Deux de ces hélices font face à l'interface de dimérisation de E1 tandis que les autres font face au domaine C-terminal (Fig. 1.9B) (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2000; Enemark et al., 2002). Deux structures de l'OBD entrent en contact avec l'ADN : 1) une région flexible nommée « boucle de liaison à l'ADN » qui se situe entre les acides aminés R204 et C213 et 2) l'hélice α_4 qui se situe entre les acides aminés C263 et L274. Ces structures, qui furent d'abord connues sous les noms respectifs de HR1 et HR3 (HR : *Hydrophilic Region*), forment une grande surface chargée positivement (Fig. 1.9B) (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2000; Enemark et al., 2002). De façon plus précise, les acides aminés S208, K210, S211 de la boucle de liaison interagissent avec les bases de l'ADN via des interactions de type van der Waals,

tandis que les acides aminés C263, K265, T269, K272 de l'hélice $\alpha 4$ entre en contact avec les phosphates du squelette désoxyribose de l'ADN grâce à la formation de ponts hydrogènes (Enemark et al., 2002). Bien que les acides aminés responsables de ces interactions soient essentiels à l'interaction de E1 avec l'origine, le positionnement de la boucle de liaison et l'hélice $\alpha 4$ à l'intérieur de l'OBD l'est tout autant. Ainsi, les résidus lysine 265 et arginine 267, dont la mutation en alanine (K265A/R267A) inhibe la liaison de E1 à l'ADN *in vitro*, ne seraient pas impliqués directement dans la création de lien entre l'origine de réplication et E1, mais seraient plutôt importants pour la stabilisation de la boucle de liaison ainsi que pour le positionnement des deux modules de liaison à l'ADN à l'intérieur de la structure de l'OBD (Enemark et al., 2000; Titolo et al., 2000; West et al., 2001; West and Wilson, 2002).

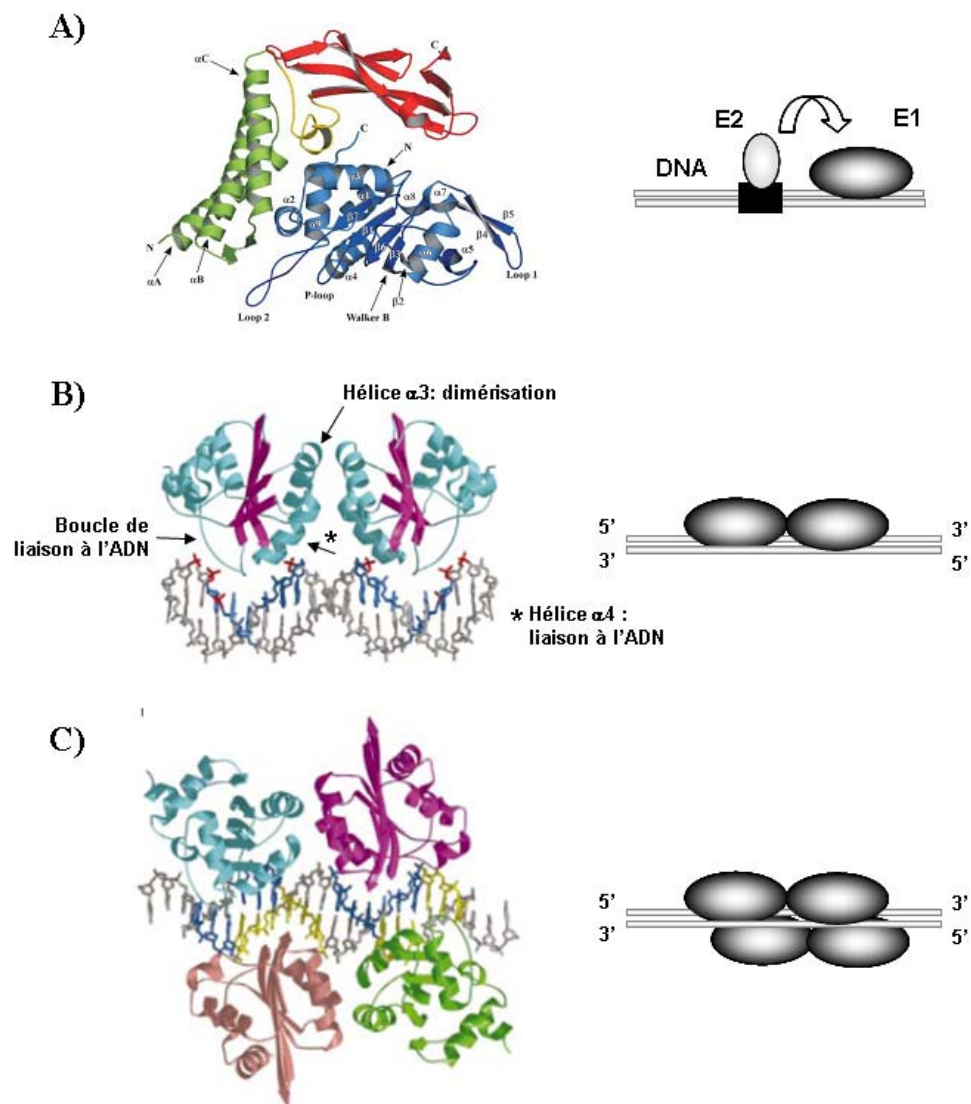


Figure 1.9. Structures intermédiaires de l'assemblage du double hexamère de E1.

(A) Structure du complexe formé entre le TAD de E2 et le domaine C-terminal de E1. Les trois régions du TAD du VPH 18 E2 (acides aminés 1-215) sont représentées par des rubans verts (domaine à hélice), jaunes (domaine charnière) et rouges (domaine à feuillettes β), tandis que le domaine C-terminal du VPH 18 E1 (acides aminés 428-631) est représenté par des rubans bleus. Dans la structure de E1, la boucle P du Walker A (P-

Loop) et le Walker B, dont les fonctions sont décrites à la section 1.4.1.3, sont identifiés. Figure empruntée de Abbate et al. (2004) *Genes and Dev* (Abbate et al., 2004). (B) Structure de deux OBD de la protéine E1 du VPB liés sur l'ADN. Les feuillets β localisés au cœur de la protéine sont colorés en mauve tandis que les hélices α sont colorées en bleu. La boucle de liaison à l'ADN, l'hélice $\alpha 4$ et l'hélice $\alpha 3$, responsables de la liaison à l'ADN et de la dimérisation de la protéine, sont identifiées. (C) Structure du double dimère de l'OBD de E1 du VPB lié à l'origine de réplication. Les figures présentées en B et C ont été empruntées de Enemark et al. (2002) *EMBO J* (Enemark et al., 2002).

Le site de liaison de E1 (E1BS) est composé de 6 paires de bases. Diverses études ont permis d'établir que les interactions entre la boucle de liaison de l'ADN de E1 et le E1BS se font spécifiquement au niveau des trois premiers nucléotides du brin 5'-3' et que les interactions de l'hélice $\alpha 4$ se font au niveau des phosphates du brin 3'-5' des trois autres nucléotides composant ce site (Fig. 1.8A) (Chen and Stenlund, 1998; Enemark et al., 2002). Des analyses d'empreinte d'ADN digéré par la DNase, ainsi que des essais de réplication transitoire, ont très tôt mis en évidence l'importance de la région liée par E1 dans l'origine de réplication (Lu et al., 1993; Russell and Botchan, 1995; Sun et al., 1996). Celle-ci fut d'abord considérée comme une grande séquence riche en AT. Puis, il a été démontré qu'elle est en fait composée de quatre E1BS disposés en deux séquences répétées et inversées (Fig. 1.8A) (Auster and Joshua-Tor, 2004). L'analyse systématique des nucléotides composant le E1BS des VPH, ainsi que de la distance les séparant les uns des autres, a ensuite été réalisée grâce à l'utilisation d'un essai de liaison à l'ADN basé sur la polarisation de la fluorescence (Annexe 5 et (Fradet-Turcotte et al., 2007; Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 2003b)). Comme ce type d'essai est utilisé au cours de l'étude présentée au chapitre 2, celui-ci est présenté à la figure 1.10. Brièvement, cet essai de liaison à l'ADN est basé sur le principe que la liaison d'une protéine à proximité d'une molécule de fluorescéine située en 5' d'une molécule d'ADN double brin induit une augmentation de la polarisation de la fluorescence émise par la fluorescéine (Fig. 1.10). Grâce à son utilisation, Titolo et al a déterminé que la séquence consensus reconnue par

l'OBD du VPH 11, 5'-ATTGTT-3', est similaire à celle identifiée chez d'autres PV (Chen and Stenlund, 1998, 2001; Titolo et al., 2003a). Les nucléotides A1, T2 et G4 du E1BS contribuent énormément à l'affinité de E1 pour l'ADN et la majorité des interactions entre la boucle de liaison et l'ADN se font à travers T2 (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2000; Enemark et al., 2002; Titolo et al., 2003a). La plus ou moins grande conservation de la séquence consensus à travers les quatre E1BS localisés dans l'origine de réplication serait un élément de régulation de l'ordre d'assemblage de E1 à l'origine (Fig. 1.8A).

La dimérisation de E1 est essentielle à la stabilisation de sa liaison sur l'origine ainsi qu'à son activité de réplication. Celle-ci permet à E1 de lier l'ADN de manière coopérative, ce qui augmente de plus de 5X son affinité pour l'ADN (Fig. 1.9B) (Chen and Stenlund, 2001; Enemark et al., 2002; Titolo et al., 2003a). Les E1BS permettant la formation de dimères sont espacés par un tour d'hélice et l'éloignement de ces sites par plus de 3 nucléotides inhibe la formation du dimère (ex. : site 2 et 4) (Fig. 1.9B) (Titolo et al., 2003a). En plus d'être dictée par le positionnement des E1BS, la formation du dimère dépend de l'intégrité de l'hélice $\alpha 3$ qui est localisée à l'interface du dimère de E1 et qui crée une surface hydrophobe d'environ 500 \AA^2 entre les deux monomères (Fig. 1.9B) (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2002). Par ailleurs, malgré le fait que les mutations affectant la dimérisation de E1 soient peu conservées à travers les divers PV (G230R chez le VPH 31 et A251R chez le VPH 11), il est intéressant de noter qu'elles sont toutes situées à l'intérieur de l'hélice $\alpha 3$ (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2000; Enemark et al., 2002; Titolo et al., 2003a). Bien que nécessaire pour lier fortement l'ADN, la dimérisation de E1 n'affecte pas directement son hexamérisation ni son activité ATPase (Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 2003b).

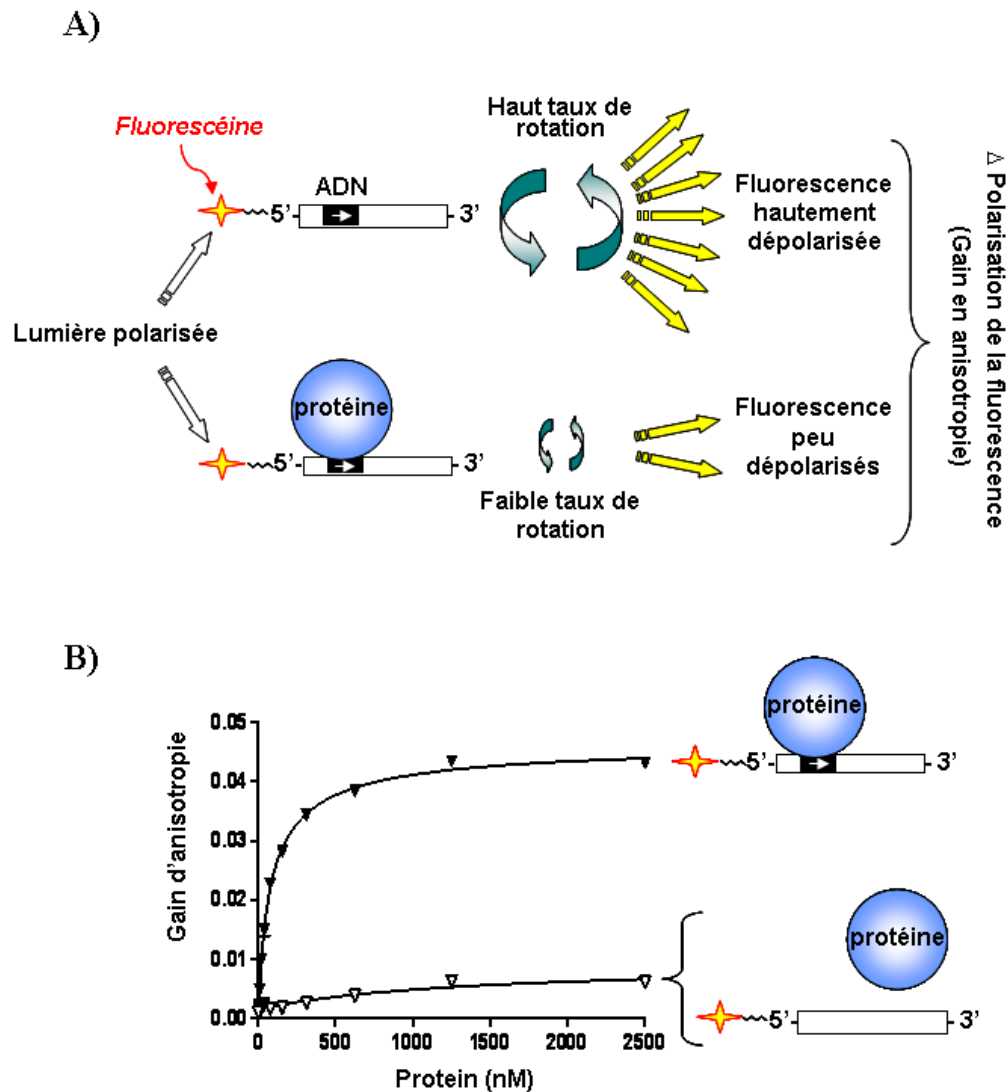


Figure 1.10. Essai de liaison à l'ADN basé sur la polarisation de la fluorescence.

(A) Principe de l'essai de liaison à l'ADN basé sur le changement de polarisation de la fluorescence de la fluorescéine par la liaison d'une protéine à l'ADN. De façon plus précise, lorsque la protéine lie l'ADN à proximité de la molécule de fluorescéine, elle inhibe sa liberté de mouvement en solution. Par conséquent, suite à son excitation par une lumière polarisée, une sonde libre réémettra de la fluorescence dans toutes les directions tandis qu'une sonde liée par une protéine réémettra une fluorescence beaucoup moins dépolarisée dû à son mouvement restreint en solution. (B) La différence de polarisation

(exprimé ici en anisotropie) peut être représentée en fonction de la quantité de protéine utilisée et une constante d'affinité (K_D) peut ainsi être déterminée. Contrairement aux analyses de liaison à l'ADN par retard sur gel (ElectroMobility Shift Assay, EMSA), les analyses de liaison à l'ADN via un essai de polarisation de la fluorescence sont réalisées dans des conditions d'équilibre.

L'ordre d'assemblage de deux dimères à l'origine de réplication serait dicté par les séquences des E1BS. En fait, la meilleure affinité de liaison de l'OBD pour les sites 2 et 4 permettrait l'assemblage d'un premier dimère, puis le tétramère prendrait forme suite à l'assemblage d'un autre dimère sur les sites 1 et 3 (Fig. 1.9C) (Chen and Stenlund, 1998; Titolo et al., 2003a). La disposition des boucles de liaison des quatre monomères liés à l'ADN permettrait ensuite de cibler l'assemblage de chaque hexamère sur un brin d'ADN spécifique. De manière plus spécifique, les boucles de liaison des monomères liés sur les sites 1 et 2 interagiraient avec le brin supérieur de l'ADN double brin tandis que les boucles de liaison des monomères liés sur les sites 3 et 4 interagiraient avec le second brin d'ADN (Enemark et al., 2002).

1.4.1.1.2.2 Interactions non spécifiques

Tel que mentionné précédemment, la liaison non spécifique de E1 à l'ADN est surtout médiée par son domaine C-terminal. Lorsque E2 quitte le complexe d'initiation de la réplication, le domaine C-terminal de E1 interagit non spécifiquement avec les nucléotides retrouvés de chaque côté des E1BS. Plus précisément, il a été observé que la liaison d'un dimère d'OBD à l'origine couvre une région d'environ 18 nt tandis, qu'en l'absence de E2, la liaison d'un dimère de E1 contenant l'OBD et le domaine C-terminal couvre une région de plus de 80 paires de bases (Stenlund, 2003). À l'intérieur de cette région, on retrouve une séquence riche en AT au niveau de laquelle l'ouverture des deux brins, qui est essentielle à la réplication de l'ADN, est initiée en présence d'ATP (Section 1.4.1.2 et 1.4.1.3) (Castella et al., 2006a; Gillette et al., 1994; Sun et al., 1996). Les résidus contribuant à l'interaction non spécifique de E1 avec l'ADN sont peu caractérisés et les

données existantes proviennent surtout de l'étude de la protéine E1 du VPB (Liu et al., 2010; Schuck and Stenlund, 2005a; Sedman and Stenlund, 1995). Au cours de ces études, l'affinité de E1 pour l'ADN non spécifique a été déterminée de manière indirecte, via la compétition de la liaison spécifique de E1 à un ADN radiomarqué par des ADN compétiteurs non spécifiques et non marqués (Liu et al., 1995; Liu et al., 2010). Contrairement à la protéine E1 de type sauvage, l'interaction spécifiques de certains mutants de E1 avec l'ADN radiomarqué n'a pu être compétitionnée par de l'ADN non spécifique. De cette manière, il a été déterminé que les acides aminées F488, V529, K530, H531 et particulièrement K485 joueraient un rôle important dans la liaison non spécifique de E1 à l'ADN (Liu et al., 2010). Plusieurs des résidus identifiés dans cette étude sont également essentiels à l'ouverture de l'ADN au niveau de la région AT, suggérant que la liaison non spécifique du domaine C-terminal est nécessaire à l'ouverture du double brin d'ADN (Castella et al., 2006a).

Lorsque deux E2BS sont présents, un de chaque côté de la région où est assemblé le double hexamère, la protéine E1 lie suffisamment l'ADN de manière non spécifique pour permettre la réplication transitoire de l'ADN en absence de E1BS (Lu et al., 1993; Muller et al., 1994; Sverdrup and Khan, 1995). Ce phénomène est dû à la capacité de l'OBD de E1 à interagir non spécifiquement avec l'ADN. En effet, bien que la majeure partie de la liaison non spécifique de E1 à l'ADN soit médiée par son domaine C-terminal, l'OBD de E1 est également capable d'interagir avec l'ADN de manière non spécifique. Tout comme la liaison spécifique, la liaison non spécifique de E1 à l'ADN est augmentée par la dimérisation de E1. Il est également intéressant de noter que celle-ci est plus élevée chez les VPH à haut risque oncogénique que chez ceux à bas risque (Titolo et al., 2003a). La raison de cette différence entre les VPH à bas risque et à haut risque est inconnue. Jusqu'à maintenant, les études de liaison non spécifique ont surtout été réalisées en présence de l'OBD et du domaine C-terminal et il est donc difficile de discriminer la contribution de chacun de ces domaines aux interactions non spécifiques de E1 avec l'ADN (Liu et al., 2010; Stenlund, 2003).

1.4.1.1.2.3 Influence de la région N-terminale

In vitro, les 166 premiers acides aminés de E1 ne sont pas nécessaires à la réplication de l'ADN. En fait, non seulement ils ne sont pas nécessaires, mais l'étude de *Titolo et al* suggère qu'une portion de ce domaine aurait un effet inhibiteur sur la liaison de E1 à l'origine. Plus précisément, cette étude démontre que la troncation des 71 premiers acides aminés de la protéine E1 du VPH 11 augmente drastiquement sa liaison à une sonde d'ADN radiomarquée contenant l'origine de réplication (Russell and Botchan, 1995; Titolo et al., 2000). Dans ce type d'essai, la liaison de E1 à l'ADN dépend de sa capacité à lier spécifiquement l'ADN via son OBD, à lier non spécifiquement l'ADN via son domaine C-terminal et à s'oligomériser (Titolo et al., 2000). Malgré qu'une région du domaine N-terminal inhibe la liaison de E1 à une sonde d'ADN radiomarquée, nous avons observé que celle-ci n'inhibe pas fortement sa liaison spécifique et la dimérisation de l'OBD de E1 du VPH 31 sur une sonde d'ADN dans un essai de liaison basé sur la polarisation de la fluorescence (Annexe 3). Dans ce type d'essai, la liaison de E1 à l'ADN ne dépend que de son affinité pour la sonde et de sa capacité à dimériser. Donc, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la liaison de E1 à l'origine par la région N-terminale n'est pas due à une inhibition drastique de sa liaison spécifique à l'ADN ou de sa capacité à dimériser. Ainsi, il est possible que la région N-terminale inhibe d'autres activités de E1, telles que la liaison non spécifique de son domaine C-terminal à l'ADN ou sa capacité à oligomériser. Dans les deux cas, l'absence des 71 premiers acides aminés de la région N-terminale dans la protéine E1 72-629 du VPH 11 se traduirait en une augmentation de la liaison de E1 sur une sonde d'ADN radiomarquée. De plus amples études seront nécessaires afin de définir le rôle exact de la région N-terminale dans l'assemblage du complexe d'initiation de la réplication du VPH. Cependant, il est intéressant de noter que les 50 premiers acides aminés de la région N-terminale de E1 sont clivés par les caspase-3/-7 et que ce clivage est nécessaire à l'induction de l'amplification du génome par E1 dans les couches supérieures de l'épithélium (Section 1.4.2.2) (Moody et al., 2007). Donc, bien que la région N-terminale ne soit pas requise pour la réplication *in vitro*, il semble possible que la présence de celle-ci

réduise l'assemblage du double hexamère dans les cellules non différenciées et que son clivage par les caspases serve à lever cette inhibition dans les cellules différenciées.

1.4.1.2 Assemblage du double hexamère

L'assemblage du double hexamère dépend de la capacité des monomères de E1 à s'oligomériser. Cette fonction requiert deux sous-domaines de la région C-terminale de E1 : 1) une région qui est conservée entre les PV et l'AgT de SV40 (AgT) et qui se nomme « région A » (Section 1.4.1.3), et 2) le domaine de liaison à l'ATP (Fig. 1.7) (Titolo et al., 2000). À l'intérieur de la région A, le domaine minimal d'interaction entre les monomères de E1 est composé des résidus 332 à 410, et la mutation de résidus hautement conservés à l'intérieur de ce domaine inhibe l'oligomérisation de la protéine, ainsi que son activité de réplication *in vivo* (Y359A, N368A, et F372A) (Titolo et al., 2000). Au niveau du domaine de liaison à l'ATP, la mutation d'une lysine conservée (K463) essentielle à la liaison de l'ATP (Section 1.4.1.3), inhibe l'oligomérisation de E1 (Titolo et al., 2000). Finalement, des études faites chez le VPH 11 et chez le VPB suggèrent que l'OBD, et plus précisément les dix derniers acides aminés de celui-ci, auraient un rôle à jouer dans l'oligomérisation de E1 sur l'ADN. Plus précisément, il a été démontré que l'ADN simple brin stimule l'oligomérisation d'une protéine contenant l'OBD et le domaine C-terminal de la protéine E1 du VPH 11 et d'une protéine contenant les dix derniers acides aminés de l'OBD et le domaine C-terminal de la protéine E1 du VPB (Castella et al., 2006b; Titolo et al., 2000).

Chronologiquement, la formation du double hexamère de E1 se fait via l'assemblage de monomère en dimères, en doubles dimères, en doubles trimères et finalement en doubles hexamères (Fig. 1.8B). L'assemblage d'un double hexamère débute par la formation d'un complexe E1-E2-origine contenant un ou deux dimères de E2 et deux molécules de E1 (Fig. 1.8B) (Chen and Stenlund, 1998; Lusky et al., 1994). Chez le VPB, il a été démontré que la formation de ce complexe induit une courbure significative dans l'ADN, mais le rôle de celle-ci est cependant encore imprécis (Gillitzer et al., 2000). Les études de l'assemblage de E1 sur l'ADN, via la détection de régions de l'ADN sensibles au

permanganate de potassium, ainsi que par des analyses structurales, démontrent qu'une première distorsion de l'ADN est induite au niveau de l'origine par la formation du premier dimère. Puis, les études démontrent que cette distorsion est encore plus prononcée suite à la formation d'un double dimère (Fig. 1.8B) (Chen and Stenlund, 2002; Enemark et al., 2002; Gillette et al., 1994; Sanders and Stenlund, 2000). Cette distorsion mènerait à l'ouverture des deux brins d'ADN et serait essentielle à l'incorporation de nouveaux monomères de E1 dans le complexe. Chez le VPB, la formation d'un double trimère, suite à l'assemblage du double dimère, a été rapportée, mais la formation d'un tel intermédiaire n'a jamais été observée chez le VPH. L'identité exacte des intermédiaires menant à la formation du double hexamère demeure donc inconnue. Nonobstant les intermédiaires qui mènent à l'assemblage du double hexamère, il a été montré que l'ouverture de l'ADN au niveau de la région riche en AT est essentielle à ce processus (Gillette et al., 1994). En fait, la stabilité de la liaison de E1 avec l'ADN double brin serait d'abord augmentée par sa liaison à l'ATP puis, l'hydrolyse de l'ATP permettrait de séparer les deux brins d'ADN (Gillette et al., 1994; Liu et al., 1995; Sanders and Stenlund, 1998; Seo et al., 1993; Titolo et al., 2000; White et al., 2001). Plusieurs études réalisées avec la protéine E1 du VPB suggèrent que cette ouverture serait induite par un motif en épingle à cheveux (*β -hairpin*), très conservé chez les différents PV ainsi que chez l'AgT de SV40 (Castella et al., 2006a; Gai et al., 2004; Liu et al., 2007; Schuck and Stenlund, 2005a). En fait, ces études ont révélé que la liaison d'une molécule d'ATP dans le domaine C-terminal, ainsi que l'intégrité du *β -hairpin*, sont nécessaires à l'ouverture de l'ADN au niveau de la région riche en AT et à l'assemblage du double hexamère capable de dérouler l'ADN (Enemark and Joshua-Tor, 2006; Gillette et al., 1994; Kumar et al., 2007). De ce fait, la substitution de l'un ou l'autre des résidus composant le *β -hairpin* (K530 et H531) inhibe l'ouverture de la région AT (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2007; Liu and Stenlund, 2010). Finalement, la même étude révèle que l'intégrité du motif FWL (F464, W465 et L466) serait nécessaire à l'ouverture de l'ADN. Tout comme les résidus du *β -hairpin*, ces résidus sont également importants pour l'assemblage du double hexamère de E1 (Section 1.4.1.3) (Castella et al., 2006a).

1.4.1.3. Déroulement de l'ADN

Une fois assemblée en double hexamère, E1 hydrolyse l'ATP pour dérouler l'ADN (Lin et al., 2002). Le domaine C-terminal de la protéine E1 contenant les acides aminés 332 à 629 contient les activités ATPase et 3'-5' hélicase nécessaires à ce déroulement et est suffisant pour lier l'ADN simple brin de manière non spécifique (Fig. 1.7) (Seo et al., 1993; White et al., 2001). L'hypothèse que E1 puisse contenir une activité ATPase a d'abord été formulée suite à l'identification de régions hautement similaires (A, B, C et D) entre la protéine E1 et l'AgT de SV40, dont l'activité ATPase a été définie dans les années 1980 (Fig. 1.7) (Clark et al., 1981; Clertant and Seif, 1984; Seif, 1984). La conservation de fonctions similaires entre les deux protéines a ensuite été confirmée par des études de mutagenèse d'acides aminés conservés entre la protéine E1 du VPB et AgT, puis chez le VPH (Bream et al., 1993; Hughes and Romanos, 1993; Jenkins et al., 1996; Mansky et al., 1997; Sarafi and McBride, 1995; Seo et al., 1993; Yang et al., 1993). Parmi les régions conservées, la région A est impliquée dans l'oligomérisation de E1 et les domaines B et C englobent les éléments nécessaires à l'activité ATPase/hélicase. La grande similarité entre la protéine E1 et l'AgT est la raison pour laquelle, les PV ont d'abord fait partie intégrante d'une famille appelée *Papovaviridae*, qui englobait les papillomavirus et les polyomavirus, avant de devenir une famille de virus à part entière, les *Papillomaviridae*.

L'hélicase virale E1 est classée dans la superfamille d'hélicases III (SF3), comprenant des hélicases hexamériques provenant de petits virus à ADN et à ARN (Gorbalenya et al., 1990). Cette famille se caractérise par la conservation de quatre motifs (Walker A, Walker B, motif B' et motif C, respectivement a, b, b' et c dans la Fig. 1.7A). Le Walker A (aussi appelé boucle P) et le Walker B forment le domaine catalytique capable de lier et d'hydrolyser une molécule d'ATP couplée à un ion de magnésium Mg^{2+} (Fig. 1.11A). Le motif C est aussi appelé *senseur 1* et est caractérisés par la présence d'un résidu asparagine conservé. Conjointement avec le motif B', le motif C agirait principalement à titre de détecteur de l'état de phosphorylation de l'ATP et de stabilisateur d'une molécule d'eau nécessaire à l'attaque nucléophile du γ -phosphate de l'ATP (Fig.

1.7A et Fig. 1.11A) (Gorbalenya et al., 1990; Hickman and Dyda, 2005; Ogura and Wilkinson, 2001). Le repliement des ces motifs en cinq feuillets β entourés de plusieurs hélices α est caractéristique des membres de la superfamille AAA⁺ (*ATPase-Associated with various cellular Activity*) ATPase dont fait partie E1 (Hanson and Whiteheart, 2005; Hickman and Dyda, 2005). Ce type d'ATPase contient également un « doigt d'arginine » qui détecte l'état de phosphorylation de l'ATP situé sur le monomère adjacent et qui coordonne l'hydrolyse de l'ATP au changement conformationnel nécessaire au déroulement de l'ADN. Chez le VPH, la conservation de ces motifs dans le domaine C-terminal permet à E1 de lier et d'hydrolyser l'ATP. Ainsi, la mutation de résidus conservés dans le Walker A (G462, K463, S464), dans le Walker B (D502 et D503), dans le motif B' (R516 et D520), dans le motif C (T545 et N547) ou du « doigt d'arginine » (R562) est associée à une diminution de l'activité ATPase et de la fonction de réplication de E1 (Abbate et al., 2004; Dixon et al., 2000; Lin et al., 2002; Rocque et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001; Yasugi et al., 1997b). En plus des motifs décrits ci-dessus, l'étude de la protéine E1 du VPB a permis de démontrer que la mutation de résidus retrouvés à l'intérieur de la pochette de liaison à l'ATP (K449 et Y558) est aussi associée à une perte de l'activité ATPase de E1 (Fig. 1.11A) (Enemark and Joshua-Tor, 2006; Liu and Stenlund, 2010).

Malgré que la simple liaison de l'ATP dans le domaine C-terminal de E1 soit suffisante à la relâche de la protéine E2 et à l'oligomérisation de E1 sur l'ADN, son hydrolyse est essentielle à la génération de l'énergie qui est nécessaire à l'ouverture et au déroulement de l'ADN. Afin de transférer l'énergie de l'ATP hydrolysé en une action mécanique, deux motifs de E1 sont essentiels : le motif FWL et le β -*hairpin*. En ce sens, il est intéressant de noter que l'introduction de mutations dans ces motifs inhibe les fonctions associées à l'hydrolyse de l'ATP (ouverture de l'ADN et déroulement de l'ADN) sans inhiber l'activité ATPase de la protéine (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2010). Bien que le rôle exact du motif FWL ne soit pas encore connu, le rôle du β -*hairpin* a été élucidé grâce à l'obtention de la structure cristalline du domaine C-terminal de la protéine VPB E1. À

l'intérieur d'un canal de ~ 13 Å de diamètre formé au centre de l'hexamère assemblé sur l'ADN simple brin, les β -*hairpins* entre en contact avec des riboses du squelette d'acide nucléique (Fig. 1.11B et C) (Enemark and Joshua-Tor, 2006). Plus précisément, le β -*hairpin* de chaque monomère entre en contact avec l'ADN grâce à une interaction entre le groupement ammonium de la lysine 506 et l'oxygène du groupement phosphate de l'ADN simple brin ainsi que par la formation d'un lien hydrogène entre l'histidine 507 et le phosphate du nucléotide adjacent (Fig. 1.11C). Ces interactions sont également stabilisées par des interactions de type van der Waals créées par le groupement aliphatique de la lysine et le groupement aromatique de l'histidine avec la portion ribose de l'ADN simple brin. L'hydrolyse de l'ATP en ADP, puis la relâche de l'ADP (forme Apo), induit le déplacement du β -*hairpin* de la région N-terminale vers la région C-terminale de la protéine. Comme le β -*hairpin* reste lié au ribose en tout temps, son déplacement à l'intérieur de l'hexamère permet d'escorter l'ADN simple brin à travers le canal central (Enemark and Joshua-Tor, 2006). Ainsi, tel que schématisé à la figure 1.11C et D, un monomère lié à l'ATP lie d'abord l'ADN et le transloque à travers l'hélicase grâce au changement de conformation d'abord induit par l'hydrolyse de l'ATP en ADP, puis par le relâchement de l'ADP. Lorsque chaque monomère passe à travers le processus ATP-ADP-Apo, l'ADN est transloqué d'une longueur de 6 nt à l'intérieur du canal central de l'hexamère. Les études biochimiques de l'activité hélicase de E1 *in vitro* estiment que la vitesse de déroulement d'un hexamère serait d'environ 0.3 pM de substrat/h/nM de monomère de E1 purifié lorsque le substrat utilisé est un petit brin d'ADN hybridé à un ADN simple brin circulaire (M13mp18) (Rocque et al., 2000; White et al., 2001).

Au cours du déroulement de l'ADN, la route exacte empruntée par le brin d'ADN simple brin complémentaire ne passant pas au centre de l'hexamère est imprécise. Chez l'AgT, la présence d'une ouverture entre les OBD de l'hexamère servirait de passage pour la sortie d'un des brins suite à la liaison à l'ADN double brin (Meinke et al., 2007; Meinke et al., 2010). La présence d'une telle ouverture n'a cependant pas été décrite chez les VPH. Finalement, bien que des études démontrent que les deux hexamères restent assemblés au

cours du déroulement de l'ADN et que celui-ci est pompé à l'intérieur du double hexamère, une autre étude suggère que les hexamères se sépareraient pour migrer dans des directions opposées sur les brins d'ADN complémentaires (Fig. 1.8B) (Fouts et al., 1999; Lin et al., 2002; Liu et al., 1998). Comme l'OBD du VPH lie l'ADN de manière spécifique, le déroulement de l'ADN par deux hexamères indépendants qui se déplacent dans des directions opposées, nécessiterait l'abolition de cette interaction. Le mécanisme d'élongation de l'ADN au cours de la réplication du génome viral est donc encore à définir. Il est toutefois intéressant de noter que malgré le fait que plusieurs études aient démontré que le double hétérohexamère de MCM du complexe de réplication de l'ADN des eucaryotes (équivalent au double hexamère de E1) reste assemblé au cours de la réplication de l'ADN, une étude plus récente suggère fortement que ce complexe de réplication de l'ADN des eucaryotes soit converti en deux réplisomes indépendants au cours de l'élongation de la réplication de l'ADN (Fig. 1.6) (Yardimci et al., 2010).

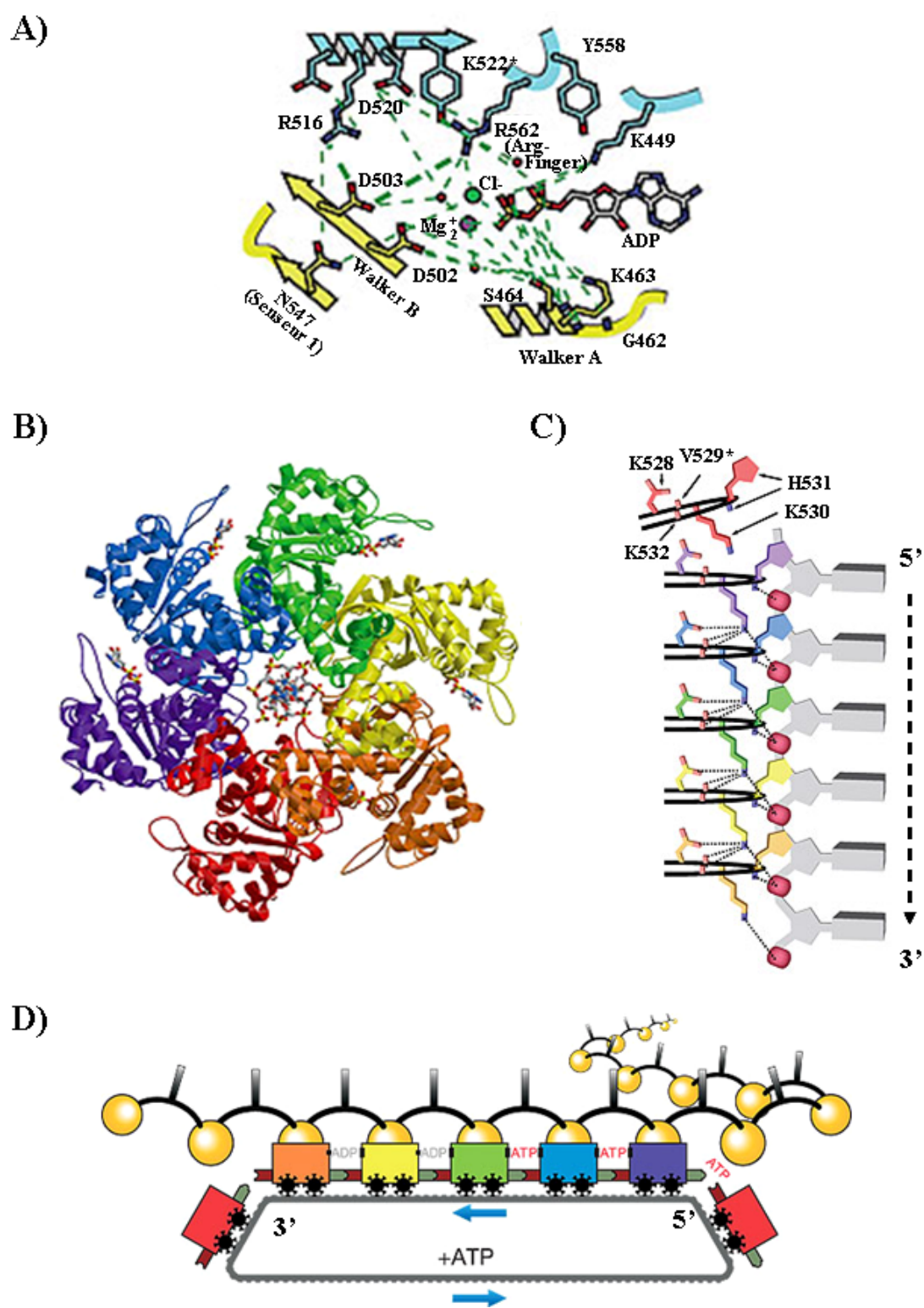


Figure 1.11. Structure du domaine hélicase de la protéine E1.

(A) Représentation des acides aminés impliqués dans la coordination de l'ATP et de l'ADP ainsi que dans la détection de leur état d'hydrolyse par le monomère de E1 adjacent. Afin de faciliter la cohérence avec le texte, la numérotation des acides aminés suit celle du VPH 31. Lorsqu'un acide aminé n'est pas conservé d'un PV à l'autre, l'acide aminé est accompagné d'un astérisque (*). Dans cette figure, les résidus des Walker A et B coordonnant une molécule d'ADP sont identifiés en jaune tandis que les résidus du monomère adjacent sont identifiés en bleu. Un ion Mg^{2+} , nécessaire à l'activité de l'hélicase, et un ion Cl^- , qui était présent dans le cristal, sont également identifiés. Finalement, les molécules d'eau sont représentées par de petits cercles rouges.

(B) Structure du domaine C-terminal (acides aminés 306-577) de la protéine E1 du VPB (acides aminés 330-602 du VPH 31) obtenue par l'assemblage de 6 monomères de E1 sur de l'ADN simple brin. Chaque monomère est représenté par une couleur différente.

(C) Représentation linéarisée des 6 β -hairpin localisés au centre de l'hexamère et faisant contact avec le simple brin d'ADN. L'histidine H507 du β -hairpin de chaque monomère est représentée par une couleur différente et l'interaction (ligne pointillée) entre la lysine K506 et l'oxygène du sucre composant le squelette de l'ADN (cercles rouges) est représentée.

(D) Schématisation du mouvement de translocation de l'ADN simple brin à l'intérieur de l'hexamère. Les boules jaunes représentent les β -hairpins tandis que les chariots représentent les nucléotides de l'ADN. Chacun des nucléotides est d'abord lié par un monomère complexé à l'ATP, puis l'hydrolyse de l'ATP en ADP permet au β -hairpin de transloquer le nucléotide à travers l'hexamère. Cette figure a été adaptée de Enemark et al. (2006) *Nature* (Enemark and Joshua-Tor, 2006).

1.4.2 Régulation de la réplication de l'ADN viral

1.4.2.1 Interaction de E1 avec des protéines cellulaires

1.4.2.1.1 Protéines du réplisome

Les études faites sur le VPH suggèrent que la réplication de son ADN est semi-conservative, c'est-à-dire que le nouvel épisode synthétisé contient un nouveau brin d'ADN et un brin de l'ADN parental (Melendy et al., 1995). Pour ce faire, E1 s'associe avec des composantes du réplisome cellulaire (Johnson and O'Donnell, 2005). Tel que mentionné au tout début de cette section, ce complexe cellulaire contient plusieurs protéines ayant un rôle spécifique au cours de l'élongation de la réplication. Ainsi, la sous-unité primase de la polymérase α -primase enclenche le processus en produisant de petites amorces d'ARN, puis sa sous-unité polymérase les utilise pour synthétiser les amorces d'ADN sur le brin avancé et les fragments d'Okasaki sur le brin retardé (Fig. 1.12). La création de nouveaux brins d'ADN à partir de ces amorces est ensuite assurée par la polymérase δ sur le brin retardé et par la polymérase ϵ sur le brin avancé. Le chargement de ces polymérases sur l'ADN est assuré par le complexe RFC-PCNA qui se forme au bout 3' de l'amorce d'ADN, déplace la polymérase α -primase et stabilise le complexe polymérase δ (ou ϵ)-PCNA-ADN (Johnson and O'Donnell, 2005; Moldovan et al., 2007; Sclafani and Holzen, 2007; Waga and Stillman, 1998). Suite au déroulement de l'ADN, les deux brins sont maintenus ouverts grâce à RPA, une protéine liant l'ADN simple brin, et les torsions de l'ADN induites par son déroulement sont relâchées par l'action des topoisomérases I et II (Branzei and Foiani, 2010; Waga and Stillman, 1998).

L'importance de ces protéines au cours de la réplication de l'ADN viral par E1 et E2 fut mise en évidence dès les premières analyses de la réplication de l'ADN du VPH 11 et du VPB *in vitro*. Plus particulièrement, il a été démontré que la réplication de l'ADN dans des extraits cellulaires est inhibée en présence d'anticorps ou d'inhibiteurs spécifiques ciblant la polymérase α , PCNA, RPA et les topoisomérases I et II (Kuo et al., 1994; Park et

al., 1994). De plus, grâce au fractionnement de l'extrait cellulaire capable de supporter la réplication de l'ADN du VPB *in vitro*, il a été démontré que la protéine RFC ainsi que de la polymérase δ sont également essentielles à la réplication du génome viral (Melendy et al., 1995). Dans certains cas, des analyses biochimiques ont permis de mieux définir les interactions entre E1/E2 et ces protéines. Il est cependant important de noter qu'à l'exception de la polymérase α -primase, toutes les interactions ont été rapportées uniquement pour la protéine du VPB E1.

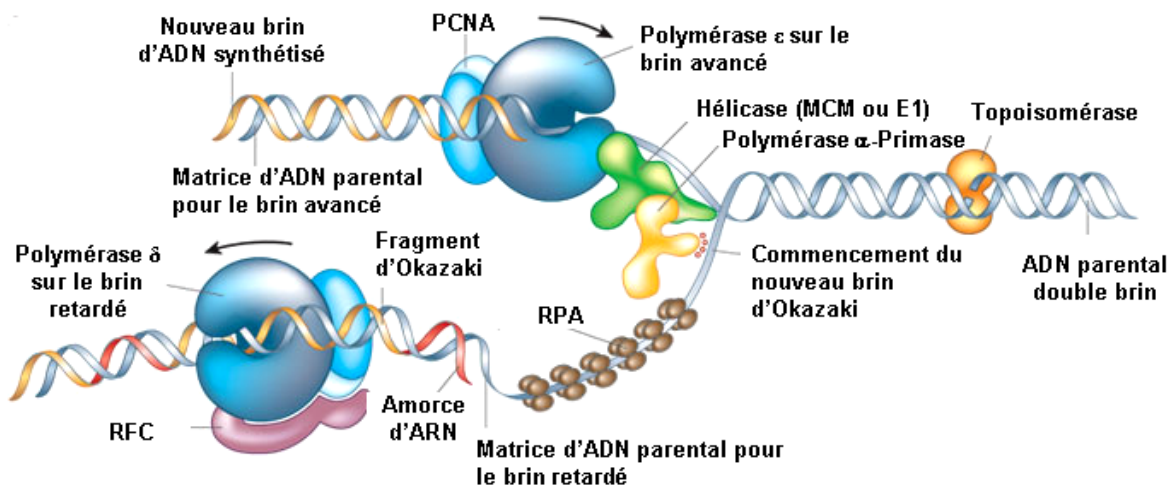


Figure 1.12. Progression de la fourche de réplication au cours de l'élongation de l'ADN chez les eucaryotes.

Chaque composante du réplisome décrite dans le texte apparaît sur cette figure. Bien que non représenté par une structure hexamérique, l'emplacement occupé par le complexe hélicase cellulaire (MCM-GINS-Cdc45) et l'hélicase virale (E1) au cours de la réplication est identifié. La figure a été adaptée à partir de Alberts et al. (2003) *Nature* (Alberts, 2003).

1.4.2.1.1.1 Polymérase α -primase

La polymérase α -primase contient quatre sous-unités : p48, la sous-unité catalytique primase, p180, la sous-unité polymérase, p58, une sous-unité auxiliaires, et p70, une sous-unité importante dans l'assemblage du complexe. Bien que deux études suggèrent que E1 interagisse avec la sous-unité p180, la majorité des études ayant caractérisé l'interaction entre E1 et la polymérase α rapportent que les protéines E1 du VPH et du VPB interagissent avec la sous-unité p70 du complexe polymérase *in vitro* ainsi que dans les levures, et non avec la sous-unité p180 (Amin et al., 2000; Bonne-Andrea et al., 1995; Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998; Park et al., 1994). Dans tous les cas, ces interactions sont dépendantes du domaine C-terminal de E1 et sont mutuellement exclusives aux interactions entre E1 et E2 (Fig. 1.7) (Amin et al., 2000; Masterson et al., 1998). Puisque E2 est nécessaire à la formation du complexe d'initiation de la réplication du VPH, cette observation suggère que la polymérase interagit avec l'hexamère de E1, c'est-à-dire lorsque E2 a été évincé du complexe (Fig. 1.8B).

1.4.2.1.1.2 RPA

RPA est composée de trois sous-unités : RPA32, RPA70 et RPA14. Bien que chaque sous-unité soit importante pour les fonctions de RPA, RPA70 serait responsable de la majorité des liaisons du complexe protéique à l'ADN ainsi qu'aux protéines cellulaires telles que la polymérase α (Braun et al., 1997; Dornreiter et al., 1992; Wold, 1997). L'interaction entre E1 et la sous-unité RPA70 a été observé dans des essais d'interaction protéine-protéine de type ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent protein interaction Assay*) et *GST-pulldown*, utilisant des protéines pures produites chez *E. coli* ou des protéines produites *in vitro* dans un système de réticulocytes de lapin (Han et al., 1999; Loo and Melendy, 2004). Dans ce type d'essai, les interactions entre RPA, E1 et l'ADN simple brin sont mutuellement exclusives (Loo and Melendy, 2004). En dépit de ces résultats *in vitro* et en accord avec les résultats de *Bonne-Andrea et al*, les chromatographies d'affinités faites dans notre laboratoire n'ont jamais permis de détecter l'interaction entre E1 et RPA

(Bonne-Andrea et al., 1995; Fradet-Turcotte and Archambault, Données non-publiées). Combinés, ces résultats suggèrent que l'interaction entre E1 et RPA est de faible affinité. Finalement, puisqu'il a déjà été rapporté que le TAD de E2 est également capable d'interagir avec RPA, il est possible que l'interaction *in vivo* soit favorisée en présence des deux protéines virales (Li and Botchan, 1993). Globalement, ces résultats suggèrent que RPA interagit faiblement avec E1 et E2.

1.4.2.1.1.3 Topoisomérase I

En clivant et re-liant l'ADN, les topoisomérases permettent de relaxer les torsions induites par le déroulement et la réplication de l'ADN. Tout comme RPA, les interactions des protéines E1 du VPH et du VPB avec la topoisomérase I ont seulement été identifiées *in vitro*. En fait, les études de *GST-pulldown* suggèrent que l'OBD et le domaine C-terminal de E1 interagissent avec la topoisomérase I, et que cette interaction stimulerait à la fois la liaison spécifique de E1 à l'ADN et l'activité de la topoisomérase I (Fig. 1.7) (Clower et al., 2006a; Hu et al., 2006). Comme E2 est également capable d'interagir et de stimuler l'activité de la topoisomérase I (Clower et al., 2006b), d'autres études seront essentielles afin de définir l'importance de ces interactions entre E1/E2 et la topoisomérase I.

1.4.2.1.2 p80

Aussi connue sous les noms de WDR48 et UAF1 (Usp1-Associated Factor 1), la protéine cellulaire p80 contient un domaine composé d'un motif WD40 répété qui est prédit pour s'assembler en une structure tertiaire en forme d'hélice de bateau à 8 pales (*β -propeller*) ainsi qu'un domaine composé de deux faisceaux d'hélices torsadées (*coiled-coil*) (Park et al., 2002). Les premières études de p80 ont été faites au début des années 2000 et ont démontré que la protéine Tip du virus de l'herpès Saimiri utilise p80 afin d'induire la dégradation des récepteurs T des lymphocytes (Park et al., 2003; Park et al., 2002). Bien que p80 ait d'abord été observée au niveau des lysosomes, des études récentes démontrent

que p80 interagit et module l'activité d'une protéine nucléaire. De manière plus précise, p80 lie et stimule l'activité de Usp1, une dé-ubiquitineuse impliquée dans la régulation de plusieurs voies de réparation de l'ADN (Cohn et al., 2009; Cohn et al., 2007; Kee and D'Andrea, 2010). Plus précisément, Usp1 inhibe la voie de réparation de l'ADN de l'anémie de Fanconi en dé-ubiquitinant la protéine FANCD2 (Moldovan and D'Andrea, 2009a, b). De plus, en collaboration avec la protéine cellulaire ELG1, Usp1 dé-ubiquitine PCNA, dont les niveaux d'ubiquitination dictent son implication dans diverses voies de réparation de l'ADN (Brun et al., 2010; Huang et al., 2006; Lee et al., 2010; Niimi et al., 2008; Oestergaard et al., 2007). Finalement, une nouvelle étude démontre qu'Usp1 maintient la kinase Chk1 active suite à la stimulation de la voie de dommages à l'ADN dépendante de ATR (*ATM and Rad3-related kinase*) (Guervilly et al., 2011). En plus de Usp1, p80 interagit et stimule les activités de Usp12 et 46. Bien que les fonctions de ces Usp soient peu connues, la récente découverte que ces complexes dé-ubiquitinent les histones H2A et H2B suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans la régulation de la compaction de la chromatine (Cohn et al., 2009; Joo et al., 2011; Kee et al., 2010).

Dans notre laboratoire, l'étude des divers domaines fonctionnels de la protéine E1 du VPH 11 par une approche de type *Tandem Affinity Purification* (TAP) a permis d'identifier une nouvelle interaction entre la région N-terminale de la protéine virale et la protéine cellulaire p80 (Cote-Martin et al., 2008). Des méthodes de *GST-pulldown* et de co-immunoprécipitation ont ensuite permis d'établir que les acides aminés 10-40 sont essentiels à l'interaction de la protéine E1 des VPH 11 et 31 avec p80. La mutation d'acides aminés spécifiques hautement conservés de ce domaine permet d'abolir cette interaction (W17A/F18A, V20A/E21A ou V23A/I24A) (Fig. 1.7). *In vivo*, cette interaction permet à la protéine E1 du VPH 11 et 31 de relocaliser la protéine cytoplasmique p80 au noyau (Cote-Martin et al., 2008). Finalement, l'utilisation d'essais de répllication transitoire ainsi que l'introduction de mutations abolissant l'interaction E1-p80 dans un génome viral complet ont permis de démontrer que les protéines E1 mutantes étaient incapable de répliquer efficacement l'ADN et donc de maintenir le génome viral sous forme épisomale dans les

kératinocytes (Annexe 5 et (Cote-Martin et al., 2008)). En dépit de leur défaut de réplication, ces protéines sont toujours en mesure d'amplifier le génome du VPH suite à la différenciation des kératinocytes. Ce résultat suggère que la liaison de E1 à p80 n'est pas essentielle à l'amplification du génome et va de pair avec l'observation que la région N-terminale de E1 permettant la liaison à p80 est clivée par la caspase-3/-7 au cours de la différenciation des kératinocytes (Fig. 1.7 et section 1.4.2.2) (Moody et al., 2007). Bien que les fonctions exactes de l'interaction de E1 avec p80 soient encore mal définies, on sait qu'une protéine E1 incapable d'interagir avec p80 est toujours localisée au noyau cellulaire et interagit toujours spécifiquement et non spécifiquement avec l'ADN.

1.4.2.1.3 p56

Au début des années 1980, il a été démontré que la forme épisomale du génome du VPB n'est pas maintenue dans les cellules en présence d'interféron (IFN) (Turek et al., 1982). Le même phénotype a par la suite été observé dans les kératinocytes maintenant le génome du VPH 31 ou du VPH 16 (Chang et al., 2002; Herdman et al., 2006). Dès lors, il a été proposé que l'activation de la voie de l'interféron induisait une inhibition de la réplication de l'ADN viral. Ce n'est cependant que dernièrement qu'une partie du mécanisme moléculaire responsable de cette inhibition a été révélée. En fait, il a été découvert qu'une protéine induite par la voie de l'interféron, p56, lie E1 et interfère avec ses fonctions de réplication (Terenzi et al., 2008). Plus précisément, il a été démontré que le domaine N-terminal de p56 interagit avec les acides aminés 372-629 du domaine C-terminal de la protéine E1 et que cette interaction inhibe la réplication de l'ADN viral *in vitro* et *in vivo* (Fig. 1.7) (Saikia et al., 2010; Terenzi et al., 2008). Bien que p56 induise la relocalisation cytoplasmique de E1, les analyses biochimiques suggèrent que p56 inhiberait directement la réplication en inhibant la liaison spécifique de E1 à l'ADN, son interaction avec E2 ainsi que son activité hélicase (Saikia et al., 2010; Terenzi et al., 2008). Il a également été proposé que la phénylalanine 399 du VPH 18 (F399) serait importante à l'interaction entre E1 et p56. En fait, il a été démontré que la délétion de F399 n'affecte pas les fonctions de réplication de E1, mais les rendent insensibles à l'inhibition par p56 ainsi

que par les traitements à l'interféron (Saikia et al., 2010). Il est cependant important de noter que le rôle exact de cette phénylalanine dans l'interaction E1-p56 est difficile à évaluer, puisque nous avons démontré que sa mutation chez la protéine E1 de d'autres types de VPH inhibe ses activités de réplication (Annexe 5 et (Titolo et al., 2000; White et al., 2001)). Ainsi, bien que ces résultats permettent d'expliquer l'efficacité des traitements des infections au VPH par l'IFN ou par l'imiquimode (Section 1.2), les mécanismes moléculaires précis permettant à l'IFN et à p56 d'inhiber les fonctions de réplication de E1 restent à être identifiés et/ou confirmés chez les autres VPH.

1.4.2.1.4 Hsp40 et Hsp70

La famille des chaperonnes moléculaires est composée entre autre des protéines Hsp40 et Hsp70 (*Heat Shock Protein*), dont la fonction majeure est d'assister le repliement tridimensionnel des protéines au cours de leur formation *de novo* ou le dépliement des protéines au cours de processus tels que la dégradation (Bukau and Horwich, 1998). Ces chaperonnes sont en mesure de moduler les structures de leurs protéines cibles (aussi appelés clients) grâce à leur activité ATPase. Deux études suggèrent que la réplication des VPH requiert l'action de chaperonnes. Tout d'abord, l'implication des chaperonnes Hsp40 et 70 dans la modulation de la réplication a été démontrée chez la protéine E1 du VPH 11. Plus précisément, il a été démontré que le domaine J de Hsp40 ainsi que la protéine Hsp70 augmentent l'affinité de liaison de E1 à l'origine de réplication. De plus, des études *in vitro* démontrent que ces Hsp favorisent l'assemblage de doubles hexamères ainsi que l'initiation de la réplication (Liu et al., 1998). En fait, il a été suggéré que les Hsp réguleraient ces processus en facilitant l'éjection de la protéine E2 du complexe d'initiation de la réplication (Lin et al., 2002). Finalement, l'importance des Hsp dans la réplication de l'ADN des virus à ADN double brin a également été soulignée chez le SV40 où la réplication de l'ADN viral dépend de l'interaction du domaine J de l'AgT avec les chaperonnes Hsp40 et Hsp70 (Campbell et al., 1997; Sullivan and Pipas, 2002).

1.4.2.1.5 hSNF5 et H1

SWI/SNF est un complexe de remodelage de la chromatine qui inhibe ou active la transcription selon qu'il favorise ou non l'ouverture de la chromatine au niveau de promoteurs spécifiques (Sudarsanam and Winston, 2000). Ce complexe contient une activité ATPase lui permettant de moduler l'interaction des histones avec l'ADN. L'interaction de E1 avec les acides aminés 182-331 de la sous unité Ini1/hSNF5 du complexe cellulaire SWI/SNF a d'abord été identifiée chez la protéine du VPH 18, puis elle a été confirmée chez le VPH 11 et le VPB (Lee et al., 1999). Au niveau de la protéine E1, l'interaction requière la région 143-437 et peut être inhibée par la mutation de résidus spécifiques (S198P/F199S, L278K, N368H/A369E et N390E/Y391H) (Fig. 1.7). Bien que le rôle précis de cette interaction demeure inconnu, le fait que la réplication de l'ADN viral soit activée lorsque Ini1/hSNF5 est surexprimé, et réprimée lorsque son expression est inhibée par un ARN anti-*sense*, suggère que Ini1/hSNF5 favoriserait la réplication de l'ADN viral. Comme le génome du VPH est empaqueté sous forme de chromatine, et que la liaison de l'ADN viral par les nucléosomes inhibe sa réplication par les protéines E1 et E2, de même que l'expression des gènes viraux à partir du promoteur p97 (del Mar Pena and Laimins, 2001; Favre et al., 1977; Li and Botchan, 1994), il est possible que l'interaction de E1 avec le complexe SWI/SNF favorise la réplication de l'ADN et/ou la transcription des gènes viraux en induisant la déstabilisation des histones présentes dans le LCR (Tang et al., 2010).

En plus de son interaction avec un complexe de remodelage de la chromatine, il a été suggéré que E1 était capable d'évincer l'histone H1 de l'ADN viral au cours de sa réplication (Swindle and Engler, 1998). Dans les cellules eucaryotes, l'histone H1 est située entre deux nucléosomes et sert à compacter la chromatine (Raghuram et al., 2009). Ainsi, l'étude de *Swindle et al*, qui suggère qu'une région contenant les acides aminés 1-170 de E1 soit capable d'interagir avec l'histone H1, porte à croire encore une fois que E1 contribue à la déstabilisation de la chromatine au cours de la réplication (Fig. 1.7) (Swindle and Engler, 1998). De plus amples recherches seront toutefois nécessaires afin de déterminer le rôle

exact des interactions de E1 avec la sous unité Ini1/hSNF5 du complexe SWI/SNF ainsi qu'avec l'histone H1 au cours de la réplication de l'ADN viral.

1.4.2.1.6 E1-BP

L'interaction entre E1 et la protéine E1-BP a été identifiée au cours d'un crible de type double-hybride utilisant la protéine E1 du VPH 16 comme proie (Yasugi and Howley, 1996; Yasugi et al., 1997b). E1-BP est une protéine de 432 acides aminés contenant un site de liaison à l'ATP. Cette protéine serait une forme épissée de la protéine TRIP13 (*Thyroid hormone Receptor Interactor Protein 13*), soit une protéine interagissant avec les récepteurs d'hormones thyroïdiennes (Lee et al., 1995). La caractérisation de l'interaction entre E1 et E1-BP a démontré que toutes les protéines E1 contenant une mutation abolissant leur liaison à E1-BP (Y382F, W419R et L, G462D et G476R) étaient incapables de répliquer efficacement l'ADN du VPH *in vivo* (Yasugi et al., 1997b). Comme la fonction cellulaire exacte de E1-BP demeure toujours inconnue et que les mutants de E1 inhibant sa liaison à E1-BP sont aussi incapables d'hydrolyser l'ATP, de s'oligomériser ou de lier E2, d'autres études seront nécessaires pour déterminer le rôle spécifique de l'interaction E1-E1-BP au cours de la réplication de l'ADN viral.

1.4.2.2 Clivage d'une portion de la région N-terminale de E1 par les caspases-3 et -7

La région N-terminale de la protéine E1 contient un site consensus de clivage par les caspase-3/-7 (D-x-x-D-x-x-D) qui est hautement conservé à travers les différents types de PV (Fig. 1.7). *In vitro* et *in vivo*, cette région est clivée par la caspase-3 et ce clivage peut être inhibé par la mutation de l'aspartate centrale du site consensus (D49A) (Moody et al., 2007; Morin et al., 2011). L'utilisation de ce mutant a permis de déterminer que le clivage d'une portion de la région N-terminale n'est pas nécessaire à la réplication transitoire de l'ADN viral, ni au maintien de l'épisome dans des kératinocytes immortalisés. Cependant, l'incapacité de la protéine E1 D49A à amplifier le génome suite à la re-suspension des kératinocytes immortalisés dans la méthylcellulose suggère que le clivage de E1 est

essentiel à l'amplification du génome dans les couches supérieures de l'épithélium (Moody et al., 2007). De manière intéressante, il a été démontré que les caspases sont hautement activées dans des kératinocytes immortalisés avec le génome du VPH 31 et que l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 contribuent grandement à cette activation (Moody et al., 2007). Bien qu'il ait été suggéré que l'activation des caspases par les oncogènes viraux dépende de leur capacité à activer une réponse de dommages à l'ADN dépendante de ATM (Section 1.5), les mécanismes moléculaires contrôlant l'activation des caspases ainsi que les fonctions associées à la protéine E1 clivée sont encore inconnues. En fait, l'incapacité de E1 à répliquer l'ADN dans un essai de réplication transitoire en absence des 50 premiers acides aminés suggère que des facteurs et/ou des mécanismes inconnus permette à cette protéine clivée d'amplifier l'ADN (Morin et al., 2011)

1.4.2.3 Conservation d'une hélice amphipathique dans la région N-terminale de E1

Plusieurs études ont rapporté que la protéine E1 induit une activation de la transcription dans des essais de type deux-hybrides en levure et une étude a également permis d'observer ce phénomène dans les cellules de mammifères (Demeret et al., 1998; Titolo et al., 2000; Yasugi et al., 1997b). Récemment, notre laboratoire a démontré que cette activité est modulée par une petite région de la région N-terminale de E1 (Morin et al., 2011). Celle-ci contiendrait en fait un domaine intrinsèquement désordonné (IDD - *Intrinsically Disorder Domain*) capable de former une hélice amphipatique (HA) suite à sa liaison à des facteurs cellulaires tels que la sous-unité Tfb1/p62 du facteur général de transcription TFIIH (Fig. 1.7). L'introduction de mutations dans trois résidus hydrophobes conservés de cette région (M47A, F50A, I51A ; MFI), inhibe la capacité de la région N-terminale à induire la transactivation dans les levures ainsi que dans les cellules de mammifères (Morin et al., 2011). En plus d'inhiber ces fonctions, ce motif jouerait un rôle au cours la réplication puisque sa mutation induit une perte de plus de 50% de la réplication de l'ADN du VPH 31. Bien que le rôle précis de l'hélice amphipatique de E1 au cours de la réplication de l'ADN soit encore inconnu, nous avons démontré que la mutation du motif

MFI n'inhibe pas l'interaction de E1 avec l'ADN, E2, et p80, ni son clivage par les caspase-3/-7.

1.4.2.4 Motif de localisation et d'export nucléaire de E1

Chez les eucaryotes, le transport nucléo-cytoplasmique de la plupart des protéines est restreint par les pores nucléaires (NPC, *Nuclear Pore Complex*) et seules les protéines de la famille des β -karyophérines peuvent les traverser. Pour entrer au noyau, les protéines (appelées cargo) doivent donc lier les importines, et pour en sortir, elles doivent interagir avec les exportines (Fig. 1.13) (Cook et al., 2007). Plus précisément, les importines interagissent avec leur cargo en liant leur séquence de localisation nucléaires (NLS : *Nuclear Localisation Signal*) et les exportines, en liant leur séquence d'export nucléaire (NES : *Nuclear Export Signal*). Selon le type d'importine avec lequel ils interagissent, les NLS sont regroupés en trois différentes classes. Ainsi, l'hétérodimère importine α/β est responsable de l'import des protéines contenant un NLS classique. Ce type de NLS est composé de régions riches en résidus chargés positivement (lysine et arginine) et peut se présenter sous forme monopartite (K-K-x-K) ou bipartite (2K/R-x₍₁₀₋₁₂₎-K/R) (Conti et al., 1998). Deux autres types d'importines ont également été identifiées : 1) la Snurportine 1, qui est responsable de l'import du complexe UsnRNP (*spliceosomal ribonucleoproteins containing the UsnRNA*), dans lequel la coiffe m3G retrouvée en 5' de ces petits ARN sert de NLS, et 2) la Transportine 1 qui assure l'import des protéines responsables de l'export nucléaire des ARNm via la reconnaissance de larges NLS dont la séquence contient un motif PY conservé R/K/H-x₍₂₋₅₎-P-Y (Cook et al., 2007; Lange et al., 2008; Lee et al., 2006). À l'inverse de l'import, la majorité des exports nucléaires sont médiés par l'exportine Crm1 (*Chromosome Region Maintenance 1*). Le seul rôle connu de l'autre exportine, la CAS, est d'assurer l'export nucléaire de l'importine α . Contrairement au NLS, Crm1 reconnaît une seule classe de NES dont la séquence consensus est riche en leucines. Bien que les leucines soient prédominantes dans la plupart des NES, la comparaison de plusieurs NES a révélé que dans certains cas, la leucine est remplacée par d'autres acides aminés.

Ainsi, la séquence consensus de ce type de NES est Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X- Φ , où Φ peut être une leucine, une valine, une isoleucine, une phénylalanine ou une méthionine (Dong et al., 2009; Kutay and Guttinger, 2005; la Cour et al., 2004). L'interaction entre Crm1 et le NES peut être spécifiquement inhibée par la Leptomycine B, un antifongique qui induit l'alkylation d'une cystéine (C528) localisée dans la pochette de liaison au NES du domaine central de Crm1 (Fig. 1.13) (Dong et al., 2009; Kudo et al., 1999).

L'accessibilité du NLS et du NES des protéines cargo aux importines et aux exportines peut être modulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la sumoylation (Alvisi et al., 2008; Hagting et al., 1999; Jans and Hubner, 1996; Pichler and Melchior, 2002). Un excellent exemple de ce type de contrôle est le rôle que joue la phosphorylation des sous-unités du complexe d'initiation de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes sur leur localisation cellulaire. En fait, bien que l'augmentation de l'activité des Cdk et de Ddk à la fin de la phase G1 soit nécessaire à l'activation de l'activité hélicase du complexe MCM (Fig. 1.6) (Araki, 2010), l'accumulation de phosphorylations par ces kinases en phase S induit la relocalisation des MCMs au cytoplasme (Nguyen et al., 2000; Nguyen et al., 2001). Ainsi, ce processus permet d'inhiber la ré-initiation de la réplication au cours de la phase S. La protéine E1 ne fait pas exception à cette règle et plusieurs études, dont celle présentée dans cette thèse, ont investigué le rôle des modifications post-traductionnelles de E1 dans le contrôle de son import/export nucléaire (Section 1.4.2.5).

Finalement, la directionnalité du transport nucléo-cytoplasmique est dictée par la différence de concentration de la GTPase RAN liée au GTP (RanGTP) entre le noyau et le cytoplasme. Dans le cytoplasme, la faible concentration de RanGTP permet le chargement du cargo-NLS sur l'importine. Suite à la translocation de ce complexe au noyau, la haute concentration de RanGTP induit la relâche du cargo-NLS. À l'opposé, le chargement du cargo-NES sur les exportines dépend de la présence d'une haute concentration de RanGTP retrouvée dans le noyau, et sa relâche au cytoplasme dépend de l'hydrolyse du GTP en GDP par une RanGAP (*GTPase Activating Protein*). Le maintien du gradient de RanGTP

au noyau est assuré par la protéine NTF2 (*Nuclear Transport Factor 2*) qui permet le rétro-transport de la RanGDP au noyau et par la Ran-GEF (*GTPase Exchanging Factor*) qui échange le GDP pour du GTP (Fig. 1.13) (Cook et al., 2007).

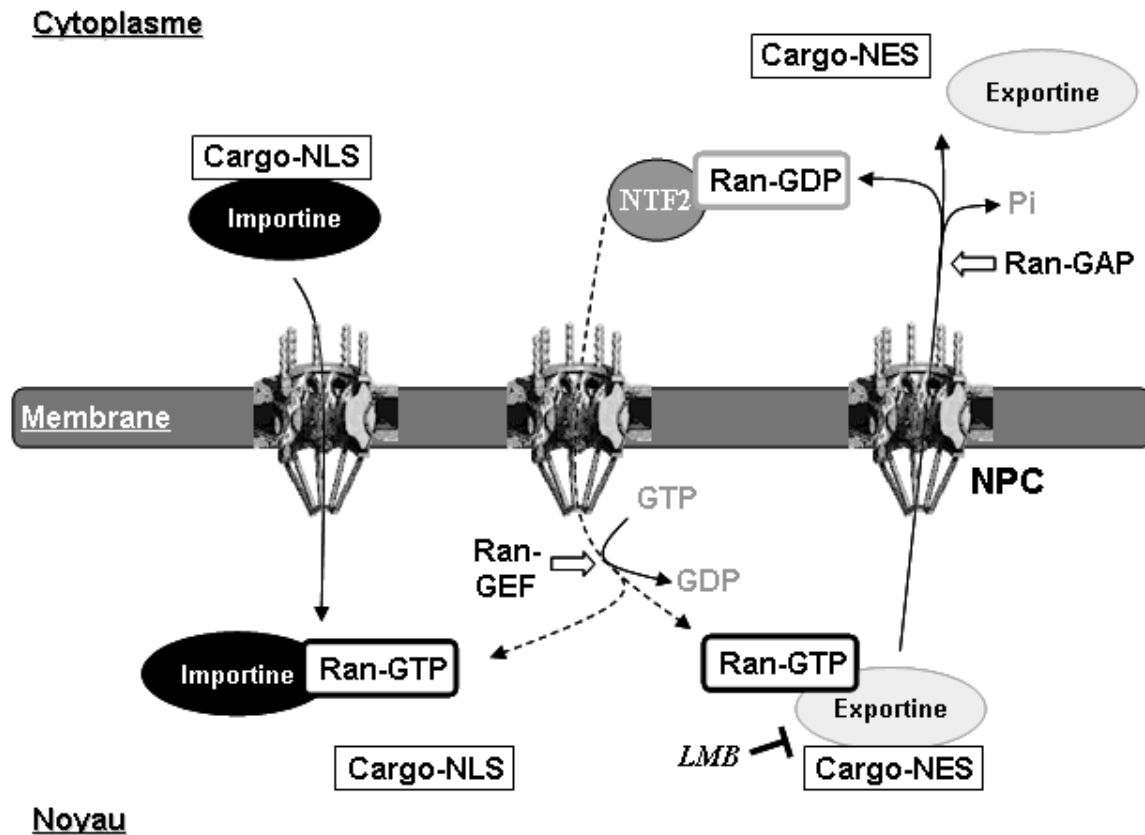


Figure. 1.13. Contrôle du transport nucléo-cytoplasmique chez les eucaryotes.

L'entrée au noyau est régulée par les importines et la sortie par les exportines. Ces protéines permettent de traverser la membrane nucléaire en passant par les pores du noyau (NPC). Ces processus sont régulés par le maintien d'un gradient de Ran-GTD entre le noyau et le cytoplasme. La leptomycine B (LMB) inhibant l'interaction de l'exportine Crm1 avec le cargo-NES est aussi identifiée. La structure des NPC provient de Nakielny et al. (1997) *Curr Opin Cell Biol* (Nakielny and Dreyfuss, 1997)

La protéine E1 du VPH contient un NLS ainsi qu'un NES (Fig. 1.14). D'abord identifiée chez la protéine du VPB, le NLS classique de type bipartite, retrouvée dans la région N-terminale de la protéine E1, a ensuite été caractérisé par mutagenèse chez la protéine du VPH 11 (Leng and Wilson, 1994; Lentz et al., 1993; Yu et al., 2007a). La première partie du NLS est hautement conservée à travers les divers PV, tandis que la seconde est plus variable (Annexe 1). Ainsi, la substitution de deux ou des trois acides aminés composant la première partie du NLS en alanine ou en glycine (K86, R87 et K88) est suffisante pour réduire de plus de 98% l'import de la protéine au noyau (Chapitre 3 et (Yu et al., 2007a)). Bien que la seconde partie du NLS soit moins conservée à travers les PV (K119-R122), celle-ci comporte toujours de 2 à 3 résidus basiques (lysine ou arginine) et la substitution de ceux-ci en alanine est également suffisante pour inhiber l'import de E1 au noyau (Fig. 1.14) (Yu et al., 2007a). Aucune interaction entre la protéine E1 des VPH et des importines cellulaires n'a été rapportée. Cependant, une étude suggère que la protéine E1 du VPB interagit avec les importines $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ à travers son NLS. Cette étude suggère également que cette interaction serait réduite via la phosphorylation d'acides aminés juxtaposant le NLS et qui ne sont pas conservés chez les VPH (T102 et S109) (Bian et al., 2006). En accord avec le fait que l'accumulation nucléaire de E1 est nécessaire à la réplication de l'ADN viral, la mutation de la S109 en alanine augmente les niveau de réplication de l'ADN du VPB *in vivo* (Zanardi et al., 1997). Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler ces résidus *in vitro* (PKC, PKA, Cdk1 et Cdk2) (Cueille et al., 1998; Lentz et al., 1993; Zanardi et al., 1997). Ainsi, l'identité de la kinase responsable de la modulation de l'import de la protéine E1 du VPB *in vivo* reste à être définie.

Contrairement au NLS, le NES retrouvée dans la région N-terminale des VPH diffère grandement des NES qui ont été identifiés chez la protéine du VPB (Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Chez le VPH, le NES est localisé entre les acides aminés 105 et 114 de E1 (Fig. 1.14). L'inhibition de l'export nucléaire de E1 via la substitution en alanine de deux acides aminés de la séquence consensus du NES reconnue par Crm1 (leucine 109 et de l'isoleucine 112) ou via l'utilisation de leptomyicine B suggère que la protéine est

exportée au cytoplasme via l'exportine Crm1 (Chapitre 3 et (Deng et al., 2004)). Chez les VPB, trois NES ont été identifiées et aucun ne concorde avec celui retrouvé chez les VPH (Rosas-Acosta and Wilson, 2008).

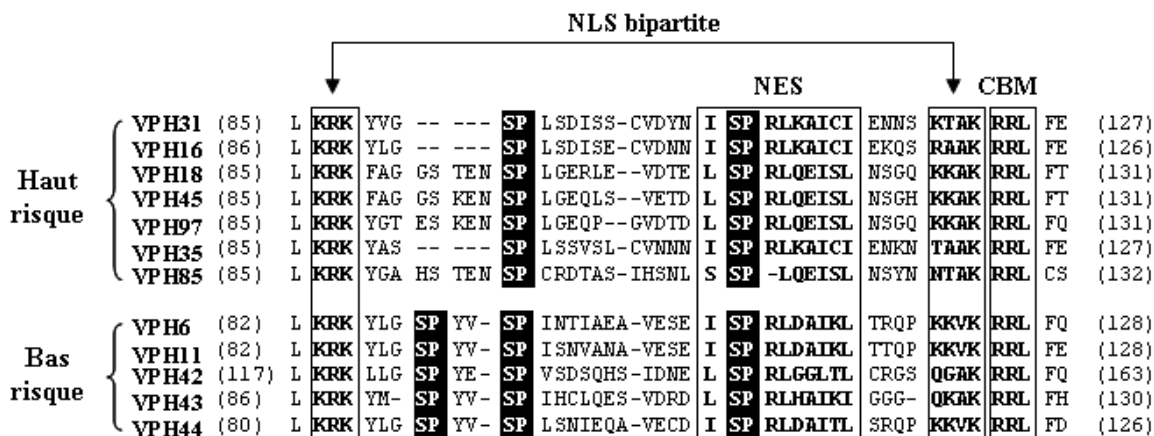


Figure 1.14. Séquence modulant la localisation nucléaire des VPH à haut et à bas risque oncogénique.

Séquences d'une portion de la région N-terminale de divers VPH dans lesquelles la localisation du NLS bipartite, du NES et du CBM est identifiée. En plus de ces séquences, les sites consensus reconnus par la cycline E-A/Cdk2 sont identifiés (noire).

Bien que l'accumulation nucléaire de E1 induite par son NLS soit essentielle à la réplication virale, la mutation du NES n'induit pas de défaut de réplication de l'ADN en tant que tel (Deng et al., 2004). Les études présentées dans cette thèse ont permis de confirmer que l'export nucléaire de E1 n'est pas essentiel à la réplication de l'ADN viral. Celles-ci révèlent cependant que l'export nucléaire est essentiel au maintien de l'épisome viral dans les kératinocytes. En fait, nous avons démontré que l'accumulation nucléaire de E1 induits des effets anti-prolifératifs, qui sont annihilés par l'export de E1 au cytoplasme. Ces résultats sont présentés et discutés aux chapitres 3 et 4.

1.4.2.5 Modifications post-traductionnelles de E1

Chez la protéine E1, le rôle majeur des modifications post-traductionnelles identifiées jusqu'à maintenant est de contrôler l'import de la protéine au noyau afin d'assurer la réplication de l'ADN viral et son export nucléaire afin de limiter ses effets anti-prolifératifs (Chapitres 3 et 4). Selon l'étude, il a été rapporté que le transport intracellulaire de E1 est modulé par sa sumoylation et/ou par sa phosphorylation par les complexes cycline/Cdk. Comme les complexes cycline/Cdk modulant la localisation intracellulaire de E1 contrôlent aussi la progression du cycle cellulaire, ces observations suggèrent que l'accumulation de la protéine virale au noyau coïncide avec la phase S du cycle cellulaire. Finalement, en plus de contrôler son transport intracellulaire, certaines modifications post-traductionnelles inhibent les fonctions de réplication de E1. Les modifications, les enzymes responsables de ces modifications et le rôle de celles-ci sur la localisation cellulaire de E1, sur ses fonctions de réplication et/ou sur sa stabilité sont décrites dans les trois prochaines sections.

1.4.2.5.1 Phosphorylation de E1 par les complexes Cycline/Cdk.

Les complexes cycline/Cdk sont les enzymes responsables de la progression du cycle cellulaire (Harper and Adams, 2001; Lee and Nurse, 1987; Viallard et al., 2001). Dans les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire peut être divisé en quatre phases : 1) une première phase de croissance (Gap 1, G1), 2) la phase de réplication de l'ADN dans laquelle le génome cellulaire est dupliqué (2N à 4N) (Synthèse, S), 3) une deuxième phase de croissance permettant la préparation de la cellule à sa division (Gap 2, G2) et finalement 4) la mitose (M). À la fin de cette dernière phase, deux cellules filles sont formées (Fig. 1.15). En plus de ces phases actives, les cellules ont également la possibilité de quitter le cycle cellulaire et d'entrer dans une phase quiescente (G0). La progression à travers ces phases est assurée par l'activité des Cdk et par la disponibilité des cyclines dont l'expression et la dégradation sont spécifiques à une phase donnée du cycle cellulaire (Fig. 1.15). Le point de restriction, c'est-à-dire le point à partir duquel la progression du cycle

cellulaire devient indépendante des facteurs de croissance cellulaires, est régulé par les niveaux de phosphorylation de la protéine pRb, dont la forme hypo-phosphorylée lie et inhibe l'activité des facteurs de transcriptions E2F associés aux promoteurs des gènes de la phase S (Section 1.1). Ainsi, en présence de facteurs de croissance, l'augmentation de la cycline D permet la formation des complexes cycline D/Cdk4 ou 6 responsables de la phosphorylation partielle de pRb ainsi que de l'expression de la cycline E. En s'assemblant avec Cdk2, la cycline E assure ensuite l'achèvement de la phosphorylation de pRb, ce qui permet la relâche complète de pRb et la transcription des gènes de la phase S par les protéines E2F (Section 1.1). Le complexe cycline E/Cdk2 permet également l'expression de la cycline A, qui s'assemble aussi à la Cdk2 et qui est nécessaire à la progression de la cellule en phase S. Suite à la duplication de l'ADN, la cycline A s'assemble à la Cdk1 et permet la transition de la phase S à la phase G2/M. Finalement, l'expression et l'import nucléaire de la cycline B permettent la formation du complexe cycline B/Cdk1, nécessaire au passage de la cellule en phase G2 vers la phase M.

Tout au long de la progression du cycle cellulaire, quatre principaux points de contrôle permettent de coordonner l'activité des complexes cycline/Cdk avec l'environnement intra- et extracellulaire (Fig. 1.15). Ainsi, le premier point de contrôle (G1/S) sert à vérifier que l'environnement cellulaire est adéquat pour la croissance de la cellule (c'est-à-dire qu'il y a suffisamment de nutriments) et que l'ADN n'est pas initialement endommagé. Le deuxième point de contrôle (intra S) s'assure que la réplication de l'ADN progresse normalement, puis avant de permettre la division de la cellule, le troisième point de contrôle (G2/M) s'assure qu'aucun dommage n'ait été inséré dans l'ADN au cours de la réplication. Finalement, le quatrième point de contrôle (M) s'assure que les chromosomes sont bien alignés sur les fuseaux mitotiques afin de permettre leur ségrégation dans les deux cellules filles.

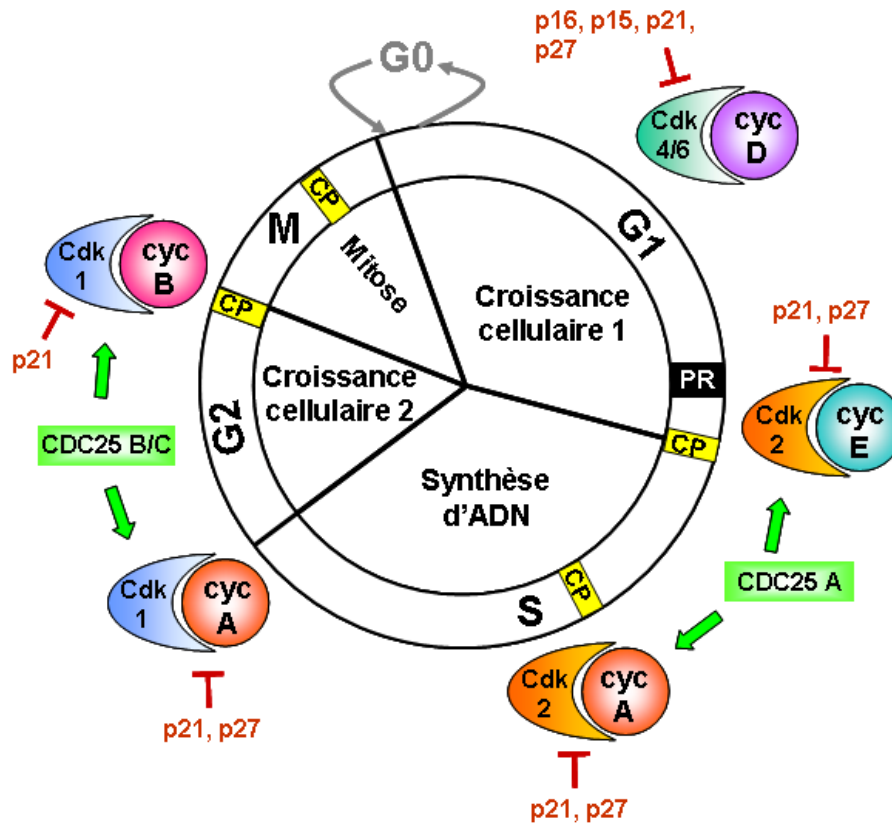


Figure 1.15. Contrôle de la progression du cycle cellulaire par la formation de complexes cycline/Cdk spécifiques.

Telle que décrit dans le texte, la progression du cycle cellulaire est assurée par l'activité spécifique de complexes formés entre les cyclines et les Cdk. Les protéines responsables de l'inhibition et de l'activation des Cdk sont respectivement identifiées en rouge et en vert. Le point de restriction (PR) et les points de contrôle (Checkpoints - CP), sont respectivement représentés par un encadré noir et jaune.

Selon le contexte cellulaire, les complexes cycline/Cdk peuvent être rapidement inhibés par des protéines appelées « inhibiteurs de Cdk » (CKI, *Cdk Inhibitor*) ou par la dégradation de phosphatases essentielles à leur activation. Parmi les CKI, la famille des INK4 (p15 et p16) contient des protéines qui lient les kinases Cdk4 et 6 et inhibent leur liaison aux cyclines D, tandis que la famille des CIP/KIP (p21 et p27) contient des

protéines qui s'associent aux complexes cycline/Cdk et inhibent leur activité (Fig. 1.15) (Besson et al., 2008; Viallard et al., 2001). Ces processus sont essentiels à l'arrêt de croissance cellulaire en présence de stress (absence de nutriment) ou de dommages à l'ADN trop importants pour permettre la duplication du génome (Buchakjian and Kornbluth, 2010). Dans de telles conditions, l'augmentation de l'expression du facteur de transcription p53, qui est responsable de l'expression de p21, induit un arrêt du cycle cellulaire et une mort programmée de la cellule lorsque la situation est irrémédiable (apoptose). Finalement, l'activité des complexes cycline/Cdk est étroitement contrôlée par les phosphatases CDC25 A, B et C qui permettent respectivement l'activation des complexes cyclines E-A/Cdk2 et cycline B/Cdk2 (Fig. 1.15) (Boutros et al., 2007). Ces phosphatases sont rapidement dégradées lorsque les kinases des voies de réponse aux dommages à l'ADN (Chk1 et Chk2) sont activées (Section 1.5). Ainsi la stabilité de celles-ci est directement dépendante de l'état de l'ADN. Ce processus permet donc de coupler la réparation de l'ADN à un arrêt de la progression du cycle cellulaire et d'assurer le maintien de la stabilité génomique.

Les complexes cycline/Cdk phosphorylent un site consensus optimal composé de x-S/T-P-(K/R)-(K/R) (Harper and Adams, 2001). En présence d'un site sous-optimal contenant seulement les acides aminés S/T-P, un site de liaison aux cyclines R-x-L (CBM) est requis pour assurer une phosphorylation efficace du substrat (Harper and Adams, 2001; Stevenson-Lindert et al., 2003). La région N-terminale de la protéine E1 du VPH contient un motif R-x-L, et celui-ci est nécessaire à l'interaction de E1 avec les cyclines (Fig, 1.14). De façon plus précise, il a été démontré que ce motif, hautement conservé et localisé entre les acides aminés 123 et 125 de la région N-terminale de E1, est essentiel à son interaction avec la cycline E et A *in vivo* et *in vitro* (Annexe 1 et Fig, 1.14) (Chapitre 3 et (Cueille et al., 1998; Ma et al., 1999)). De plus, bien que E1 n'interagisse pas directement avec la Cdk2, il a été démontré que cette dernière peut être efficacement co-purifiée par E1, et donc, qu'elle forme un complexe trimérique avec les cyclines E ou A et E1 (Chapitre 3 et (Cueille et al., 1998)). En plus du CBM, les VPH à bas risque contiennent généralement 4

sites consensus de phosphorylation par la Cdk2, dont trois sont concentrés dans la région N-terminale de la protéine, tandis que les VPH à haut risque en contiennent de quatre à cinq, dont deux sont hautement conservés dans la région N-terminale et un dans le domaine de liaison à l'ADN (Fig. 1.14 et 1.16). Bien qu'il n'ait pas été établie si tous ces sites présumptifs sont phosphorylés, il a été démontré que les sérines la région N-terminale de E1 le sont *in vivo* et que cette phosphorylation dépend du motif R-x-L (Chapitre 3 et (Deng et al., 2004)).

Chez les protéines du VPH 11, la substitution en alanine des acides aminés du CBM (R124, R125 et L126) et des sérines des sites de phosphorylation localisés dans la région N-terminale de E1 (S89, S93 et S107) a d'abord permis de démontrer que la phosphorylation de E1 est nécessaire à son accumulation nucléaire ainsi qu'à la réplication de l'ADN viral (Deng et al., 2004; Ma et al., 1999). L'introduction de mutations additionnelles dans le NES de ces protéines mutantes a ensuite permis de démontrer que leur accumulation cytoplasmique est causée par un export nucléaire non contrôlé de la protéine E1, et donc que la phosphorylation de E1 inhibe son export nucléaire (Deng et al., 2004). En accord avec cette observation, l'accumulation nucléaire de E1 ainsi que sa phosphorylation par le complexe cycline E/Cdk2 peuvent être efficacement inhibés par la CKI p21 ou par la roscovitine, un inhibiteur de l'activité des Cdk (Deng et al., 2004). Bien que les sérines 89 et 93 soient uniquement nécessaires au contrôle de l'accumulation nucléaire de E1, il a été démontré que la sérine 107 (106 chez le VPH 31) est aussi essentielle à la réplication de l'ADN viral.

En accord avec les études présentées ci-haut, l'étude de la protéine E1 du VPH 31 présentée au chapitre 3 démontre que la phosphorylation des deux sérines de la région N-terminale de E1 (S92 et S106) régule l'activité du NES. Cependant, contrairement au E1 du VPH 11, la mutation de la sérine 106 en alanine n'affecte pas la réplication. De plus, tel qu'observé avec la protéine E1 mutante dans le NES (Section 1.4.2.4), le confinement de la protéine au noyau via l'introduction d'acides aminés phosphomimétiques, c'est-à-dire imitant la phosphorylation de E1 (S92D et S106D), n'affecte pas les capacités de

réplication de la protéine mais inhibe sa capacité à maintenir le génome viral dans les kératinocytes (Chapitre 3).

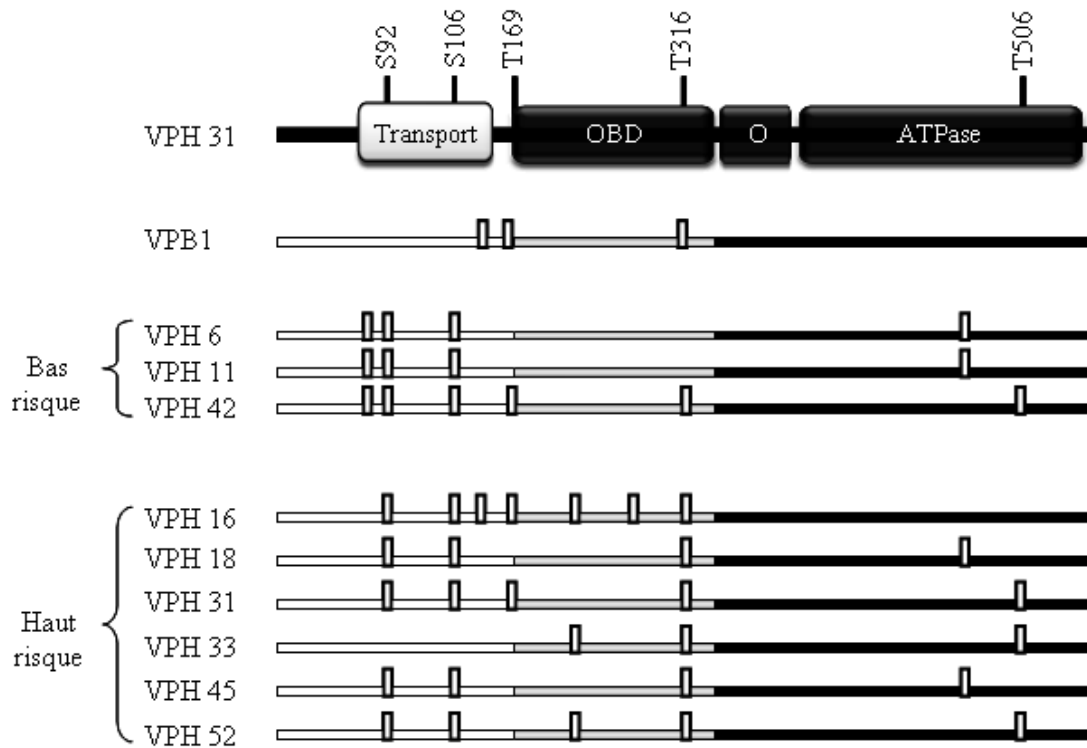


Figure 1.16. Sites présumés de phosphorylation par les complexes cycline E-A/Cdk2 à travers le VPH et le VPB.

Représentation schématisée de la conservation des sites présumés de phosphorylation par les complexes cycline E-A/Cdk2 chez les protéines E1 des VPH à bas-risque et à haut-risque oncogénique. Les sites sont identifiés par des boîtes blanches. À titre de comparaison, la protéine du VPB a également été illustrée.

Au cours de la réplication de l'ADN cellulaire, les complexes cycline/Cdk servent à contrôler deux événements précis, soit l'activation du complexe de pré-RC à l'origine de réplication au moment de l'entrée en phase S et la prévention de la ré-initiation de la réplication durant les phases S/G2 et M (Harper and Adams, 2001; Tachibana et al., 2005;

Tanaka and Araki, 2010). Plus précisément, la phosphorylation des facteurs de la réplication Sld2 et 3 induit le chargement ainsi que l'activation du complexe hélicase MCM (Araki, 2010). Cependant, l'augmentation de la phosphorylation au cours de la phase S inhibe la ré-initiation de la réplication en induisant la dégradation ou la relocalisation cytoplasmique des protéines ORC, Cdc6, Cdt1 et MCM (Nguyen et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Tachibana et al., 2005). Il est donc possible que, tout comme chez les eucaryotes, la phosphorylation de E1 induise d'abord sa rétention au noyau afin d'augmenter les niveaux de réplication de l'ADN puis, que la phosphorylation d'autres sites de E1 soit nécessaire à l'arrêt de la réplication. Ce processus permettrait en fait de coordonner la réplication de l'ADN du VPH à la progression du cycle cellulaire.

La mutation en alanine de tous les sites potentiels de phosphorylation des protéines E1 du VPH 31 et du VPB n'affecte pas leurs capacités à répliquer l'ADN (Chapitre 3 et (Deng et al., 2004; Hsu et al., 2007)). Toutefois, chez la protéine E1 du VPB, il a été rapporté qu'une sérine localisée dans l'OBD de E1 est phosphorylée par le complexe cycline A/Cdk2 *in vitro* et que la substitution de cet acide aminé par un phosphomimétique (S283E du VPB) promeut son export au cytoplasme et inhibe son activité de réplication (Hsu et al., 2007). Puisque nous avons observé que la substitution d'un site de phosphorylation présomptif de la protéine E1 du VPH 31 pour un glutamate ou un aspartate inhibe son activité de réplication et augmente également son export nucléaire (T316D ou E), cela suggère que la phosphorylation de l'OBD de E1 pourrait servir de mécanisme de terminaison de la réplication au cours de la progression du cycle cellulaire (Fig. 1.16). Les résultats obtenus au cours de l'étude sur T316 sont présentés à l'annexe 4 et sont décrits dans la discussion. De façon générale, d'autres études seront nécessaires afin de déterminer le rôle de la thréonine 316 du VPH 31 ainsi que de la sérine 107 du VPH 11 dans la réplication de l'ADN viral. En plus de la cycline E/Cdk2, l'étude de *Ma et al* a démontré que E1 est capable d'interagir avec les complexes cycline B/Cdk1 ainsi qu'avec la cycline F (Ma et al., 1999). L'existence et, s'il y a lieu, l'importance de ces interactions au cours du cycle viral restent toujours à être définies.

1.4.2.5.2 Phosphorylation de E1 par d'autres kinases

1.4.2.5.2.1 MAPK

En plus des complexes cycline/Cdk, la protéine E1 serait aussi phosphorylée par ERK1 et JNK1, deux kinases de la famille des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Yu et al., 2007a). Les MAPK sont des kinases qui régulent plusieurs voies de signalisation de l'apoptose, de la prolifération et de la différenciation cellulaire lorsqu'elles sont activées par des stimuli extracellulaires (Keshet and Seger, 2010). Une étude récente suggère que la protéine E1 interagit et est phosphorylée par ERK1 et JNK *in vitro* et que ces activités sont dépendantes de la conservation de deux motifs de liaison au MAPK localisés dans le domaine C-terminal de E1. Le premier site est composé d'un motif L-x-L (M535, Q536, L537) précédé d'un groupe d'acides aminés basiques (K530, H531, K532) ou suivi d'un groupe d'acides aminés hydrophobes (L542, L543, I544), tandis que le second site est composé d'un motif F-x-F-P (F566, T567, F568, P569). Chez le VPH 11, la substitution en alanine des acides aminés hydrophobes et du motif L-x-L (L542A, L543A, I544A, M535A, L537A) ou des acides aminés composant le motif F-x-F-P (F566A, F568A) résulte en une relocalisation cytoplasmique de la protéine en plus d'inhiber son interaction et sa phosphorylation par les MAPK (Yu et al., 2007a). Cette accumulation cytoplasmique est également observée dans des cellules exprimant la protéine de type sauvage lorsque celles-ci sont traitées avec des inhibiteurs de ERK (U0126) ou de JNK (SP600125). Globalement, ces résultats suggèrent que l'activité des MAPK contribue à l'accumulation nucléaire de E1 (Yu et al., 2007a). Les protéines E1 qui n'interagissent plus avec les MAPK sont incapables de supporter la réplication de l'ADN viral *in vivo*, possiblement parce qu'elles sont incapables d'entrer au noyau. Finalement, puisqu'ils ont montré que la substitution des sérines S89 et S93 du VPH 11 (S92 VPH 31) en aspartate ou en glutamate augmente l'accumulation nucléaire de E1, les auteurs de cette étude ont proposé que les MAPK contrôleraient l'import de E1 en phosphorylant les sérines en question (Yu et al., 2007a). D'autres études seront requises pour déterminer si l'accumulation nucléaire des mutants

S89E/D, S93E/D est due à une augmentation de l'import ou une diminution de l'export nucléaire de E1.

1.4.2.5.2.2 CK2

La caséine kinase de type 2 (CK2) phosphoryle des sites consensus composés d'une sérine ou d'une thréonine et suivi d'une région riche en acides aminés acides (S/T-x-x-E/D) et cible une série de protéines impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire (Hanif et al., 2010; Meggio and Pinna, 2003). Chez la protéine E1 du VPH, seule la phosphorylation par les complexes cycline E-A/Cdk2 et les MAPK a été rapportée. Cependant, il a été démontré que la protéine E1 du VPB peut être phosphorylée *in vitro* par CK2 au niveau de S48 et S584 et que la phosphorylation de ces serines peut être détectée par spectrométrie de masse sur une protéine produite dans les cellules d'insectes Sf9 (Lentz et al., 2002; Lentz et al., 2006; McShan and Wilson, 1997). La substitution de la sérine 48 pour une glycine inhibe complètement les fonctions de réplication de la protéine E1 du VPB *in vivo* et, inversement, sa substitution par des phosphomimétiques (E/D) les augmente. Ainsi, il semblerait que la région N-terminale de la protéine E1 du VPB doit être phosphorylée par la CK2 afin de répliquer efficacement son ADN. Les mécanismes moléculaires permettant à la phosphorylation de S48 de promouvoir l'activité de réplication de E1 ne sont pas connus. Toutefois, il faut noter qu'un mutant S48G de E1 est toujours capable de lier l'origine de réplication, d'interagir avec E2 et de s'oligomériser (McShan and Wilson, 1997). Le rôle de la phosphorylation du domaine C-terminal de la protéine E1 du VPB n'a quant à lui pas encore été établi.

Malgré le fait que les sérines 48 et 584 ne soient pas conservées chez la protéine E1 du VPH, cette dernière contient au moins deux sites consensus de phosphorylation par la CK2. Un de ceux-ci est localisé au niveau de la thréonine 43 (T-G-E-D-M-V-D; les acides aminés acides sont soulignés) et la mutation de ce site en alanine ou en phosphomimétique n'affecte pas sa capacité à répliquer l'ADN *in vivo* (Morin et al., 2011). Le second site est

localisé au niveau de la sérine 33 (S-E-D-E-N-ED) mais aucune mutation de ce site n'a encore été réalisée.

1.4.2.5.3 Sumoylation de E1 par Ubc9

En plus de la phosphorylation, il a été démontré que la sumoylation pouvait moduler le transport intracellulaire d'une protéine ainsi que sa localisation intranucléaire (Pichler and Melchior, 2002). À titre d'exemple, on retrouve l'hélicase BLM et la protéine adénovirale E1B 55-KDa, dont l'accumulation respective dans les foyers nucléaires de PML et au noyau est dépendante de leur sumoylation (Eladad et al., 2005; Endter et al., 2001).

Plusieurs études démontrent que E1 interagit avec Ubc9, une enzyme médiant la conjugaison de la protéine SUMO (*Small Ubiquitine-like MOdifier*) (Chapitre 2 et (Rangasamy and Wilson, 2000; Yasugi and Howley, 1996; Yasugi et al., 1997b)). Chez les eucaryotes, la voie de sumoylation est régulée par quatre protéines ou groupes de protéines, dont trois assurent la conjugaison de la protéine SUMO : 1) la protéine activatrice E1 (SAE1/SAE2), 2) la protéine de conjugaison E2 (Ubc9) et 3) différentes protéines E3 ligases. Le rôle du quatrième groupe de protéines est d'assurer la dé-conjugaison de la SUMO : les isopeptidases (Fig. 1.17) (Gareau and Lima, 2010; Pichler and Melchior, 2002). Contrairement à la voie de l'ubiquitination, où la spécificité du transfert de l'ubiquitine est médiée par les E3 ligases, la spécificité du transfert de la protéine SUMO est dictée par la protéine Ubc9. Ainsi, Ubc9 cible spécifiquement les protéines en liant un site consensus composé de ψ -K-x-D/E (où ψ est un acide aminé hydrophobe) (Bernier-Villamor et al., 2002; Sampson et al., 2001). La sumoylation module plusieurs processus cellulaires tels que la transcription (Mascle et al., 2007; Melchior and Hengst, 2002), la réparation de l'ADN (Matunis, 2002) ainsi que le transport intracellulaire et intranucléaire (Pichler and Melchior, 2002; Terui et al., 2004).

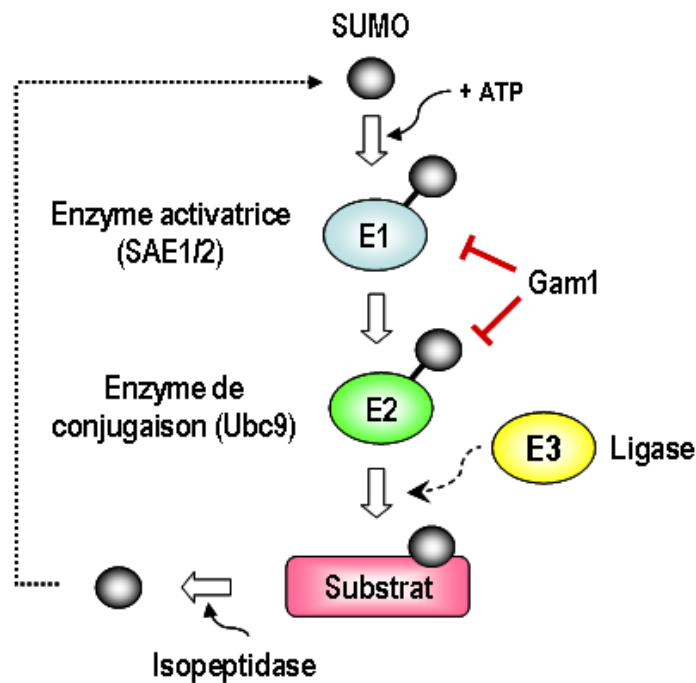


Figure 1.17. Voie de sumoylation chez les eucaryotes.

La première étape de la voie de sumoylation consiste à charger la protéine SUMO sur la protéine activatrice E1 (SAE1/SAE2) via la formation d'un lien thioester. Ensuite, la protéine SUMO est transférée sur la protéine de conjugaison E2 (Ubc9). La protéine E2 reconnaît ensuite un site de sumoylation spécifique du substrat (ψ -K-x-D/E) et transfère la SUMO directement sur la lysine du site consensus retrouvé dans la protéine cible via la formation d'un lien isopeptide. Bien que la présence de E3 ligases (ex. : PIAS et RanBP2) favorise le transfert, celles-ci ne sont pas requises pour la spécificité de la sumoylation. Finalement, les isopeptidases (ex. : SENP) sont responsables de retirer la protéine SUMO de la protéine cible en plus d'être nécessaire à la maturation de la SUMO avant son chargement sur la protéine activatrice E1. La protéine Gam1, qui inhibe l'activité ainsi que la stabilité des sous-unités de la protéine activatrice E1, et Ubc9 sont aussi représentées.

Les protéines E1 du VPH 11, du VPH 16 et du VPB interagissent avec Ubc9 *in vitro* ainsi que dans des essais de type double hybride chez levures. Bien qu'il ait été démontré

que certains mutants de E1 incapables d'interagir avec Ubc9 soient inaptes à répliquer l'ADN viral (S310R, Y392F, W419R, G462D et G476R), il demeure difficile de déterminer la fonction de l'interaction E1-Ubc9 au cours de la réplication virale puisque les mutants en question affectent aussi d'autres fonctions essentielles de E1 (Chapitre 2 et (Yasugi et al., 1997b)). En plus d'interagir avec Ubc9, une série d'études rapporte que la protéine E1 est sumoylée *in vitro* et *in vivo* et que cette modification augmente l'interaction de VPB E1 avec Crm1 (Hsu et al., 2007; Rangasamy and Wilson, 2000; Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta et al., 2005; Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Plus précisément, il a été rapporté que les protéines E1 des VPH 1, 11, 18 et du VPB peuvent être sumoylées dans un système *in vitro* en présence des protéines SAE1/SAE2, Ubc9 et des E3 ligases de la famille PIAS (PIAS1, ARIP3 et Miz2) (Rangasamy and Wilson, 2000; Rosas-Acosta et al., 2005). Des études ont également montré qu'il est possible de détecter la sumoylation de la protéine E1 du VPB *in vivo* (Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta et al., 2005) et que les formes sumoylées de E1 interagissent davantage avec Crm1 en *GST-pulldown* (Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Malgré ces études, il nous a personnellement été impossible de détecter la sumoylation des protéines E1 du VPH 11 et du VPB *in vivo* et ce, même si nous avons été en mesure de démontrer que la protéine PML, une protéine dont la sumoylation est bien caractérisée, était efficacement sumoylée dans ces mêmes conditions (Chapitre 2).

Dans les études ayant décrit la sumoylation de E1, il a également été démontré que la mutation de lysines et d'une leucine conservées (K538R ou A, L444P/K445A) dans le domaine C-terminal de E1 abolit la sumoylation de E1 et inhibe la réplication virale (Rangasamy and Wilson, 2000; Rangasamy et al., 2000). Bien que la caractérisation de ces mutants en microscopie ait d'abord permis à ces auteurs de stipuler que la sumoylation régulaît la localisation cellulaire de E1, ils ont été incapables de reproduire le même phénotype à travers trois différentes études. Ainsi, selon l'étude, différentes localisations cellulaires des mutants de E1 ont été répertoriées : au cytoplasme, dans des sous-domaines nucléaires ou au noyau (Rangasamy and Wilson, 2000; Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Au cours de l'étude présentée dans cette thèse, l'analyse de la

localisation de la protéine E1 du VPH 11, du VPH 16 et du VPB a déterminé que la voie de sumoylation n'est pas nécessaire à l'accumulation nucléaire de E1 (Chapitre 2). Plus précisément, l'utilisation de la protéine Gam1 de l'adénovirus de type aviaire CELO (Boggio and Chiocca, 2005; Boggio et al., 2004; Chiocca, 2007), une protéine qui inhibe l'activité SAE1/SAE2 et induit la dégradation de SAE1/SAE2 et de Ubc9 (Fig. 1.17), a permis de démontrer que bien que la voie de sumoylation soit nécessaire à l'accumulation de PML dans des *foci* nucléaires, son inhibition n'interfère pas avec l'accumulation nucléaire de E1 du VPH 11, du VPH 16 et du VPB (Chapitre 2 et (Shen et al., 2006)). Nous avons également démontré que, contrairement aux résultats obtenus avec la protéine E1 du VPB, l'acide aminé K538 n'est pas essentiel à la réplication de l'ADN du VPH 11. Malgré la divergence des résultats obtenus au cours des études sur le rôle de la voie de sumoylation dans la localisation cellulaire de E1, toutes s'entendent pour dire que la protéine est capable d'interagir avec la protéine de conjugaison Ubc9. Le rôle de cette interaction reste toutefois à être défini.

1.4.2.5.4 Ubiquitination de E1

L'ubiquitination est un processus par lequel une protéine E3 ligase attache une ou plusieurs ubiquitines à une protéine cible. Tout comme la sumoylation, la voie d'ubiquitination implique trois protéines : une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2 et une E3 ligase. La liaison spécifique de l'ubiquitine à la protéine cible est assurée par la E3 ligase. La polyubiquitination d'une protéine induit généralement sa dégradation par le protéasome.

Des études réalisées par *Masclé et al* démontrent que la protéine E1 du VPB est polyubiquitinée *in vitro* et *in vivo* (Malcles et al., 2002). De plus, cette étude révèle qu'une dégradation de plus de 50% de la protéine a lieu en moins de 20 minutes dans un extrait cellulaire. Cette dégradation peut être inhibée par la cycline E/Cdk2 et augmentée en condition de réplication, c'est à dire en présence de E2 et de l'origine du VPB. Ainsi, ces résultats suggèrent que la protéine E1 est dégradée suite à son assemblage en complexe de

réplication sur l'ADN (Malcles et al., 2002). Une étude plus récente a également permis de démontrer que la protéine est spécifiquement dégradée par l'APC (*Anaphase-Promoting Complex*), un complexe régulant la stabilité des protéines lors de la mitose et au cours de la phase G1 (Mechali et al., 2004). Par exemple, ce complexe dégrade Cdc6 et empêche l'initiation de la réplication durant ces deux phases du cycle cellulaire. De manière détaillée, il a été démontré que la protéine E1 du VPB contient deux séquences qui sont spécifiquement reconnues par le complexe APC : une séquence similaire au motif KEN, localisée dans la région N-terminale de E1, et un motif appelé « boîte de destruction » (BD) (R-x-x-L), localisé dans son domaine C-terminal. La mutation de l'un ou l'autre de ces motifs est suffisante pour stabiliser la protéine *in vitro* et *in vivo*. Cependant, seule la mutation de la BD inhibe la réplication *in vivo* (Mechali et al., 2004). Bien que, globalement, ces études démontrent que E1 est ubiquitinée, ils ne démontrent pas directement que l'ubiquitination induit la dégradation de E1. D'autres études seront requises pour clarifier cette association. Jusqu'à maintenant, aucune étude ne rapporte l'ubiquitination des protéines E1 du VPH et les mécanismes contrôlant la stabilité de E1 au cours du cycle viral PV restent donc à être définis.

1.5 Réplication de l'épisome à travers le cycle viral

La réplication de l'ADN est requise au cours de trois étapes du cycle viral du VPH. Tout d'abord, l'établissement de 50-100 copies du génome sous forme extrachromosomique dans les cellules dépend d'une amplification initiale de l'ADN. Puis, le maintien de ce nombre de copies dans les cellules basales est assuré par de faibles niveaux de réplication. Finalement, une amplification finale de l'épisome à plus de 1000 copies requiert de hauts niveaux de réplication. Ceux-ci sont atteints suite à la différenciation des kératinocytes dans les couches supérieures de l'épithélium. Dans tous les cas, la réplication de l'ADN doit s'effectuer au cours de la phase S du cycle cellulaire où les facteurs cellulaires de réplication sont produits. De plus, il a récemment été démontré

que l'activation de voies de réponse aux dommages à l'ADN est nécessaire pour l'amplification du génome dans les cellules différenciées. La description de chaque étape de réplication de l'ADN au cours du cycle viral, les différents modes de réplication de l'ADN et l'importance de la voie de réponse aux dommages à l'ADN au cours de la réplication de l'ADN viral sont discutés dans cette section.

1.5.1 Mode de réplication de l'ADN spécifique à chaque phase du cycle viral

Au cours de l'établissement, du maintien et de l'amplification de l'épisome, la réplication de l'ADN viral est dépendante de E1, de E2, et de l'origine de réplication. Ainsi, tout mécanisme régulant la concentration cellulaire de E1 et de E2, ainsi que leur liaison à l'origine de réplication, influence la réplication de l'ADN viral. Des mécanismes uniques régulent également chacune des trois phases de réplication de l'ADN au cours du cycle viral.

1.5.1.1 Établissement

Dans les kératinocytes, l'établissement du génome a lieu de manière rapide et transitoire. De manière générale, il est accepté que ce soit ce genre de réplication qui est récapitulé au cours des essais de réplication transitoire de l'ADN *in vivo*. Dans ces essais, un ADN contenant une origine de réplication du VPH est rapidement amplifié par E1 et E2 dans des cellules qui sont non différenciées (Section 1.3). Bien que les mécanismes qui contrôlent la réplication de l'ADN dans ces essais soient bien caractérisés, les mécanismes exacts qui régulent l'initiation et la terminaison de l'établissement de l'épisome dans les kératinocytes infectés ne sont pas connus. En fait, plusieurs faits devront être conciliés afin de mieux comprendre la régulation de ces processus. Par exemple, bien que les protéines virales E1 et E2 soient essentielles à la réplication de l'épisome, il est difficile de réconcilier le fait que cette amplification de l'ADN survienne rapidement après l'entrée virale, avec le fait que E1 et E2 soient peu exprimés dans les cellules basales et qu'ils soient

absents dans la capsid (Section 1.1). Il a été proposé qu'une forte expression de E1 et E2 aurait lieu suite à l'entrée virale. Celle-ci serait en partie modulée par la liaison de facteurs de transcription cellulaires dans le LCR. Aussi, une plus grande quantité de E1 serait traduite à partir du polycistron grâce à l'épissage de deux sites : un localisé dans un intron situé dans la séquence N-terminale de E1 et l'autre dans la séquence de E6 (Demeret et al., 1995; Deng et al., 2003; Hartley and Alexander, 2002; Hubert, 2005; Hubert and Laimins, 2002). De façon similaire, la terminaison serait induite par une diminution de l'expression de E1 et E2. Au cours de l'initiation et de la terminaison de l'amplification initiale, E2 participerait à la régulation de l'expression de E1. De façon spécifique, l'expression de E2 à de faibles niveaux induirait l'expression de E1 tandis que l'expression de E2 à de hauts niveaux inhiberait son expression (Hubert and Laimins, 2002).

1.5.1.2 Maintien

Le maintien du génome dans les kératinocytes de la couche basale est essentiel à l'établissement d'un réservoir de génomes viraux au cours de l'infection et est assuré par de faibles niveaux de réplication de l'ADN. Les études présentées dans cette thèse démontrent que l'export de la protéine E1 au cytoplasme est nécessaire au maintien de l'épisome. En fait, l'accumulation nucléaire de E1 serait défavorable à la prolifération cellulaire requise pour ce processus (Chapitre 3). En plus de la réplication de l'ADN, le maintien du génome requiert les fonctions de ségrégation de E2 (Section 1.1) (Ilves et al., 1999; Lehman and Botchan, 1998; Parish et al., 2006a; Piirsoo et al., 1996). Chez le VPB, E2 lie des sites spécifique du génome du VPB afin de ségréguer le génome viral (MME, *Mini chromosome Maintenance Element*) (Piirsoo et al., 1996), cependant ceux-ci ne sont pas présents chez les VPH et la ségrégation est donc assurée par la liaison de E2 aux E2BS du LCR. Bien que la presque totalité des études démontrent que le maintien du génome dans les kératinocytes dépend des fonctions de réplication des protéines E1 et E2, quelques études réalisées chez la levure, ainsi que dans des cellules de mammifères, suggèrent que le génome pourrait être maintenu en absence des protéines virales (Angeletti et al., 2002; Kim et al., 2005; Kim and Lambert, 2002; Pittayakhajonwut and Angeletti, 2008, 2010; Rogers et al., 2008). Ce

phénomène dépendrait en fait de la présence de séquences spécifiques localisées en 3' du gène E6, en 5' du gène E2 et dans le gène L1. L'incapacité de plusieurs groupes à observer ce phénomène jette cependant un doute sur la présence de telles séquences.

En plus de E1 et E2, d'autres protéines virales contribuent au maintien du génome (Section 1.1). En fait, la substitution d'acides aminés essentiels aux fonctions de E6 et de E7 n'influence pas les niveaux de répliquions transitoires de l'ADN, mais entraîne une perte de l'épisome dans les kératinocytes. Bien que des études aient proposé que E8^{E2C}, E1^{E4} et E5 joueraient aussi un rôle au cours de ce processus, les résultats obtenus chez différents PV ou par différents groupes de recherches sont contradictoires. Cependant, il est intéressant de noter que selon une des études, la capacité de la protéine E8^{E2C} à réprimer l'expression des protéines virales serait nécessaire au maintien de l'épisome. Ainsi, cette observation serait en accord avec la nécessité de garder les niveaux d'expression de E1 bas afin de réduire ses effets anti-prolifératifs sur les kératinocytes maintenant le génome viral (Chapitre 3).

1.5.1.3 Amplification

Au cours de la phase de maintien du génome, les niveaux de E1 et de E2 sont maintenus très bas, en partie grâce à la répression de E2 sur le promoteur p97 (Section 1.1). Ainsi, dans les kératinocytes en différenciation, l'activation du promoteur tardif p742, qui est indépendante du contrôle de E2, permet de produire de grandes quantités d'ARNm encodant les protéines E1, E2, E1^{E4} et E5. L'augmentation drastique de l'expression des protéines E1 et E2 dans les couches suprabasales de l'épithélium permet l'amplification de l'épisome viral à plus de 1000 copies (Bedell et al., 1991; Grassmann et al., 1996; Hummel et al., 1992; Klumpp and Laimins, 1999; Ozbun and Meyers, 1997, 1998a, b). L'utilisation de marqueurs de prolifération cellulaire et d'expression de gènes viraux tardifs en microscopie a permis de démontrer que l'amplification a lieu dans des cellules en phase S où le promoteur tardif est activé (Doorbar et al., 1997; Middleton et al., 2003; Peh et al., 2002). En plus de E6 et E7, nos récentes découvertes suggèrent que E1 contribuerait à

l'établissement de la phase S nécessaire à l'amplification du génome (Chapitre 3). Bien que l'expression de E1^{E4} et de E5 concorde avec l'amplification du génome dans les kératinocytes en différenciation, les mécanismes exacts par lesquels ils contribuent à ce processus restent encore inconnus (Grassmann et al., 1996; Wilson et al., 2005). Finalement, en plus des protéines virales, une étude récente a démontré que l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM était essentielle à l'amplification du génome (Section 1.5.3) (Moody and Laimins, 2009).

1.5.2 Modes de réplication de l'ADN du VPH

1.5.2.1 Réplication : ordonnée vs aléatoire

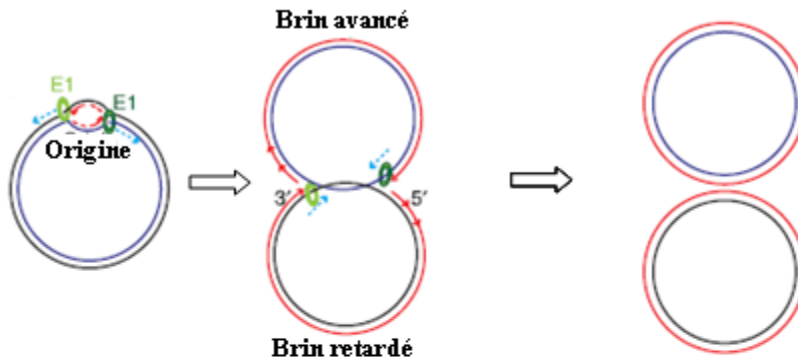
Au cours de l'amplification, la réplication de l'ADN se fait en continu dans des cellules où un environnement similaire à la phase S est maintenu par E6, E7 et E1. Au cours de la phase de maintien du génome dans des cellules en prolifération, le mode de réplication est moins bien défini et le nombre de copies répliquées au cours de la phase S de chaque cycle cellulaire est encore un sujet de controverse. En fait, selon le type de VPH, et la lignée cellulaire utilisée, deux modes de réplifications ont été rapportés. Selon le premier mode, la réplication de l'ADN viral se fait de manière ordonnée, c'est-à-dire coordonnée avec la réplication de l'ADN de l'hôte et chaque copie de l'épisome est répliquée une seule fois par cycle cellulaire (Botchan et al., 1986; Roberts and Weintraub, 1988). Selon le second mode, la réplication de l'ADN viral se fait de manière aléatoire et la réplication de chaque copie du génome a lieu plusieurs fois ou une seule fois par cycle cellulaire (Gilbert and Cohen, 1987; Piirsoo et al., 1996; Ravnan et al., 1992). Dans plusieurs des cas où une réplication aléatoire de l'ADN viral a été suggérée, il est intéressant de noter que les analyses ont été faites dans des lignées cellulaires exprimant E1 et E2 de manière constitutive ou dans des essais de réplication transitoire, c'est-à-dire récapitulant les étapes de l'établissement et non du maintien du génome. En ce sens, une étude récente suggère que le choix du mode de réplication serait dicté par les niveaux d'expression de la protéine E1. En présence de peu de E1, l'ADN viral serait répliqué de manière ordonnée tandis

qu'en présence d'une plus grande quantité de E1, l'ADN serait répliqué en mode aléatoire (Hoffmann et al., 2006). En accord avec ce modèle, nous avons récemment découvert qu'une accumulation excessive de E1 au noyau induit un arrêt de cycle cellulaire en phase S. Ainsi, le mode de répllication dit « aléatoire » pourrait en fait être dû à un prolongement de la phase S dans les cellules étudiées (Chapitre 3).

1.5.2.2 Bidirectionnelle vs unidirectionnelle

À partir d'une origine de répllication, l'ADN peut être répliqué dans une seule direction (unidirectionnelle) ou dans deux directions (bidirectionnelle), et ces modes de répllication peuvent être distingués grâce aux patrons de migration de l'ADN répliqué qui est induit lors de l'électrophorèse d'un gel de polyacrylamide en deux dimensions (gel-2D) ou par microscopie électronique (Baranska et al., 2002). En présence d'ADN circulaire, la répllication unidirectionnelle entraîne un mode de répllication de type cercle roulant (Fig. 1.18). Chez les PV, plusieurs observations appuient l'idée que l'ADN soit répliqué de manière bidirectionnelle. Par exemple, l'ouverture de l'ADN observée par microscopie électronique démontre que le double hexamère de E1 induit la formation de bulles de répllication à l'origine, qui sont caractéristiques d'une répllication bidirectionnelle (Fouts et al., 1999; Lin et al., 2002). Puis, les analyses de l'ADN répliqué *in vitro* ou dans des cellules maintenant un génome viral ont démontré que le patron d'ADN obtenu par gel-2D est caractéristique d'une répllication de type bidirectionnelle (Auborn et al., 1994; Flores and Lambert, 1997; Geimanen et al., 2011; Kadaja et al., 2009a).

A) Réplication bidirectionnelle



B) Réplication unidirectionnelle

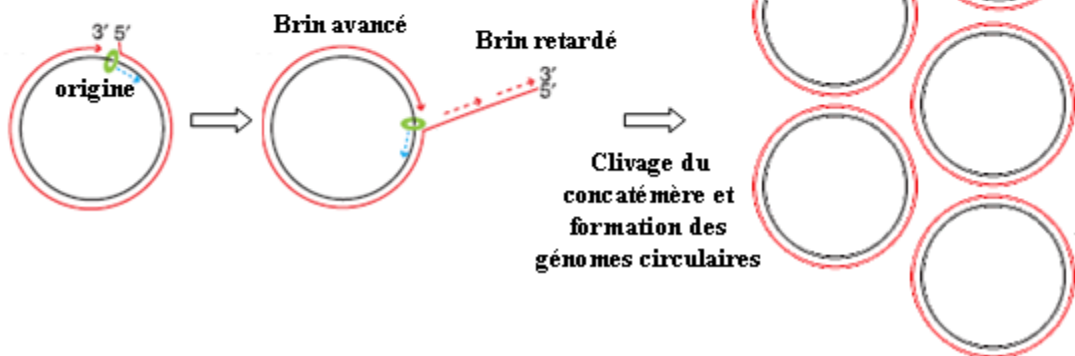


Figure 1.18. Réplication bidirectionnelle et unidirectionnelle de l'ADN viral.

(A) La réplication bidirectionnelle est initiée par un double hexamère qui déroule l'ADN dans les deux directions et qui permet de dupliquer l'ADN. (B) La réplication unidirectionnelle de type cercle roulant est initiée par le clivage d'un des brins d'ADN à l'origine et par la formation subséquente d'un hexamère au site de clivage. Dans ce type de réplication, l'ADN constamment répliqué forme un long concatémère de génome qui est ensuite clivé afin de former plusieurs génomes. Cette figure a été adaptée à partir de Kusumoto-Matsua et al. (2011) *Genes Cells* (Kusumoto-Matsuo et al., 2011).

Dans d'autres études, l'obtention de patrons d'ADN viral obtenus par gel-2D suite à l'induction de la différenciation des kératinocytes, ainsi que l'observation d'un

concatémère en microscopie électronique, suggère que l'ADN est amplifié de manière unidirectionnelle (Dasgupta et al., 1992; Flores and Lambert, 1997). De plus, une étude récente réalisée avec des extraits cellulaires de kératinocytes différenciés suggère que les formes d'ADN de haut poids moléculaires obtenus au cours de la réplication de l'ADN viral seraient en fait le produit de concatémères typiques d'un mode de réplication de type cercle roulant (Kusumoto-Matsuo et al., 2011). Dans ce système, l'amplification de l'ADN par cercle roulant est dépendante de E1 et de E2. Il a donc été proposé que la réplication de l'ADN viral aurait lieu selon un type de réplication cercle roulant au cours de l'amplification du génome dans les couches supérieures de l'épithélium. Bien qu'il soit possible que l'ADN viral soit amplifié selon ce mode de réplication, les composantes protéiques qui permettraient sa réalisation restent inconnues. En effet, la réplication de type cercle roulant doit être initiée par une protéine capable d'introduire une coupure spécifique dans l'un des brins d'ADN à l'origine de réplication (Fig. 1.18). La terminaison de ce type de réplication requiert également une ou des protéines, capables de cliver et de lier l'ADN, afin de produire des ADN circulaires contenant une seule copie du génome à partir du concatémère provenant de la réplication.

De manière générale, il est accepté que le VPH réplique son ADN de manière bidirectionnelle (Geimanen et al., 2011; Schwartzman et al., 1990). Le modèle du cercle roulant devra être davantage investigué afin de déterminer si celui-ci a vraiment lieu au cours de l'amplification du génome dans les kératinocytes et, si tel est le cas, quelles protéines cellulaires sont requises pour ce processus. De plus, comme le modèle du cercle roulant n'est pas compatible avec la présence d'un double hexamère sur l'ADN viral, les mécanismes permettant d'assembler un seul hexamère sur l'ADN devront être identifiés.

1.5.3 Rôle de la voie de réponse aux dommages à l'ADN au cours de la réplication de l'ADN viral

Chez les eucaryotes, les voies de réponses aux dommages à l'ADN permettent d'enclencher les processus de réparation de l'ADN tout en induisant une pause dans la

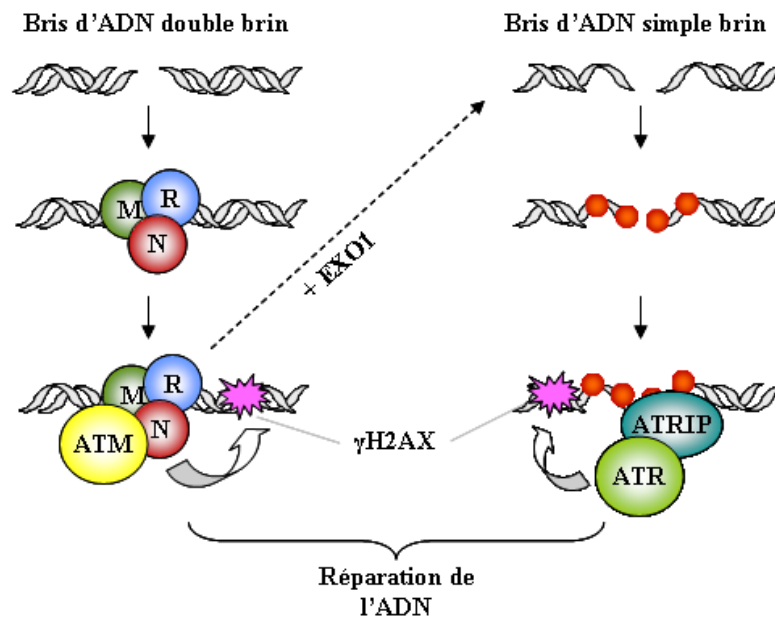
progression du cycle cellulaire. Récemment, plusieurs études ont démontré que la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM est activée dans les cellules contenant le génome du VPH 31 et que cette activation est nécessaire à l'amplification du génome dans les cellules différenciées ((Moody and Laimins, 2009), communication personnelle par A. McBride). Aussi, conjointement avec le groupe du D^r McBride, nous avons découvert que E1 est capable d'activer cette voie et que, contrairement à l'ADN de l'hôte, l'ADN viral peut être répliqué en présence de dommages à l'ADN (Chapitre 4 et (King et al., 2010)). Ainsi, cette dernière section porte sur les études récentes démontrant l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN par les protéines du VPH au cours du cycle viral.

1.5.3.1 Mécanisme d'activation des réponses aux dommages à l'ADN

La cassure de l'ADN, qu'elle soit dans un seul ou dans les deux brins, peut être causée par des phénomènes extra- et intra- cellulaire, tels que les rayons ultraviolets, les radiations ionisantes et par la collision de fourches de réplication de l'ADN. Ainsi, la réparation de celle-ci est cruciale afin de maintenir l'intégrité génomique de la cellule (Su, 2006). Chez les cellules eucaryotes, la présence de cassure dans l'ADN induit l'activation de voies de réponse aux dommages dépendante de ATM ou de ATR qui permettent de recruter des facteurs de réparation de l'ADN et d'induire un arrêt de cycle cellulaire (résumé dans (Freeman and Monteiro, 2010; Ljungman, 2005)). La détection d'un bris d'ADN double brin est assurée par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 et le processus de réponse à ce dommage est enclenché par l'activation de la kinase ATM (Fig. 1.19). En présence d'un bris d'ADN simple brin, l'accumulation de RPA sur l'ADN induit quant à elle l'activation de la kinase ATR. Il est également important de noter que lorsque les cassures d'ADN double brin sont détectées au cours de la phase G1, les protéines responsables de la réparation de l'ADN par recombinaison non homologue (*Non-Homologous End Joining*) sont recrutées au site de dommages par la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM. Cependant, lorsque ce type de dommage est détecté au cours de la phase S et G2, un phénomène de résection du brin 5'-3' de l'ADN

par l'exonucléase EXO1 est observé, et l'exposition d'ADN simple brin mène au recrutement des protéines de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATR (Fig. 1.19) (Longhese et al., 2010). L'activation de cette dernière induit le recrutement des protéines de la réparation homologue de l'ADN (*Homologous Recombination*).

A) Activation de ATM et ATR



B) Activation des points de contrôle cellulaire

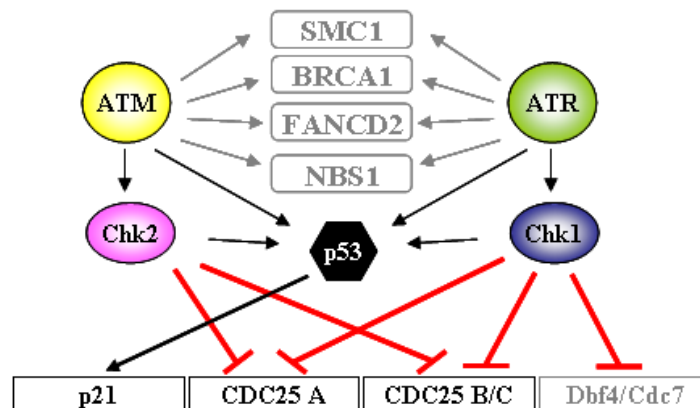


Figure 1.19. Activation de ATM et ATR et de leurs effecteurs.

(A) Activation de ATM et ATR selon le type de bris d'ADN. RPA est représenté par de petites boules rouges sur l'ADN et les protéines MRE11, RAD50 et NBS1 sont respectivement identifiées M, R et N. L'EXO1, responsable de la résection de l'ADN est aussi identifiée. (B) Activation d'effecteurs permettant d'induire un arrêt de la progression du cycle cellulaire. Les mécanismes par lesquels l'activation ou l'inhibition de ces effecteurs sont induits par l'activation de ATM, ATR, Chk2 et Chk1 sont décrits dans le texte. Les rôles de p21 et des phosphatases CDC25 au cours de la progression cellulaire sont illustrés à la figure 1.15, et discutés à la section 1.4.2.5.1.

Suite à leur activation, ATM et ATR phosphorylent la sérine 139 de l'histone H2AX (γ H2AX). Cette phosphorylation permet d'amplifier le signal de réponse aux dommages à l'ADN, de déstabiliser la chromatine et de recruter les facteurs de réparation (Ljungman, 2005; Su, 2006). En plus d'initier la réparation de l'ADN, ATM et ATR inhibent la progression du cycle cellulaire en activant respectivement les kinases effectrices Chk2 et Chk1 (Bartek et al., 2004; Reinhardt and Yaffe, 2009). Pour ce faire, ATM phosphoryle la thréonine 68 de Chk2 et ATR phosphoryle la serine 345 de Chk1. Conjointement avec ATM et ATR, ces kinases effectrices phosphorylent p53 (Fig. 1.19). Ces phosphorylations stabilisent la protéine suppresseur de tumeur, un phénomène qui mène à l'augmentation de la transcription de p21 et à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire (Fig. 1.15). Chk2 et Chk1 inhibent également la progression du cycle cellulaire en phosphorylant les phosphatases responsables de l'activation des complexes cycline/Cdk (CDC25 A, B et C). Cette phosphorylation induit la dégradation des phosphatases par le protéasome. Finalement, il a également été démontré que l'activation de Chk1 permet d'inhiber les fonctions du complexe Dbf4/Cdc7 nécessaire à l'activation du pre-RC sur l'ADN au début de la phase S (Section 1.4, Fig. 1.6) (Lambert and Carr, 2005). En plus d'activer Chk1 et Chk2, ATM et ATR phosphorylent les protéines SMC1, BRCA1, FANCD2 et NBS1. La phosphorylation de ces protéines serait aussi importante pour l'activation des points de contrôle cellulaire en phase S et G2 (Shiloh, 2003).

1.5.3.2 Activation d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM au cours du cycle viral

Tel que mentionné ci-haut, la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM est essentielle à l'amplification du génome viral dans les kératinocytes différenciés. En fait, il a été démontré que plusieurs effecteurs de cette voie, tels que Chk2, NBS1, BRCA1 et Chk1, sont activés dans les kératinocytes immortalisés avec le VPH 31. De plus, il a été démontré que l'amplification du génome induite par la différenciation de ces kératinocytes peut être prévenue par des inhibiteurs d'ATM (KU-55933) et de Chk2 (Moody and Laimins, 2009). Malgré cela, la voie de réponse aux dommages dépendante de ATM n'est pas requise pour le maintien du génome dans les kératinocytes en prolifération, ni pour la réplication de l'ADN de manière transitoire (Chapitre 4 et (Moody and Laimins, 2009)). Bien que l'on ne comprenne pas encore les mécanismes exacts par lesquels la voie de réponse aux dommages à l'ADN contribue à l'amplification du génome, il est possible que celle-ci soit nécessaire à l'activation de caspases capables de cliver la partie N-terminale de E1 (Section 1.4). En fait, cette étude a démontré que ces caspases ne sont plus activées en présence d'un inhibiteur de Chk2 (Moody et al., 2007; Moody and Laimins, 2009). Finalement, il est aussi intéressant de noter que, contrairement à la réplication de l'ADN de l'hôte, la réplication de l'ADN viral peut avoir lieu en présence d'une forte activation de la voie de réponses aux dommages à l'ADN dépendante de ATM (Chapitre 4 et (King et al., 2010)). Il est donc possible que le virus active la voie de réponse aux dommages afin d'inhiber la réplication de l'ADN de l'hôte. Ainsi, celle-ci ne lui ferait plus compétition pour la machinerie de réplication de l'ADN qui est possiblement limitante dans la cellule.

Les mécanismes par lesquels le VPH active les voies de réponse aux dommages à l'ADN commencent à émerger. Ainsi, ces études suggèrent que les oncogènes viraux contribuent à l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN. En fait, il a été montré que l'expression de E6 et E7 dans les kératinocytes est accompagnée d'une augmentation des bris d'ADN double brin et de γ H2AX (Duensing and Munger, 2002;

Moody and Laimins, 2009). De plus, dans les kératinocytes immortalisés avec le VPH 31, E7 serait nécessaire à l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM, possiblement en interagissant directement avec la kinase ATM ((Moody and Laimins, 2009) et communication personnelle de C. Moody). L'étude présentée dans cette thèse démontre que E1 est aussi capable d'induire les voies de réponse aux dommages à l'ADN de la cellule hôte (Chapitre 4). Les fonctions de liaison à l'ADN, ainsi que l'activité ATPase de E1, sont toutes deux requises pour l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM. De plus, l'observation que l'export nucléaire de E1 réduit sa capacité à induire des dommages à l'ADN suggère que la voie de réponse aux dommages à l'ADN est surtout activée dans les couches supérieures de l'épithélium où l'accumulation nucléaire de E1 est favorisée.

En dehors du cadre du cycle viral, il a été démontré que la réplication d'un génome du VPH intégré dans le génome de la cellule hôte est aussi accompagnée d'une réponse de dommage à l'ADN (Kadaja et al., 2009a; Kadaja et al., 2007). Dans ces conditions, les protéines NBS1, MRE11, RAD50, ATM, Chk2, ATRIP, Chk1 et KU70/KU80, des protéines de la voie de réparation de l'ADN par recombinaison non homologue, sont retrouvées dans les sites de réplication contenant E1, E2 et la machinerie de réplication de l'ADN (Kadaja et al., 2009a). Ainsi, il a été suggéré que les produits de la réplication de l'ADN intégré, qui sont composés de plusieurs petits fragments linéaires d'ADN double brins, seraient en partie responsables de l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et de l'instauration d'une instabilité génomique dans les cellules infectées (Kadaja et al., 2009b).

1.6 But du projet de recherche

Le but de ce projet était de déterminer le rôle et les modifications post-traductionnelles responsables de la régulation de l'export nucléaire de la protéine E1 au cours du cycle de réplication du VPH. Puisqu'il avait été rapporté que le transport intracellulaire de la protéine E1 du VPB pouvait possiblement être régulé par la sumoylation de E1, nous avons d'abord investigué le rôle de cette modification post-traductionnelle dans le transport intracellulaire de la protéine E1 des VPH (Chapitre 2). En plus de la sumoylation, il a été démontré que la phosphorylation des protéines E1 du VPH à bas risque oncogénique de type 11 et du VPB régule leur accumulation nucléaire, mais de manière différente. De manière plus précise, la phosphorylation de trois sérines inhibe l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 11, tandis que la phosphorylation d'une sérine de la protéine E1 du VPB augmente son export. Ainsi, au cours de notre seconde étude (Chapitre 3), notre but était de déterminer le rôle de la phosphorylation dans l'accumulation nucléaire de la protéine E1 du VPH à haut risque oncogénique de type 31. En particulier, nous voulions déterminer si les deux sérines de la région N-terminale de la protéine E1 du VPH 31 avait un rôle similaire aux trois sérines retrouvées chez la protéine E1 du VPH 11. Puisque les VPH à haut risque peuvent être utilisés pour faire des études de maintien et d'amplification du génome viral dans les kératinocytes primaires (Section 1.3), nous avons utilisé le génome du VPH 31 afin d'établir le rôle de l'export nucléaire de E1 au cours d'étapes clés du cycle viral (Chapitre 3). Finalement, puisque l'étude présentée au chapitre 3 a révélé que l'accumulation nucléaire de E1 induit un arrêt du cycle cellulaire menant à une inhibition de la prolifération cellulaire, l'étude présentée au chapitre 4 avait pour but de définir dans quelle phase cellulaire les cellules exprimant E1 étaient arrêtées, et d'identifier les fonctions de E1 requises pour cette arrêt. De plus, puisque nous avons découvert que l'arrêt de cycle cellulaire par E1 est accompagné de l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN, l'étude présentée au chapitre 4 avait pour but d'identifier les voies de réponse aux dommages activées par E1 ainsi que le rôle de cette activation au cours de la réplication de l'ADN viral.

Chapitre 2 - Caractérisation de mutants de l'hélicase E1 des papillomavirus incapables d'interagir avec l'enzyme de conjugaison de SUMO, Ubc9

*Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the
SUMO-conjugating enzyme Ubc9*

Cet article a été publié en 2009 dans *Virology*, 395(2):190–201

2.1 Mise en contexte de l'article

Tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, il a été démontré que la protéine E1 du VPB interagit avec Ubc9 et qu'elle est sumoylée *in vitro* et *in vivo*. Des conclusions divergentes sur le rôle de la sumoylation de E1 ont cependant été obtenues suite à l'analyse de la localisation intracellulaire de protéines E1 mutantes qui ne peuvent plus être sumoylées. Le but de cette étude était donc de clarifier le rôle de cette voie dans l'accumulation nucléaire de la protéine E1 au noyau ainsi que sur ses fonctions de réplication de l'ADN viral.

2.2 Contribution des auteurs

Karine Brault et moi sommes co-auteurs de ce manuscrit puisque nous avons fait séparément la moitié des expériences présentées cette étude. De manière plus précise, Karine a fait les expériences présentées à la figure 2.2, tandis que les figures 1, 3 et 9 ont été conjointement réalisées par Karine Brault et Steve Titolo. Je suis personnellement responsable des expériences présentées aux figures 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, S2.1, S2.2, S2.3, S2.4 et S2.5. J'ai également contribué à l'écriture de l'article final.

Steve Titolo a réalisé les expériences de GST-pulldown présentées aux figures 2.1, 2.3B et 2.9D. De plus, il a été le premier à réaliser l'expérience présentée à la figure 2.7C (Liaison à l'ADN du mutant S331R de l'OBD de la protéine E1 du VPH 11).

Dr Peter M. Howley a fourni les vecteurs d'expression pour les protéines E1 de type sauvage et mutantes du VPH 16.

D^r Jacques Archambault a supervisé le projet et a écrit l'article.

2.3 Texte de l'article

2.3.1 Abstract

The E1 helicase from BPV and HPV16 interacts with Ubc9 to facilitate viral genome replication. We report that HPV11 E1 also interacts with Ubc9 in vitro and in the yeast two-hybrid system. Residues in E1 involved in oligomerization (353–435) were sufficient for binding to Ubc9 in vitro, but the origin-binding and ATPase domains were additionally required in yeast. Nuclear accumulation of BPV E1 was shown previously to depend on its interaction with Ubc9 and sumoylation on lysine 514. In contrast, HPV11 and HPV16 E1 mutants defective for Ubc9 binding remained nuclear even when the SUMO pathway was inhibited. Furthermore, we found that K514 in BPV E1 and the analogous K559 in HPV11 E1 are not essential for nuclear accumulation of E1. These results suggest that the interaction of E1 with Ubc9 is not essential for its nuclear accumulation but, rather, depends on its oligomerization and binding to DNA and ATP.

2.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are small double-stranded DNA tumor viruses that cause benign and malignant lesions of the skin and mucosa, notably cervical cancer (reviewed in [Chow and Broker, 1997] and [zur Hausen and de Villiers, 1994]). Maintenance of the viral genome as a circular episome in the nucleus of infected basal epithelial cells is essential for the viral life cycle and the ensuing pathology (reviewed in [Howley, 1996], [Shah and Howley, 1996] and [Stubenrauch and Laimins, 1999]). Replication of the HPV genome is performed by two viral proteins, E1 and E2, together with cellular DNA replication factors (reviewed in [Chow and Broker, 1994] and [Hebner and Laimins, 2006]). E1 is the replicative helicase of the virus that, with the help of E2, assembles into double hexamers at the origin of replication and unwinds the DNA ahead of

the bidirectional replication fork (reviewed in [Sverdrup and Myers, 1997] and [Wilson et al., 2002]). Structure–function studies indicated that E1 comprised at least three functional domains. For HPV11 E1, these consist of an N-terminal region (amino acids 1–191) essential for replication *in vivo* but dispensable *in vitro*, an origin DNA-binding domain (OBD, amino acids 191–353), and a C-terminal helicase domain (amino acids 353–649) sufficient to form hexamers and to bind E2 ([Amin et al., 2000], [Sun et al., 1998], [Titolo et al., 2000] and [Titolo et al., 1999][Titolo et al., 2003b] and [White et al., 2003]). The helicase domain can be further subdivided into two regions. One comprised of residues 353–435 of HPV11 E1 mediates the oligomerization of the protein and constitutes the minimal E1–E1 interaction domain that can be identified in the yeast two-hybrid system (Titolo et al., 2000). The other, spanning amino acids 435–649, contains the ATPase motifs conserved among members of the SF3 family of helicases ([Hickman and Dyda, 2005], [James et al., 2003] and [White et al., 2001]). E1 also interacts with several cellular replication factors to promote viral DNA replication, including polymerase α -primase, RPA, and topoisomerase I ([Amin et al., 2000], [Clower et al., 2006], [Conger et al., 1999], [Loo and Melendy, 2004], [Masterson et al., 1998] and [Park et al., 1994]).

E1 was also reported to interact with Ubc9 suggesting that it may be regulated by the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) pathway ([Rangasamy and Wilson, 2000], [Yasugi and Howley, 1996] and [Yasugi et al., 1997]). Sumoylation is a process biochemically akin to ubiquitination but involving the covalent attachment of SUMO to specific lysines of target proteins (reviewed in [Hochstrasser, 2002], [Kim et al., 2002] and [Schwartz and Hochstrasser, 2003]). It has been shown to regulate a diverse array of processes including nuclear transport, chromosome segregation, cell cycle regulation, DNA replication, and regulation of the activity of several transcription factors (reviewed in [Mascle et al., 2007], [Matunis, 2002], [Melchior and Hengst, 2002], [Pichler and Melchior, 2002], [Seeler and Dejean, 2003], [Verger et al., 2003] and [Wilson and Rangasamy, 2001]). The enzymology of sumoylation is similar to that of ubiquitination but is accomplished by a different set of activating (E1) and conjugating enzymes (E2) as well as

E3 ligases (reviewed in [Geiss-Friedlander and Melchior, 2007] and [Hilgarth et al., 2004]). The human E1 activating enzyme is a heterodimer of the two proteins SAE1 and SAE2. Interestingly, the Gam1 protein of the avian adenovirus CELO (chicken embryo lethal orphan) has been shown to interfere with cellular sumoylation by abrogating the function of this heterodimer and inducing its ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome (reviewed in Chiocca, 2007). Ubc9 is the only known SUMO-conjugating enzyme (E2) in yeast and human ([Desterro et al., 1997], [Johnson and Blobel, 1997] and [Schwarz et al., 1998]). E3 ligases are dispensable *in vitro* where most of the substrate specificity comes from the consensus sumoylation site itself, as exemplified by the crystal structure of Ubc9 in complex with a portion of the target protein RanGAP1 ([Bernier-Villamor et al., 2002] and [Sampson et al., 2001]). The consensus sequence for sumoylation is ψ -K-x-D/E in which the lysine (K) subject to modification is preceded by a hydrophobic residue (ψ) and separated by any single amino acid (x) from an aspartic or glutamic acid (D or E).

The interaction of papillomavirus E1 with human Ubc9 was discovered in yeast two-hybrid screens, first for the HPV16 protein ([Yasugi and Howley, 1996] and [Yasugi et al., 1997]) and subsequently for that of BPV (Rangasamy and Wilson, 2000). Sumoylation of E1 from BPV, HPV1, and HPV18 has been demonstrated *in vitro*, in assays performed with Ubc9, SUMO-1 and *in vitro* translated E1 ([Rangasamy and Wilson, 2000] and [Rangasamy et al., 2000]). Sumoylation of BPV E1 was also shown to occur *in vivo*, in transfected cells overexpressing E1, Ubc9 and SUMO-1 (Rangasamy and Wilson, 2000). The site of SUMO attachment in BPV E1 was identified by mutagenesis as lysine 514, located in a highly conserved region of the C-terminal helicase domain (Rangasamy et al., 2000). Substitution of lysine 514 for alanine or arginine was shown to abrogate the ability of the protein to support transient DNA replication *in vivo* (Rangasamy et al., 2000). A similar result was obtained with a double amino acid substitution, L420P/K421A, that weakens binding to Ubc9 *in vitro* and in yeast and abrogates sumoylation *in vitro* and *in vivo* ([Rangasamy and Wilson, 2000] and [Rangasamy et al., 2000]). Strikingly, both the

L420P/K421A and K514R BPV E1 mutant proteins were found to accumulate in the cytoplasm rather than in the nucleus of transfected COS-1 cells, when fused to GFP (Rangasamy et al., 2000). These studies led to the proposal that interaction with Ubc9 and conjugation with SUMO-1 are required for intranuclear accumulation of BPV E1.

Here we report that that HPV11 E1 also interacts with Ubc9 and provide evidence that the ability of E1 to oligomerize and to bind DNA and ATP is required for this interaction. We also demonstrate that the nuclear accumulation of E1 is not dependent on its interaction with Ubc9 and on a functional SUMO pathway in C33A cervical carcinoma cells.

2.3.3 Results and discussion

2.3.3.1 HPV11 E1 binds to human Ubc9 in vitro through a region required for its oligomerization

To determine if HPV11 E1 could interact with Ubc9 similarly to what was observed for BPV and HPV16 E1, we first performed an in vitro binding assay using GST-Ubc9 purified from bacteria and in vitro translated E1 produced in a rabbit reticulocyte lysate. Using this pulldown assay, a positive interaction was detected between both proteins (Fig. 2.1). The specificity of this interaction was demonstrated by showing that E1 did not bind to GST alone and that GST-Ubc9 could not pulldown an unrelated protein, firefly luciferase (Luc). We also showed that the E1-Ubc9 interaction was not sensitive to ethidium bromide in vitro (data not shown), indicating that it is not artefactually mediated through DNA present in the E1 lysate. We then used the set of deletions shown in Fig. 2.1 to map the domain of HPV11 E1 required for binding to Ubc9. E1 fragments were tested for their binding to purified GST-Ubc9, or to GST alone as a control. Among the N-terminally truncated E1 fragments, the one comprised of amino acids 353–649 was the shortest one that retained binding to Ubc9 (Fig. 2.1). For the C-terminally truncated fragments, we found that the one comprised of the first 458 amino acids of E1 could bind to Ubc9,

whereas a shorter one ending at amino acid 344 could not (Fig. 2.1). Incidentally, the fact that an E1 fragment lacking the ATPase domain (amino acids 435–649), which is essential for single-stranded DNA binding (Enemark and Joshua-Tor, 2006), could still interact with Ubc9 ruled out the possibility that the interaction was artefactually mediated by single-stranded DNA present in the E1 lysate. Collectively, these studies indicate that amino acids 353–435 of HPV11 E1 are required for interaction with Ubc9. Interestingly, we previously reported that this region is also required for the oligomerization of E1 into hexamers (Titolo et al., 2000).

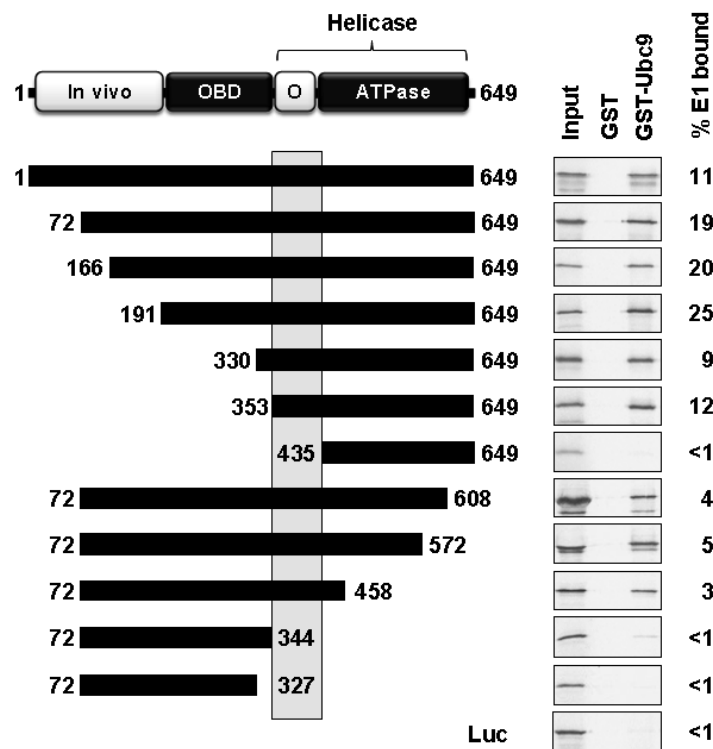


Figure 2.1. Interaction of HPV11 E1 with Ubc9 in vitro.

A schematic representation of the HPV11 E1 protein, 649 amino acids in length, is shown at the top of the figure. The N-terminal domain essential for in vivo replication (in vivo, amino acids 1–191), the origin DNA-binding domain (OBD, amino acids 191–353) and the helicase domain encompassing a region required for oligomerization (O, amino

acids 353–435) and ATPase activity (amino acids 435–649) are indicated. Truncated E1 proteins that were tested for interaction with Ubc9 in GST-pulldown assays are diagrammed as black boxes. The region of HPV11 E1 essential for its interaction with Ubc9 in vitro is highlighted by a grey box. The results of GST-pulldown assays performed with these truncations and the percentage of input E1 bound to GST-Ubc9 (% E1 bound) are shown on the right of the panel. In these experiments, in vitro translated and 35S-labeled E1 proteins were chromatographed over GST or GST-Ubc9 columns and the bound proteins eluted with high-salt were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Firefly luciferase (Luc) was used as a negative control.

2.3.3.2 HPV11 E1 interacts with human Ubc9 in the yeast two-hybrid system

We determined that HPV11 E1 also interacts with Ubc9 in the yeast two-hybrid system, giving rise to high levels of β -galactosidase activity comparable to those obtained with BPV E1 (Fig. 2.2). As we previously reported, the complete HPV11 E1 protein (1–649) can activate transcription by itself in yeast, although not to an extent that prevents detection of its interaction with Ubc9 (Titolo et al., 1999). Fortunately, the interaction was conserved with a shorter HPV11 E1 fragment that lacks the first 71 amino acids and does not activate transcription in yeast. We also found that the interaction is independent of Ubc9 enzymatic activity since this E1 fragment could also interact with an inactive form of Ubc9 carrying the amino acid substitution C93S at the site of thioester linkage (Chakrabarti et al., 1999) (Fig. 2.2). The domain of HPV11 E1 required for interaction with Ubc9 was then mapped using a series of deletions shown in Fig. 2.2. These studies revealed that a fragment spanning amino acids 191–649 was the smallest region of E1 that gave rise to high levels of β -galactosidase activity in presence of Ubc9. This fragment of E1 encompasses the origin-binding domain (OBD; amino acids 191–353) and the C-terminal helicase domain (amino acids 353–649). Interestingly, the E1 (191–649) fragment and all of the larger ones that interacted strongly with Ubc9 were only weakly expressed in yeast (Supplementary Fig. 2.1). Truncations that removed part of the ATPase region (72–572) or

the OBD (353–649) resulted in substantially lower levels of β -galactosidase activity, suggesting that both domains are necessary for interaction with Ubc9. Neither the OBD nor the C-terminal helicase domain interacted strongly with Ubc9 although low levels of β -galactosidase activity were measured for both domains, suggesting that they can each interact weakly with Ubc9. A fragment encompassing the OBD and minimal E1–E1 oligomerization domain (191–438) gave rise to higher levels of β -galactosidase activity in presence of Ubc9 than the OBD alone (191–353), despite the fact that it was expressed at lower levels than the OBD (Supplementary Fig. 2.1). This finding re-enforces the role of amino acids 353–438 for interaction with Ubc9. Collectively, these results indicate that an E1 fragment encompassing the OBD, minimal E1 oligomerization domain, and ATPase motifs interacts robustly with Ubc9 and that all three regions participate in this interaction.

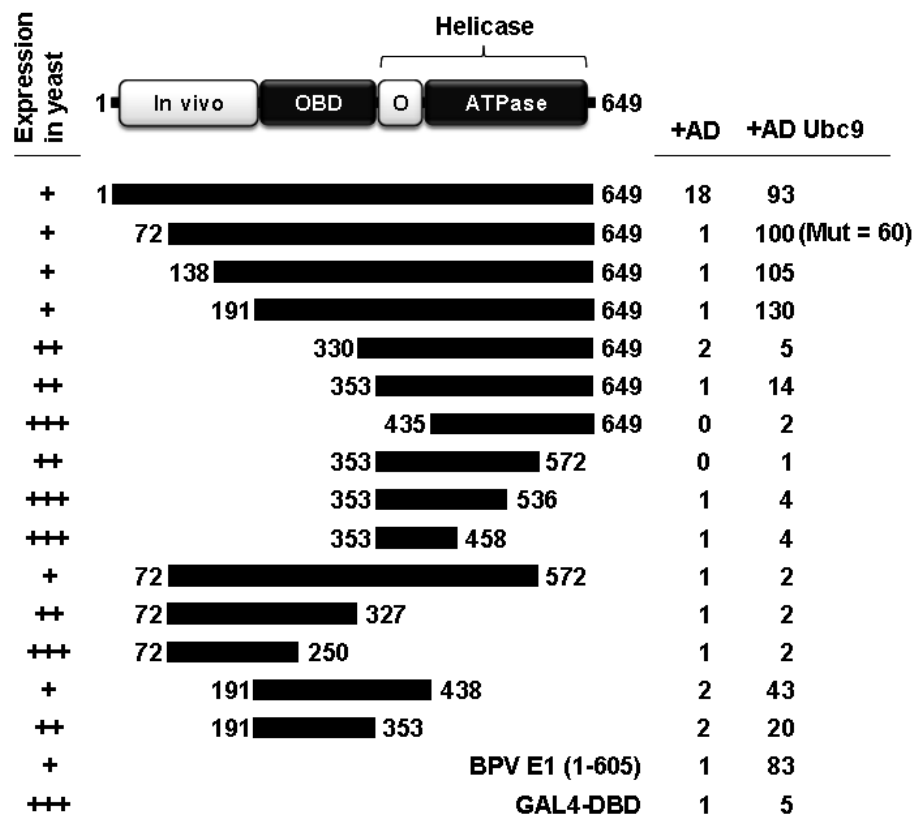


Figure 2.2. Interaction of HPV11 E1 with Ubc9 in the yeast two-hybrid system.

A schematic representation of the HPV11 E1 protein is shown at the top of the figure, as described in the legend of Fig. 2.1. Truncated E1 proteins tested for interaction with Ubc9 in the yeast two-hybrid system are diagrammed as black boxes. The level of expression of the different E1 fragments (Supplementary Fig. 2.1) are summarized on the left as low (+), intermediate (++), and high (+++) expression level. Yeast two-hybrid results are indicated on the right of each truncation as relative levels of β -galactosidase activity measured in cells expressing either human Ubc9 fused to the Gal4 activation domain (AD-Ubc9) or the Gal4 activation domain (AD) alone. The value for the interaction between E1 and a mutant Ubc9, carrying the C93S (Mut) substitution in the site of thioester linkage, is indicated in parentheses. All values are presented relative to that obtained for the combination of E1 (72–649) and Ubc9, which was set arbitrarily at 100. Negative and positive controls were the Gal4-DBD and BPV E1 (amino acids 1–605), respectively.

2.3.3.3 Effect of single amino acid substitutions in HPV11 E1 on its interaction with Ubc9 in vitro and in yeast

The results presented above identified amino acids 353–435 of E1 as important for Ubc9 binding in vitro and in yeast (Fig. 2.3A). Furthermore, they revealed that the OBD and ATPase region also contribute to the E1–Ubc9 interaction in yeast (Fig. 2.3A). To substantiate these findings, we tested the effect of single amino acid substitutions in E1 that impair its origin binding, oligomerization or ATPase activity on its interaction with Ubc9 in vitro and in yeast (Figs. 2.3B and C). For BPV E1, it was previously shown that the K183A substitution in the OBD abrogates origin binding (Gonzalez et al., 2000). We therefore created the analogous amino acid substitution (K228A) in HPV11 E1, confirmed that it abrogates origin binding (see below), and analyzed its effect on the E1–Ubc9 interaction. We found that this substitution reduced the binding of HPV11 E1 to Ubc9 both in pulldown assays (Fig. 2.3B) and in yeast (Fig. 2.3C), thereby confirming a role for the OBD in this interaction. To investigate the role of E1 oligomerization in its interaction with Ubc9, we used previously described amino acid substitutions, Y380A, N389A, and F393A that

abolish the oligomerization of HPV11 E1 ([Titolo et al., 2000] and [White et al., 2001]). These three substitutions also affect the ATPase activity of HPV11 E1 ([Titolo et al., 2000] and [White et al., 2001]) as E1 needs to assemble into hexamers to be enzymatically active. We found that the three substitutions reduced interaction of E1 to Ubc9 in vitro and yeast, confirming a role for the oligomerization domain in Ubc9 binding. We previously demonstrated that these substitutions do not affect the interaction of E1 with E2 (Titolo et al., 2000), indicating that the folding of the helicase domain is not grossly disturbed. Finally, we tested the effect of mutating the highly conserved K484 residue of the HPV11 E1 Walker A ATPase motif that is predicted to make critical hydrogen bonds with the triphosphate tails of ATP ([Enemark and Joshua-Tor, 2006], [James et al., 2003] and [James et al., 2004]). Substitution of K484 for either alanine or arginine had no effect on the interaction of E1 with Ubc9 in vitro but completely abolished it in yeast. This result provided further support that the ATP-binding activity of E1 is needed for its interaction with Ubc9 in yeast. Together, the results described above support the notion that the minimal E1 oligomerization domain contains a binding site for Ubc9 that is sufficient for interaction in vitro. This domain of E1 is also required for interaction with Ubc9 in yeast but additional sequences in the origin-binding domain and C-terminal ATPase domain of E1 are also needed for maximal interaction (i.e., for high levels of β -galactosidase activity).

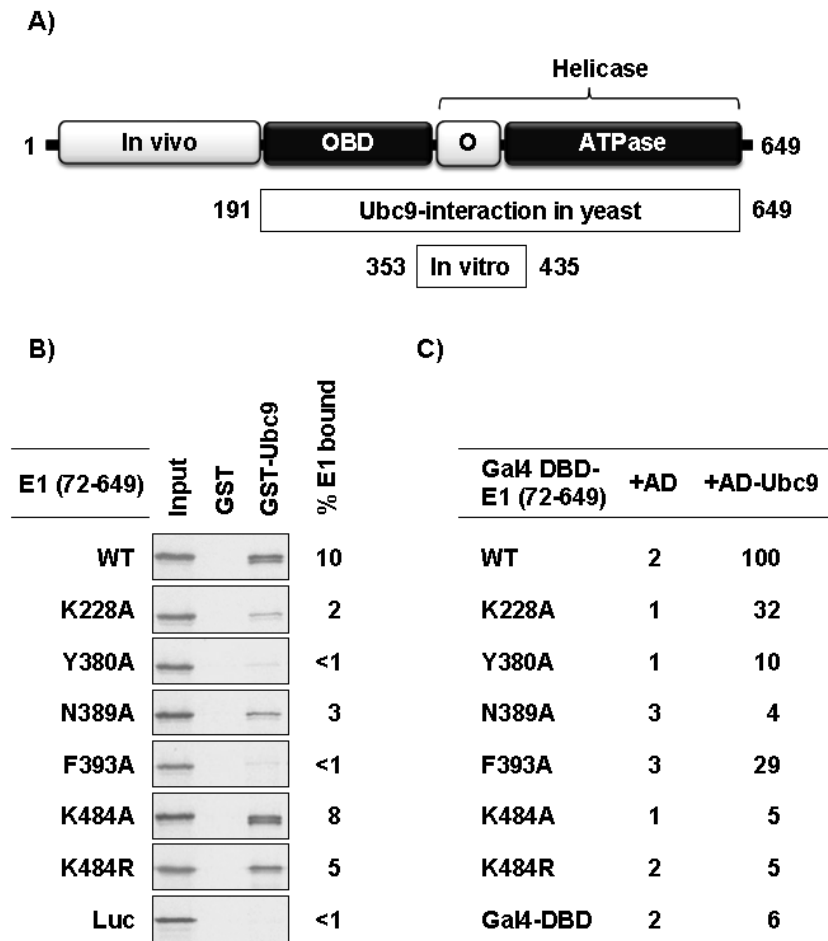


Figure 2.3. Amino acid substitutions affecting the interaction of HPV11 E1 with Ubc9.

(A) Diagram of HPV11 E1 highlighting the portion of the protein required for interaction with Ubc9 in vitro (amino acids 353–435) and in the yeast two-hybrid system (amino acids 191–649). (B) GST-pulldown assays showing the binding of wild-type (WT) and the indicated mutant E1 proteins to GST-Ubc9 or GST as a control. The percentage of input E1 bound to GST-Ubc9 (% E1 bound) is shown on the right of the panel. (C) Yeast two-hybrid results showing the interaction of wild-type and mutant E1 (72–649) proteins with Gal4 AD-Ubc9 or the Gal4 AD alone as a control. β -Galactosidase levels are reported as a percentage of those measured in cell expressing wild-type E1 (72–649) and AD-Ubc9.

2.3.3.4 Nuclear accumulation of HPV11 E1 is not affected by substitutions that weaken Ubc9 binding and by inhibition of the SUMO pathway

It was previously reported that intranuclear accumulation of BPV E1 is dependent on its interaction with Ubc9 ([Rangasamy and Wilson, 2000] and [Rangasamy et al., 2000]). We therefore examined the intracellular localization of the HPV11 E1 mutant proteins described above. As was done in the BPV study, we chose to visualize HPV11 E1 by fusing it to GFP. We were cautious to use a GFP-E1 construct in which a splicing donor site within the E1 ORF had been inactivated by silent mutations to prevent expression of a truncated fusion protein ([Cote-Martin et al., 2008] and [Deng et al., 2003]) and verified proper expression of each GFP-E1 protein by Western blotting (Supplementary Fig. 2.2A). In transfected C33A cells, this GFP-HPV11 E1 fusion protein was nuclear (Fig. 2.4), as previously reported (Deng et al., 2003). We also observed that the HPV11 E1 mutant proteins defective for Ubc9 binding were nuclear (Fig. 2.4), in contrast to what would have been expected from the BPV study ([Rangasamy and Wilson, 2000] and [Rangasamy et al., 2000]). These results suggested that nuclear accumulation of HPV11 E1 is independent of its interaction with Ubc9.

Given that the primary function of Ubc9 is to conjugate SUMO to its target proteins (Johnson, 2004) and that the nuclear accumulation of HPV11 E1 is independent of its interaction with Ubc9, we surmised that nuclear accumulation of E1 was independent of the SUMO pathway. To conclusively rule out the involvement of the SUMO pathway in HPV11 E1 nuclear accumulation, we initially used the Gam1 protein of the CELO adenovirus, a known inhibitor of the SUMO-activating enzyme (SAE1/SAE2 heterodimer) (reviewed in Chiocca, 2007). First, we confirmed that expression of Gam1 could inhibit the SUMO pathway in C33A cells by showing that it could prevent the sumoylation of the promyelocytic leukemia protein (PML), a prototypical substrate of the SUMO pathway, and also disrupt its characteristic punctuate intranuclear localization. Specifically, we showed by Western blotting that Gam1 could effectively inhibit the accumulation of the

sumoylated forms of PML in C33A cells, 24 h post-transfection (Fig. 2.5A). PML is known to accumulate in discrete nuclear foci known as nuclear domains 10 (ND10) or PML oncogenic domains (PODs) (Zhong et al., 2000) whose formation depends on the sumoylation of PML (Shen et al., 2006). To further demonstrate that Gam1 was capable of inhibiting the SUMO pathway in C33A cells, we showed that its cotransfection resulted in the redistribution of GFP-PML from discrete nuclear foci to the nuclear periphery and in larger intranuclear domains (Fig. 2.4 and Fig. 2.5), similar to what was reported by Shen et al. (2006). Together, these results demonstrated that Gam1 was indeed inhibiting the SUMO pathway under our assay conditions. When cotransfected with GFP-E1, Gam1 had no effect on the nuclear accumulation of wild-type E1 in C33A cells (Fig. 2.4 and Fig. 2.5), suggesting that the SUMO pathway is not involved in this process. To exclude the possibility that residual activity of the SUMO pathway was responsible for the nuclear accumulation of HPV11 E1, we also verified that the effect of Gam1 on PML and HPV11 E1 was the same at 48 h post-transfection. At this time point, sumoylation of PML was still inhibited and its cellular localization was disturbed (Fig. 2.5). However, the nuclear accumulation of HPV11 E1 remained unchanged, further supporting the notion that HPV11 E1 nuclear accumulation is independent of the SUMO pathway.

To rule out any potential pleiotropic effect of Gam1, we used two additional methods of interfering with the SUMO pathway. First, we made use of a dominant negative version of Ubc9 (Ubc9dn, C93S) that can still interact with its target proteins, including E1 (Fig. 2.2), but is unable to conjugate SUMO (Chakrabarti et al., 1999). As expected, Ubc9dn, but not Ubc9WT, significantly reduced the sumoylation of PML and led to a redistribution of GFP-PML at the nuclear periphery and in larger intranuclear domains 24 and 48 h post-transfection (Supplementary Fig. 2.3B). Importantly, it had no effect on the intranuclear accumulation of E1 (Supplementary Fig. 2.3B). We then tested the effect of depleting the levels of Ubc9 in C33A cells using a specific shRNA (shUbc9 11077, Supplementary Fig. 2.4A). As anticipated, the Ubc9 shRNA, but not the inactive control shRNA, led to a redistribution of PML 96 h post-transfection but had no effect on the

intranuclear accumulation of E1 (Supplementary Fig. 2.4B). From these studies, we conclude that a functional SUMO pathway is not required for nuclear accumulation of wild-type HPV11 E1.

Next, we wondered if HPV11 E1 mutants that are defective for Ubc9 binding would be more sensitive to inhibition of the SUMO pathway. We therefore investigated the nuclear accumulation of these E1 mutants in the presence of Gam1, which we have found is a stronger inhibitor of the SUMO pathway than Ubc9dn or the Ubc9 shRNA. We found that all of the Ubc9-binding defective E1 mutants were still localized to the nucleus when the SUMO pathway was inhibited by Gam1 (Fig. 2.4). Collectively, these results indicate that the nuclear accumulation of HPV11 E1 is independent of both its interaction with Ubc9 and a functional SUMO pathway.

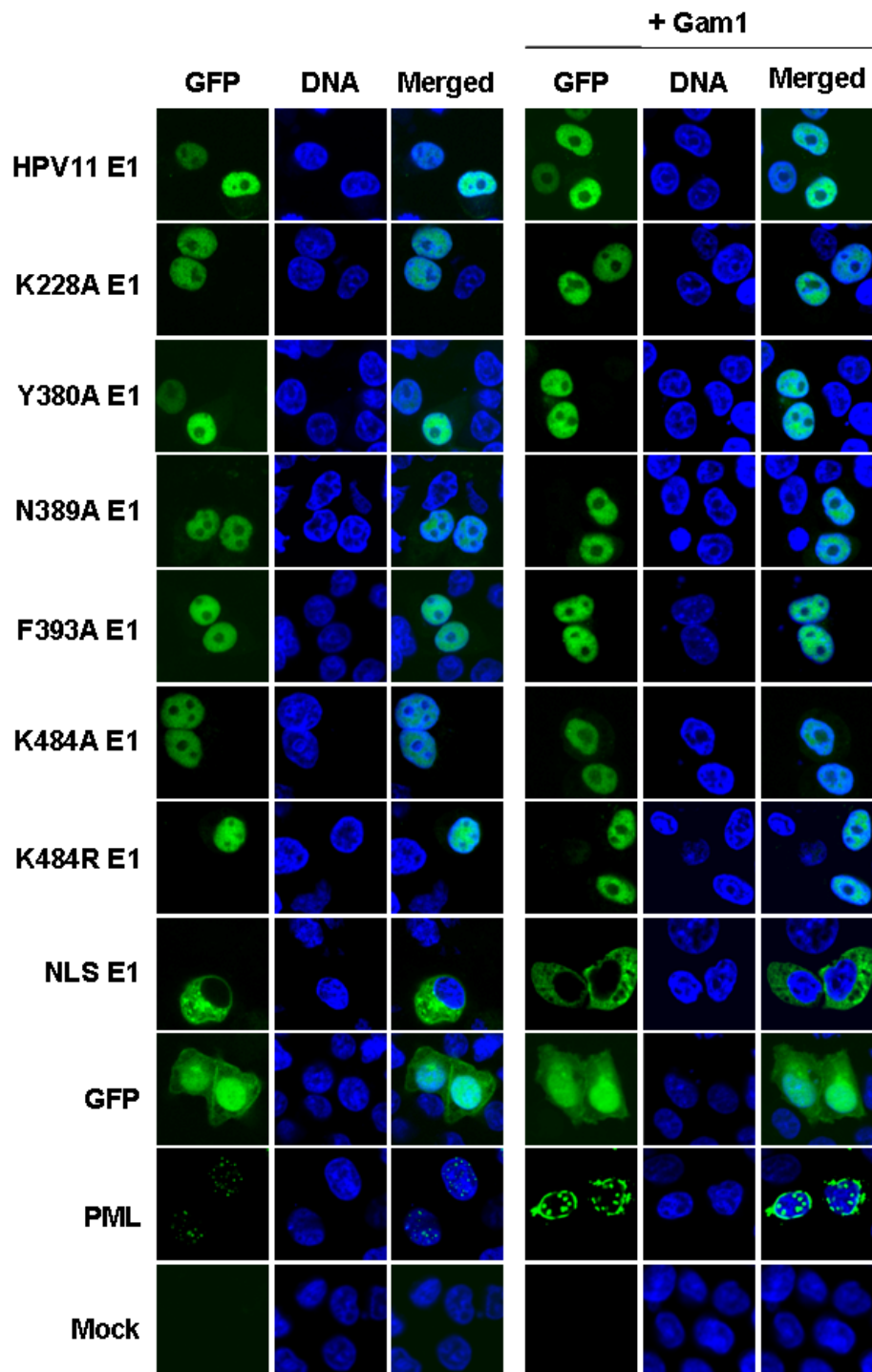


Figure 2.4. Intracellular localization of wild-type and mutant HPV11 E1.

C33A cells transiently expressing the indicated GFP-HPV11 E1 proteins, or GFP-PML, with or without Gam1, were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.

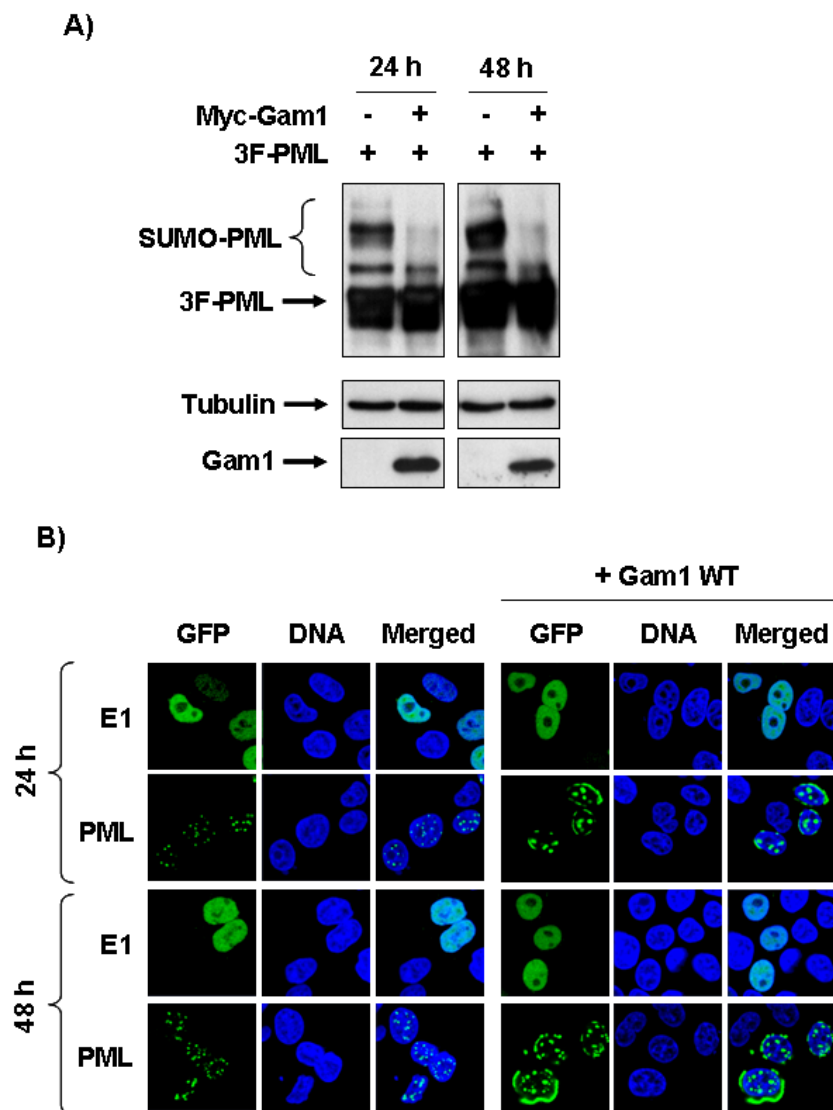


Figure 2.5. Effect of the Gam1 protein on PML sumoylation and intracellular localization of PML and HPV11 E1.

(A) Sumoylation of PML. C33A cells were transfected with a plasmid encoding a triple Flag-tagged PML (3F-PML) either alone or together with a plasmid encoding Myc-Gam1. Anti-Flag, anti-tubulin, and anti-Myc immunoblots were performed on whole cell extracts (WCE) 24 and 48 h post-transfection. (B) Cellular localization of PML and HPV11 E1. C33A cells transiently expressing GFP-E1 or GFP-PML, with or without Gam1, were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy 24 and 48 h post-transfection. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.

2.3.3.5 Mutant HPV16 E1 proteins that are defective for interaction with Ubc9 also localize to the nucleus

One of our laboratories has previously identified five amino acid substitutions in HPV16 E1 that abrogate its interaction with Ubc9 in the yeast two-hybrid system (Yasugi et al., 1997). Of these substitutions, four lie in the C-terminal helicase domain (Y412F, W439R, G482D, and G496R) whereas the fifth one is in the OBD (S330R). To analyze the nuclear accumulation of these mutant HPV16 E1, we constructed GFP fusion proteins in which the major splicing donor site within the E1 ORF was mutated to prevent expression of a truncated fusion protein, essentially as we did for HPV11 E1 (Cote-Martin et al., 2008), and verified their proper expression by Western blotting (Supplementary Fig. 2.2B). We then determined their intracellular localization in C33A cells. We found that the wild-type GFP-HPV16 E1 fusion protein localizes predominantly to the nucleus and that this phenotype was not altered by amino acid substitutions that affect Ubc9 binding (Fig. 2.6). Furthermore, expression of Gam1 did not affect the nuclear accumulation of either wild-type or mutant E1 (Fig. 2.6). The fact that none of the five amino acid substitutions prevented nuclear accumulation of GFP-HPV16 E1, even in presence of Gam1, provides strong evidence that this process can occur independently of an interaction with Ubc9 and a functional SUMO pathway, similarly to what we observed for HPV11 E1.

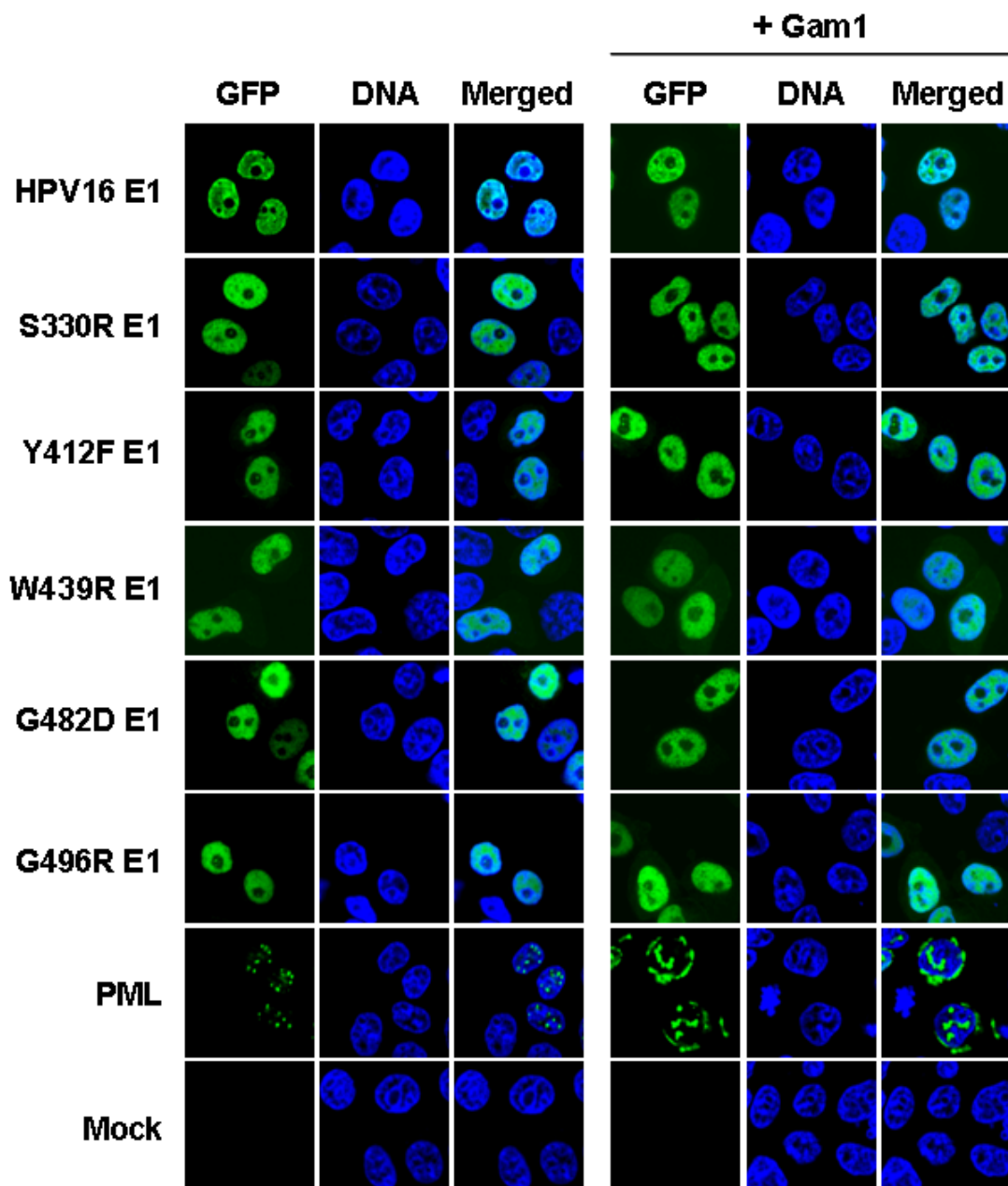


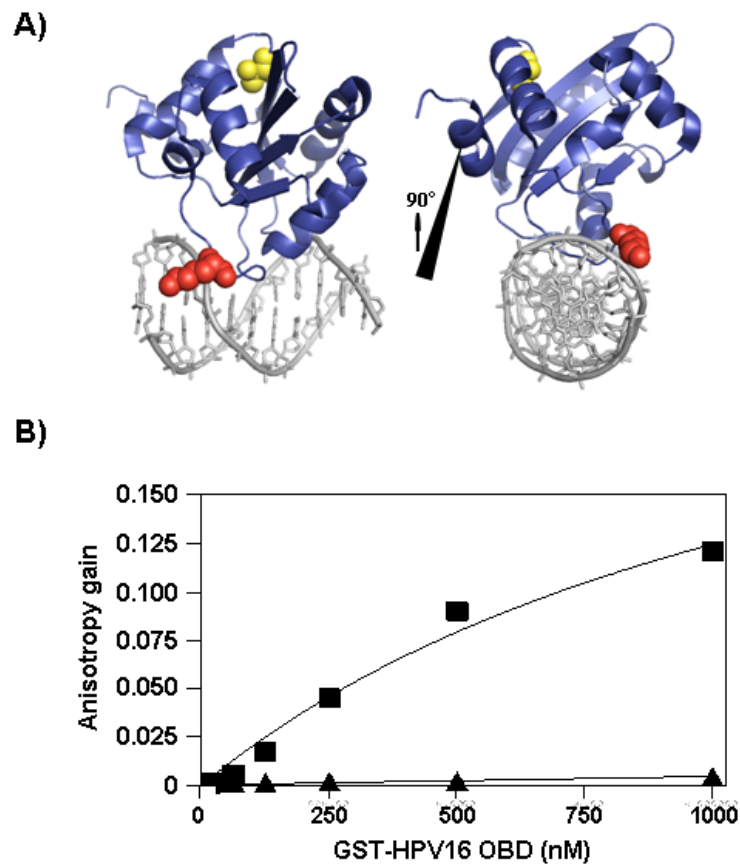
Figure 2.6. Intracellular localization of wild-type and mutant HPV16 E1.

C33A cells transiently expressing the indicated GFP–HPV16 E1 proteins, or GFP–PML, with or without Gam1 were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.

2.3.3.6 The S330R substitution in the HPV16 E1 OBD reduces its affinity for DNA

In this study, we found that mutations that affect the oligomerization of HPV11 E1 also impair Ubc9 binding. A similar observation was made by Yasugi et al. (Yasugi et al., 1997), who found that four of their five substitutions in HPV16 E1 that affected interaction with Ubc9 also affected oligomerization of the protein, detected as an E1–E1 interaction in the yeast two-hybrid system. Accordingly, these four mutant proteins showed reduced ATPase activity and were unable to support transient DNA replication (Yasugi et al., 1997). In contrast the fifth substitution, S330R, impaired the interaction of E1 with Ubc9 with little effect on its ATPase activity and oligomerization (Yasugi et al., 1997). The S330R substitution was also unique in that it conferred a dominant negative phenotype in transient DNA replication assays, unlike the other mutants (Yasugi et al., 1997). Since S330R lies in the OBD, albeit in a region opposite to the DNA-binding surface (Fig. 2.7A), we wondered if it had any effect on its affinity for DNA. To test this possibility, we produced and purified the wild-type and S330R HPV16 E1 OBDs (residues 190–352) fused to GST. For comparison, we also produced the analogous wild-type and mutant (S331R) OBD from HPV11. An HPV11 OBD carrying the K228A substitution, which lies near the DNA-binding surface (Fig. 2.7A), was also produced as a DNA-binding defective control. The DNA-binding activities of these different OBDs were then measured using a quantitative assay based on fluorescence anisotropy, which we previously described (Titolo et al., 2003a). In this assay, binding of the purified GST-E1 OBD to a 21-bp duplex DNA labeled at one end with fluorescein results in a change in anisotropy that reaches a plateau when all of the binding sites are occupied. The fluorescent duplex DNA used in these experiments contained two inverted E1 binding sites separated by 3 bp, (5'-Fluo-GGATACTTAATAATAATGGGC-3; the two binding sites are underlined), an optimal substrate for the GST-OBD (Titolo et al., 2003a). As expected, we observed that the wild-type HPV16 E1 OBD could readily bind to the probe, with an estimated dissociation constant (K_D) of 875 ± 100 nM (Fig. 2.7B). In contrast, the S330R mutant OBD had a much lower affinity for the probe, too weak to be accurately measured (Fig. 2.7B). These results

indicate that the S330R substitution reduces the affinity of the E1 OBD for DNA. Similar results were obtained for the HPV11 OBD (Fig. 2.7C). Specifically, the S331R mutant was also inactive similar to the control mutant K228A. Since S330R affects the binding of HPV16 E1 to Ubc9 in the yeast two-hybrid system, these results provide additional evidence that the DNA-binding activity of E1 is required for interaction with Ubc9 in yeast. In addition, the fact that the S330R substitution reduces DNA binding (this study), while having little effect on the oligomerization of E1 or its interaction with E2 (Yasugi et al., 1997), provides a likely mechanism for its dominant negative phenotype in transient DNA replication assays (Yasugi et al., 1997).



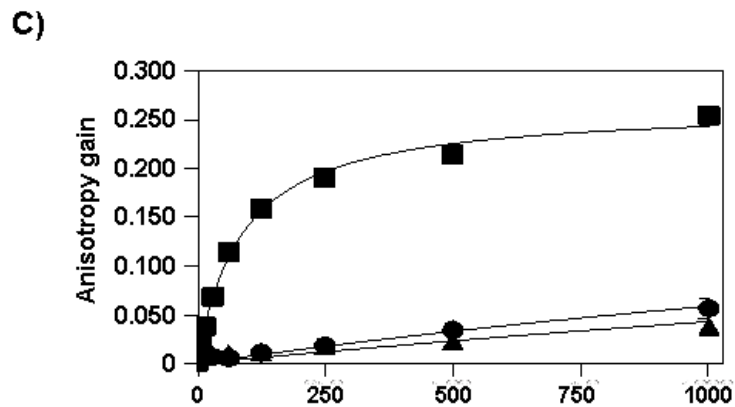


Figure 2.7. Effect of the S330R and S331R substitutions on the DNA-binding activity of the HPV16 and HPV11 E1 OBD, respectively.

(A) Location of S330/S331 and K228 in the structure of the OBD. Crystal structure of the BPV E1 OBD bound to DNA (PDB ID: 1KSY (Enemark et al., 2002)) showing the location of threonine 286 (in yellow), which is analogous to serine 330 and 331 in HPV16 and HPV11 E1, respectively. The location of lysine 183, analogous to lysine 228 in HPV11 E1, is shown in red. (B) Fluorescence anisotropy DNA-binding assays. Binding isotherms were performed with 10 nM of fluorescent DNA probe containing two E1 binding sites and increasing concentrations of purified wild-type (squares) or S330R (triangles) GST-HPV16 OBD. (C) Same as panel B but using the wild-type GST-HPV11 E1 OBD (squares) or mutant derivatives carrying the K228A (circles) or S331R (triangles) amino acid substitution. Each binding isotherm was performed in triplicate.

2.3.3.7 Nuclear accumulation of BPV E1 is independent of the SUMO pathway and of lysine 514 in C33A cells

Our finding that nuclear accumulation of HPV11 and HPV16 E1 is independent of Ubc9 binding and of the SUMO pathway is in contrast to what has been reported for BPV E1 by Rangasamy and Wilson (Rangasamy and Wilson (2000) and Rangasamy et al. (2000)). This prompted us to re-examine the intracellular localization of BPV E1 in C33A

cells, under our assay conditions. As expected, we observed that BPV E1, when fused to GFP as was done by Rangasamy and Wilson (2000) and Rangasamy et al. (2000), accumulated in the nucleus of transfected C33A cells. Surprisingly, however, BPV E1 remained nuclear when the SUMO pathway was inhibited by Gam1. It was previously reported that BPV E1 is sumoylated on lysine 514 and that substitution of this residue for either alanine or arginine abrogates its nuclear accumulation (Rangasamy et al., 2000). When tested for their effect in C33A cells, we observed that neither of the two K514 substitutions had an effect on the nuclear accumulation of BPV E1, even when the SUMO pathway was inhibited by Gam1 (Fig. 2.8). We also investigated if similar substitutions had any effect in the context of HPV11 E1. As was observed for BPV E1 both HPV11 mutants (K559A and K559R) accumulated in the nucleus of transfected cells even in presence of Gam1 (Fig. 2.8). From these results, we conclude that nuclear accumulation of BPV and HPV11 E1 is not dependent on a functional SUMO pathway and on the integrity of K514/K559 in C33A cells, regardless of whether K514/K559 is a site of sumoylation in these cells.

The finding presented above promoted us to test more directly if BPV and HPV11 E1 were sumoylated in C33A cells. We found that both proteins, either in their wild-type or mutant forms (K514/K559), were not significantly sumoylated in C33A cells as compared to PML, which was used as a positive control in these experiments (Supplementary Fig. 2.5). We cannot rule out that a very small amount of E1 sumoylation occurs in C33A cells, below the detection limit of our assay. However, if this were the case, we would anticipate that this low level of sumoylation would be very efficiently inhibited by Gam1 as this adenoviral protein can inhibit the much more robust sumoylation of PML (Fig. 2.5A). Overall, these findings provide further support to the idea that nuclear accumulation of E1 is independent of sumoylation in C33A cells.

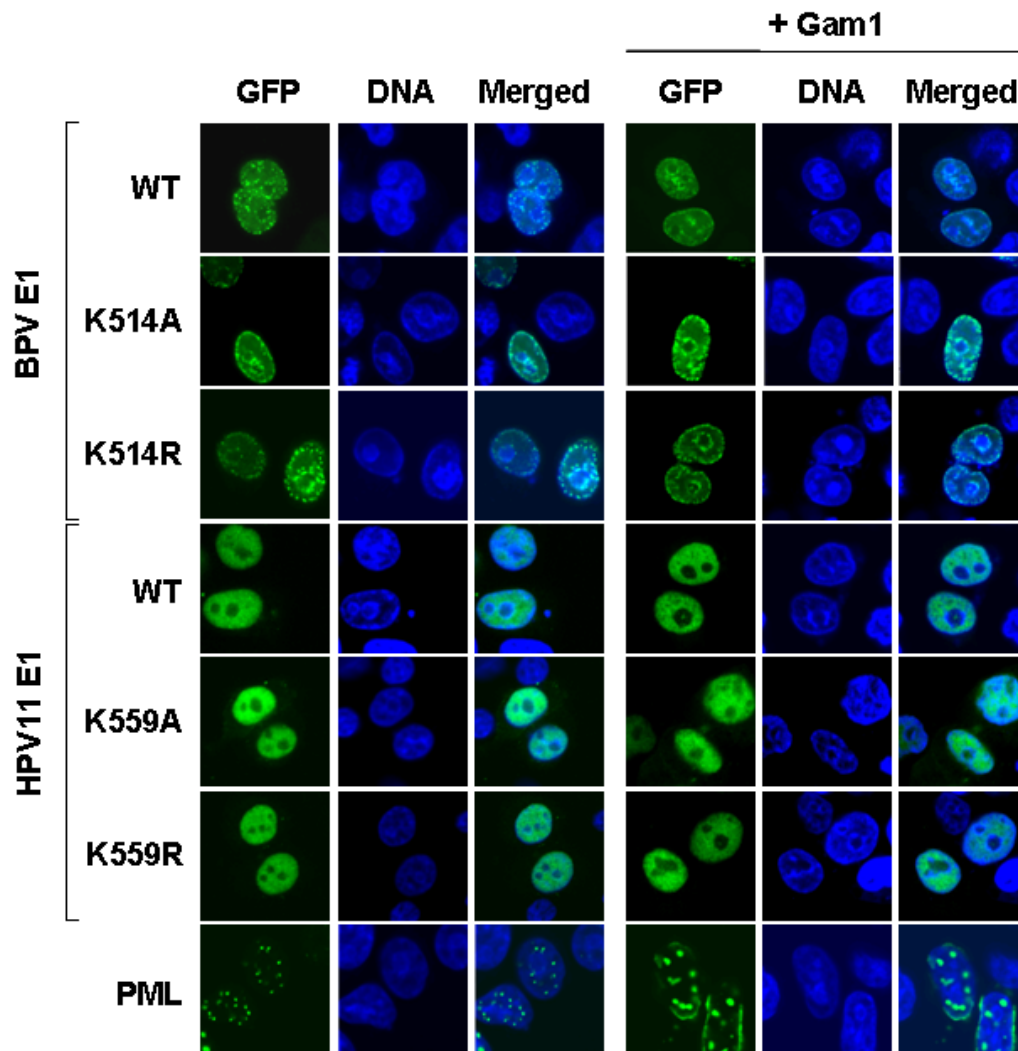
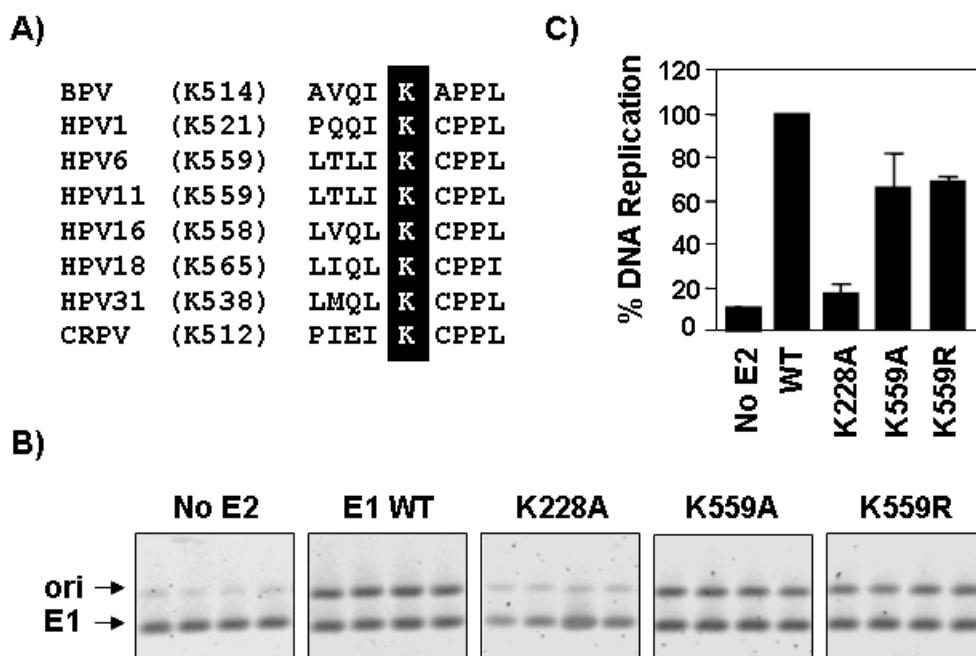


Figure 2.8. *K559 and K514 are not essential for the intracellular localization of HPV11 and BPV E1, respectively, in C33A cells.*

C33A cells transiently expressing the indicated GFP–E1 proteins, or GFP–PML, with or without Gam1, were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.

2.3.3.8 Lysine 559 in HPV11 E1 is not essential for transient HPV DNA replication

K514 in BPV E1 has been shown to be essential for viral DNA replication. Specifically, it was reported that BPV E1 mutants carrying the K514A and K514R substitutions were unable to support transient BPV DNA replication (Rangasamy et al., 2000). Because K514 is highly conserved (Fig. 2.9A), we tested if this residue was also essential for viral DNA replication in the context of HPV11 E1. Surprisingly, we found that the K559A and K559R substitutions had little effect in a transient HPV DNA replication assay performed with untagged HPV11 E1 and E2 (Figs. 2.9B and C). The fact that the K559A and K559R mutant E1 were nearly as active as their wild-type counterpart indicated that not only are they functional but also that they must localize to the nucleus where viral DNA replication takes place. Consistent with the fact that the two K559 mutant E1 are functional, they both retained the ability to interact with Ubc9 *in vitro* and in yeast (Figs. 2.9D and E). Thus, unlike what was found for BPV E1, K559 is not essential for HPV11 E1's ability to support viral DNA replication.



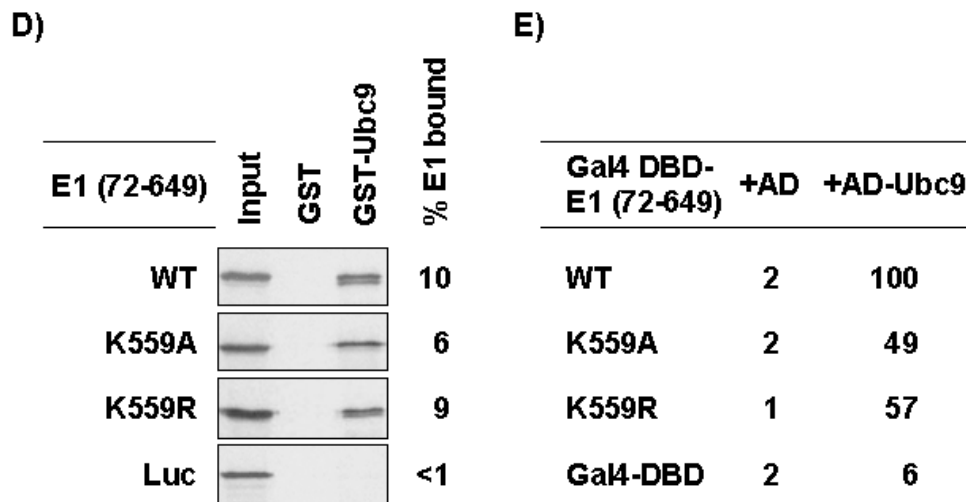


Figure 2.9. K559 is not essential for the replication activity of HPV11 E1.

(A) Sequence alignment showing the conservation of K559 in the E1 proteins from different papillomaviruses. (B) Transient HPV11 DNA replication. Cells were transfected with expression plasmids for the indicated wild-type or mutant HPV11 E1 together with an E2-expression plasmid and an origin-containing plasmid. The amount of replicated origin plasmid was measured by PCR from DpnI-digested genomic DNA. A portion of the E1-expressing plasmid devoid of DpnI site was amplified as an internal control to normalize for variation in transfection efficiencies. Each E1 mutant was tested in quadruplicates. The figures show the amounts of origin (ori) and E1 PCR products separated on 1% agarose gels and stained with the fluorescent dye SYBRGreen I (Molecular Probes). The HPV11 E1 K228A mutant defective in DNA binding was used as negative controls. (C) DNA replication activity of mutant E1 proteins. The intensities of the ori and E1 PCR fragments shown in panel B were quantified using a Storm PhosphorImager (Amersham Biosciences) and used to calculate the replication activity of each mutant protein relative to that of wild-type E1, which was set at 100%. Each value is the average of four replicates with the standard deviation indicated. (D) GST-pulldown assays showing the binding of wild-type (WT) and the indicated mutant E1 proteins to GST-Ubc9 or GST as a control. The

percentage of input E1 bound to GST-Ubc9 (% E1 bound) is shown on the right of the panel. (E) Yeast two-hybrid results showing the interaction of wild-type and mutant E1 (72–649) proteins with Gal4 AD-Ubc9 or the Gal4 AD alone as a control. β -Galactosidase levels are reported as a percentage of those measured in cell expressing wild-type E1 (72–649) and AD-Ubc9.

2.3.4 Concluding remarks

In this report, we provide evidence that HPV11 E1 interacts with the human SUMO-conjugating enzyme Ubc9 in yeast and in vitro, similarly to what was reported for HPV16 and BPV E1 ([Rangasamy and Wilson, 2000], [Yasugi and Howley, 1996] and [Yasugi et al., 1997]). We determined that the region of HPV11 E1 spanning amino acids 353–435 is important for interaction with Ubc9 both in yeast and in vitro, in agreement with the mapping data reported for BPV E1, which implicated residues 315 to 459 (corresponding to amino acids 360 to 504 of HPV11 E1). In addition to this region, we found that the OBD and the ATPase domain of E1 are also required for the interaction of E1 with Ubc9 in yeast, although both domains are dispensable in vitro. Based on our previous experience in using the yeast two-hybrid system and in vitro GST-pulldown assays to characterize protein–protein interactions, we would argue that the E1–Ubc9 interaction gives rise to a robust β -galactosidase signal in yeast but to weaker binding in pulldown assays. One reason for this difference may be the oligomerization status of E1. We previously determined that in vitro translated E1 is mostly monomeric (Titolo et al., 2000), and this may explain why it interacts only weakly with Ubc9 in pulldown assays. In yeast, interaction with Ubc9 may be enhanced by oligomerization of E1, which we have shown previously to occur in the two-hybrid system (Titolo et al., 2000). Interestingly, we also reported before that amino acids 353–435 of HPV11 E1, which we determined here to be necessary for interaction with Ubc9, mediate the oligomerization of E1 (Titolo et al., 2000). Furthermore, we have found in this study that substitutions in this region that abrogate the oligomerization of E1 (Y380A, N389A, and F393A) also prevent its interaction with Ubc9 (Titolo et al., 2000).

Collectively, these findings suggest that the ability of E1 to oligomerize and bind to Ubc9 may be functionally related. We previously showed that the oligomerization of E1, as well as its ATPase activity, is abolished by substitution of the ATPase Walker A residue K484 to either alanine or arginine ([Titolo et al., 2000] and [White et al., 2001]). Here we found that these same substitutions also affect the interaction of E1 with Ubc9 in yeast. Similarly, four of the five substitutions in HPV16 E1 that reduce its interaction with Ubc9 in yeast also inhibit its oligomerization (E1–E1 interaction in yeast) and ATPase activity (Yasugi et al., 1997). Collectively, these results support the notion that oligomerization and ATP-binding/hydrolyzing activity of E1 are needed for its robust interaction with Ubc9 in yeast. Based on the two-hybrid and in vitro interaction data, we propose that residues 353–435 of E1 contain the primary binding site for Ubc9 and that this interaction can be further modulated by oligomerization of the protein.

We also observed that the OBD can modulate the interaction of E1 with Ubc9 in the yeast two-hybrid system. This is most obvious when comparing an HPV11 E1 fragment containing both the OBD and helicase domain (aa 191–649) to one encompassing the helicase domain alone (aa 353–649). Although both E1 fragments bind to GST-Ubc9 with comparable affinities in vitro, the larger one gives rise to substantially higher levels of β -galactosidase activity in yeast, suggesting that it interacts more efficiently with Ubc9. The contribution of the OBD is also highlighted by the finding that the HPV11 K228A and HPV16 S330R substitution that abrogate the DNA-binding activity of the OBD also weakens the E1–Ubc9 interaction in yeast. Thus the origin-binding activity of both HPV11 and HPV16 E1 is essential for their interaction with Ubc9 in yeast. Given that we previously demonstrated that the OBD modulates the oligomerization of E1 (Titolo et al., 2000), it may not be surprising that it also affects its interaction with Ubc9 in yeast.

Previous studies on BPV E1 suggested that nuclear accumulation of the protein was dependent on its interaction with Ubc9 and sumoylation on lysine 514 (Rangasamy et al., 2000). In contrast to what was reported for BPV E1, we found that lysine 559 of HPV11 is

neither required for the replication activity of the protein nor for its nuclear accumulation. More importantly, we found that HPV11 and HPV16 E1 proteins defective for Ubc9 binding could still accumulate in the nucleus, even when the SUMO pathway was inhibited by the Gam1 protein of the CELO adenovirus. The lack of effect of Gam1 is consistent with our observation that HPV11 E1 proteins are not significantly sumoylated in C33A cells even when the SUMO conjugation capacity of these cells is augmented by co-expression of Ubc9 and SUMO-1. Collectively, our findings indicate that nuclear accumulation of HPV11 and HPV16 E1 can occur independently of their sumoylation and interaction with Ubc9. Surprisingly, we also observed that the nuclear accumulation of BPV E1 was not changed by Gam1 or by mutation of lysine 514 in C33A cells, in contrast to what was reported previously in COS-1 cells (Rangasamy et al., 2000). This discrepancy between the two studies is unlikely due to our use of a GFP-E1 fusion protein, since a similar fusion was used in the BPV study. Furthermore, Deng et al., (2003) have shown that HPV11 E1 remains functional in transient DNA replication assays when fused to GFP. Our localization studies were performed in C33A cervical carcinoma cells, rather than in the COS-1 monkey kidney cells, because we believe that the C33A cell line is a more relevant system in which to study the function and regulation of HPV proteins. In support of our findings, we note that Yu et al. (2007) also observed that the K559A and K559R substitutions in HPV11 E1 have no effect on nuclear accumulation of the protein, in their case in COS-7 cells. We further note that the group that described the nuclear accumulation defect of the K514 BPV E1 protein has recently published that this mutant E1 is nuclear (Rosas-Acosta and Wilson, 2008). Finally, we stress that the nuclear accumulation of HPV11 and HPV16 E1 was unaffected by the combined effect of mutations that prevent Ubc9 binding and inhibition of the SUMO pathway by Gam1, thus providing strong evidence that sumoylation of E1 is not required for its nuclear accumulation.

In summary, the fact that all of the Ubc9-binding defective E1 mutants identified so far are unable to support viral DNA replication ([Titolo et al., 2000] and [Yasugi et al., 1997]), despite being in the nucleus, suggests that Ubc9 is required for some, yet

unidentified, aspects of viral DNA replication. In addition, the results in this manuscript indicate that the interaction of E1 with Ubc9 depends on its oligomerization and binding to DNA and ATP ([Titolo et al., 2000] and [Yasugi et al., 1997]). Together, these findings support a model whereby Ubc9 facilitates viral DNA replication at a step following assembly of E1 into a double hexamer at the origin.

2.3.5 Materials and methods

Plasmid constructions and mutagenesis. Plasmids to express GFP–E1 fusion proteins were constructed by inserting PCR fragments encoding the HPV11 and BPV1 E1 ORFs into plasmid pQBI25-fc1 (Qbiogene) using BamHI and EcoRI. The HPV11 E1 ORF in these constructs carries silent mutations at codons 5–6 (nucleotides 844–849) that inactivate an internal splicing donor site, which, if not mutated, leads to expression of a truncated GFP–E1 protein (Deng et al., 2003). Plasmids to express GFP–HPV16 E1 fusion proteins were constructed by inserting PCR fragment encoding the HPV16 E1 ORF into plasmid pGFP2-C2 (Perkin-Elmer) using XhoI and BamHI. The HPV16 E1 ORF in these constructs also carries silent mutations at codons 5–6 (nucleotides 877–882) to inactivate an internal splicing donor site and prevent expression of a truncated GFP–E1 protein (data not shown). Plasmids to express the HPV16 E1 OBD (amino acids 190–352) and HPV11 E1 OBD (amino acids 191–353) fused to GST have been described (Titolo et al., 2003a). Site-directed mutagenesis was performed with the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. All DNA constructs were verified by sequencing. Plasmids expressing 21-nucleotide short hairpin RNAs (shRNA) against Ubc9 were expressed from the pLKO.1-Puro plasmid and obtained from Open Biosystems (Cat: RHS4533-NM_003345). The targeting sequences for the shRNA against Ubc9 are available online and the targeting sequence for the shRNA control is 5'-GCTATGAGAATAACGGTAACA-3'. Details on construction of these plasmids will be made available upon request.

Yeast two-hybrid analysis. Yeast two-hybrid analysis was performed using *Saccharomyces cerevisiae* strain Y153 (MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-901 his3- Δ 200 ade2-101 gal4 Δ gal80 Δ URA3::GAL-lacZ LYS::GAL-HIS3) as described (Titolo et al., 1999). β -Galactosidase assays were performed with the substrate chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (Roche Applied Science) as described (Titolo et al., 1999). HPV11 E1 plasmids have been described ([Titolo et al., 1999] and [Titolo et al., 2000]). Plasmids encoding BPV E1 and human Ubc9 fused to the Gal4 DNA-binding domain and activation domain, respectively, were a gift from Dr. Van Wilson (Texas A&M) and have been described (Rangasamy and Wilson, 2000).

GST-pulldown assay. GST and GST-Ubc9 proteins were purified from *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) as previously described (Titolo et al., 2000). GST-pulldown assays were performed as described in Titolo et al. (2000). The GST-Ubc9 plasmid was a kind gift from Dr. Van Wilson (Texas A&M) and has been described (Rangasamy and Wilson, 2000). Plasmids used for in vitro translation of E1 have been described (Titolo et al., 2000).

Cell culture and transfections. The human cervical carcinoma cell line C33A was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 IU/ml of penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Transfections of C33A cells were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen).

Confocal fluorescence microscopy. C33A cells (8×10^6) were transfected with 400 ng of GFP-E1 expression plasmid and either 400 ng of Gam1 expression plasmid or the same amount of empty vector as control, and grown on coverslips. Twenty-four hours post-transfection cells were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 when required. DNA was stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes). Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning

microscope (Zeiss, Toronto, CAN) and analyzed using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss, Toronto, Canada).

Antibodies and Western blotting. Gal4 DNA-binding domain fusion proteins were detected in total yeast extracts using a mouse monoclonal antibody against Gal4-DBD from Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-510) and β -actin was detected using a mouse monoclonal antibody from Abcam (Cat: ab8224). GFP fusion proteins were detected using a mixture of two mouse monoclonal antibodies purchased from Roche (Cat: 11814460001) and β -tubulin was detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (Cat: T0426). Myc-Gam1 and endogenous Ubc9 were detected using a c-Myc mouse monoclonal antibody (Cat: sc-40) and a Ubc9 goat polyclonal antibody (Cat: sc-5231) from Santa Cruz Biotechnology. For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and detected using horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse secondary antibody from GE healthcare (Cat: NA931) or a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat secondary antibody from Santa Cruz Biotechnology (Cat: 2768) and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Transient HPV DNA replication assay. Transient HPV DNA replication was performed as described previously (Titolo et al., 2003a). Briefly, CHO-K1 cells were transfected with three plasmids encoding HPV11 E1, E2, and the minimal origin of DNA replication (pN9), respectively. Replication of the origin-containing plasmid was quantified 48 h post-transfection by PCR from Dpn1-digested genomic DNA. As a control, a fragment of the E1 expression plasmid devoid of Dpn1 restriction sites was amplified in the same PCR reaction. A low number of PCR cycles were used to ensure that amplification reactions remain in the linear range (data not shown). PCR products were separated on a 1% TBE agarose gel and visualized by staining with the intercalating dye SYBRGreen I (Molecular Probes). Amount of replicated ori-plasmid was quantified by exposure on a STORM 860 Phosphorimager (Molecular Dynamics) and normalized to the amplified E1

signal. Transfection and detection of replicated ori plasmid were performed in quadruplicates.

Fluorescence anisotropy DNA-binding assay. The HPV11 and HPV16 E1 OBDs were expressed as fusions to GST and purified from bacteria as described previously (Fradet-Turcotte et al., 2007). The duplex DNA probe encoding two E1 binding sites was described previously (Titolo et al., 2003a) and was prepared by annealing a fluorescein-labeled oligonucleotide to a complementary oligonucleotide as described (Titolo et al., 2003a). Binding reactions (150 μ l) were assembled in 96-well HTRF plates (Packard) using 10 nM fluorescein-labeled probe and the indicated concentrations of protein in the following buffer: 20 mM Tris (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.01% NP-40, and 1 mM DTT. Fluorescence readings were recorded and K_D values calculated as previously described ([Fradet-Turcotte et al., 2007] and [Titolo et al., 2003a]).

2.3.6 Acknowledgements

We thank Dr. Van G. Wilson (Texas A&M University) for providing the expression plasmid encoding GST-Ubc9 and the yeast two-hybrid plasmids encoding UBC9 and BPV E1 and Dr. Muriel Aubry (University of Montreal) for the gift of the GFP-SUMO-1 expression plasmid. We also thank Dr. Susanna Chiocca (Milan, Italy) and Dr. Eric Cohen (IRCM) for providing us with the Gam1 and eGFP-PML expression plasmids, respectively. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to J.A. A.F.-T. hold a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.A. is a senior scholar from the FRSQ.

2.3.7 References

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

Bernier-Villamor V., D.A. Sampson, M.J. Matunis and C.D. Lima, Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1, *Cell* 108 (3) (2002), pp. 345–356.

Chakrabarti S.R., R. Sood, S. Ganguly, S. Bohlander, Z. Shen and G. Nucifora, Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (13) (1999), pp. 7467–7472.

Chiocca S., Viral control of the SUMO pathway: Gam1, a model system, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (Pt 6) (2007), pp. 1419–1421.

Chow L.T. and T.R. Broker, Papillomavirus DNA replication, *Intervirology* 37 (3-4) (1994), pp. 150–158. Chow and Broker, 1997 L.T. Chow and R. Broker, Small DNA tumor viruses. In: N. Nathanson, Editor, *Viral pathogenesis*, Lippencott-Raven Publ., Philadelphia (1997), pp. 267–301.

Clower R.V., J.C. Fisk and T. Melendy, Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I, *J. Virol.* 80 (3) (2006), pp. 1584–1587.

K.L. Conger, J.S. Liu, S.R. Kuo, L.T. Chow and T.S. Wang, Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase, *J. Biol. Chem.* 274 (5) (1999), pp. 2696–2705.

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, Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes, *J. Virol.* 82 (3) (2008), pp. 1271–1283.

Deng W., G. Jin, B.Y. Lin, B.A. Van Tine, T.R. Broker and L.T. Chow, mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication, *J. Virol.* 77 (19) (2003), pp. 10213–10226.

Desterro J.M., J. Thomson and R.T. Hay, Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin, *FEBS Lett.* 417 (3) (1997), pp. 297–300.

Enemark E.J. and L. Joshua-Tor, Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase, *Nature* 442 (7100) (2006), pp. 270–275.

Enemark E.J., A. Stenlund and L. Joshua-Tor, Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex, *EMBO J.* 21 (6) (2002), pp. 1487–1496.

Fradet-Turcotte A., C. Vincent, S. Joubert, P.A. Bullock and J. Archambault, Quantitative analysis of the binding of simian virus 40 large T antigen to DNA, *J. Virol.* 81 (17) (2007), pp. 9162–9174.

Geiss-Friedlander R. and F. Melchior, Concepts in sumoylation: a decade on, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 8 (12) (2007), pp. 947–956.

Gonzalez A., C. Bazaldua-Hernandez, M. West, K. Woytek and V.G. Wilson, Identification of a short, hydrophilic amino acid sequence critical for origin recognition by the bovine papillomavirus E1 protein, *J. Virol.* 74 (1) (2000), pp. 245–253.

C.M. Hebner and L.A. Laimins, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, *Rev. Med. Virol.* 16 (2) (2006), pp. 83–97.

Hickman A.B. and F. Dyda, Binding and unwinding: SF3 viral helicases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (1) (2005), pp. 77–85.

Hilgarth R.S., L.A. Murphy, H.S. Skaggs, D.C. Wilkerson, H. Xing and K.D. Sarge, Regulation and function of SUMO modification, *J. Biol. Chem.* 279 (52) (2004), pp. 53899–53902.

Hochstrasser M., New structural clues to substrate specificity in the “ubiquitin system”, *Mol. Cell* 9 (3) (2002), pp. 453–454.

Howley P.M., Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors, “Fields virology”, third ed. vol. 2, Lippincott-Raven, Philadelphia (1996), pp. 2045–2076.

James J.A., C.R. Escalante, M. Yoon-Robarts, T.A. Edwards, R.M. Linden and A.K. Aggarwal, Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2, *Structure* 11 (8) (2003), pp. 1025–1035.

James J.A., A.K. Aggarwal, R.M. Linden and C.R. Escalante, Structure of adeno-associated virus type 2 Rep40-ADP complex: insight into nucleotide recognition and catalysis by superfamily 3 helicases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (34) (2004), pp. 12455–12460.

Johnson E.S., Protein modification by SUMO, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004), pp. 355–382.

Johnson E.S. and G. Blobel, Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p, *J. Biol. Chem.* 272 (43) (1997), pp. 26799–26802.

Kim K.I., S.H. Baek and C.H. Chung, Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function, *J. Cell Physiol.* 191 (3) (2002), pp. 257–268.

Loo Y.M. and T. Melendy, Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA, *J. Virol.* 78 (4) (2004), pp. 1605–1615.

Masclé X.H., D. Germain-Desprez, P. Huynh, P. Estephan and M. Aubry, Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain, *J. Biol. Chem.* 282 (14) (2007), pp. 10190–10202.

Masterson P.J., M.A. Stanley, A.P. Lewis and M.A. Romanos, 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) (1998), pp. 7407–7419.

Matunis M.J., On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications, *Mol. Cell* 10 (3) (2002), pp. 441–442.

Melchior F. and L. Hengst, SUMO-1 and p53, *Cell Cycle* 1 (4) (2002), pp. 245–249.

Park P., W. Copeland, L. Yang, T. Wang, M.R. Botchan and I.J. Mohr, 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) (1994), pp. 8700–8704.

Pichler A. and F. Melchior, Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport, *Traffic* 3 (6) (2002), pp. 381–387.

Rangasamy D. and V.G. Wilson, Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein, *J. Biol. Chem.* 275 (39) (2000), pp. 30487–30495.

Rangasamy D., K. Woytek, S.A. Khan and V.G. Wilson, SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation, *J. Biol. Chem.* 275 (48) (2000), pp. 37999–38004.

Rosas-Acosta G. and V.G. Wilson, Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein, *Virology* 373 (1) (2008), pp. 149–162.

Sampson D.A., M. Wang and M.J. Matunis, The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification, *J. Biol. Chem.* 276 (24) (2001), pp. 21664–21669.

Schwartz D.C. and M. Hochstrasser, A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers, *Trends Biochem. Sci.* 28 (6) (2003), pp. 321–328.

Schwarz S.E., K. Matuschewski, D. Liakopoulos, M. Scheffner and S. Jentsch, The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (2) (1998), pp. 560–564.

Seeler J.S. and A. Dejean, Nuclear and nuclear functions of SUMO, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 4 (9) (2003), pp. 690–699.

Shah K.V. and P.M. Howley, Papillomaviruses. In: B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors, “Fields virology”, third ed. vol. 2, Lippincott-Raven, Philadelphia (1996), pp. 2077–2109.

Shen T.H., H.K. Lin, P.P. Scaglioni, T.M. Yung and P.P. Pandolfi, The mechanisms of PML-nuclear body formation, *Mol. Cell* 24 (3) (2006), pp. 331–339.

Stubenrauch F. and L.A. Laimins, Human papillomavirus life cycle: active and latent phases, *Semin. Cancer Biol.* 9 (6) (1999), pp. 379–386.

Sun Y., H. Han and D.J. McCance, Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication, *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 7) (1998), pp. 1651–1658.

Sverdrup F. and G. Myers, The E1 proteins. In: G. Myers, C. Baker, K. Münger, F. Sverdrup, A. McBride and H.-U. Bernard, Editors, *Human Papillomavirus 1997, Theoretical Biology and Biophysics*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1997), pp. 37–53 Chapter III.

Titolo S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P.W. White, A. Amin, M.G. Cordingley and J. Archambault, Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin, *J. Virol.* 73 (7) (1999), pp. 5282–5293.

Titolo S., A. Pelletier, A.M. Pulichino, K. Brault, E. Wardrop, P.W. White, M.G. Cordingley and J. Archambault, Identification of domains of the human papillomavirus

type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin, *J. Virol.* 74 (16) (2000), pp. 7349–7361.

Titolo S., K. Brault, J. Majewski, P.W. White and J. Archambault, 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) (2003a), pp. 5178–5191.

Titolo S., E. Welchner, P.W. White and J. Archambault, Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy, *J. Virol.* 77 (9) (2003b), pp. 5512–5518.

Verger A., J. Perdomo and M. Crossley, Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation, *EMBO Rep.* 4 (2) (2003), pp. 137–142.

White P.W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M. Fazekas, M.G. Cordingley and J. Archambault, 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) (2001), pp. 22426–22438.

White P.W., S. Titolo, K. Brault, L. Thauvette, A. Pelletier, E. Welchner, L. Bourgon, L. Doyon, W.W. Ogilvie, C. Yoakim, M.G. Cordingley and J. Archambault, Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists of the E1-E2 protein interaction, *J. Biol. Chem.* 278 (29) (2003), pp. 26765–26772.

Wilson V.G. and D. Rangasamy, Intracellular targeting of proteins by sumoylation, *Exp. Cell Res.* 271 (1) (2001), pp. 57–65.

Wilson V.G., M. West, K. Woytek and D. Rangasamy, Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features, *Virus Genes* 24 (3) (2002), pp. 275–290.

Yasugi T. and P.M. Howley, Identification of the structural and functional human homolog of the yeast ubiquitin conjugating enzyme UBC9, *Nucleic Acids Res.* 24 (11) (1996), pp. 2005–2010.

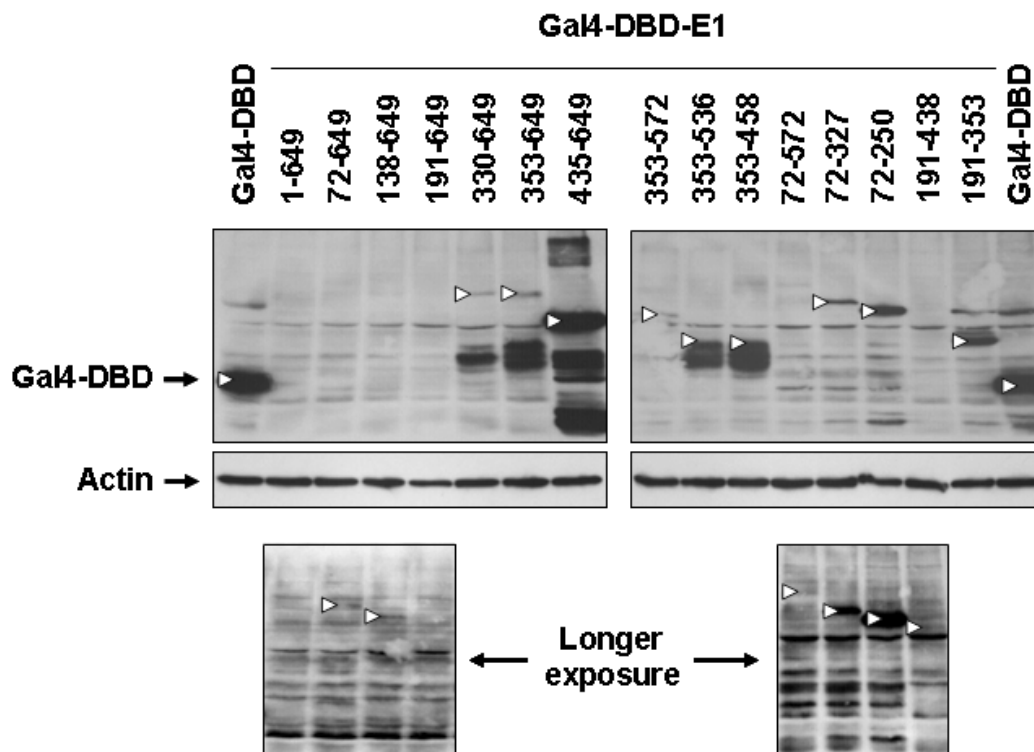
Yasugi T., M. Vidal, H. Sakai, P.M. Howley and J.D. Benson, Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins, *J. Virol.* 71 (8) (1997), pp. 5942–5951.

Yu J.H., B.Y. Lin, W. Deng, T.R. Broker and L.T. Chow, 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) (2007), pp. 5066–5078.

Zhong S., P. Salomoni and P.P. Pandolfi, The transcriptional role of PML and the nuclear body, *Nat. Cell. Biol.* 2 (5), E85-90. (2000).

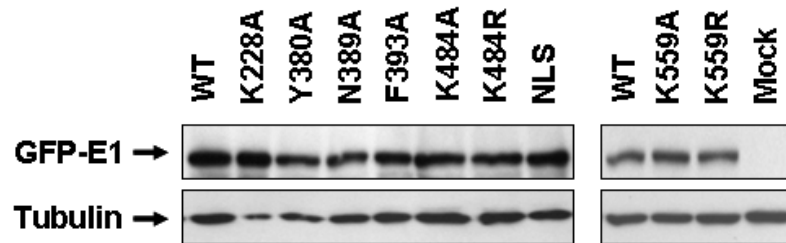
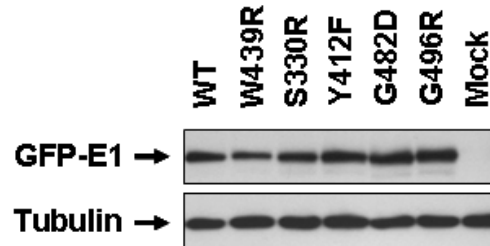
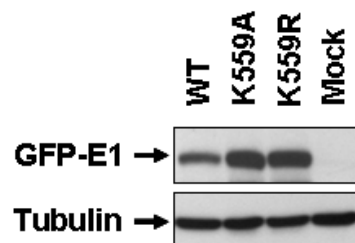
zur Hausen H. and E.M. de Villiers, Human papillomaviruses, *Annu. Rev. Microbiol.* 48 (1994), pp. 427–447.

2.3.8 Supplementary data

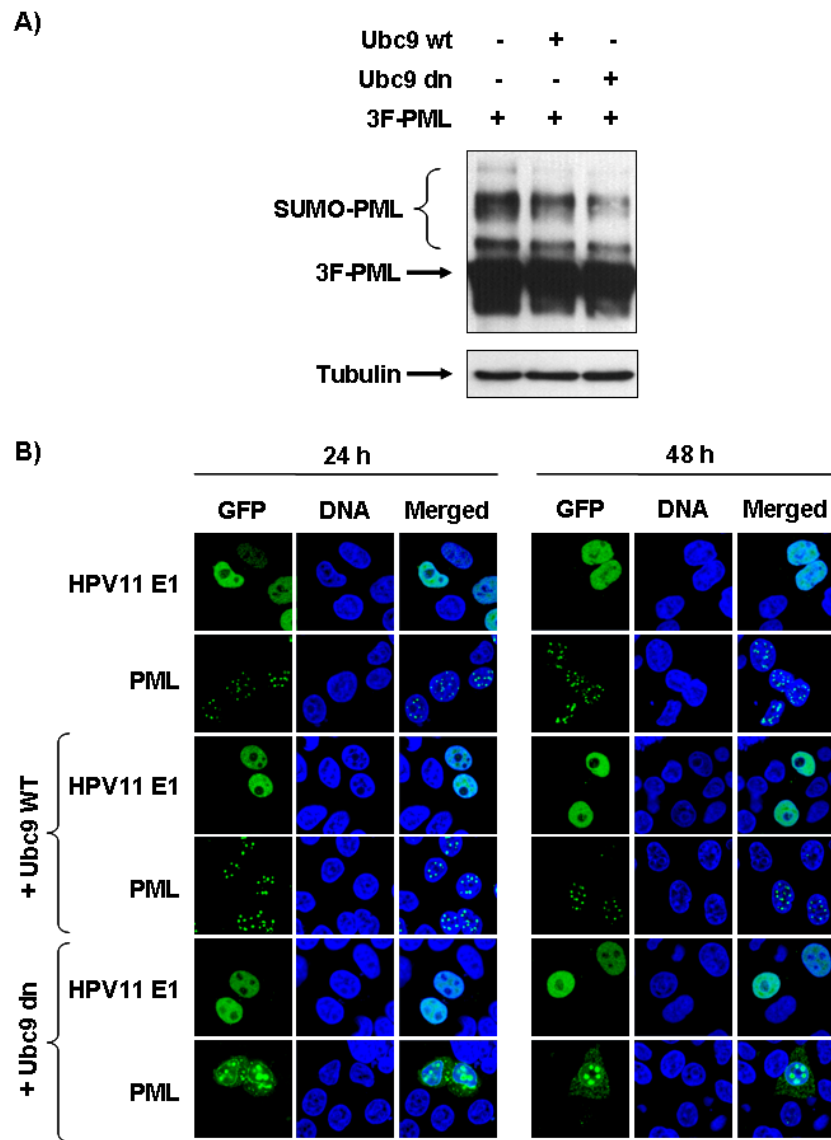


Supplementary Figure 2.1. Expression of Gal4-DBD fusion proteins in yeast.

Western blot analysis of total protein extracts prepared from transformed yeast expressing the indicated Gal4-DBD E1 fusion protein. Gal4-DBD fusion proteins were detected using an anti-Gal4-DBD antibody. β -actin was used as a loading control. The position of each full-length fusion protein is indicated with an open arrow. The bottom two panels represent a longer exposure of the blot to detect the weakly expressed proteins.

A) GFP-HPV11 E1**B) GFP-HPV16 E1****C) GFP-BPV E1****Supplementary Figure 2.2. Expression of GFP fusion proteins used in this study.**

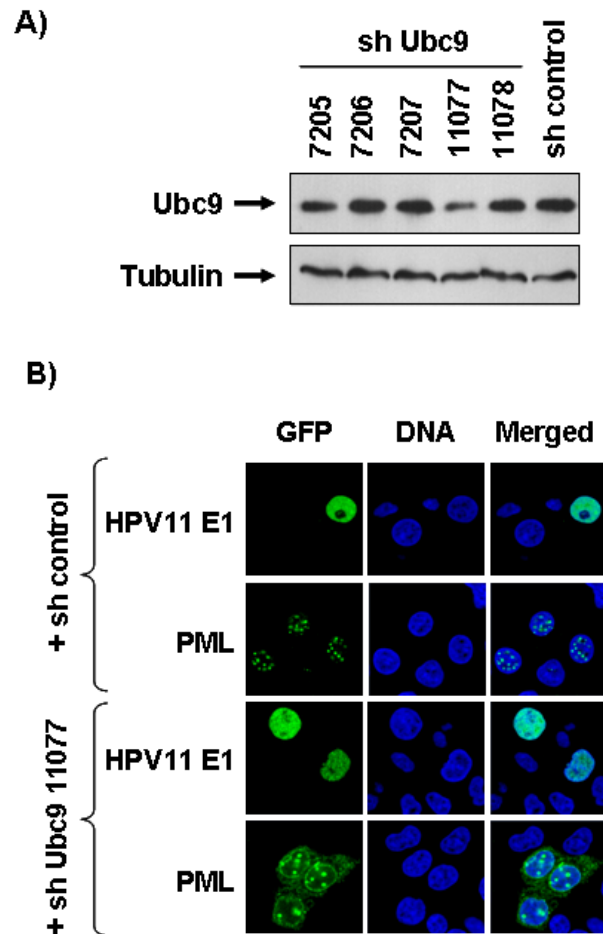
Western blot analysis of total protein extracts prepared from transfected C33A cells expressing GFP-E1 wild type or the indicated mutant protein from (A) HPV11, (B) HPV16, and (C) BPV. E1 proteins were detected using an anti-GFP antibody and tubulin, used as a loading control, was detected using an anti- β -tubulin.



Supplementary Figure 2.3. Effect of a dominant negative Ubc9 on PML sumoylation and intracellular localization in C33A cells.

(A) Sumoylation of PML. C33A cells were transfected with a plasmid encoding a triple Flag-tagged PML (3F-PML) either alone or together with a plasmid encoding a dominant negative (dn) Ubc9 or wild type (WT) Ubc9 as a control. Anti-Flag, anti-tubulin, and anti-Myc immunoblots were performed on whole cell extracts (WCE) 24 h post-

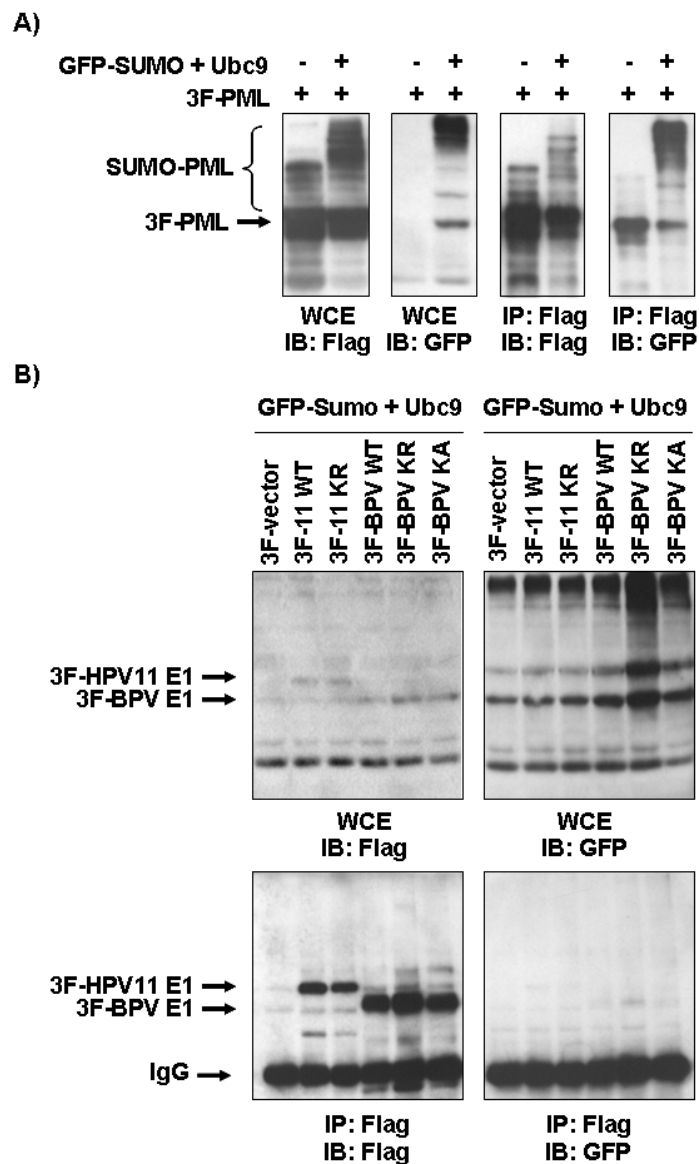
transfection. (B) Intracellular cellular localization of PML. C33A cells transiently expressing GFP-HPV11 E1 or GFP-PML, either alone or together with Ubc9 WT or *dn* were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy 24 and 48 h posttransfection. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.



Supplementary Figure 2.4. Effect of shRNA-mediated depletion of Ubc9 on PML localization in C33A cells.

(A) Depletion of endogenous Ubc9. C33A cells were transfected with plasmids encoding five shRNA against Ubc9 (sh Ubc9) or a control sh RNA (sh control). Anti-Ubc9 and anti-tubulin immunoblots were performed on whole cell extracts (WCE) 96 h post-

transfection. (B) Cellular localization of PML and HPV11 E1. C33A cells transiently expressing GFP-E1 or GFP-PML, with or without *sh* Ubc9 11077 or *sh* control, were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy 96 h post-transfection. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.



Supplementary Figure 2.5. Sumoylation of HPV11 E1, BPV E1 and PML in C33A cells.

(A) *Sumoylation of PML. C33A cells were transfected with plasmids encoding a triple Flag-tagged PML (3F-PML) either alone or together with two other plasmids encoding GFP-SUMO-1 and Ubc9 to stimulate sumoylation. Anti-GFP and anti-Flag immunoblot (IB) analysis were performed on whole cell extracts (WCE) from transfected cells or following immunoprecipitation (IP) of 3F-PML using an anti-Flag antibody.* (B) *Sumoylation of HPV11 and BPV E1. C33A cells were transfected with plasmids encoding triple Flag-tagged HPV11 E1 (3F-11) or BPV E1 (3F-BPV), either wild type or carrying the indicated amino acid substitution, and together with two other plasmids encoding GFP-SUMO-1 and Ubc9. Anti-GFP and anti-Flag immunoblot (IB) analysis were performed on whole cell extracts (WCE) from transfected cells (top panels) or following immunoprecipitation (IP) of E1 using an anti-Flag antibody (lower panels). 11KR: HPV11 E1 K559R, BPV KR: BPV E1 K514R, BPV KA: BPV E1 K514A.*

2.3.8.1 Supplementary materials and methods

In vivo sumoylation assays. $4\text{-}5 \times 10^6$ C33A cells were transfected in 10 cm plates with 3 μg of expression plasmid for wild type or mutant 3F-HPV11 E1 or 3-BPV E1 WT along with 3.5 μg each of two other plasmids expressing Ubc9 and GFP-SUMO-1. Transfected cells were lysed 48 h post-transfection in IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 350 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 20 μM MG132, 10mM NEM, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)), for 45 min. Whole cell extracts were then incubated for 3 hours with 2.5 μg of a mouse monoclonal M2-Flag antibody from Sigma-Aldrich (Cat: F1804) pre-bound onto protein G-sepharose (GE Healthcare). The beads were washed 4 times with IP buffer and the bound proteins analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The plasmid encoding GFP-SUMO-1 has been described previously (Masclé et al., 2007). (Similar results were obtained when 20 mM NEM and 10 mM iodoacetamide were used in the preparation of the WCE (data not shown)).

Chapitre 3 - L'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31 est régulé par Cdk2 et est requis pour le maintien du génom viral

*Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2
phosphorylation and required for viral genome maintenance*

Cet article a été publié en 2010 dans *Journal of Virology*, 84(22):11747-60

3.1 Mise en contexte de l'article

La région N-terminale de la protéine E1 des VPH est essentielle pour la replication de l'ADN viral in vivo. Cette région contient des séquences de localisation et d'export nucléaire (NLS et NES) ainsi qu'un motif de liaison aux cyclines (CBM). Chez les VPH à bas risque, la phosphorylation de trois sérines de la région N-terminale de E1 inhibe son export au cytoplasme. Chez les protéines E1 des VPH à haut risque, seulement deux de ces sérines sont conservées. Ainsi, le premier objectif de cette étude était de déterminer le rôle de ces sérines au cours de l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31. Bien que l'accumulation nucléaire de E1 soit nécessaire à la réplication virale, il a été démontré que l'inhibition de l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 11 n'affecte pas les niveaux de réplication transitoire de l'ADN. Ainsi, le rôle de l'export nucléaire de E1 était toujours inconnu. L'objectif principal de cette étude était donc de déterminer si l'export de la protéine E1 jouait un rôle au cours du cycle viral.

3.2 Contribution des auteurs

À l'exception de la figure 3.7, j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans ce manuscrit. J'ai également construit les génomes mutants qui ont été utilisés dans les expériences réalisées par D^r Moody et j'ai écrit l'article en étroite collaboration avec le D^r Archambault.

D^r Cary A. Moody était à ce moment une stagiaire postdoctorale dans le laboratoire du D^r Laimins. Au cours de cette étude, elle a réalisé les expériences de maintien et de l'amplification du génome dans les kératinocytes primaires immortalisés qui sont présentées à la figure 3.7.

D^r Laimonis A. Laimins a commenté l'article et supervisé l'étude du rôle du NES de E1 dans les kératinocytes faites par D^r Moody dans son laboratoire.

D^r Jacques Archambault a supervisé le projet et a écrit l'article avec moi.

3.3 Texte de l'article

3.3.1 Abstract

The initiator protein E1 from human papillomavirus (HPV) is a helicase essential for replication of the viral genome. E1 contains three functional domains: a C-terminal enzymatic domain that has ATPase/helicase activity, a central DNA-binding domain that recognizes specific sequences in the origin of replication, and a N-terminal region necessary for viral DNA replication in vivo but dispensable in vitro. This N-terminal portion of E1 contains a conserved nuclear export signal (NES) whose function in the viral life cycle remains unclear. In this study, we provide evidence that nuclear export of HPV31 E1 is inhibited by cyclin E/A-Cdk2 phosphorylation of two serines residues, S92 and S106, located near and within the E1 NES, respectively. Using E1 mutant proteins that are confined to the nucleus, we determined that nuclear export of E1 is not essential for transient viral DNA replication but is important for the long-term maintenance of the HPV episome in undifferentiated keratinocytes. The findings that E1 nuclear export is not required for viral DNA replication but needed for genome maintenance over multiple cell divisions raised the possibility that continuous nuclear accumulation of E1 is detrimental to cellular growth. In support of this possibility, we observed that nuclear accumulation of E1 dramatically reduces cellular proliferation by delaying cell cycle progression in S phase. On the basis of these results, we propose that nuclear export of E1 is required, at least in part, to limit accumulation of this viral helicase in the nucleus in order to prevent its detrimental effect on cellular proliferation.

3.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are small double-stranded DNA viruses that infect keratinocytes of the differentiating epithelium of the skin or mucosa (reviewed in references 4 and 63). Of more than 150 different HPV types identified thus far, about 25

infect the anogenital region (9). The low-risk types, such as HPV11 and HPV6, are associated with the development of genital warts, while the high-risk types, such as HPV16, -18, and -31, cause high-grade lesions that can progress to invasive cervical carcinoma (17, 38, 61).

The HPV life cycle is coupled with the differentiation program that keratinocytes undergo in the epithelium. After infection of the basal cell layer of the epithelium, the virus establishes and maintains its genome as an extrachromosomal element (episome) in the nucleus of infected cells. While the viral episome is maintained at low levels in basal cells, its amplification to a high copy number is triggered in the upper layers of the epithelium by the action of the viral oncogenes E6 and E7 and the differentiation of the infected keratinocytes (reviewed in reference 21). Replication of the HPV genome relies on the viral proteins E1 and E2 and the host DNA replication machinery. Viral DNA replication is initiated by the binding of E2 to specific sites on the viral origin where it facilitates the recruitment and assembly of E1 into a double hexamer that is required to unwind DNA ahead of the bidirectional replication fork (3, 14, 15, 31, 33, 36, 43-45, 52, 60). In addition to its helicase activity, E1 interacts with several cellular replication factors, including polymerase α -primase, replication protein A (RPA), and topoisomerase I, to replicate the viral episome (5, 6, 19, 32, 35, 39).

E1, which belongs to helicase superfamily III (SF3) (22, 26), can be divided into three functional regions. Its C-terminal domain has ATPase and helicase activity and can self-assemble into hexamers. It is also this domain that is contacted by E2 to recruit E1 at the origin (50, 57, 58). The middle portion of E1 encompasses the origin-binding domain (OBD) that binds and dimerizes on specific sequences in the origin (55, 56). We and others previously found that a fragment of E1 containing only the C-terminal enzymatic domain and the OBD is capable of supporting viral DNA replication *in vitro* but is inactive *in vivo* (2, 51). This suggested that the N-terminal region of E1 plays an essential regulatory function *in vivo*. As such, it has been shown for HPV11 E1 that this region contains a cyclin E/A-Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) binding motif (CBM), a bipartite nuclear

localization signal (NLS) and an CRM1-dependent nuclear export signal (NES), which together regulate the nucleocytoplasmic shuttling of the protein (10, 30, 34). Specifically, it has been shown that phosphorylation of HPV11 E1 on three serine residues within its N-terminal region inhibits its nuclear export (10, 62). Interestingly, bovine papillomavirus (BPV) E1 was also shown to shuttle between the nucleus and the cytoplasm in a phosphorylation-dependent manner. In this case, however, Cdk2 phosphorylation was found to promote, rather than inhibit, the export of the viral helicase (24). This apparent discrepancy between HPV11 and BPV E1 prompted us to examine the regulation of a third E1 protein, specifically that of the high-risk HPV31.

We report here that HPV31 E1 also shuttles between the nucleus and the cytoplasm through its conserved NLS and NES. We determined that nuclear export of HPV31 E1 is dependent on the CRM1 export pathway and is inhibited by Cdk2 phosphorylation of serines 92 and 106. We also found that nuclear export of E1 is not required for transient viral DNA replication and thus investigated its role in viral genome maintenance and amplification in immortalized keratinocytes. In contrast to the wild type (WT), a mutant genome carrying a defective E1 NES was poorly maintained and progressively lost upon cell division, indicating that nuclear export of E1 is required for long-term maintenance of the viral episome. Because nuclear export of E1 is not required for viral DNA replication per se but needed for episomal maintenance over several cell divisions, we investigated the possibility that continuous accumulation of E1 into the nucleus is detrimental to cellular proliferation. In support of this possibility, we found that the accumulation of E1 at high levels in the nucleus impedes cellular proliferation by delaying cell cycle progression in the S phase. In addition, we found that this delay was alleviated when nuclear export of E1 was increased. Altogether, these results suggest that nuclear export of E1 is required, at least in part, to limit accumulation of this viral helicase in the nucleus in order to prevent its detrimental effect on cellular proliferation.

3.3.3 Materials and methods

Plasmid constructions and mutagenesis. Plasmids expressing dominant-negative (dn) HA-Cdk2, 6xmyc-cyclin E, 6xmyc-cyclin A, and p21-6xhis proteins were kindly provided by Sylvain Meloche (University of Montreal) and were described previously (8, 40). The plasmid used to express EYFP-31E1 was previously described (7). In this plasmid, the splicing site of HPV31 E1 (GCAGGT) was changed to GCTGGC by mutagenesis using the following primer: 5'-GCTGATCCAGCTGGCACAGATGGGGAGGGGACGG-3'. EYFP-31E1 expression plasmids, as well as HPV31 genomes harboring mutation of either the cyclin-binding motif (CBM; R123A, R124A, and L125A), the NLS (K86G and R87G), the nuclear export signal (NES; L109A and I112A), or substitution of the five putative Cdk2 phosphorylation sites to alanine (S92, S106, T169, T316, and T506) or aspartate (S92 and S106) were constructed by site-directed mutagenesis using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details on their construction will be made available upon request.

Cell culture and transfection. The human cervical carcinoma cell line C33A was grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5 IU of penicillin/ml, 50 µg of streptomycin/ml, and 2 mM L-glutamine. Human foreskin keratinocytes (HFKs) were maintained in KGM (Clonetics) or in E medium in the presence of mitomycin C (Boehringer Mannheim)-treated fibroblast feeders. Transfections of C33A cells were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), and HFKs were transfected using the Fugene 6 reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol.

Confocal fluorescence microscopy. Approximately 8×10^5 C33A cells were transfected with 0.5 µg of EYFP-31E1 expression plasmid and grown on coverslips. When indicated, 0.5 µg of 3F-31E2 (WT or E39Q) or 1.0 to 2.0 µg of an expression plasmid for the dominant-negative form of Cdk2 (Cdk2dn) or p21 were cotransfected with EYFP-31E1. At 24 h posttransfection, cells were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with

0.2% Triton X-100. DNA was stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes). Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). When indicated, leptomycin B (LMB [Sigma-Aldrich]; catalog no. L2913) (15 ng/ml) was added to the cells 6 h before fixation. Images were acquired by using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, Canada) and analyzed using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss).

GST fusion proteins and pulldown assays. PCR-amplified E1 fragments encompassing either the OBD alone (amino acids [aa] 191 to 353 for HPV11 and aa 170 to 332 for HPV31) or the OBD together with the N-terminal region of E1 (aa 1 to 353 for HPV11 and aa 1 to 332 for HPV31) were inserted between the BamHI and EcoRI sites of the plasmid AB-401, a modified version of pGEX-4T-1 (GE Healthcare) in which a sequence encoding a hexahistidine tag was inserted downstream of the glutathione S-transferase (GST) coding region. GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) and purified as previously described (46). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Bradford analysis. GST pulldown assays were performed as described previously (7, 46).

Immunoprecipitations. For coimmunoprecipitation studies, approximately 4×10^6 C33A cells were transfected with 3 μg of EYFP-31E1 expression plasmid along with 3 μg of 6xmyc-tagged cyclin E or A expression plasmid in a 100-mm plate. Transfected cells were lysed 48 h posttransfection in coimmunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors [10 μg of antipain, 2 μg of leupeptin, 1 μg of pepstatin, and 2 μg of aprotinin/ml; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 50 mM NaF; and 1 mM orthovanadate (Na_3VO_4)] for 30 min at 4°C. Cleared whole-cell extracts were incubated with 1 μg of anti-GFP antibodies coupled with protein G-Sepharose (GE Healthcare) for 180 min. The beads were washed three times with TBS buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl), and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. For the detection of phosphorylated E1, EYFP-31E1 proteins were immunoprecipitated essentially as described

above with the exception that the transfected cells were lysed 24 h posttransfection in immunoprecipitation buffer (i.e., coimmunoprecipitation buffer supplemented with 10 mM iodoacetamide, 20 mM N-ethylmaleimide [NEM], and 20 μ M MG132) and that the beads were washed with TBS buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (10 μ g of antipain, 2 μ g of leupeptin, 1 μ g of pepstatin, and 2 μ g of aprotinin/ml; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 50 mM NaF; 1 mM orthovanadate [Na_3VO_4], 10 mM iodoacetamide; 20 mM NEM; 20 μ M MG132).

Antibodies and Western blotting. Endogenous Cdk2 and cyclin A were detected using mouse monoclonal antibody from BD Transduction Laboratory (catalog no. 610145) and Lab Vision Corp. (catalog no. Ab-6), respectively. The mouse monoclonal antibody against the myc epitope that was used to detect the 6xmyc-tagged cyclin E and cyclin A proteins was purchased from Santa Cruz (catalog no. sc-40). Green fluorescent protein (GFP) fusion proteins were detected using a mixture of two mouse monoclonal antibodies purchased from Roche (catalog no. 11814460001), while β -tubulin was detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (catalog no. T0426). Phosphorylation of EYFP-31E1 was detected using a mouse monoclonal anti-phospho-serine/threonine-proline (P-Ser/Thr-Pro, MPM-2) from Millipore (catalog no. 05-368). For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and detected using horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse secondary antibody from GE Healthcare (catalog no. NA931) and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Transient HPV DNA replication assay. Transient HPV31 DNA replication was performed as described previously (13) but using EYFP-31E1 instead of Flag-tagged E1 (3F-31E1). Briefly, 5×10^4 C33A cells were transfected with four plasmids encoding, respectively, EYFP-31E1, 3F-31E2, the minimal origin of DNA replication together with a firefly luciferase reporter gene, and Renilla luciferase. Replication of the origin-containing plasmid was quantified by measuring the levels of firefly and Renilla luciferase activities using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega) at 72 h posttransfection. Each E1

mutant was analyzed in duplicates, in two separate experiments. The results are reported as the mean of the four independent values, and error bars represent the standard deviation.

HPV31 genome maintenance and amplification assays. WT and mutant HPV31 genomes (accession no. J04353 [18]) were released from the pBR322 min plasmid by restriction enzyme digestion, followed by unimolecular ligation with T4 DNA ligase (New England Biolabs), as described previously (25). The genomes were then precipitated in 35% isopropyl alcohol and 10% NaCl and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 7.5]). Genomes were cotransfected with pSV2neo vector in HFKs grown to 30% confluence in 10-cm dishes. After 24 h, the transfected cells were treated with trypsin and replated onto tissue culture dishes containing E medium with epidermal growth factor and J2 fibroblast feeder cells. G418 selection was done as previously described (11). Selected HFKs were resuspended in 1.5% methylcellulose-containing E medium (methylcellulose solution was prepared as previously described [11]) to induce differentiation. Fibroblast feeders were removed prior to cell harvesting at 0, 24, and 48 h by a 2-min treatment with phosphate-buffered saline containing 0.5 mM EDTA. After centrifugation and washing, the cells were resuspended in DNA lysis buffer (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10 mM EDTA, 50 μ g of RNase A/ml, and 0.2% SDS), followed by incubation overnight at 37°C with proteinase K (50 μ g/ml). Samples were then passed through an 18-gauge needle 10 times to shear the DNA, which was next extracted by phenol-chloroform, followed by ethanol precipitation. TE-resuspended DNA was finally analyzed by Southern blotting as previously described (54) to detect HPV31 genomic DNA.

Flow cytometry analysis. Approximately 2×10^6 C33A cells were transfected with 3 μ g of the indicated plasmid(s) in 60-mm plates. At 4 h posttransfection, the cells were treated with trypsin and seeded in 60-mm plates at a low density (5×10^5 cells/plate) to promote cell division. After 24 h, the culture medium was changed and replaced with either fresh medium only (asynchronous population) or with fresh medium containing 500 μ M mimosine to synchronize cells in G1/S. When indicated, cells were released from the

mimosine block into fresh medium containing 0.5 μg of nocodazole/ml to block cell cycle progression in G2/M for a period of 24 h. For cell cycle analysis, cells were treated with trypsin, resuspended at a concentration of 10^6 cells/ml, and stained using fresh medium supplemented with 6.3 μg of Hoechst (Sigma catalog no. B2261)/ml and 5 mM of Verapamil (Sigma catalog no. V4629)/ml for 30 min at 37°C. The DNA content of enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)-expressing cells was determined by flow cytometry on a FACS BD LSR flow cytometer using the CellQuest Pro Software (BD). The cell cycle distribution was further analyzed and quantified using the FlowJo (v8.1) and ModFit LT softwares, respectively.

Colony formation assay. Approximately 1.2×10^6 C33A cells were transfected with 1.5 μg of the indicated plasmid in a six-well plate. At 24 h posttransfection, cells were treated with trypsin and seeded onto 100-mm plates in fresh medium supplemented with 500 μg of G418/ml. Antibiotic selection was maintained for a period of approximately 3 weeks. Cells were then fixed for 10 min in cold methanol and stained for 2 min with methylene blue (1% [wt/vol] in 60% MeOH-H₂O).

3.3.4 Results

To study the intracellular localization of HPV31 E1 in transfected cervical carcinoma cells (C33A) by fluorescence confocal microscopy, we fused the EYFP coding sequence at the N terminus of a modified HPV31 E1 open reading frame in which the major donor splicing site was removed by silent mutations, as previously described (7). Removal of this splicing site was necessary to prevent the expression of a truncated EYFP-31E1 fusion protein, as determined by Western blotting (Fig. 3.1A). Using this modified expression vector, we then confirmed by fluorescence confocal microscopy that full-length EYFP-31E1 accumulates almost exclusively in the nucleus of transfected C33A cells (Fig. 3.1B). Finally, we also determined that the presence of the EYFP moiety on E1 did not affect its interaction with E2 and its capacity to replicate viral DNA (see below).

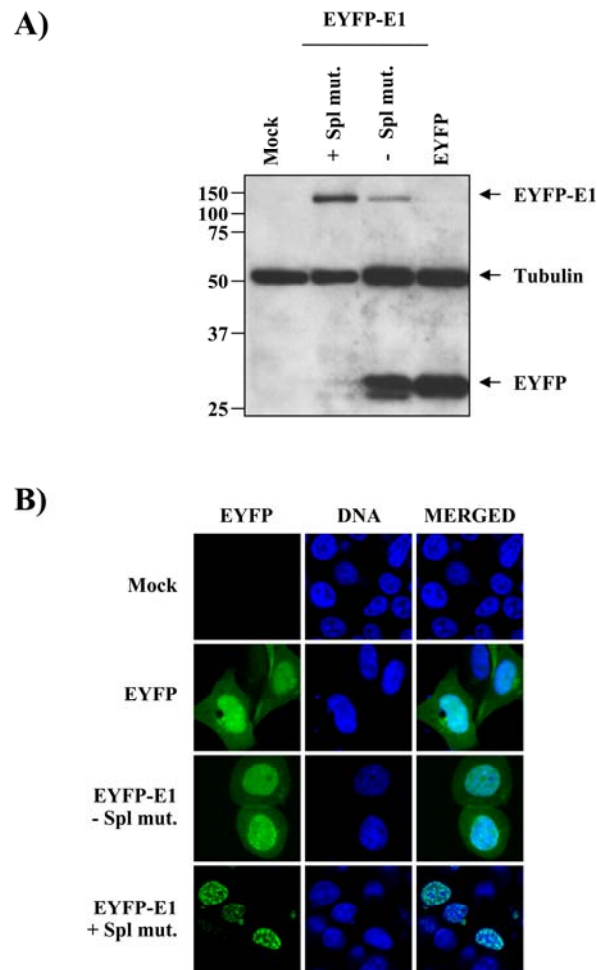


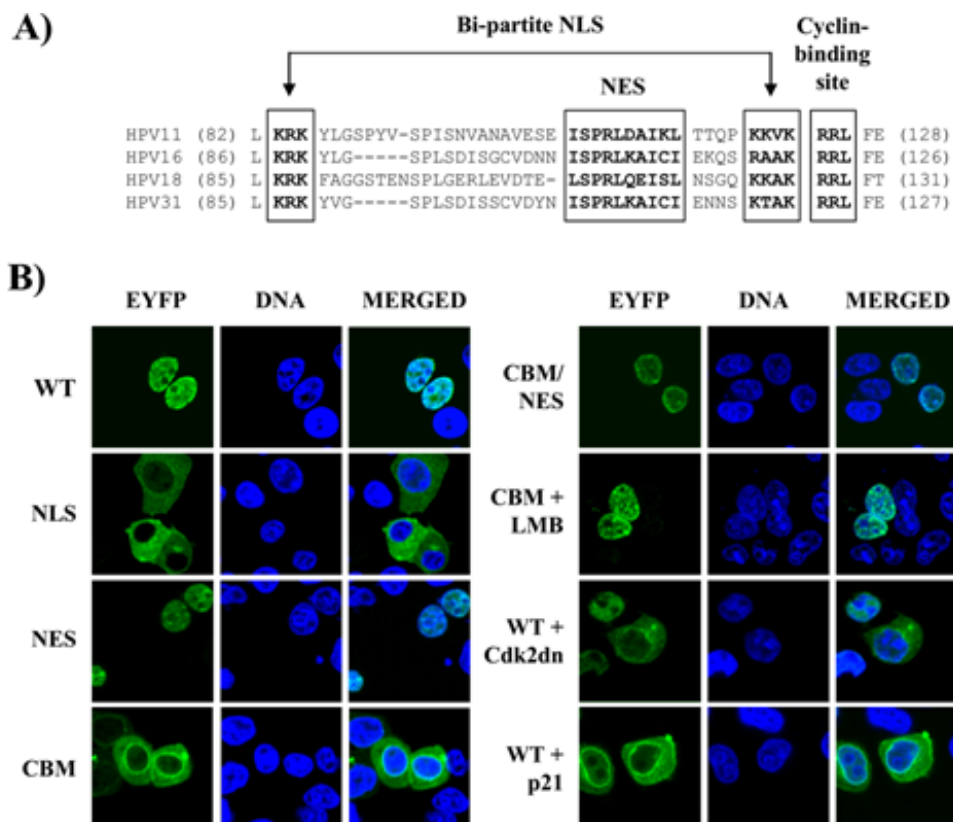
Figure 3.1. Mutation of the major donor splicing site in the HPV31 E1 open reading frame increases expression of full-length EYFP-31E1.

(A) Western blot analysis of C33A cells transfected with an EYFP-31E1 expression vector either containing (+) or lacking (–) the major splicing site mutation (Spl mut.), or transfected with and EYFP expression vector, as a control. E1 proteins were detected using an anti-GFP antibody. Tubulin was used as a loading control. (B) Effect of the major splicing site mutation on the intracellular localization of EYFP-31E1. The indicated EYFP-31E1 expression vectors were transfected in C33A cells. After 24 h, the cells were fixed, mounted, and visualized by fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3.

3.3.4.1 A conserved CBM in HPV31 E1 inhibits its CRM1-dependent nuclear export.

HPV11 E1 has been shown to shuttle between the nucleus and the cytoplasm through a bi-partite NLS and a leucine-rich NES, both of which are highly conserved (Fig. 3.2A). To verify whether these sequences are also mediating the shuttling of HPV31 E1, we mutated them in the context of EYFP-31E1 and examined the localization of the resulting mutant proteins in C33A cells by confocal fluorescence microscopy. As shown in Fig. 3.2B, WT E1 was found almost exclusively in the nucleus of transfected cells. Examination of 300 EYFP-positive cells allowed us to quantify this result (Table 3.1) and determine that E1 was exclusively nuclear (N) in 95% of cells while being located in both the nucleus and the cytoplasm (NC) in the remaining 5%. As expected, mutation of the NLS completely abolished the exclusively nuclear accumulation of E1 (Fig. 3.2B, N = 0%). The E1 NLS mutant was found either all in the cytoplasm (C = 42%) or in both the nucleus and the cytoplasm (NC = 58%). In contrast and as expected, the E1 NES mutant protein was as nuclear as WT E1 (Fig. 3.2B, N = 97%). Because the nuclear export of HPV11 E1 was shown to be inhibited by cyclin E/A-Cdk2 (10), which binds directly to E1 through a conserved RxL CBM (34), we investigated the effect of a CBM mutation on the localization of EYFP-31E1. First, we determined by GST pulldown assay that the N-terminal region of HPV31 E1 is able to interact with Cdk2 as efficiently as that of HPV11 E1 (Fig. 3.2C). Next, we confirmed by coimmunoprecipitation that HPV31 E1 can interact with both cyclin E and cyclin A through its CBM (Fig. 3.2D). We then examined the intracellular localization of the EYFP-31E1 CBM mutant protein and found that a substantial portion of the protein was localized to the cytoplasm (Fig. 3.2B, NC = 89%, C = 7%). Furthermore, we found that this cytoplasmic accumulation could be abrogated by mutation of the NES (CBM/NES double mutant; Fig. 3.2B, N = 95%), suggesting that the cytoplasmic accumulation of the E1 CBM mutant results from its nuclear export. In further support of this suggestion, we found that the cytoplasmic accumulation of the E1 CBM mutant could be prevented by LMB, an inhibitor of the CRM1-dependent nuclear export pathway (12, 16, 29). As a control, we verified by Western blotting that all of the mutant

EYFP-31E1 proteins described above were expressed at comparable levels as WT E1 (Fig. 3.2E). The results presented thus far suggested that the interaction of HPV31 E1 with cyclin E/A-Cdk2 promotes its nuclear accumulation by inhibiting its nuclear export. To determine whether the kinase activity of Cdk2 is required to prevent E1 nuclear export, we tested the effect of a dominant-negative Cdk2 (Cdk2dn) and of the endogenous Cdk2 inhibitor p21 (20). As anticipated, inhibition of Cdk2 activity resulted in the relocalization of EYFP-31E1 from the nucleus to the cytoplasm (Fig. 3.2B and Table 3.1). Collectively, these results demonstrate that HPV31 E1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm using the same regulatory elements (NLS, NES, and CBM) and cellular factors (cyclin E/A-Cdk2 and CRM1) as HPV11 E1.



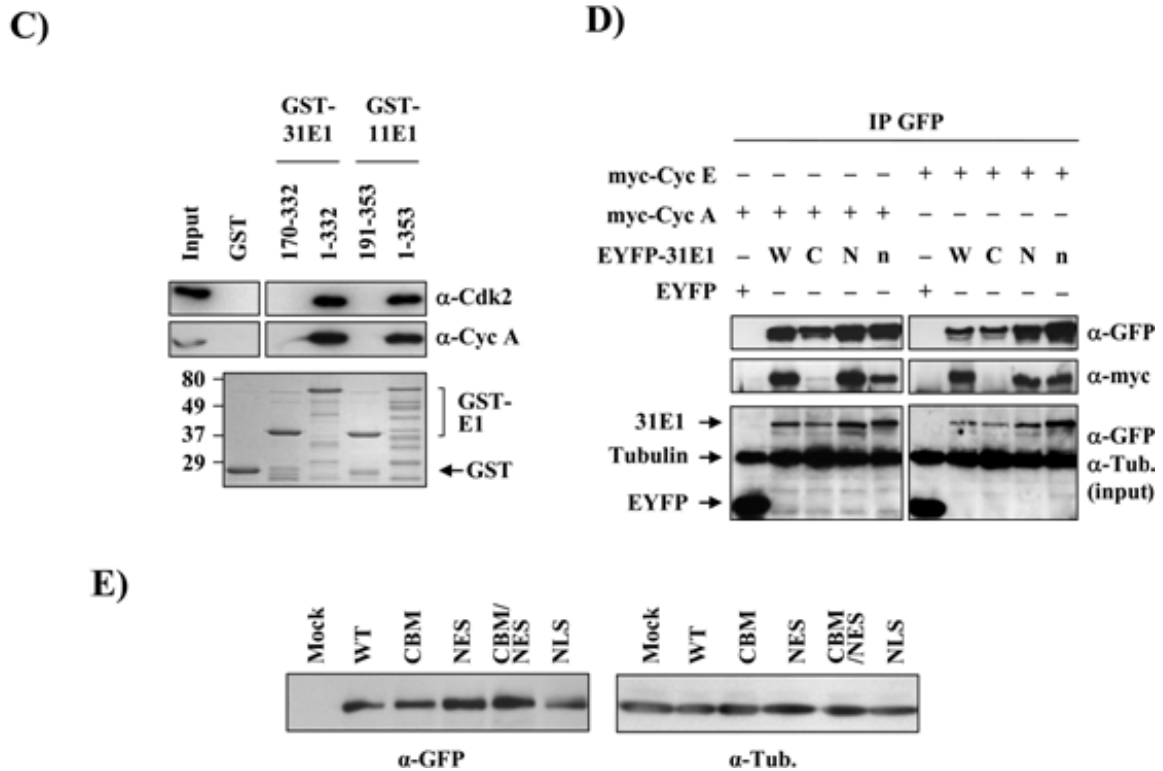


Figure 3.2. Nuclear export of HPV31 E1 is regulated by Cdk2 activity.

(A) Alignment of the N-terminal regions from different papillomavirus E1 encompassing the bipartite nuclear NLS, the NES, and the CBM. (B) Intracellular localization of WT and mutant HPV31 E1. C33A cells transiently expressing the WT or indicated mutant EYFP-31E1 proteins were visualized by fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3. When indicated, cells were also transfected with *Cdk2dn* or *p21* to inhibit Cdk2 activity or were treated with 15 μ g of LMB/ml to inhibit CRM1-dependent nuclear export. Quantification of these results is presented in Table 3.1. (C) Interaction of HPV31 E1 with cyclin A and Cdk2 in vitro. The indicated HPV11 and HPV31 E1 fragments were purified as GST fusion proteins and used in pull-down assays with EcR-293 whole-cell extracts. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-cyclin A (CycA) and anti-Cdk2 antibodies, as indicated. The bottom panel shows a Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel of the purified GST-E1 proteins used in these pull-down assays. The sizes of molecular

weight markers are indicated on the left of the gel. (D) Interaction of HPV31 E1 with cyclin E and A *in vivo* is mediated by the CBM motif. EYFP-31E1 WT (W) or CBM (C), NES (N), or NLS (n) E1 mutants were cotransfected with cyclin E (Cyc E) or cyclin A (Cyc A) fused to a 6xmyc epitope (myc). Coimmunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-GFP and anti-myc antibodies, as indicated. The lower panels show the amount of EYFP proteins expressed in the different whole-cell extracts prior to their immunoprecipitation (input). Tubulin was used as a loading control (α -Tub.). (E) Western blot analysis of total protein extracts prepared from transfected C33A cells expressing either WT or the indicated EYFP-31E1 mutant proteins. Extracts were prepared 24 h posttransfection. E1 proteins were detected by using an anti-GFP antibody (α -GFP), and tubulin was used as a loading control (α -Tub.).

Table 3.1. Intracellular localization of EYFP-31E1 proteins

EYFP-31E1	%N	%NC	%C
WT	95	5	0
NLS	0	58	42
NES	97	3	0
CBM	4	89	7
CBM/NES	95	5	0
CBM + LMB	97	3	0
WT + Cdk2dn	79	18	3
WT + p21	40	52	8
S92A	80	15	5
S106A	87	12	1
T169A	97	3	0
T316A	94	6	0
T506A	97	3	0
S92A/S106A	10	81	9
S92A/S106A + LMB	96	4	0

EYFP-31E1	%N	%NC	%C
AAAAA	11	77	12
SAAAA	90	10	0
ASAAA	81	16	3
AATAA	7	84	9
AAATA	4	86	10
AAAAT	4	91	5
SSAAA	96	4	0
S92D	96	4	0
S106D	94	6	0
S92D/S106D	97	3	0
NES + p21	91	9	0
S92D + p21	75	16	9
S106D + p21	81	18	0
S92D/S106D + p21	90	10	0

^a *The percentages of cells in which EYFP-31E1 proteins accumulate in the nucleus only (N), both the nucleus and the cytoplasm (NC), and the cytoplasm only (C) were calculated from 300 EYFP-expressing cells.*

3.3.4.2 Serines 92 and 106 of HPV31 E1 are essential for its nuclear accumulation.

The results presented above suggested that E1 needs to be phosphorylated by Cdk2 to prevent its nuclear export (i.e., to accumulate in the nucleus). HPV31 contains five putative Cdk2 phosphorylation sites (S/T-P): S92, S106, T169, T316, and T506. To test whether any one of these residues is essential for nuclear accumulation of EYFP-31E1, we mutated them to alanine, either individually or in combination, and determined the intracellular localization of the resulting mutant proteins in C33A cells. We found that two mutants, S92A and S106A, were partially relocalized to the cytoplasm (Fig. 3.3A and Table 3.1). Given that the relocalization of these two single mutants was not as robust as that observed with the CBM mutant (Fig. 3.2B), we constructed a double mutant, S92A/S106A (SSAA), and found that it recapitulated completely the cytoplasmic localization of the CBM mutant (Fig. 3.3A and Table 3.1). Furthermore, cytoplasmic accumulation of the

double mutant was found to be the result of its nuclear export as it was inhibited by LMB. None of the three other putative Cdk2 sites, either alone or in pairs, affected the nuclear accumulation of the protein (Fig. 3.3A and data not shown). To definitively rule out the involvement of these other sites (T169, T316, and T506), we created a mutant protein in which all five Cdk2 sites were mutated simultaneously to alanine (AAAAA). As expected, this quintuple mutant was as cytoplasmic as the CBM or S92A/S106A (SSAA) mutant proteins (Fig. 3.3B and Table 3.1). To determine whether S92 and S106 are sufficient to prevent nuclear export of E1, we reintroduced them in the AAAAA mutant protein, either alone or in combination. Satisfyingly, both single serine mutants (SAAAA and ASAAA) accumulated mainly in the nucleus, and the double serine mutant (SSAAA) fully recapitulated the nuclear accumulation observed with WT E1 (Fig. 3.3B, Table 3.1). We did not observe any significant effect of the aforementioned mutations on the expression of EYFP-31E1 in repeated Western blotting experiments (Fig. 3.3C and data not shown). Collectively, the results presented above indicated that S92 and S106 are the only two putative Cdk2 sites that are necessary and sufficient to prevent nuclear export of HPV31 E1.

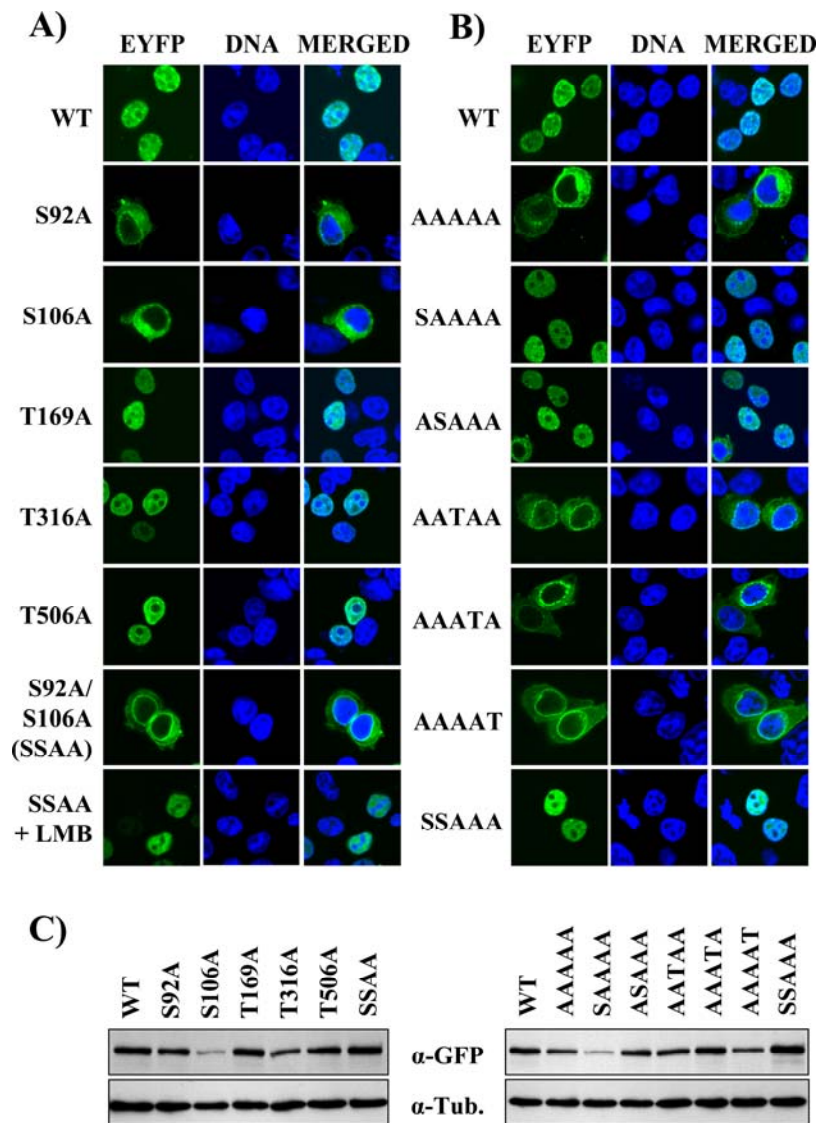


Figure 3.3. Serines 92 and 106 of HPV31 E1 are essential for its nuclear accumulation.

Intracellular localization of EYFP-31E1 proteins in which one, two (A) or several (B) putative Cdk2 phosphorylation sites have been substituted for alanine. AAAAA refers to a HPV31 E1 mutant in which all five putative Cdk2 phosphorylation sites have been substituted for alanine, as described in the text. Where indicated, cells were treated with 15 μ g of LMB/ml to inhibit nuclear export. Quantification of these results is presented in Table 3.1. (C) Western blot analysis of C33A cells expressing WT or the indicated EYFP-31E1

mutant proteins as described in Fig. 3.2E. E1 proteins were detected by using an anti-GFP antibody (-GFP), and tubulin was used as a loading control (-Tub.).

3.3.4.3 Evidence that HPV31 E1 is phosphorylated on serines 92 and 106 by Cdk2.

The results presented above suggest that Cdk2 phosphorylation of E1 on S92 and S106 is required to prevent its nuclear export, although they did not show directly that these two serines are phosphorylated. To determine whether S92 and S96 are indeed phosphorylated by Cdk2 *in vivo*, we immunoprecipitated EYFP-E1 from transfected C33A cells with an anti-GFP antibody and analyzed the precipitate by Western blotting with an anti-phospho-Ser/Thr-Pro antibody. As specificity controls, we used the aforementioned E1 protein in which all five putative Cdk2 sites were mutated to alanine (AAAAA mutant), as well as derivatives in which only S92 (SAAAA), S106 (ASAAA), or both serines (SSAAA) were left intact. Figure 3.4A shows that the immunoprecipitated E1 reacted with the anti-phospho-Ser/Thr-Pro antibody, whereas the quintuple alanine mutant did not, thus indicating that E1 is phosphorylated *in vivo* on one or more of these five sites. Interestingly, we found that E1 was only poorly phosphorylated when only S92 or S106 was present (SAAAA or ASAAA) but phosphorylated near WT levels when both of these serines were present together (SSAAA). These results are in excellent agreement with our finding presented above that both serines are required to efficiently prevent the nuclear export of E1 (Fig. 3.3). To ascertain that the phosphorylation of E1 was due to Cdk2, we performed similar experiments from cells cotransfected with expression vectors for cyclin E and Cdk2 to boost the intracellular levels of this kinase or, conversely, from cells cotransfected with p21 to inhibit Cdk2. As anticipated, we found that the levels of E1 phosphorylation were increased in cells overproducing cyclin E-Cdk2 (Fig. 3.4B) and greatly reduced in cells overproducing p21 (Fig. 3.4C). Overproduction of cyclin E-Cdk2 led to an increase in the phosphorylation of both S92 and S106 individually (SAAAA and ASAAA) (Fig. 3.4B). Significantly, maximal phosphorylation of E1 was achieved when both serines were present together (SSAAA; Fig. 3.4B), similarly to what was observed in the absence of cyclin E-Cdk2 overproduction. Collectively, these results provide strong

evidence that E1 is phosphorylated *in vivo* by Cdk2 on S92 and S106 and that both residues are needed for efficient phosphorylation of E1.

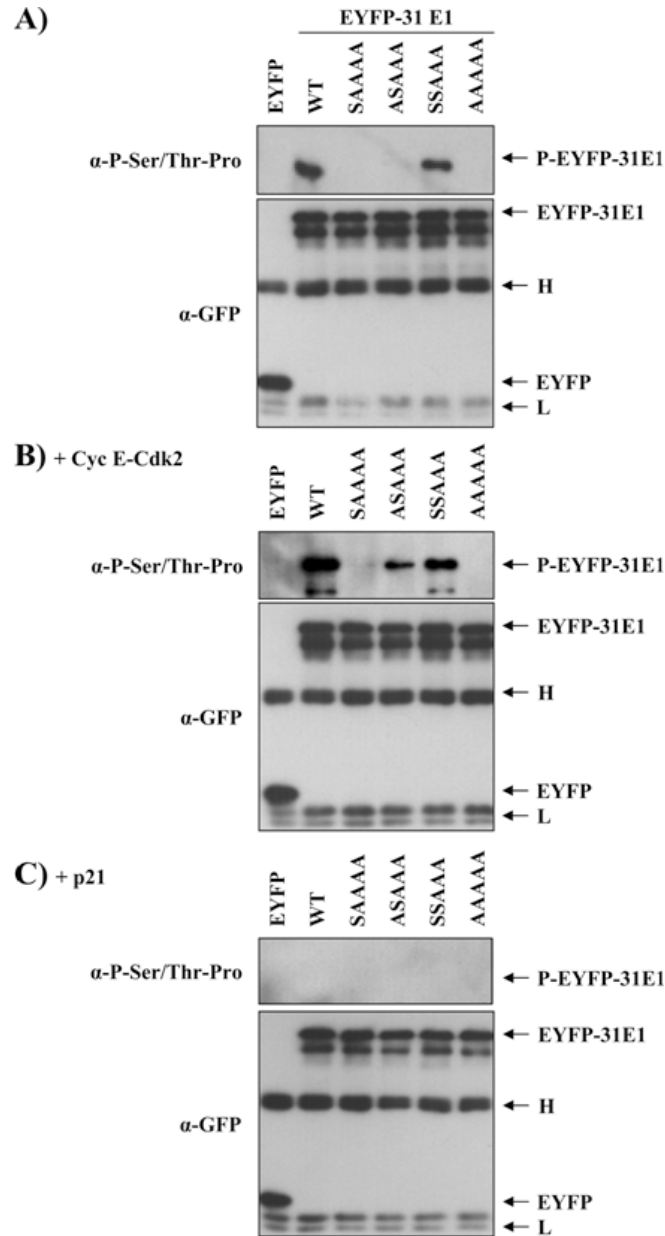


Figure 3.4. Evidence that HPV31 E1 is phosphorylated on serines 92 and 106 by Cdk2.

(A) Western blots of immunoprecipitated EYFP-31E1 fusion proteins, or of EYFP alone as a control, using an anti-phospho-Ser/Thr-Pro antibody (upper panel). Because

these proteins were immunoprecipitated with an anti-GFP antibody, an anti-GFP Western blot was also performed to control for the efficiency of immunoprecipitation (lower panel). WT E1 (WT) or mutant derivatives in which all five putative Cdk2 sites were mutated to alanine (AAAAA) or in which only S92 (SAAAA), S106 (ASAAA), or both serines (SSAAA) were left intact were used. (B and C) Same as in panel A, but using EYFP-31E1 fusion protein immunoprecipitated from C33A cells cotransfected with expression vectors for cyclin E and Cdk2 (B, +Cyc E-Cdk2) or for p21 (C, +p21). The positions of EYFP, EYFP-31E1, and of the anti-GFP antibody heavy (H) and light (L) chains are indicated.

3.3.4.4 Cytoplasmic E1 mutants can be relocalized to the nucleus by E2 and are able to support transient viral DNA replication.

The intracellular localization studies presented above were all performed with E1 alone, in the absence of E2. Because E2 interacts with E1 and is itself a nuclear protein, we investigated whether it could relocalize cytoplasmic E1 mutants to the nucleus. First, we tested the effect of E2 on the localization of the EYFP-31E1 NLS mutant. As shown in Fig. 3.5A, E2 was not only able to relocalize the E1 NLS mutant from the cytoplasm to the nucleus but also promoted its accumulation into discrete nuclear foci similarly to what is observed with WT E1 and E2 (Fig. 3.5A and Table 3.2). E2 has been shown to accumulate in nuclear foci whose function remains unclear, although it has been suggested that they may be precursors to DNA replication foci (53). Regardless of their exact function, E2 was able to recruit E1 to these foci in a manner that was dependent on the interaction between both proteins, as an E2 mutant with a reduced affinity for E1 (E2 E39Q) (1, 13, 42, 47) was unable to relocalize E1 efficiently (Fig. 3.5A). Next, we tested whether E2 was also able to promote the accumulation of different E1 phosphorylation site mutants into nuclear foci. This was indeed the case for all mutants tested, including the one lacking the CBM and those lacking S92 and/or S106 (Fig. 3.5A and Table 3.2).

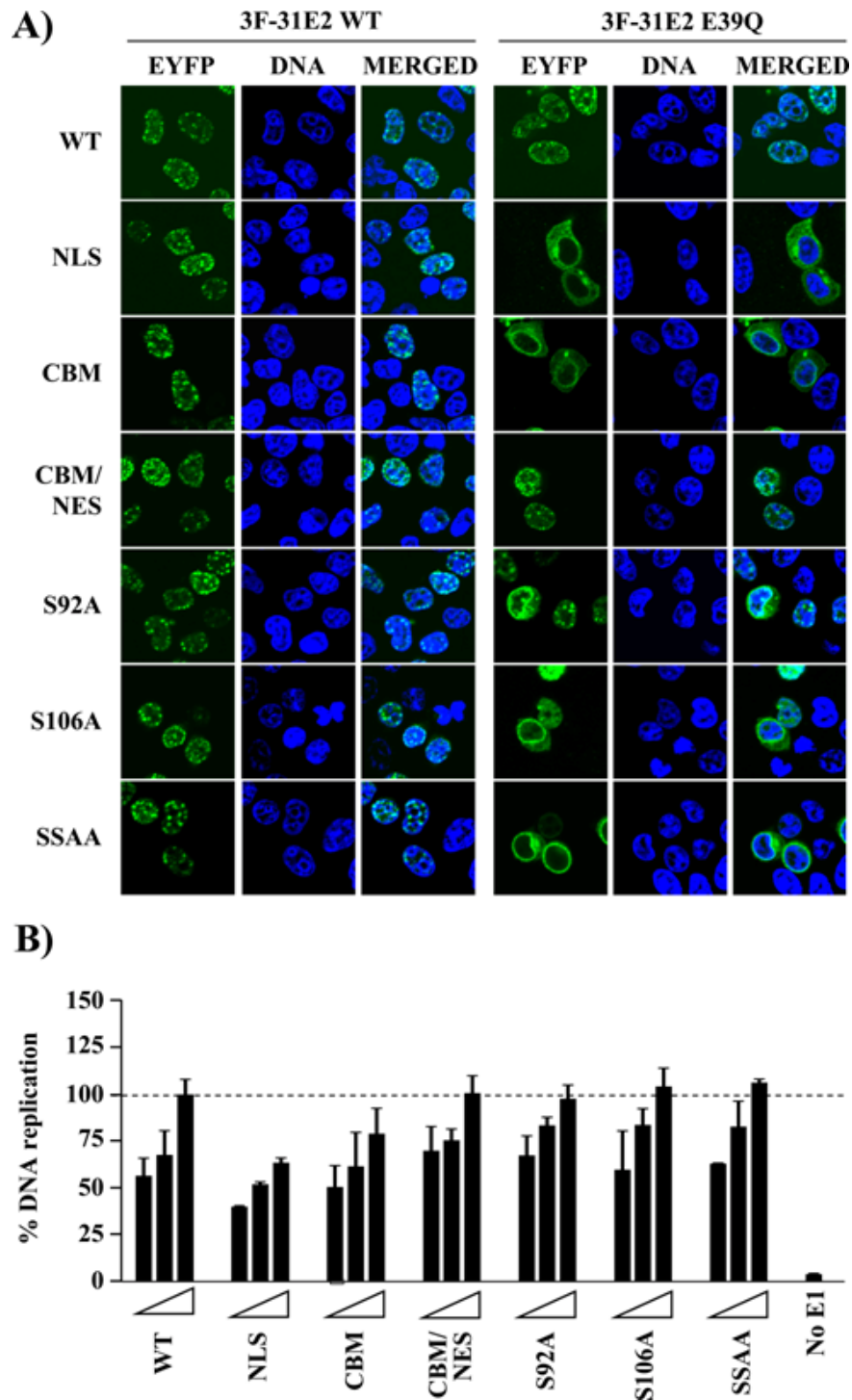


Figure 3.5. Cytoplasmic E1 proteins are relocalized to the nucleus by E2 and are able to support transient viral DNA replication.

(A) Intracellular localization of WT or the indicated mutant EYFP-31E1 proteins coexpressed with either WT (left panel) or E39Q (right panel) HPV31 E2. Quantification of these results is presented in Table 3.2. (B) Transient DNA replication activities of the indicated EYFP-31E1 proteins in C33A cells. DNA replication activities were measured by determining the ratio of firefly (*Fluc*) to *Renilla* (*Rluc*) luciferase activity as described in Materials and Methods. Cells transfected with EYFP only (No E1) were used as a negative control. Replication activities are reported as a percentage of the *Fluc/Rluc* ratio obtained with the highest amount of WT E1 expression vector.

Table 3.2. Intracellular localization of EYFP-31E1 proteins in the presence of WT or E39Q E2

EYFP-31E1	3F-31E2	%N	%NC	%C
WT	WT	98	2	0
	E39Q	91	9	0
NLS	WT	83	16	1
	E39Q	0	39	61
CBM	WT	89	11	0
	E39Q	3	77	20
CBM/NES	WT	94	6	0
	E39Q	89	11	0
S92A	WT	95	5	0
	E39Q	73	25	2
S106A	WT	93	7	0
	E39Q	81	17	2
S92A/S106A	WT	83	17	0
	E39Q	10	78	12

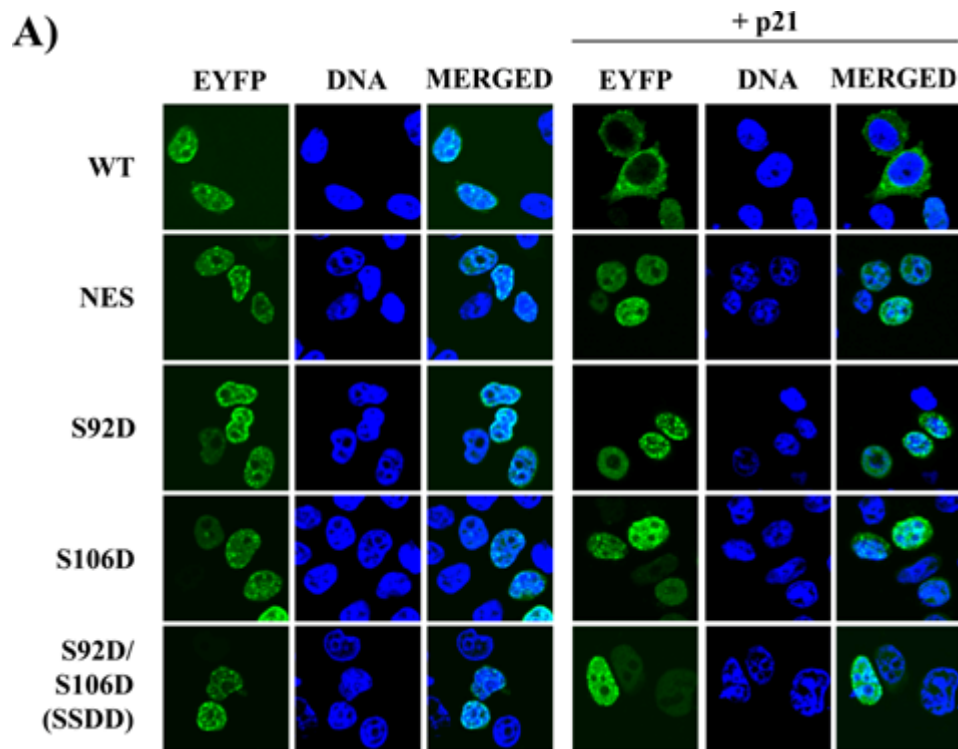
^a The percentages of cells in which EYFP-31E1 proteins accumulate in the nucleus only (N), both the nucleus and the cytoplasm (NC), and the cytoplasm only (C) were calculated from 300 EYFP-expressing cells.

These results prompted us to test whether these E1 mutants could support transient viral DNA replications, using our recently developed HPV31 assay in which replication of an ori-containing plasmid by E1 and E2 results in increased expression of a firefly luciferase gene located in cis of the ori (13). For each E1 mutant, three different amounts of expression plasmid were used, along with a constant amount of E2 and of the origin. A Renilla luciferase plasmid was also cotransfected for normalization, as previously described (13). Under these conditions, the E1 NLS mutant was able to support ca. 70% of the WT level of DNA replication. A similar finding was obtained with the CBM mutant. Interestingly, we found that the addition of the NES mutation in the CBM mutant (to create a CBM/NES double mutant) was sufficient to restore almost WT levels of DNA replication (Fig. 3.5B). This result demonstrated that the CBM, and we surmise the interaction of E1 with cyclin E/A-Cdk2, is not essential for viral DNA replication per se, as long as the E1 CBM mutant is maintained in the nucleus in this case by mutation of its NES. Consistent with the interaction of E1 with cyclin E/A-Cdk2 being dispensable for viral DNA replication, we found that none of the putative Cdk2 site mutants were replication defective, including the S92A/S106A double mutant (SSAA, Fig. 3.5B). Together, these results and those presented in the previous sections indicate that the CBM, S92, and S106 are not essential for viral DNA replication per se but rather are needed to facilitate nuclear accumulation of E1 in the absence of E2. Although the inhibition of E1 nuclear export by cyclin E/A-Cdk2 is not essential for viral DNA replication in transfected cells because E2 can relocalize cytoplasmic E1 to the nucleus, it is likely an important process during a normal infection where the levels of E2 are lower and likely insufficient to counteract the nuclear export of E1.

3.3.4.5 Nuclear export of HPV31 E1 is inhibited by phosphomimetic substitution of S92 and S106 and is dispensable for transient viral DNA replication.

The results presented above suggested that phosphorylation of S92 and S106 is necessary and sufficient to prevent E1 nuclear export. To test this possibility more directly, we investigated whether the substitution of S92 and/or S106 by aspartate, as a

phosphomimetic, in EYFP-31E1 was sufficient to inhibit its nuclear export. We found that all three E1 proteins accumulated in the nucleus to a similar extent as the WT protein (S92D, N = 96%; S106D, N = 94%; SSDD, N = 97%) (Fig. 3.6A and Table 3.1). Presumably, nuclear accumulation of these phosphomimetic E1 mutants is now independent of Cdk2 activity. To verify this hypothesis, we inhibited Cdk2 by transfection of its inhibitor p21, which we showed in Fig. 3.2B promotes the nuclear export of WT E1. As expected, whereas a high proportion of WT E1 was relocalized to the cytoplasm by the action of p21, all three phosphomimetic mutants remained nuclear, similarly to the E1 NES mutant, which was used as a control (Fig. 3.6A and Table 3.1). We also verified by Western blotting that all three phosphomimetic E1 mutants were expressed at similar levels as WT E1 (Fig. 3.6B).



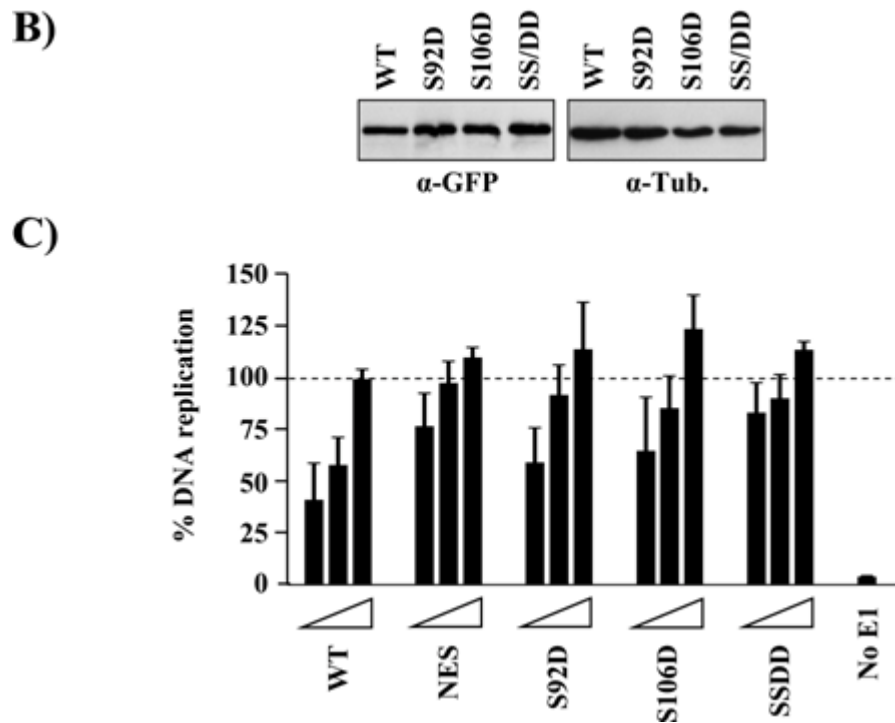


Figure 3.6. Nuclear export of HPV31 E1 is inhibited by phosphomimetic substitution of S92 and S106 and is dispensable for transient viral DNA replication.

(A) Intracellular localization of EYFP-31E1 and of mutant derivatives carrying a mutation in the NES or in which S92 and/or S106 have been changed to an aspartic acid as a phosphomimetic. In the right panel, the same proteins were cotransfected with the Cdk2 inhibitor p21. Quantification of these results is presented in Table 3.1. (B) Western blot analysis of C33A cells expressing WT or the indicated EYFP-31E1 mutant proteins as described in Fig. 3.2E. E1 proteins were detected by using an anti-GFP antibody (-GFP), and tubulin was used as a loading control (-Tub.). (C) Transient DNA replication activities of the indicated EYFP-31E1 proteins in C33A cells. DNA replication activities were measured by determining the ratio of firefly (*Fluc*) to Renilla (*Rluc*) luciferase activity as described in Materials and Methods. Cells transfected with EYFP only (No E1) were used as a negative control. Replication activities are reported as a percentage of the *Fluc/Rluc* ratio obtained with the highest amount of WT E1 expression vector.

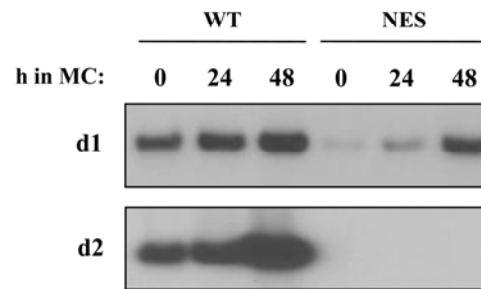
Next, we used these E1 mutants that are confined to the nucleus to test whether nuclear export of E1 is required for transient viral DNA replication. Specifically, we tested the activities of the NES, S92D, S106D, and S92D/S106D E1 mutants in our luciferase DNA replication assay, using three different concentrations of expression vector for each E1 protein. These experiments revealed that all four E1 mutants were as active as the WT protein (Fig. 3.6C). In fact, we consistently observed slightly higher levels of replication with these E1 mutants that are confined to the nucleus. Collectively, the results presented above indicated that phosphomimetic mutations at S92 and S106 are sufficient to prevent export of E1 to the cytoplasm, even in the absence of Cdk2 activity. Furthermore, they showed that transient DNA replication is independent of E1 nuclear export, at least under our assay conditions.

3.3.4.6 Nuclear export of HPV31 E1 is required for viral genome maintenance in HFKs.

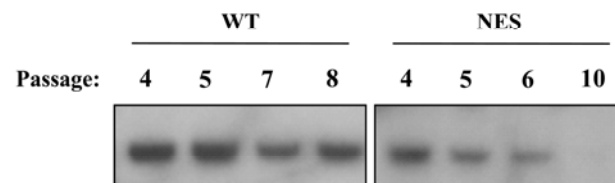
The aforementioned results showed that nuclear export of HPV31 E1 is highly regulated but not required for its DNA replication function per se. This prompted us to investigate whether nuclear export of E1 is required for maintenance and amplification of the viral genome, two important stages of the HPV life cycle that rely on DNA replication. To do this, we used a HPV31 genome carrying the E1 NES mutation, as well as the WT genome as a control, to immortalize primary HFKs, as described previously (59). Southern blotting analysis was then performed to assess whether the NES genome could be maintained in episomal form and, if so, whether it could be amplified upon cellular differentiation (27, 41, 59). We found that in contrast to the WT genome, only low levels of episomes were detected for the NES mutant in HFKs from two independent donors (Fig. 3.7A, compare 0 h in methylcellulose for WT and NES). Interestingly, the low level of mutant episome detected in one of the donors was increased upon cellular differentiation induced by growth of the HFKs in methylcellulose (Fig. 3.7A), indicating that the NES mutant genome could be amplified and thus that the E1 NES mutant helicase is functional. Collectively, these results indicated that the primary defect of the NES genome is a failure

to be properly maintained in episomal form in undifferentiated cells rather than a defect in late functions. We further characterized this phenotype by monitoring the amount of mutant episome over several cell passages. These studies indicated that the NES episome was progressively lost upon cell division, in contrast to the WT, which remained at a constant level throughout the experiment (Fig. 3.7B). To rule out that this maintenance phenotype was due to a nonspecific effect of the NES mutation, we also characterized a genome carrying the E1 SSDD mutation (in which serines 92 and 106 were both substituted by aspartate as phosphomimetics). Similar to what was observed with the NES genome, the E1 SSDD mutant was not maintained efficiently as an episome (Fig. 3.7C). Altogether, the results presented above indicated that nuclear export of E1 is essential for proper maintenance of the episome in undifferentiated cells but not for its amplification upon differentiation.

A)



B)



C)

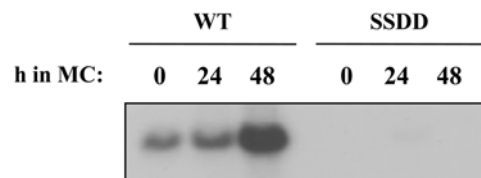


Figure 3.7. Nuclear export of HPV31 E1 is required for genome maintenance in HFKs.

(A) Maintenance and amplification of HPV31 genomes expressing either the WT or NES mutant E1 protein. HFKs immortalized with the WT or the NES genomes were resuspended in methylcellulose (MC) for 24 and 48 h to induce their differentiation. DNA was harvested from undifferentiated (0 h) and from differentiated cells (24 and 48 h). The figure shows the Southern blots used to detect the presence of episomal genomes. Two independent experiments are presented that were performed using HFKs from two different donors (d1 and d2). (B) Southern blots showing the maintenance of the HPV31 WT or NES genome in immortalized HFKs at the indicated number of cell passages. (C) Maintenance and amplification of an HPV31 genome expressing the S92D/S106D (SSDD) E1 mutant in HFKs from donor d2. Experiments were performed as described in panel A.

3.3.4.7 E1 interferes with cell cycle progression.

One possibility to explain the inability of the E1 NES genome to be maintained in episomal form would be that it is poorly replicated and, as a result, lost upon cell division. However, we did not favor this possibility given that we had observed that the E1 NES mutant protein is competent for transient DNA replication (Fig. 3.6C) and for genome amplification (Fig. 3.7A). Instead, we considered the possibility that the NES genome has a deleterious effect on cell proliferation, perhaps caused by sustained or unregulated viral DNA replication, and thus selected against over multiple cell passages. One reason for favoring this possibility was our fortuitous observation that cells undergoing transient HPV DNA replication are altered in their cell cycle progression. Indeed, cell cycle analysis of C33A cells expressing EYFP-31E1 and 3F-31E2 proteins and containing the Ori plasmid (DNA replication conditions) revealed that the proportion of EYFP-expressing cells that are in S phase is increased by ca. 15% compared to mock-transfected EYFP-expressing cells (left panels in Fig. 3.8A, Table 3.3). As would be expected from a defect in cell cycle progression, this increase in S-phase cells was accompanied by a reduction of cells in G1

and G2/M. Similar findings were obtained when these experiments were repeated with the E1 NES mutant protein (Fig. 3.8A).

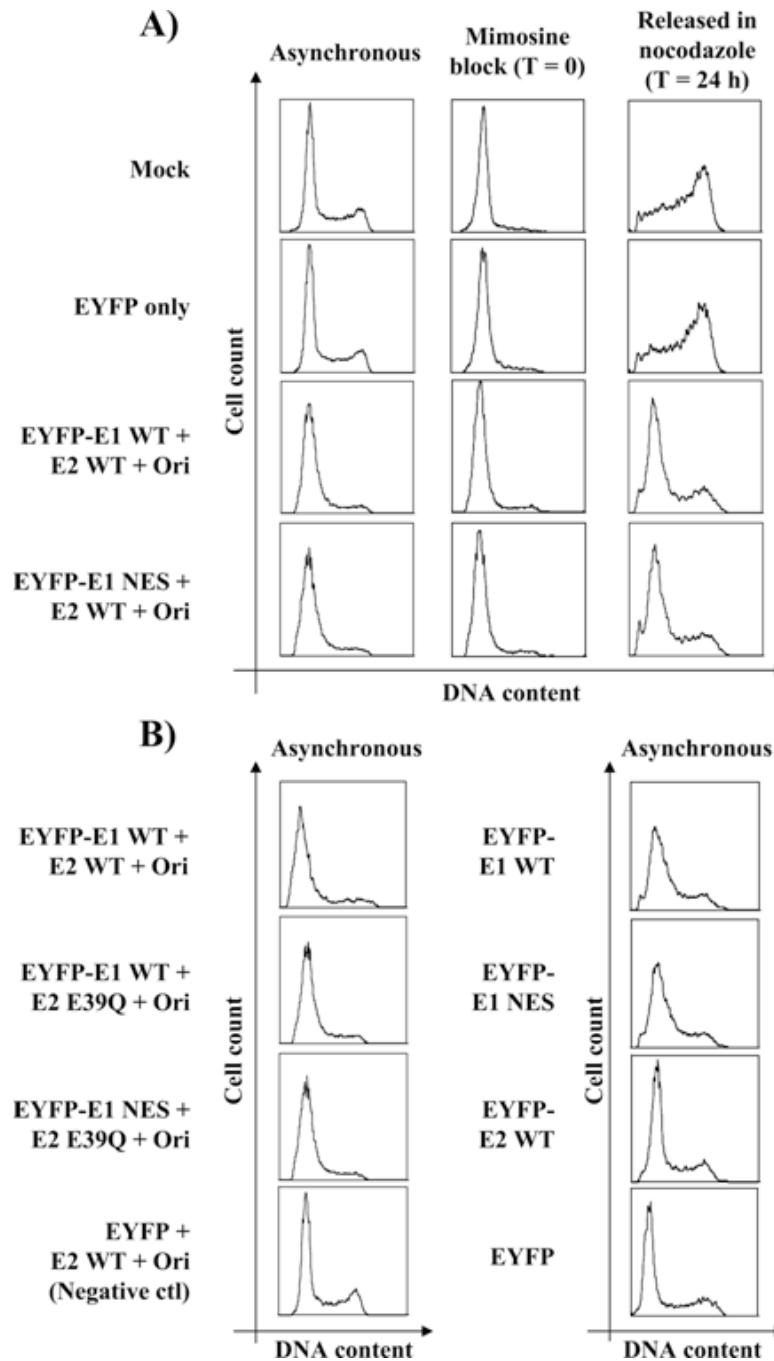


Figure 3.8. HPV31 E1 impairs cell cycle progression in S-phase.

(A and B) C33A cells were transfected with the indicated EYFP-31E1 or EYFP expression vector either alone or together with an expression vector for 3F-31E2 and the ori-containing plasmid. After 48 h, cells were treated with trypsin, and their DNA was stained with Hoechst. The DNA content of EYFP-expressing cells was then analyzed by flow cytometry. For each transfection condition described on the left side of the figure, the cells were either grown asynchronously, synchronized in G1/S with mimosine ($T = 0$) or synchronized with mimosine for 24 h and then released in nocodazole for an additional 24 h ($T = 24$ h), as indicated. The cell cycle distribution of each sample was derived from the analysis of 5,000 EYFP-expressing cells and is represented by a histogram. For the analysis of untransfected cells (Mock), 5,000 Hoechst-positive cells were collected. Quantification of these results is reported in Table 3.3.

To distinguish whether these cells were blocked in S phase or only progressing very slowly through S phase, we synchronized them in G1/S with mimosine and determined their capacity to resume proliferation after removal of the inhibitor. Specifically, we treated cells for 24 h with mimosine, verified that they were efficiently blocked in G1/S (center panels in Fig. 3.8A), and then released them in medium containing nocodazole for an additional 24 h to allow their progression to G2/M (right panels in Fig. 3.8A). This analysis showed that while 80% of the control cells expressing EYFP alone were able to progress beyond the early S phase, only 36% of cells expressing either WT or the NES mutant EYFP-31E1 (together with E2 and the ori) were able to do so (Fig. 3.8A). These results suggested that cells undergoing transient DNA replication are not completely blocked but rather delayed in their progression through early S phase.

Table 3.3. Cell cycle distribution of EYFP-expressing cells

Transfected plasmid(s)	%G0/G1	%S	%G2/M	% out of the G1/early S-phase ^a
Mock*	33	54	13	78
EYFP	30	57	12	80
EYFP-E1 WT + E2 WT + Ori	29	67	5	36
EYFP-E1 NES + E2 WT + Ori	25	71	4	34
EYFP-E1 WT + E2 WT + Ori	24	71	5	-
EYFP-E1 WT + E2 E39Q + Ori	25	71	4	-
EYFP-E1 WT + E2 E39Q + Ori	27	69	4	-
EYFP+ E2 WT + Ori	31	55	13	-
Mock*	38	46	16	-
EYFP	33	56	11	
EYFP-E1 WT	22	70	8	-
EYFP-E1 NES	21	72	7	-
EYFP-E2 WT	38	49	13	-
Mock*	33	54	13	78
EYFP	30	57	12	80
EYFP-E1 WT	17	78	5	45
EYFP-E1 NES	21	75	4	42
EYFP-E1 CBM	20	61	18	72
EYFP-E1 CBM/NES	17	77	5	45
EYFP-E1 NLS	24	63	12	72

^a That is, the percentage of cells that resumed cell cycle progression after their release from a G1/S block with mimosine was quantified by counting the number of cells in mid and late S phase, as well as in the G2/M phase.

^b For mock-transfected cells, a total of 5,000 cells positively stained with Hoechst were counted. Otherwise, 5,000 cells double stained with Hoechst and EYFP were selected.

To probe the mechanism underlying this cell cycle delay, we first tested whether DNA replication itself was responsible for this effect by repeating the experiment with an E2 mutant (E39Q) that does not support DNA replication (13). Cells expressing E2 E39Q (together with EYFP-31E1 and ori) showed an altered cell cycle profile similar to that obtained with WT E2, EYFP-31E1, and ori (Fig. 3.8B), indicating that DNA replication per se is not required for this effect. In contrast, in cells in which EYFP-31E1 was omitted and replaced by EYFP alone, no cell cycle delay was observed (Fig. 3.8B). This pointed to E1 as being responsible for slowing down S-phase progression. Therefore, we tested directly whether E1 alone could cause a cell cycle delay. We observed that EYFP-31E1, either WT or containing the NES mutation, was sufficient to impair cell cycle progression (Fig. 3.8B). This effect was specific to E1 since EYFP-31E2 and EYFP alone had no effect under the same conditions (Fig. 3.8B). Collectively, these results showed that HPV31 E1 impairs cell cycle progression independently of its capacity to interact with E2 or the origin.

3.3.4.8 Nuclear export of E1 alleviates its detrimental effect on S-phase progression.

The finding that expression of E1 impairs cell cycle progression (Fig. 3.8B) prompted us to investigate whether nuclear export of E1 could attenuate this phenotype. Specifically, we investigated the effect of different E1 mutants on the cell cycle distribution of asynchronous cells (left panels in Fig. 3.9A) and, more importantly, on the ability of these E1-expressing cells to progress beyond early S phase following synchronization with mimosine and release in nocodazole-containing medium, as described above (right panels in Fig. 3.9A). Under these conditions, 45% of the cells expressing WT EYFP-31E1 were able to progress to G2/M, whereas 80% of cells expressing EYFP alone were able to do so (Table 3.3). As expected, similar results were obtained with the E1 NES mutant protein that is confined to the nucleus (Fig. 3.9A). Next, we tested the effect of the E1 CBM mutant protein that is constitutively exported to the cytoplasm and found that it had little to no effect on S-phase progression (Fig. 3.9A). Thus, nuclear export of E1 prevents its deleterious on cell cycle progression. As expected, mutation of the NES in the context of the E1 CBM mutant to prevent its nuclear export (CBM/NES double mutant) recapitulated

the S-phase delay observed with the WT or NES proteins. These findings indicate that nuclear accumulation of E1 is responsible for delaying cell cycle progression and, conversely, that nuclear export of E1 alleviates this effect. Consistent with the need for E1 to accumulate in the nucleus to impair cell cycle progression, we found that an E1 mutant defective for nuclear entry (NLS mutant, Fig. 3.2B and Table 3.1) does not interfere with cell cycle progression (Fig. 3.9A and Table 3.3).

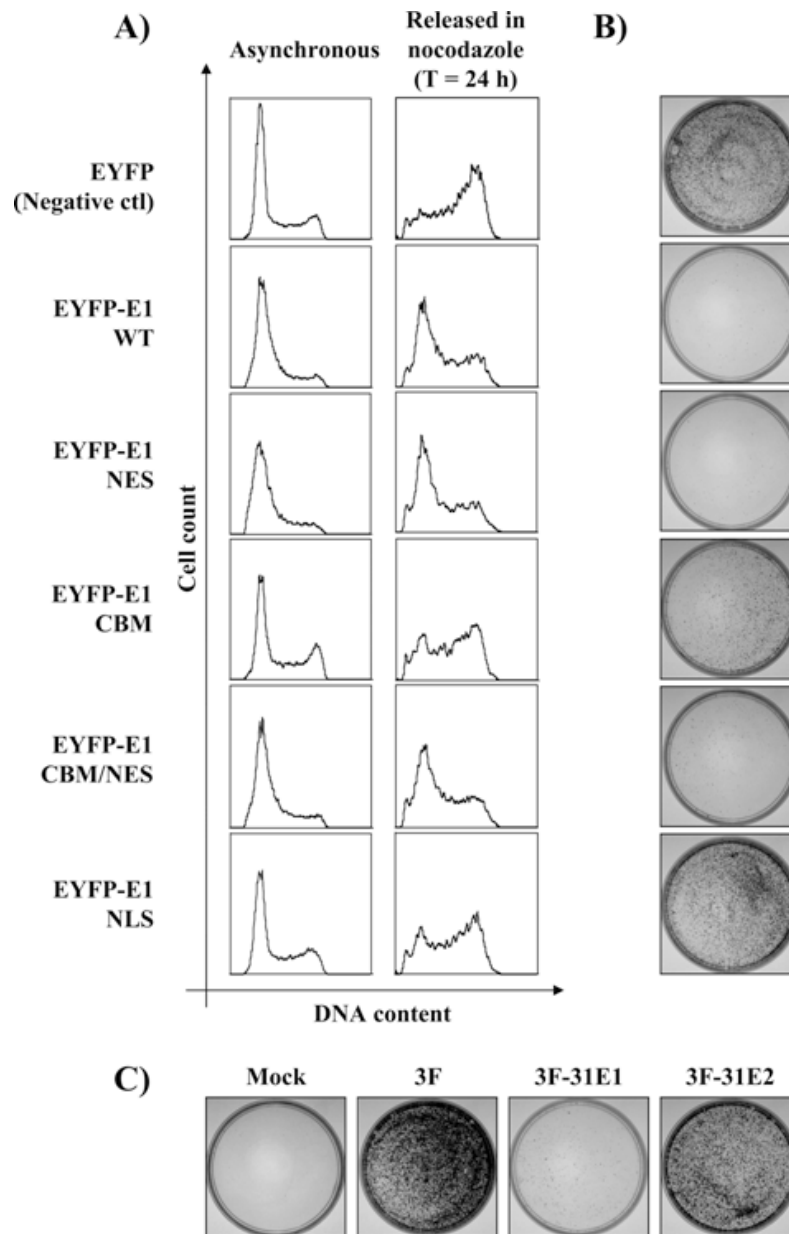


Figure 3.9. Nuclear export of E1 alleviates its detrimental effect on S-phase progression.

(A) Cell cycle distribution. C33A cells were transfected with the indicated EYFP-31E1, prepared, and analyzed as described in Fig. 3.8. The histograms show that nuclear E1, but not cytoplasmic E1, delays S phase. Quantification of these results is reported in Table 3.3. (B) Colony formation assays (CFA). CFAs were performed with C33A cells transfected with the indicated EYFP-31E1 proteins (expressed from a neomycin-resistant plasmid). After a 3-week selection in G418, the colonies were stained with methylene blue. The results indicate that nuclear but not cytoplasmic E1 impairs colony formation. (C) Cells were transfected with an expression vector for Flag-tagged HPV31 E1 (3F-31E1) and colony formation assayed as described in panel B. An expression vector for Flag-tagged HPV31 E2 (3F-31E2) and the empty vector expressing the three-Flag epitope (3F) alone were used as controls.

To substantiate the cell cycle results presented above, we investigated the impact of E1 on cellular proliferation by using a colony formation assay (CFA). In these experiments, C33A cells were transfected with different EYFP-31E1 expression vectors (neomycin resistance), selected in G418-containing medium for 3 weeks, and the number of drug-resistant colonies was then visualized by methylene blue staining. As can be seen in Fig. 3.9B, we found that E1 proteins that accumulate in the nucleus (WT, NES, and CBM/NES) drastically reduced colony formation. In contrast, E1 mutants that accumulate predominantly in the cytoplasm (CBM, NLS) had little to no effect (Fig. 3.9B). Finally, we ruled out any possible effect of the EYFP moiety on cellular progression by confirming the capacity of 3F-31E1, but not of 3F-31E2, to inhibit colony formation in CFA (Fig. 3.9C).

Altogether, the results presented above indicate that accumulation of E1 in the nucleus, but not in the cytoplasm, impairs cellular proliferation by specifically delaying S-phase progression. Continuous interference with cell cycle progression may therefore explain why the E1 NES mutant protein is unable to maintain the viral episome through many cell divisions (Fig. 3.7).

3.3.5 Discussion

In this study, we have demonstrated that HPV31 E1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm using an NLS and an NES. We have also provided evidence that E1 interacts with cyclin E/A-Cdk2, through a conserved CBM, and that its phosphorylation on serines 92 and S106 inhibits its CRM1-dependent nuclear export. We then addressed the biological significance of this nuclear export process in the HPV life cycle and found that it is not needed for transient DNA replication but is important for the long-term maintenance of the viral episome in undifferentiated keratinocytes. The latter could be explained by the observation that unregulated nuclear accumulation of E1 impedes cellular proliferation by imposing an S-phase delay and that this deleterious effect is reversed by the export of E1 out of the nucleus.

A previous study has shown that nuclear export of the low-risk HPV11 E1 is inhibited by Cdk2 phosphorylation of three serine residues (S89, S93, and S107) (10). In the present study, we found that export of HPV31 E1 is regulated by phosphorylation of S92 and S106, analogous to S93 and S107 in HPV11. Thus, HPV31 E1 is regulated in a similar manner as HPV11 E1 but differently than BPV E1 whose export is enhanced, rather than prevented, by phosphorylation. Although the nuclear export of HPV31 and HPV11 are regulated similarly, we did notice some differences. Whereas mutation of any of the three serines in HPV11 E1 to alanine is sufficient to relocalize more than 60% of the protein to the cytoplasm (10), both S92 and S106 of HPV31 E1 must be mutated simultaneously to achieve an equivalent level of export. This suggests that HPV11 E1 must be phosphorylated on all three serines in order to be completely retained in the nucleus, whereas phosphorylation of only two sites is needed for HPV31 E1. Interestingly, an alignment of 13 E1 proteins from different papillomavirus types indicates that the low-risk E1s contain three putative Cdk2 sites, analogous to S89, S93, and S107 in HPV11 E1, whereas the high-risk proteins contain only two (Fig. 3.10). Of these three N-terminal serines, S107 (in HPV11, S106 in HPV31) is the most highly conserved among all HPV types and the only one located directly in the NES, a fact that likely underlies its high degree of conservation.

High-risk E1s appear to use S93 (S92 in HPV31) as their second Cdk2 sites. The reason why phosphorylation of S107, within the NES, is not sufficient to completely prevent E1 nuclear export and, conversely, why one or two additional Cdk2 sites are needed remains to be elucidated. In this respect, it is noteworthy that phosphorylation of HPV11 E1 on S89 and S93 by mitogen-activated protein kinases was reported to promote its import into the nucleus (62). Given that nuclear accumulation of E1 is deleterious to cell cycle progression, as shown here, it is not surprising that this process is highly regulated by more than one kinase. Finally, it is worth mentioning that the N-terminal sequence of BPV1 E1 does not appear to contain a NES motif in this region, a finding consistent with the observation that its nucleocytoplasmic shuttling is regulated differently than that of HPV11 and HPV31 E1 (10, 24; the present study).

						NES			CBM					
High-risk	HPV31	(85)	LKRKYVG	--	---	SP	LSDISS-CVDYN	I	SP	RLKAICI	ENNSKTAK	RRL	FE	(127)
	HPV16	(86)	LKRKYL	--	---	SP	LSDISS-CVDNN	I	SP	RLKAICI	EKQSRAAK	RRL	FE	(126)
	HPV18	(85)	LKRKFAG	GS	TEN	SP	LGERLE--VDTE	L	SP	RLQEISL	NSGQKKAK	RRL	FT	(131)
	HPV45	(85)	LKRKFAG	GS	KEN	SP	LGEQLS--VETD	L	SP	RLQEISL	NSGHKKAK	RRL	FT	(131)
	HPV97	(85)	LKRKYGT	ES	KEN	SP	LGEQP--GVDTD	L	SP	RLQEISL	NSGQKKAK	RRL	FQ	(131)
	HPV35	(85)	LKRKYAS	--	---	SP	LSSVSL-CVNNN	I	SP	RLKAICI	ENKNTAAK	RRL	FE	(127)
	HPV85	(85)	LKRKYGA	HS	TEN	SP	CRDTAS-IHNSL	S	SP	-LQEISL	NSYNNNAK	RRL	CS	(132)
Low-risk	HPV6	(82)	LKRKYL	SP	YV-	SP	INTIAEA-VESE	I	SP	RLDAIKL	TRQPKKVK	RRL	FQ	(128)
	HPV11	(82)	LKRKYL	SP	YV-	SP	ISNVANA-VESE	I	SP	RLDAIKL	TTQPKKVK	RRL	FE	(128)
	HPV42	(117)	LKRKLLG	SP	YE-	SP	VSDSQHS-IDNE	L	SP	RLGLITL	CRGSQGAK	RRL	FQ	(163)
	HPV43	(86)	LKRKYM-	SP	YV-	SP	IHCLQES-VDRD	L	SP	RLHAIKI	GGG-QKAK	RRL	FH	(130)
	HPV44	(80)	LKRKYL	SP	YV-	SP	LSNIEQA-VECD	I	SP	RLDAITL	SRQPKKVK	RRL	FD	(126)
	BPV1	(83)	LKRKVLG	SS	-QN	SG	-SEASE-----		TP	-----	KRRKSGAK	RRL	LF	(117)

Figure 3.10. Sequence alignment of the E1 N-terminal regions from different HPV types.

The conserved Cdk2-phosphorylation sites are highlighted in black. The NES and CBM are boxed. The amino acid number of the first and last amino acid in each sequence is given in parentheses.

Another significant difference between HPV11 and HPV31 E1 is the fact S107 in HPV11 E1 is required for viral DNA replication (10), whereas the analogous residue in HPV31 E1, S106, is not (the present study). Indeed, whereas mutation of S107 to alanine was reported to decrease the ability of HPV11 E1 to support transient DNA replication by

>75%, even when the protein was confined to the nucleus by mutation of its NES, we have found here that the S106A mutation in HPV31 E1 has little to no effect on its replication activity either in absence or presence of an NES mutation (Fig. 3.5B and data not shown). We cannot rule out that this difference is cell type specific, since the HPV11 E1 study was performed in COS7 cells, whereas ours made use of C33A cells. Regardless of the precise explanation, the findings discussed above indicate that the main role of the N-terminal phosphorylation of E1 by Cdk2 is to regulate its nuclear export, although it may also have additional functions for the low-risk HPV types.

A main finding of the present study is that inhibition of E1 nuclear export is detrimental to the long-term maintenance of the HPV31 episome in undifferentiated keratinocytes (Fig. 3.7B), although it is not per se deleterious to viral DNA replication in transient assays (Fig. 3.6C) or amplification of the genome upon cellular differentiation (Fig. 3.7A). Thus, although E1 clearly needs to accumulate in the nucleus to support viral DNA replication, its accumulation in high amounts and/or in the wrong phase of the cell cycle appears to be deleterious to cell growth. We are currently trying to generate a high-affinity antiserum against HPV31 E1 to test this hypothesis more directly in immortalized HFKs. There is, however, one study in the literature that is consistent with high levels of E1 being deleterious to genome maintenance, as a result, we would surmise, of an effect on cell proliferation. The study investigated the effect of knocking-out expression of the E8^{E2C} transcriptional repressor on maintenance of the HPV31 genome in immortalized HFKs (48). E8^{E2C} represses the transcription of E1 and E2, in addition to that of E6 and E7 (reviewed in reference 49) and a mutation that prevents its synthesis was found to increase replication of the viral genome and its copy number in HFKs at early cell passages but to result in loss of the episome at later passages (48). This phenotype of the E8^{E2C} knockout is reminiscent of that imposed by the E1 NES mutation, and we would hypothesize results, at least in part, from overexpression of E1 and the ensuing deleterious effect on cell proliferation (48). Thus, we would speculate that while the E8^{E2C} mutation increases the nuclear levels of E1 through a general overexpression of the protein, the E1

NES mutation does so by preventing its export to the cytoplasm. In both cases, it would be the overaccumulation of E1 in the nucleus that would be deleterious.

Regulating the amount of E1 in the nucleus may be needed not only to prevent its deleterious effect on cell proliferation but also to control the copy number of the episome. Two different models of viral DNA replication have been proposed to occur during the HPV life cycle, the "random" model and the "ordered" model (23). In the random model, replication of the viral genome is uncoupled from that of cellular DNA and independent of cell cycle progression, such that multiple rounds of viral DNA replication are possible within one cell cycle. It has been suggested that random replication is used by the virus to establish its genome in 50 to 100 copies upon infection of basal cells, as well as to amplify the viral episome in the upper, more differentiated layers of the epithelium. In contrast, in the ordered model, viral DNA replication is synchronized with that of cellular DNA and thus happens only once per cell cycle (23). This mode of replication would be responsible for the stable maintenance of the viral episome, at a fixed copy number, in undifferentiated keratinocytes. Interestingly, it has been shown that overexpression of E1 in W12 cells, which stably maintain the HPV16 genome in episomal form, promotes a switch from ordered to random viral DNA replication (23). When considered in the context of these models, our results would be consistent with the NES mutation promoting a switch from ordered to random replication by increasing nuclear accumulation of E1. By extension, our results would also suggest that Cdk2 regulation of E1 nuclear export plays a key role in maintaining an ordered mode of replication. In this regard, one could speculate that the increased Cdk2 activity brought about by E7 in differentiated keratinocytes (28) would facilitate genome amplification by promoting nuclear retention of E1 and the switch from ordered to random replication. Further experiments are required to test this possibility.

In the present study, we discovered that increasing the accumulation of E1 in the nucleus, either by overproduction of the WT protein and/or by preventing its nuclear export with an NES mutation (or SSDD mutation), induces a delay during the early S phase of the cell cycle (Fig. 3.9 and data not shown). This delay also occurs in cells expressing E1, E2,

and the origin and undergoing transient DNA replication, suggesting that it may actually favor replication of the viral genome. Delaying S phase may be a prerequisite for random replication to occur or, stated otherwise, to achieve multiple rounds of replication per cell cycle. Although we do not yet know the exact mechanism by which E1 exerts this S-phase delay, our preliminary results indicate E1 mutants that are replication defective do not impair cell cycle progression (data not shown). One may therefore speculate that enzymatically active E1 could delay S phase by titrating replication factors that are essential for cellular DNA synthesis and/or by assembling on host (i.e., nonviral) DNA and triggering an intra-S DNA damage response. The latter suggestion is particularly intriguing in light of recent results indicating that the activation of the ATM DNA damage pathway is required for viral genome amplification (37).

In summary, our results and those of others support a model whereby nuclear export of E1 is required to synchronize the replication of the viral genome with that of the host cell DNA (i.e., ordered replication) in order to allow the long-term maintenance of the viral genome in undifferentiated keratinocytes. The present study also shed light on a potential new function of E1 that is to delay the progression of the host cell cycle during S phase, a function that may contribute to the switch from an ordered to a random replication mode needed for establishment of the viral genome upon infection and for its amplification in differentiated cells. These findings highlight the critical role of Cdk2 phosphorylation in regulating the nuclear accumulation of E1 and suggest the existence of an as-yet-unknown phosphatase that would dephosphorylate E1 to enable its nuclear export and allow cell cycle progression.

3.3.6 Acknowledgments

We thank M. Lehoux, C. D'Abramo, and H. Sénéchal for their comments on the manuscript. This study was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research to J.A. and from the National Cancer Institute (CA59655) to L.A.L. A.F.-T. holds

a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.A. is a senior scholar from the FRSQ.

3.3.7 References

1. Abbate, E. A., J. M. Berger, and M. R. Botchan. 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 18:1981-1996.
2. 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.
3. Androphy, E. J., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1987. Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325:70-73.
4. Chow, L. T., and R. Broker. 1997. Small DNA tumor viruses, p. 267-301. In N. Nathanson (ed.), *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.5
5. 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.
6. 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.
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. Coulombe, P., G. Rodier, E. Bonneil, P. Thibault, and S. Meloche. 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 24:6140-6150.
 9. de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
 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. Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* 77:2819-2831.
 12. Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90:1051-1060.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.

16. Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390:308-311.
17. Gissmann, L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldovsky, H. G. Schnurch, and H. zur Hausen. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:560-563.
18. Goldsborough, M. D., D. DiSilvestre, G. F. Temple, and A. T. Lorincz. 1989. Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus. *Virology* 171:306-311.
19. 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.
20. Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
21. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16:83-97.
22. Hickman, A. B., and F. Dyda. 2005. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:77-85.
23. Hoffmann, R., B. Hirt, V. Bechtold, P. Beard, and K. Raj. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J. Virol.* 80:4431-4439.

24. Hsu, C. Y., F. Mechali, and C. Bonne-Andrea. 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J. Virol.* 81:384-394.
25. Hubert, W. G., T. Kanaya, and L. A. Laimins. 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.* 73:1835-1845.
26. James, J. A., C. R. Escalante, M. Yoon-Robarts, T. A. Edwards, R. M. Linden, and A. K. Aggarwal. 2003. Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure* 11:1025-1035.
27. Jee, S. H., Y. F. Kuo, Y. Chen, S. H. Cheung, H. C. Chiu, and S. C. Lee. 1993. Characterization of a human keratinocyte cell line immortalized by human papillomavirus 16 DNA. *J. Formosa Med. Assoc.* 92:876-883.
28. Jones, D. L., R. M. Alani, and K. Munger. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11:2101-2111.
29. Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:9112-9117.
30. Lin, B. Y., T. Ma, J. S. Liu, S. R. Kuo, G. Jin, T. R. Broker, J. W. Harper, and L. T. Chow. 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J. Biol. Chem.* 275:6167-6174.

31. Liu, X., S. Schuck, and A. Stenlund. 2010. Structure-based mutational analysis of the bovine papillomavirus E1 helicase domain identifies residues involved in the nonspecific DNA binding activity required for double trimer formation. *J. Virol.* 84:4264-4276.
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. Lusky, M., J. Hurwitz, and Y. S. Seo. 1994. The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:8895-8899.
34. Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:382-387.
35. 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.
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. Moody, C. A., and L. A. Laimins. 2009. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog.* 5:e1000605.

38. Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 78:11451-11460.
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. Rodier, G., P. Coulombe, P. L. Tanguay, C. Boutonnet, and S. Meloche. 2008. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J.* 27:679-691.
41. Ruesch, M. N., F. Stubenrauch, and L. A. Laimins. 1998. Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J. Virol.* 72:5016-5024.
42. Sakai, H., T. Yasugi, J. D. Benson, J. J. Dowhanick, and P. M. Howley. 1996. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J. Virol.* 70:1602-1611.
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. *Mol. 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. 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.
47. Stubenrauch, F., A. M. Colbert, and L. A. Laimins. 1998. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J. Virol.* 72:8115-8123.
48. Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner, and L. A. Laimins. 2000. The E8^{E2C} protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J. Virol.* 74:1178-1186.
49. Stubenrauch, F., and L. A. Laimins. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 9:379-386.
50. 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.
51. Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216:219-222.
52. Sverdrup, F., and G. Myers. 1997. The E1 proteins, p. 37-53. In G. Myers, C. Baker, K. Münger, F. Sverdrup, A. McBride, and H.-U. Bernard (ed.), *Human papillomavirus 1997. Theoretical Biology and Biophysics*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.53

53. 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.
54. Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch, and L. A. Laimins. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:8449-8454.
55. Titolo, S., K. Brault, J. Majewski, P. W. White, and J. Archambault. 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J. Virol.* 77:5178-5191.
56. 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.
57. 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.
58. White, P. W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M. Fazekas, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J. Biol. Chem.* 276:22426-22438.

59. Wilson, R., and L. A. Laimins. 2005. Differentiation of HPV-containing cells using organotypic "raft" culture or methylcellulose. *Methods Mol. Med.* 119:157-169.
60. Wilson, V. G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24:275-290.
61. Woodman, C. B., S. I. Collins, and L. S. Young. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* 7:11-22.
62. Yu, J. H., B. Y. Lin, W. Deng, T. R. Broker, and L. T. Chow. 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.* 81:5066-5078.
63. zur Hausen, H., and E. M. de Villiers. 1994. Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:427-447.

Chapitre 4 - L'accumulation nucléaire de la protéine E1 des papillomavirus bloque la progression de la phase S et active une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM

Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response

Cet article a été soumis pour publication au mois d'avril 2011 à *Journal of Virology*

Note 1 : Cet article a été co-soumis avec un article provenant du laboratoire du D^r Allison McBride. Ce groupe a également découvert que la protéine E1 de divers PV est capable d'induire l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM.

Note 2 : Le 22 juin 2011, une version modifiée de cet article a été acceptée pour publication dans *Journal of Virology*, volume 85, issue 17. Au moment de la publication de cette thèse, l'article est sous-press.

4.1 Mise en contexte de l'article

Au cours de l'étude présentée au chapitre 3 de cette thèse, nous avons déterminé que l'accumulation de E1 au noyau inhibe la prolifération cellulaire. Au même moment, nos collègues, D^r Moody et D^r Allison McBride, ont découvert que E1 est capable d'activer une voie de réponse aux dommages à l'ADN. Le but de l'étude présentée dans ce dernier chapitre était donc de caractériser l'arrêt de la progression du cycle cellulaire ainsi que l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN induits par l'accumulation nucléaire de E1. De manière plus précise, nous désirions déterminer si les fonctions anti-prolifératives de E1 étaient conservées à travers les divers PV et identifier les activités de E1 qui sont nécessaires à ces fonctions. De plus, nous voulions déterminer si l'arrêt de cycle cellulaire induit par E1 était dépendant de l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN, et finalement, si l'activation de cette voie était essentielle à la réplication de l'ADN viral.

4.2 Contribution des auteurs

Je me suis personnellement occupée de l'élaboration de la majorité des expériences présentées dans ce manuscrit. Techniquement, je me suis occupée d'environ la moitié des expériences réalisées au cours de cette étude et j'ai supervisé **Fanny Bergeron-Labrecque**, alors une étudiante sous-graduée, au cours de la réalisation des autres expériences. De manière plus détaillée, j'ai réalisé les expériences présentées aux figures 4.1, 4.3, 4.4, 4.5, 4.9, S4.2, S4.7 et S4.9. Je me suis également occupée de la mise au point de la méthode d'analyse de l'activation de γ H2AX, pATM et pChk2 par microscopie confocale. Finalement, Fanny et moi avons conjointement réalisé les expériences présentées aux figures 4.2, 4.6, 4.7, 4.10, S4.3, S4.4 et S4.8.

Fanny Bergeron-Labrecque a fait la mise au point de la technique de détection de l'activation de γ H2AX par cytométrie en flux, et a réalisé seule les expériences présentées aux figures 4.8, S4.1, S4.5 et S4.6.

D^r Cary A. Moody était à ce moment une stagiaire postdoctorale dans le laboratoire du D^r Laimins. Elle a découvert que la transfection de EYFP-31E1 active une réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules U2OS (non présentée dans l'article) et dans les kératinocytes primaires immortalisés avec un génome du VPH 31 de type sauvage ou dans lequel la protéine E1 est mutée au niveau de son NES. Les résultats obtenus dans les kératinocytes sont présentés à la figure 4.11.

Michaël Lehoux a été le premier à réaliser l'expérience présentée à la figure 4.5B. De plus, il a contribué à la mise au point des techniques de formation de colonies et d'analyse de cycle cellulaire.

D^r Laimonis A. Laimins a supervisé les études réalisées dans les kératinocytes primaires par le D^r Moody et a commenté l'article final.

D^r Jacques Archambault a supervisé le projet et m'a aidé à écrire l'article.

4.3 Texte de l'article

4.3.1 Abstract

Replication of the papillomavirus genome is initiated by the assembly of a complex between the viral E1 and E2 proteins at the origin. The E1 helicase is comprised of a C-terminal ATPase/helicase domain, a central domain that binds to the origin, and a N-terminal regulatory region that contains nuclear import and export signals mediating its nucleo-cytoplasmic shuttling. We previously reported that nuclear accumulation of E1 has a deleterious effect on cellular proliferation which can be prevented by its nuclear export. Here, we show that nuclear accumulation of E1 from different papillomavirus types blocks cell cycle progression in early S-phase and triggers the activation of a DNA damage response (DDR) and of the ATM pathway, in a manner that requires both the origin-binding and ATPase activities of E1. Complex formation with E2 reduces the ability of E1 to induce a DDR but does not prevent cell cycle arrest, suggesting that both events are distinct. Transient viral DNA replication still occurs in S-phase arrested cells but, surprisingly, is neither affected by nor is dependent on induction of a DDR and of the ATM kinase. Finally, we provide evidence that a DDR is also induced in HPV31-immortalized keratinocytes expressing a mutant E1 defective for nuclear export. We propose that nuclear export of E1 prevents cell cycle arrest and the induction of a DDR during the episomal maintenance phase of the viral life cycle and that complex formation with E2 further safeguards undifferentiated cells from undergoing a DDR when E1 is in the nucleus.

4.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small double-stranded DNA viruses that infect the differentiating epithelium of the skin or mucosa (reviewed in (10, 92)). About 25 types infect the anogenital tract (6, 18) which have been characterized either as low-risk or high-risk types, according to their association with benign or malignant hyper-proliferative

lesions. Clinically, low-risk HPV types cause benign warts while high-risk types are associated with lesions that can progress to cancer (28, 57, 64, 87).

The HPV life cycle is dependent on the differentiation program that keratinocytes undergo within a stratified epithelium. Viral DNA replication is required during three distinct phases of the viral life cycle (reviewed in (36)). First, upon infection of cells from the basal layer of the epithelium, the viral genome is established as a nuclear episome and replicated up to 50- 100 copies (reviewed in (30)). Second, these episomes are maintained at a constant copy number by low levels of replication in the lower layers of the epithelium. During this maintenance phase, viral DNA replication is thought to occur only once per cell cycle, during S-phase, and in synchrony with replication of the host DNA (32). As the infected keratinocytes reach the upper most differentiated layers of the epithelium and under the action of the viral E6 and E7 oncoproteins, the copy number of the viral episome is amplified to very high levels (reviewed in (30)) presumably through multiple rounds of replication in S-phase arrested cells (24, 32). These episomes drive the expression of the late capsid proteins (27) and become encapsidated to form new virions, which are eventually shed-off with the top layer of the epithelium.

Two viral proteins, E1 and E2, are required for replication and amplification of the viral episome (reviewed in (75)). Initiation of viral DNA replication relies on the capacity of E2 to bind specific sequences within the viral origin of replication and to simultaneously interact with the viral helicase E1 (1, 3). Through these interactions, E2 recruits several E1-monomers to the viral origin (25, 26, 46, 51, 62, 79, 83) and facilitate their assembly into a functional double hexamer that will unwind DNA ahead of the replication fork (65, 66, 78, 81, 82, 86) and serve as a platform for the assembly of host DNA replication factors such as RPA, DNA polymerase α -primase and topoisomerase I (12, 13, 29, 45, 49, 59).

The HPV E1 helicase can be divided into three main functional regions. The C-terminal half of E1 comprises an ATPase/helicase domain typical of superfamily III (31, 33) that can self assemble into hexamers and interact with E2, the DNA polymerase α -

primase and topoisomerase I (12, 49, 76, 83, 85). The origin-binding domain (OBD) is located in the center of E1 and is required for dimerization and binding to the viral origin (81, 82). Together, the OBD and C-terminal domain are sufficient to catalyze viral DNA replication *in vitro* but not *in vivo* (this study and (2, 77)), thereby suggesting that the N-terminal region of E1 has a regulatory role during viral DNA replication *in vivo*. Many elements within the N-terminal region are required for efficient viral DNA replication *in vivo* (14, 53, 55). Among these, a bi-partite nuclear localization signal (NLS), a Crm1-dependent nuclear export signal (NES), a cyclin E/A-binding motif (CBM), and specific Cdk2 phosphorylation sites (S92 and S106 in HPV31 and S89, S93 and S107 in HPV11) have been shown to regulate the nucleo-cytoplasmic shuttling of E1 (19, 23, 44, 47, 89). Recently, we showed that this shuttling needs to be tightly regulated as sustained accumulation of E1 in the nucleus induces a cell cycle arrest in S-phase and is detrimental to cellular proliferation (23). Specifically, we showed that nuclear export of E1 is required for the maintenance of the viral genome but not for its amplification in differentiated keratinocytes. Overall, these findings suggested that the sustained nuclear accumulation of E1 need to be counteracted by the nuclear export of E1 during the maintenance phase of the genome, in order to prevent cell cycle arrest. Conversely, high levels of nuclear E1 in S-phase arrested cells would create a favorable environment for viral DNA amplification in differentiated cells.

Cell cycle arrest is often the result of a cellular DNA damage response (DDR) and activation of cell cycle checkpoints (reviewed in (4, 5)). Interestingly, one of our groups has recently reported that a DDR is activated in keratinocytes immortalized with HPV and is required for the amplification of the viral episome (54). Furthermore, the induction of a DDR caused by the E1- and E2-dependent replication of integrated HPV genomes has been shown to promote genomic instability (35-37). Activation of a DDR can originate from two types of DNA breakage: double-stranded and single-stranded breaks (DSBs and SSBs, respectively). DSBs induce the activation of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent pathway, which is characterized by the phosphorylation of ATM and its

downstream effector kinase, Chk2. SSBs, however, lead to the activation of the ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR)-pathway, which results in the activation of ATR and phosphorylation of its cognate downstream effector kinase, Chk1. Upon their activation, both pathways trigger the activation of checkpoints that block cell cycle progression and facilitate DNA repair (reviewed in (4, 5)).

In this study, we demonstrate that the ability of E1 to block cell cycle progression and inhibit cellular proliferation is conserved among papillomaviruses and dependent on the activities of the E1 OBD and ATPase/helicase domain. We determined that E1-expressing cells are arrested in early S-phase and, interestingly, that this cell cycle block is accompanied by the activation of a DDR and, specifically, of the ATM pathway. We show that high concentrations of E2 can prevent the induction of a DDR by E1 but cannot relieve its inhibitory effect on cell cycle progression, indicating that both events are distinct. We also demonstrate that transient viral DNA replication neither requires nor is affected by this DDR. Finally, we provide evidence in keratinocytes expressing a nuclear export-defective E1 from the viral episome that sustained nuclear accumulation of E1 is sufficient to induce a DDR. We suggest that the ability of E1 to cause cell cycle arrest and induce a DDR is prevented by nuclear export during the episomal maintenance phase of the viral life cycle but, as previously reported (54), that it facilitates amplification the viral genome in the upper layers of the epithelium.

4.3.3 Materials and methods

Plasmid constructions. The plasmid used to express HPV31 E2 fused to a 3-Flag (3F) epitope as well as the plasmids used in the HPV31 transient DNA replication assay have been described previously (24). The RFP-PCNA expression plasmid was a kind gift of Dr M. Cristina Cardoso (73). Plasmids to express HPV31 E1 fused to EYFP as well as E1 from HPV16, HPV11 and BPV-1 fused to GFP were previously described (14, 22). The plasmid to express HPV31 E1 fused to GFP was constructed by inserting a PCR fragment that encodes a modified E1 ORF, bearing a silent mutation that inactivates an internal

splicing donor site, between the XhoI and BamHI sites of plasmid pGFP2-C2 (BioSignal Packard-Perkin-Elmer). Plasmids to express amino acids 1-159 and 1-332 of HPV31 E1 fused to EYFP were constructed by introducing the appropriate E1 PCR fragment between the XhoI and BamHI sites of plasmid pEYFP-C1 (Clontech). Plasmids to express E1 fragments that lack the E1 NLS (amino acids 160-332, 160-629 and 332-629) as fusions to EYFP and to the NLS of SV40 Large T antigen (LTA) were constructed similarly, with the exception that the PCR fragments were introduced between the BamHI and Sall sites of plasmid AB-2531, which expresses EYFP fused at its C-terminus to the SV40 LTA NLS (PKKKRKV). Plasmid AB-2531 was constructed by inserting a PCR fragment encoding the SV40 LTA NLS between the BglII and EcoRI sites of plasmid pEYFP-C1 (Clontech). Amino acids substitutions in the DNA-binding (K265A/R267A) and ATPase (K463A) domains of HPV31 E1 were introduced by mutagenesis of the EYFP-E1 expression plasmid using the QuikChange kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details on their construction will be provided upon request.

Cell culture, transfection and whole cell extract preparation. The human cervical carcinoma cell lines C33A and HeLa, ATM-deficient line (primary skin fibroblasts, HDSF, AG04405A, Coriell Institute) as well as the osteosarcoma U2OS line were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml of penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. Human foreskin keratinocytes (HFKs) that have been immortalized with either the HPV31 WT or NES mutant genomes were described previously (23). These cells lines were maintained in KGM (Clonetics) or in E medium in presence of mitomycin C (Boehringer Mannheim)-treated fibroblast feeders. Transfections of C33A cells were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Whole cell extracts were prepared 24 h post-transfection by resuspension of the transfected C33A cells in lysis buffer (PBS supplemented with 0.1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors [10 µg of antipain, 2 µg of leupeptin, 1 µg of pepstatin, and 2 µg of aprotinin/ml; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 50 mM

NaF; and 1 mM orthovanadate (Na₃VO₄)) and freezing at -80° C overnight. Cell extracts were thawed and boiled in Laemmli buffer (42) prior to SDS-PAGE.

Confocal fluorescence microscopy. ~ 8 x 10⁵ C33A cells were grown on coverslips and transfected with the amount of EYFP-31E1 expression plasmid specified in the text and grown on coverslips. When indicated, 3F-31E2 (WT or E39Q) either alone or with a plasmid containing the viral origin of replication were co-transfected with EYFP-31E1. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed with 4% formaldehyde. For the detection of γ H2AX, pATM, pChk2 and pChk1, cells were treated as described in the next section. Otherwise, cells were directly permeabilized with 0.2% Triton X-100 and their DNA stained with a solution of TO-PRO-3 (1 μ M) (Molecular Probes). Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning microscope (Zeiss) and analyzed using the ZEN 2009 LE software.

Immunofluorescence: Twenty-four hours post-transfection, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 min. at 4°C, treated with 50 mM of NH₄CL in PBS for 10 min. at room temperature and then blocked with PBS containing 10% BSA (Biomol) for 3-4 h at room temperature. Cells were then incubated with a dilution of the primary antibody (1:500 for detection of γ H2AX, pATM and pChk2; 1:200 for pChk1) overnight at 4°C. After two washes in PBS/BSA, cells were incubated with the secondary antibody (anti-mouse Alexa 633 or anti-rabbit Alexa 633) for 30 min. at room temperature. Where indicated, DNA was stained with a solution of DAPI (1 μ g/mL) (Sigma-Aldrich). Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired as described in the previous section but using a LSM710 confocal laser (Zeiss).

Antibodies. Immunofluorescence. Phospho-H2AX Ser 139 (γ H2AX) and phospho-ATM Ser1981 (pATM) were detected using mouse monoclonal antibody from Millipore (Upstate) (clone JBW301, Cat: 05-636) and Rockland (Cat: 200-301-400) respectively, and

then with an Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse secondary antibody from Molecular Probe (Cat: A21050). Similarly, phospho-Chk2 Thr 68 (pChk2) and phospho-Chk1 Ser 345 (pChk1) were detected using rabbit polyclonal antibodies from Cell Signaling (Cat: 2661 and 2348, respectively) and then with an Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody from Molecular Probe (Cat: A21070). **Western blotting.** GFP fusion proteins were detected using a mixture of two mouse monoclonal antibodies purchased from Roche (Cat: 11814460001) while β -tubulin was detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (Cat: T0426). For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and detected using horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse secondary antibody from GE healthcare (Cat: NA931) and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Transient HPV DNA replication assay. Transient HPV31 DNA replication was performed as described previously (24) but using EYFP-31E1 instead of Flag-tagged E1 (3F-31E1). Briefly, $\sim 5 \times 10^4$ C33A cells were transfected with four plasmids encoding, respectively, EYFP-31E1, 3F-31E2, the minimal origin of DNA replication together with a firefly luciferase reporter gene (pFLORI31), and Renilla luciferase (pRL). Under standard conditions, 1.25, 2.5 and 5 ng of E1 were used along with a constant quantity of the other plasmids (1X) (10 ng of 3F-31E2, 2.5 ng of pFLORI31 and 0.5 ng of pRL). When indicated, 2X, 4X and 8X of 3F-31E2 (20, 40 and 80 ng respectively) and pFLORI31 (5, 10 and 20 ng respectively) were used. For all conditions, replication of the origin-containing plasmid was quantified 24 or 72 h post-transfection by measuring the levels of firefly and Renilla luciferase activities using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega). E1 mutants were analyzed in duplicates, in two separate experiments, and error bars represent the standard deviations.

Cell cycle analysis. When several conditions were analyzed for a given transfected population (asynchronous, mimosine block and release in nocodazole), cells were prepared as previously described (23). When a single condition was analyzed (asynchronous), $\sim 8 \times$

10^5 C33A cells were transfected with 1 μg of the indicated plasmid(s) in 6-well plates and directly prepared for cell cycle analysis 24 or 48 h later. Briefly, cells were trypsinized and either fixed and stained with a solution containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich Cat: P4170), or stained directly using fresh medium supplemented with 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst (Sigma-Aldrich, Cat: B2261) and 5 mM of Verapamil (Sigma-Aldrich, Cat: V4629) for 30 minutes at 37°C . The DNA content of EYFP-expressing cells was determined by flow cytometry on a FACScanTM (PI staining) or a FACS BD LSRTM 222 (Hoechst staining) flow cytometer using the Cellquest Pro Software (BD). Cell cycle distribution was further analyzed and quantified using the FlowJo (v8.1) and ModFit LT softwares, respectively. High EYFP-expressing cells were excluded from the analysis of cells released in nocodazole as control cells expressing high levels of EYFP and GFP alone were unable to re-enter the cell cycle (data not shown).

Quantification of γH2AX and incorporation of BrdU. $\sim 8 \times 10^5$ C33A cells were transfected with 1 to 2 μg of the indicated plasmid(s) in 6-well plates. γH2AX analysis. Twentyfour hours later, cells were trypsinized and fixed in 70% ethanol overnight at -20°C . Fixed cells were permeabilized in PST (PBS supplemented with 4% FBS and 0,1% Triton X-100) for 10 min on ice. Cells were subsequently incubated with the primary antibody (γH2AX) diluted to 1:500 in PST for 2 h at room temperature. Cells were then washed twice with PBS-2%FBS solution and incubated with a dilution of 1:400 of the secondary antibody (mouse Alexa fluor 633) for 1 h at room temperature. Finally, cells were washed and resuspended in PBS-2%FBS solution for FACS analysis. As the induction of γH2AX is correlated with the levels of expression of E1, the EYFP signal was analyzed separately for low, medium and high EYFP expressing cells. Fluorescence intensities ranging from 5-20 were considered as low, from 20-115 as medium (Med) and from 115 to 1000 as high EYFP expressing cells.

Incorporation of BrdU. BrdU incorporation was measured using the APC BrdU flow kit from BD PharmingenTM (Cat: 522598) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 24 h post-transfection, cells were pulsed with 10 μM of BrdU

for 1 h and then fixed, permeabilized and treated with DNase to enable access of the APC antibody to the BrdU incorporated in the DNA. Next, cells were stained with anti-BrdU-APC and 7-AAD and analyzed by FACS. Flow cytometry analysis. The γ H2AX, BrdU and 7-AAD contents of EYFP-expressing cells were determined by flow cytometry on a FACS BD LSRTM flow cytometer using the Cellquest Pro Software (BD). γ H2AX and BrdU were further analyzed and quantified using the FlowJo (v8.1) while cell cycle distribution was analyzed by FlowJo and quantified using ModFit LT softwares. When indicated, hydroxyurea (HU, 2 mM) or aphidicolin (Aph, 5 μ g/ml) were added to the transfected cells 4 h post-transfection.

Colony formation assay. $\sim 8 \times 10^5$ C33A cells were transfected with 1 μ g of the indicated plasmid in a 6-well plate. Twenty-four hours post-transfection, cells were trypsinized and seeded onto 100 mm plates in fresh medium supplemented with 254 500 μ g/ml of G418 or 15 μ g/ml of Bleocin. Antibiotic selection was maintained for a period of approximately 3 weeks. Cells were then fixed for 10 minutes in cold methanol and stained for 2 minutes with methylene Blue (1% w/v in 60% MeOH/H₂O).

4.3.4 Results

4.3.4.1 The ability to arrest S-phase progression is a conserved feature of papillomavirus E1.

We have recently reported that nuclear accumulation of HPV31 E1 inhibits the proliferation of transfected C33A cells by arresting them in S-phase (23). To determine if this activity is conserved amongst papillomavirus E1, we tested the ability of two other E1 proteins, from HPV11 and BPV, to inhibit proliferation of C33A cells in a colony formation assay (CFA). These experiments, which were performed with GFP-E1 fusion proteins expressed from a vector containing a zeocin resistance gene, revealed that HPV11 and BPV E1 were as good as HPV31 E1 at inhibiting colony formation (Fig. 4.1A). To determine if this inhibition was due to an arrest in S-phase, we analyzed the cell cycle

distribution of C33A cells transiently expressing these GFP-E1 proteins (i.e. of GFP-positive cells). As anticipated, we found that HPV11 and BPV E1 also led to an accumulation of cells in S-phase (Fig. 4.1B and C, Table 4.1), similarly to HPV31 E1 and unlike GFP alone, which was used as a negative control. To further characterize this cell cycle arrest, we tested if E1-expressing cells were able to resume cell cycle progression following a block in G1/S by mimosine. In these experiments, cells were released from the mimosine block into medium containing nocodazole to prevent their progression past the G2/M boundary. Consistent with the results obtained with asynchronous cells, the majority of E1-expressing cells were unable to progress to G2/M, although 73% of the GFP-transfected cells were able to do so (Fig. 4.1B and Table 4.2). Western blotting analysis showed that HPV31 and -11 E1 were expressed at comparable levels. As for BPV E1, it was expressed at slightly higher levels but also showed an increase in low molecular weight degradation products (Fig. 4.1D). Collectively, the results presented above suggest that the capacity of E1 to prevent cellular proliferation, by blocking S-phase progression, is a conserved activity of papillomavirus E1.

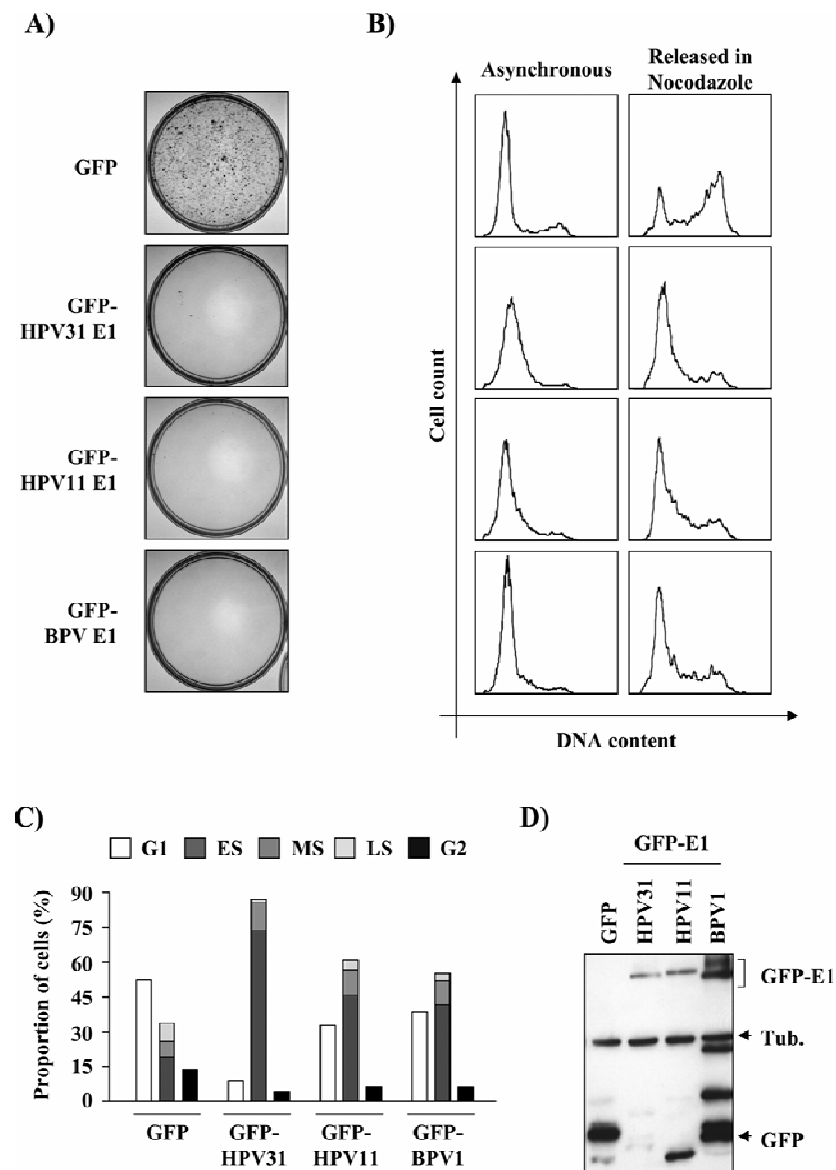


Figure 4.1. E1 from different papillomavirus types inhibit cellular proliferation.

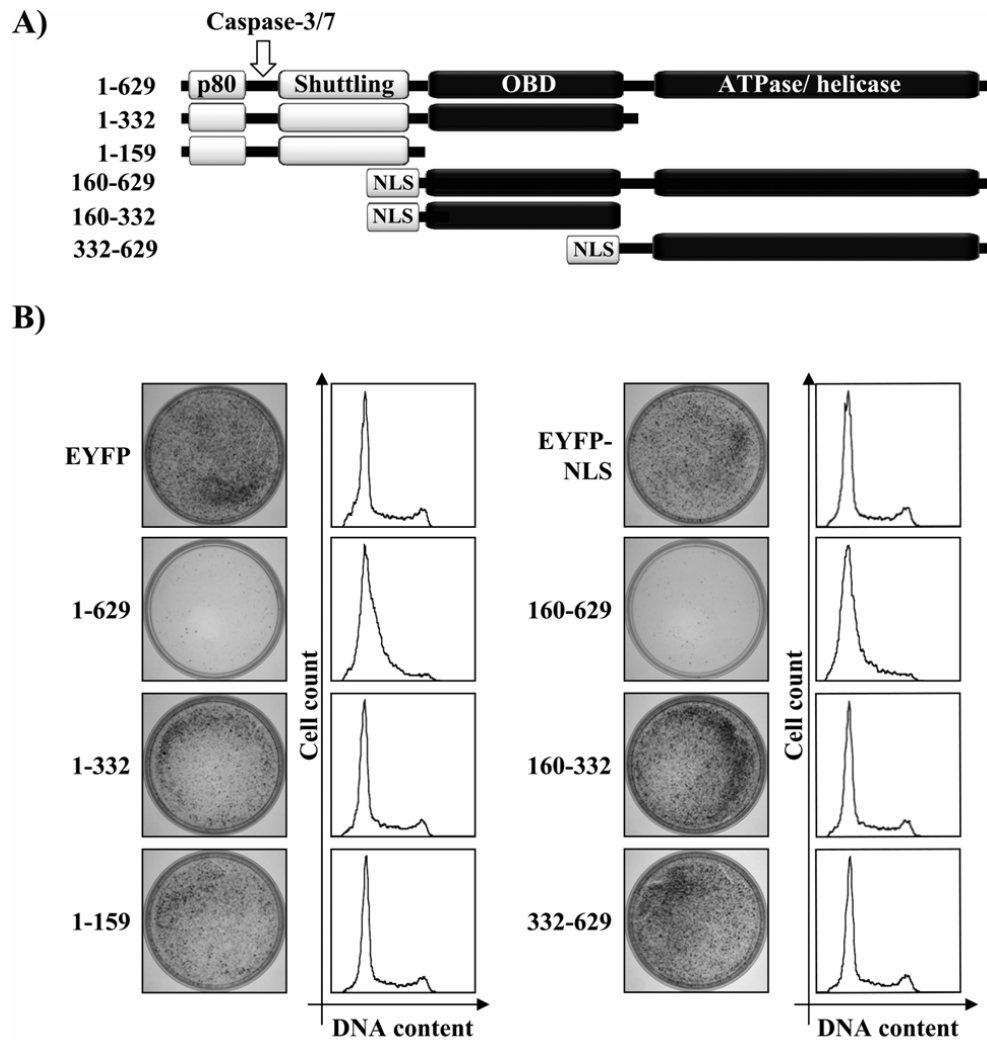
(A) Colony formation assays (CFA). C33A cells were transfected with the indicated GFP-E1 expression vector (also containing a zeocin resistance gene). Following a four weeks selection in bleocin, colonies were stained with methylene blue. (B) Cell cycle analysis. C33A cells transiently expressing the indicated GFP-E1 or GFP were trypsinized 48 h posttransfection and their DNA stained with Hoechst and analyzed by flow cytometry.

For each condition, the cells were either grown asynchronously (Asynchronous) or synchronized with mimosine for 24 h and then released in nocodazole for an additional 24 h (Released in nocodazole). The cell cycle profile of each sample is shown as a histogram and quantified in Table 4.1 and 4.2. (C) Graphical representation of the cell cycle distributions shown in (B). ES, MS and LS stand for early, mid and late S-phase, respectively. (D) Western blot analysis of total protein extracts prepared from transfected C33A cells expressing the GFP-E1 proteins of the various PVs used in this study. E1 proteins were detected using an anti-GFP antibody (α -GFP) and tubulin was used as a loading control (α -Tub.).

4.3.4.2 The origin-binding and helicase domains of E1 are necessary and sufficient to inhibit cellular proliferation.

To determine which domains of E1 are required for inhibiting cellular proliferation, we performed colony formation assays with a series of HPV31 E1 truncations spanning the N-terminal region, the OBD and/or the C-terminal enzymatic domain (Fig. 4.2A). All truncations were fused to EYFP, and those lacking the N-terminal region of E1 were fused to the SV40 Large T antigen NLS. The addition of the NLS was necessary as we previously showed that the anti-proliferative effect of E1 is dependent on its nuclear accumulation (23). The results in Fig. 4.2B show that the two N-terminal fragments of E1 lacking the ATPase/helicase domain (E1 aa 1-159 and 1-332) were unable to inhibit cellular proliferation. Accordingly, neither fragment had an effect on cell cycle progression (Fig. 4.2B and Table 4.1). In contrast, the E1 fragment comprised of the OBD and ATPase/helicase domain (E1 aa 160-629) was capable of preventing cellular proliferation and cell cycle progression to a similar extent as wild type (i.e. full length) E1 (Fig. 4.2B and Table 4.2). Neither the OBD nor the ATPase/helicase domain on its own was capable of inhibiting proliferation or cell cycle progression. All truncated proteins were properly localized to the nucleus and expressed at the correct molecular weight, as determined by confocal fluorescence microscopy and western blotting (Suppl. Fig. 4.1). Interestingly, whereas the E1 fragment spanning the OBD and ATPase/helicase domain (E1 aa 160-629)

could inhibit cellular proliferation, it did not support transient DNA replication (Fig. 4.2C). From these results, we conclude that the OBD and ATPase/helicase domain of E1 are necessary and sufficient to inhibit cellular proliferation and cell cycle progression and, consequently, that none of the previously described interactions of the N-terminal domain of E1 with cellular proteins such as p80 (14) and cyclin E/A-Cdk2 (23, 47) are required for this anti-proliferative effect (Fig. 4.2A). Finally, these results show that this effect is also independent of the capacity of E1 to replicate DNA.



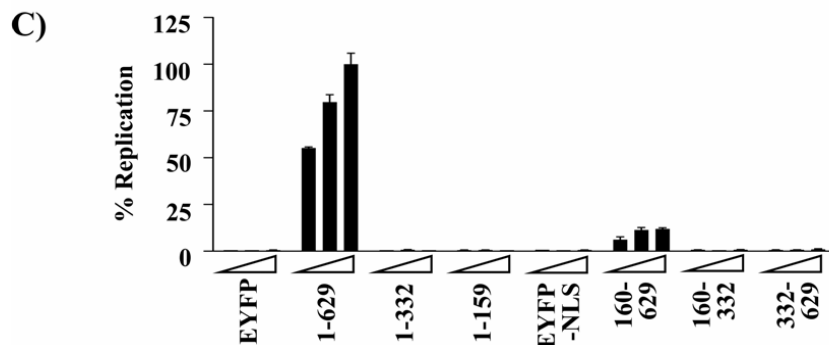


Figure 4.2. The OBD and ATPase/helicase domain of E1 are both required for its antiproliferative activity.

(A) Schematic representation of HPV31 E1 truncations used in this analysis, highlighting the location of the p80-binding site (aa 10-40), the caspase-3/7 cleavage site, the shuttling module (aa 85-125), the origin-binding domain (OBD) and the ATPase/helicase domain. E1 fragments lacking the shuttling module were fused to the SV40 Large T antigen nuclear localization signal (NLS). (B) Colony formation assay and cell cycle analysis. CFA and cell cycle analysis were done essentially as described in Fig. 4.1 with the exception that cells were selected in G418-containing medium for three weeks before staining the colonies with methylene blue. (C) Transient DNA replication activities of E1 truncations. The DNA replication activity of each E1 fragment was determined using 1.25, 2.5 and 5 ng of expression vector, 72 h post-transfection. Replication activities are reported as a percentage of the Fluc/Rluc ratio obtained with the 5 ng of 1-629 E1 expression vector. Cells transfected with EYFP or EYFP-NLS only were used as negative controls.

4.3.4.3 The origin-binding and ATPase activities of E1 are required for arresting S-phase progression.

To substantiate the results presented above, we performed colony formation assays with EYFP-31E1 mutant proteins carrying amino acid substitutions that abrogate the

origin-binding (OBD; K265A/R267A) (81, 82) or ATPase activities (ATPase; K463A) (82, 85) of E1. The results presented in Fig. 4.3A show that both E1 mutants failed to inhibit cellular proliferation. However, we observed by fluorescence microscopy that the E1 OBD mutant was not entirely localized to the nucleus, in contrast to the wild type and ATPase mutant E1, as it was present in both the nucleus and cytoplasm in approximately 15 % of the transfected cells (data not shown). To prevent cytoplasmic accumulation of the E1 OBD mutant, we generated a version lacking the nuclear export signal (NES), and confirmed that it was entirely nuclear (data not shown). For comparison, we also used NES defective versions of the ATPase mutant and of wild type E1. When tested in the CFA, both the OBD and ATPase mutant lacking the NES failed to inhibit colony formation, thus confirming that the origin-binding and ATPase activities of E1 are required for preventing cellular proliferation. When analyzed by Western blotting, the NES/OBD mutant was reproducibly found to be expressed at lower levels than the wild type protein (Fig. 4.3C). To ensure that the inability of this mutant to prevent cellular proliferation was not due to its lower expression, we analyzed the cell cycle distribution of EYFP-E1 expressing cells by flow cytometry, as this technique allows the comparison of cells expressing similar levels of EYFP fluorescence. Figure 4.3B shows that the E1 OBD and ATPase mutants were unable to prevent S-phase progression, as determined by the ability of cells expressing these mutant proteins to progress to G2/M upon release from a mimosine block (Fig. 4.3B, Table 4.1 and 4.2). Altogether, these results indicate that the origin-binding and enzymatic activities of E1 are both required for arresting cells in S-phase. To test the generality of these findings, we repeated these experiments with HPV16 E1 fused to GFP. As observed for BPV, HPV11 and HPV31 E1, we found that HPV16 E1 was able to inhibit cellular proliferation (Suppl. Fig. 4.2A) by imposing an S-phase arrest (Suppl. Fig. 4.2B and C, Table 4.1 and 4.2). Furthermore, we determined that these anti-proliferative effects of E1 could be abrogated by the introduction of an ATPase mutation (Suppl. Fig. 4.2A-D) (88). Thus, the enzymatic activity of HPV16 E1 is also required for its growth inhibitory effects, similarly to what was observed for HPV31 E1.

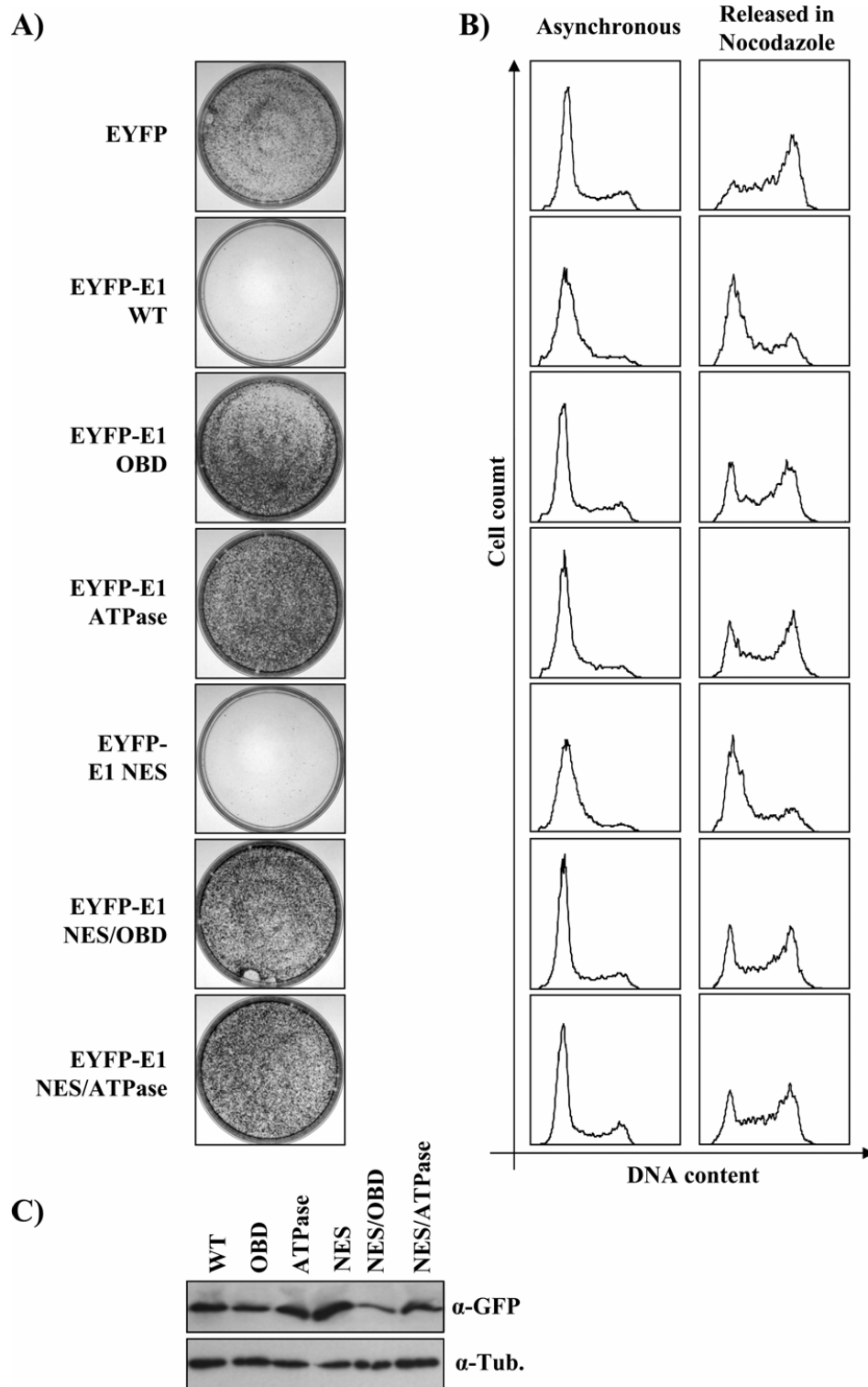


Figure 4.3. Point mutations in the origin-binding and ATPase domains of E1 abolish its anti-proliferative activity.

(A) CFA performed with EYFP alone and the indicated EYFP-E1 constructs carrying mutations in the OBD, ATPase domain and NES, as described in the text. Cells were selected in G418-containing medium before staining. (B) Western blot analysis in which E1 proteins were detected using an anti-GFP antibody (α -GFP) and tubulin was used as a loading control (α -Tub.). (C) Cell cycle analyses corresponding to the CFA were performed as described in Fig 4.1.

Table 4.1. Cell cycle distribution of GFP- and EYFP-expressing C33A cells

Transfected plasmid(s)	%G0/G1	%S	%G2/M	Intra S partitioning (Comp. E-M-L) ^a		
Mock*	32	53	15	47	26	26
GFP	52	34	14	56	21	24
GFP-HPV31 E1	9	87	4	85	14	1
GFP-HPV11 E1	33	61	7	75	18	7
GFP-BPV1 E1	39	55	6	76	18	5
GFP-HPV16 E1 WT	16	81	3	78	17	5
GFP-HPV16 E1 ATPase	43	44	14	61	23	16
EYFP	43	43	14	47	30	23
EYFP-31E1 1-629	24	72	4	75	19	6
EYFP-31E1 1-159	49	40	11	48	25	28
EYFP-31E1 1-332	49	40	11	50	30	20
EYFP-NLS	46	39	15	44	28	28
EYFP-NLS-31E1 160-332	45	43	12	47	28	26
EYFP-NLS-31E1 160-629	37	59	4	66	22	12
EYFP-NLS-31E1 332-629	45	44	11	45	27	27

Transfected plasmid(s)	%G0/G1	%S	%G2/M	Intra S partitioning (Comp. E-M-L) ^a		
EYFP	38	48	14	54	25	21
EYFP-31E1 WT	20	74	6	77	16	7
EYFP-31E1 OBD	38	49	13	53	24	22
EYFP-31E1 ATPase	37	55	9	64	22	15
EYFP-31E1 NES	18	75	7	88	7	5
EYFP-31E1 NES / OBD	44	44	12	55	25	20
EYFP-31E1 NES / ATPase	40	44	16	61	25	14

* 5000 of cells positively stained with Hoechst or double-stained with Hoechst and EYFP/GFP were selected for mock- and EYFP/GFP-transfected cells, respectively.

^a The percentage of cells estimated to be in the early (E)-, mid (M)- and late (L)-S phase according to Modfit software.

Table 4.2. Cell cycle distribution of GFP- and EYFP-expressing C33A cells released from mimosine blocks

	G1/early S	% Out of G1/early S
Mock*	20	80
GFP	27	73
GFP-HPV31 E1	74	26
GFP-HPV11 E1	67	33
GFP-BPV1 E1	67	33
GFP-HPV16 E1 WT	70	30
GFP-HPV16 E1 ATPase	39	61
EYFP	23	77
EYFP-31E1 WT	58	42
EYFP-31E1 OBD	34	66
EYFP-31E1 ATPase	35	65

	G1/early S	% Out of G1/early S
EYFP-31E1 NES	64	36
EYFP-31E1 NES / OBD	35	65
EYFP-31E1 NES / ATPase	41	59

* 5000 of cells positively stained with Hoechst or double-stained with Hoechst and EYFP/GFP were selected for mock- and EYFP/GFP-transfected cells, respectively.

^a The percentage of cells that resumed cell cycle progression following their release from a G1/S block with mimosine was quantified by counting the number of cells in mid- and late-S phase as well as in the G2/M phase.

4.3.4.4 E1 inhibits the proliferation of different cell lines.

Next, we investigated if E1 could also prevent the proliferation of cell lines other than C33A. We tested its effect in HeLa cells, which express HPV18 E6 and E7, as well as in U2OS cells, which in contrast to C33A express wild type p53. As shown in Fig. 4.4, EYFP-31 E1 was able to inhibit the proliferation of HeLa and U2OS cells to a similar extent as that of C33A cells. Importantly, proliferation of all three cell lines was not affected by the E1 NES/OBD and NES/ATPase mutants thus suggesting that the mechanism by which E1 affect cellular proliferation is the same in each cell line. We then characterized the anti-proliferative effect of E1 by flow cytometry and determined that S-phase progression was blocked in all three cell lines expressing wild type but not the mutant proteins (Fig. 4.4 and Table 4.3). Note that in these experiments, DNA content was measured by propidium iodide (PI) staining since Hoechst staining was found to be deleterious to HeLa and U2OS cells (data not shown). Consistent with the ability of E1 to induce a cell cycle arrest in HeLa cells, we found that co-expression of HPV31 E6 and/or E7 in C33A cells did not prevent the deleterious effect of EYFP-31E1 on cell cycle progression (data not shown). Altogether, the results presented above indicate that the ability of E1 to inhibit S-phase progression and cellular proliferation is independent of the expression of E6 and E7 as well as that of p53 (69).

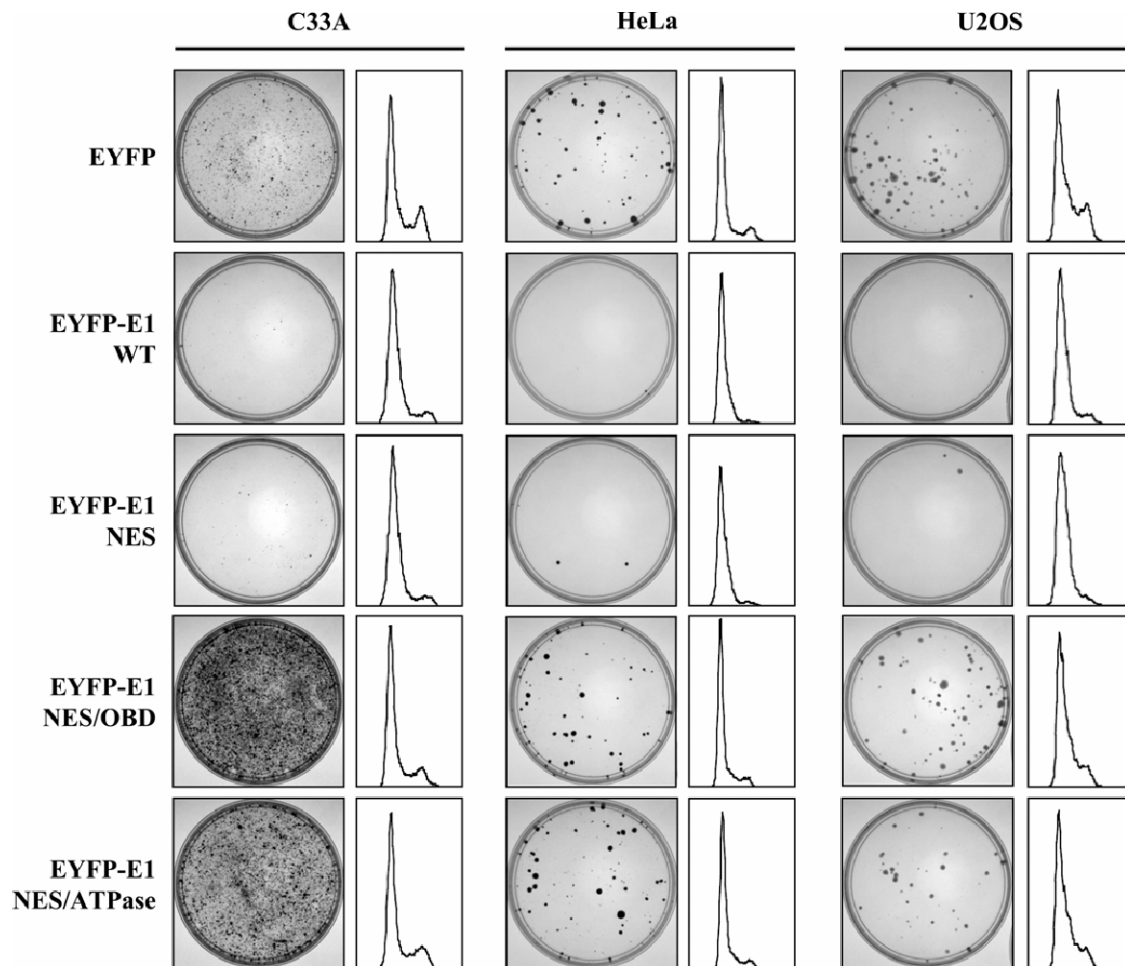


Figure 4.4. E1 inhibits cellular proliferation in p53-positive and -negative cell lines.

CFAs and cell cycle distributions of EYFP- and EYFP-E1-transfected C33A, HeLa or U2OS cells. CFA were performed in G418-containing medium. Cell cycle distributions were determined 24 h post-transfection using cells stained with propidium iodide (PI). Results are represented as histograms and quantified in Table 4.3.

Table 4.3. Cell cycle distribution of EYFP-expressing C33A, HeLa and U2OS cells

Transfected plasmid(s)	%G0/G1	%S	%G2/M	Intra S partitioning (Comp. E-M-L) ^a		
				48	32	19
Mock C33A*	47	31	22	48	32	19
EYFP	50	29	21	48	34	17
EYFP-31E1 WT	21	70	9	86	14	0
EYFP-31E1 NES	25	66	9	88	12	0
EYFP-31E1 NES-OBD	64	24	12	50	33	17
EYFP-31E1 NES-ATPase	32	51	17	84	12	4
Mock HeLa*	47	43	10	63	21	16
EYFP	57	36	8	64	19	17
EYFP-31E1 WT	33	65	2	80	18	2
EYFP-31E1 NES	38	58	4	78	19	3
EYFP-31E1 NES-OBD	60	33	7	52	33	15
EYFP-31E1 NES-ATPase	58	37	5	65	27	8
Mock U2OS*	37	39	24	51	49	0
EYFP	32	44	24	59	41	0
EYFP-31E1 WT	35	54	11	83	17	0
EYFP-31E1 NES	27	65	8	78	22	0
EYFP-31E1 NES-OBD	45	43	12	58	37	5
EYFP-31E1 NES-ATPase	42	46	12	59	37	4

* 5000 of cells positively stained with propidium iodide (PI) or double-stained with PI and EYFP were selected for mock- and EYFP-transfected cells, respectively.

^a The percentage of cells estimated to be in the early (E)-, mid (M)- and late (L)-S phase according to Modfit software.

4.3.4.5 E1 arrests cells in early S-phase.

The flow cytometry results presented above suggested that E1-expressing cells accumulate in S-phase. To confirm these results by an alternative method, we investigated the effect of E1 on the assembly of PCNA foci whose size increases from early to late S-

phase (63). As can be seen in Fig. 4.5A, large PCNA foci were never detected in cells expressing wild type EYFP-31E1 but could be readily observed in cells expressing the NES/OBD mutant E1. These results suggest that cells expressing wild type E1 fail to reach the end of S-phase. To pinpoint the position in S-phase in which E1-expressing cells were arrested, we set out to measure their capacity to carry out DNA synthesis (by BrdU incorporation) as a function of their position in the cell cycle (determined by 7-AAD staining). First, we determined the percentage of E1-expressing cells that could incorporate BrdU at 24, 48 and 72 hr post-transfection, by flow cytometry following a one-hour pulse-labeling period. As anticipated, BrdU incorporation gradually decreased over time in cells expressing wild type E1, consistent with the induction of an S-phase arrest, but not in those expressing the E1 NES/OBD and NES/ATPase mutants (Fig. 4.5B). On the basis of these findings, we decided to measure BrdU incorporation as a function of the cell cycle at 24 h post-transfection. This analysis revealed that cells expressing either the wild type or the NES mutant E1 proteins could incorporate BrdU in early S-phase only. This was in contrast to the control cells (mock or EYFP transfected) or cells expressing the E1 NES/OBD or NES/ATPase mutants (Fig. 4.5C). As additional controls, we confirmed that the BrdU incorporation profile of E1-expressing cells was similar to that of EYFP-transfected cells treated with the DNA synthesis inhibitors aphidicolin and hydroxyurea (Fig. 4.5C) (40, 58). Collectively, the results presented above indicate that E1 arrests cell cycle progression in early S-phase.

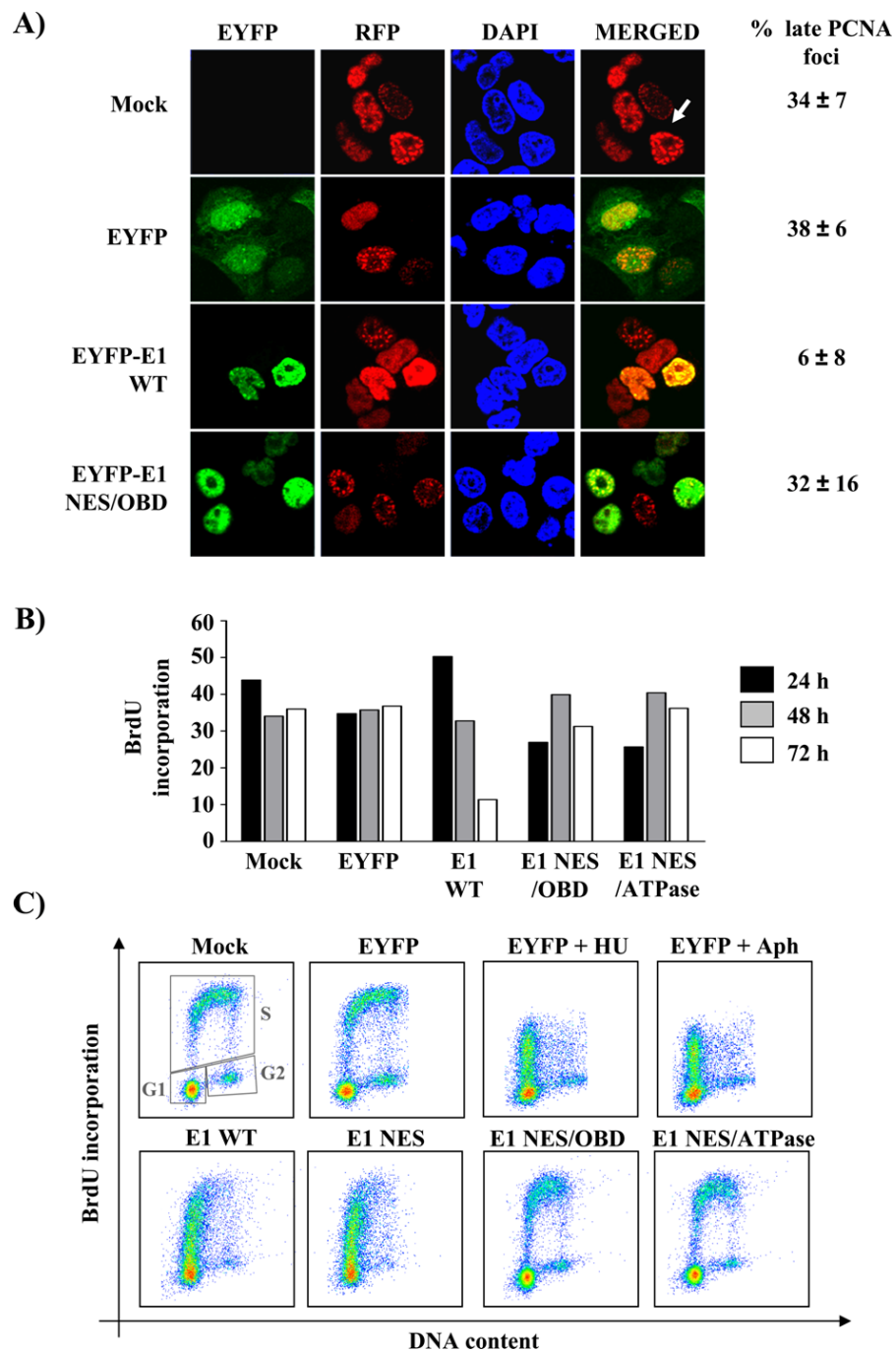


Figure 4.5. E1 arrests cell cycle progression in early S-phase.

(A) Cellular localization of RFP-PCNA in cells transfected with wild type or an origin-binding mutant of E1. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed,

mounted, and visualized by 40X fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with DAPI. Cells containing large PCNA foci (such as the one indicated by the white arrow) were quantified and are reported as a percentage of the total number of RFP-PCNA expressing cells, on the right side of the panel. (B) BrdU incorporation. Twenty-four, forty-eight and seventy two hour post-transfection, cells expressing EYFP or EYFP-E1 wild type, NES/OBD or NES/ATPase mutant were pulsed for 1 h with 10 μ M BrdU. The percentage of cells that incorporated BrdU was then determined by flow cytometry and is reported in the histogram. (C) BrdU incorporation throughout the cell cycle. Cells expressing EYFP or EYFP-E1 wild type or indicated mutant were pulsed with BrdU 24 h post-transfection and analyzed as described in (B). In addition, cells were stained with 7-AAD to measure their DNA content. For each sample, BrdU incorporation is represented as a function of DNA content (cell cycle distribution) in a scatter plot. Boxes indicate the populations of cells in G1, S and G2. EYFP-transfected cells treated with hydroxyurea (HU) and aphidicolin (Aph) were used as controls.

4.3.4.6 E1 induces a DNA damage response and activates the ATM pathway.

As inhibition of cell cycle progression can be induced by a DNA damage checkpoint response, we investigated if E1 can trigger the phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX), a hallmark of a DNA damage response (DDR) (9, 50, 60, 61). We examined the presence of γ H2AX in cells expressing EYFP-E1 by confocal immunofluorescence microscopy. As a positive control, we treated untransfected cells with 50 μ M of the topoisomerase II inhibitor etoposide for 24 h in order to induce a DDR (71). As shown in Fig. 4.6A, etoposide treatment resulted in a robust induction of γ H2AX as compared to untreated cells (Mock). A similar induction of γ H2AX was observed in cells expressing wild type E1 but not in those expressing either EYFP alone, an E1 mutant that accumulates in the cytoplasm (NLS) or nuclear E1 mutants defective for origin-binding or ATPase activity (Fig. 4.6A). Similar results were obtained for HPV11, HPV16 and BPV E1 suggesting that induction of a DDR is a conserved activity of E1 (Suppl. Fig. 4.3A). Furthermore, the ability of HPV31 E1 to induce γ H2AX was also observed in HeLa and

U2OS cells, indicating that it is independent of E6, E7 and p53 (Suppl. Fig. 4.3B). In a time course experiment, we found that the expression of HPV31 EYFP-E1 and the induction of γ H2AX could be detected as early as 6 h post-transfection and followed similar kinetics, consistent with γ H2AX being triggered soon after expression of E1 (Suppl. Fig. 4.4). Finally, evidence linking the induction of a DDR with cell cycle arrest came from the observation that amongst the different HPV31 E1 fragments characterized in Fig. 4.2, only those that caused cell cycle arrest were able to induce the phosphorylation of γ H2AX (Suppl. Fig. 4.5). As DNA damage is known to trigger the activation of the ATM or ATR checkpoints, depending of the type of DNA lesions created (reviewed in (38, 91)), we investigated which of these two DDR pathways was induced by E1. Specifically, we monitored the activation of key components of the ATM and ATR pathways by immunofluorescence microscopy. Activation of the ATM pathway was assessed by detection of phospho-serine 1981 of ATM (pATM) and, in separate experiments, phospho-threonine 68 of Chk2 (pChk2). Activation of the ATR pathway was monitored using an antibody against phospho-serine 345 of Chk1 (pChk1). As shown in Fig. 4.6B and C, the levels of both pATM and pChk2 were increased in cells expressing wild type E1, to a similar extent as in cells treated with etoposide used as a positive control. As anticipated, cells expressing the NES/OBD or NES/ATPase E1 mutants, or expressing EYFP alone, showed significantly reduced levels of these markers (Fig. 4.6B and C and data not shown). In contrast, pChk1 was detected only in a few E1-expressing cells, unlike cells treated with etoposide or hydroxyurea which were used as positive controls (Suppl. Fig. 4.6). These results suggest that E1 induces a DNA damage response and concomitant activation of the ATM pathway.

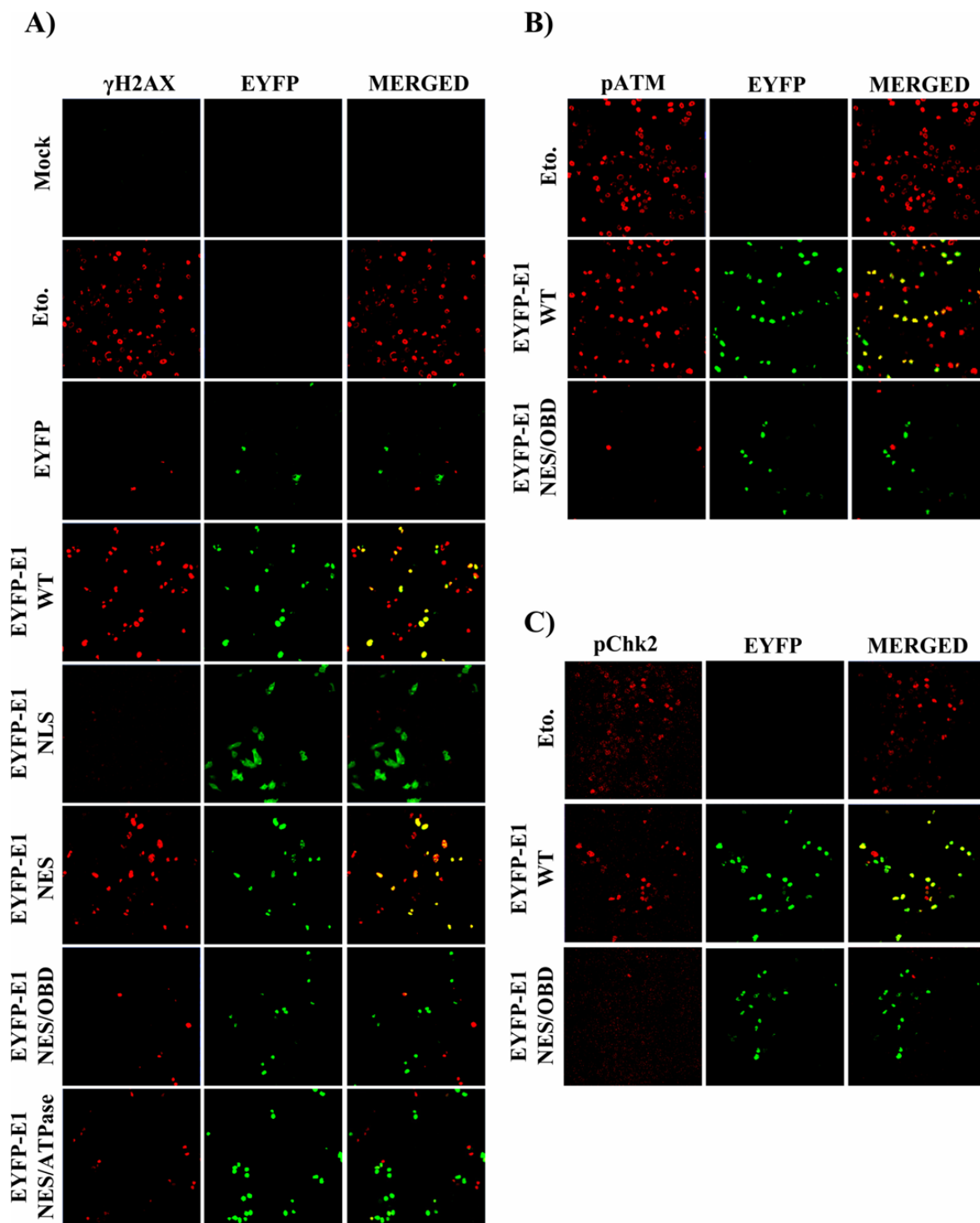


Figure 4.6. Expression of E1 induces a DNA damage response and activates the ATM pathway.

The indicated EYFP or EYFP-E1 wild type or mutant proteins were transiently expressed in C33A cells. Twenty four hours post-transfection, cells were fixed and stained for phospho-serine 139 of γ H2AX (A), phospho-serine 1981 of ATM (pATM) (B) or phospho-threonine 68 of Chk2 (pChk2) (C). Mounted cells were then visualized by 20X confocal fluorescence microscopy. Mock transfected cells and cells treated for 24 h with 50 μ M of etoposide (Eto.) were used as negative and positive controls, respectively.

4.3.4.7 γ H2AX foci are induced in cells containing low levels of nuclear E1.

In experiments such as those presented above, we consistently observed that γ H2AX was present throughout the nucleus of E1-expressing cells (pan-nuclear staining) rather than being localized into punctuated nuclear foci that are a hallmark of DNA double-strand breaks (DSBs). We reasoned that this pan-nuclear staining was in part a consequence of the amount of E1 being expressed in these cells and, accordingly, that nuclear foci may become apparent in cells expressing lower levels of E1. To investigate this possibility, we made use of an E1 mutant carrying a defective cyclin-binding motif (CBM). This mutant accumulates only at low levels in the nucleus because it is subject to rapid Crm1-dependent nuclear export (23). As anticipated, we observed that the activation of γ H2AX was poorly visible in CBM-expressing cells at a magnification 20X by fluorescence microscopy (Fig. 4.7A). Interestingly, at 63X magnification, we were able to see that low levels of γ H2AX was activated and localized to discrete nuclear foci in these cells (Fig. 4.7B). This was in contrast to the high levels of γ H2AX observed at 20X and the pan-nuclear staining observed at 63X in cells expressing wild type E1 (Fig. 4.7 A-B). Furthermore, we determined that increasing the amounts of the E1 CBM mutant in the nucleus, by treatment of the cells with leptomycin B to inhibit its Crm1-dependent nuclear export, resulted in pan-nuclear γ H2AX staining (Fig. 4.7A-B). These results indicate that the levels of nuclear E1 affect the pattern of γ H2AX staining in cells, and suggest that γ H2AX first accumulate

in discrete foci and later progresses to pan-nuclear staining as the amount of nuclear E1 increases. Furthermore, the accumulation of γ H2AX into discrete nuclear foci raises the possibility that E1 induces a DDR by creating DSB in the host genome (see Discussion).

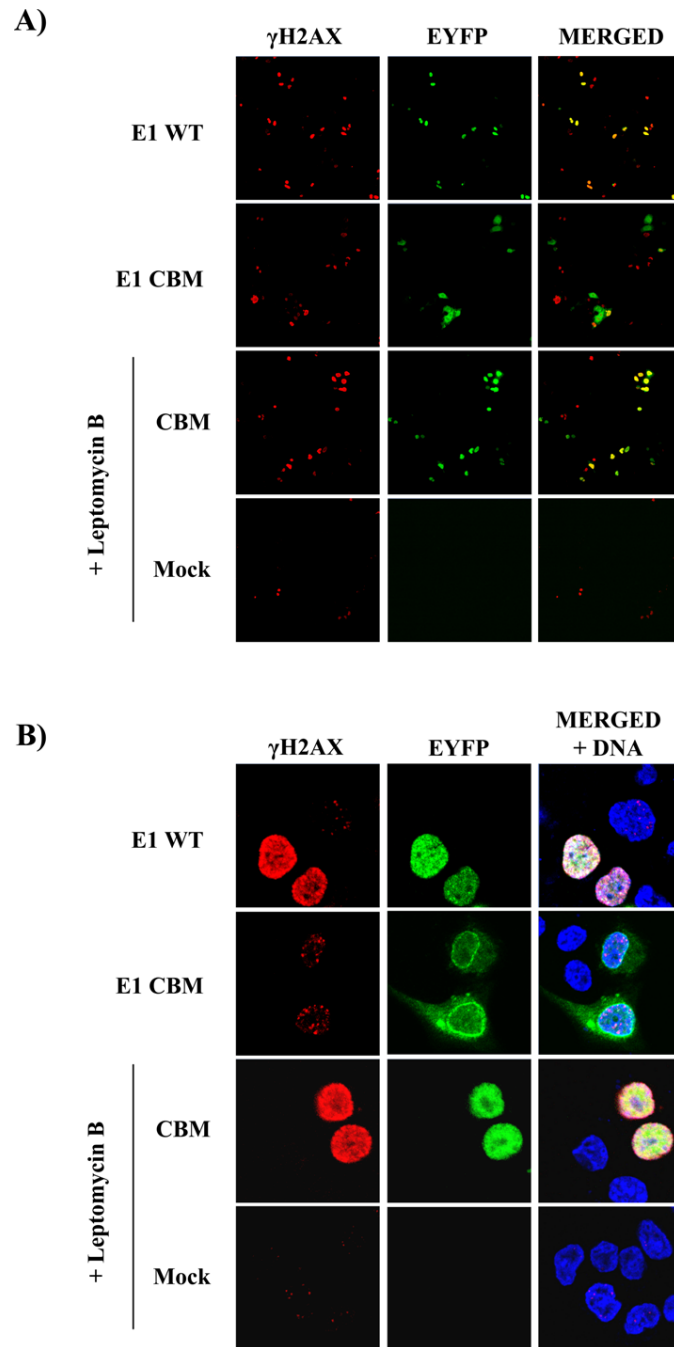


Figure 4.7. γ H2AX staining is punctuated in cells that accumulate low levels of E1 in their nucleus.

The activation of γ H2AX in cells transiently expressing EYFP-E1, either wild type (WT) or a cyclin-binding motif mutant derivative (CBM) was analyzed by microscopy 24 h post-transfection. Where indicated, the E1 CBM-expressing cells were treated with 7.5 ng/ml of leptomycin B (LMB) for 4 hours. Analysis of the γ H2AX staining was performed at a magnification of (A) 20X and (B) 63X.

4.3.4.8 The E1-induced DDR is attenuated by E2.

The results presented so far indicate that E1 expression triggers a robust DDR. To test if a similar DDR would be induced under viral DNA replication conditions, we investigated if E2, with or without a plasmid containing the viral origin (ori), had any effect on the levels of γ H2AX induced by EYFP-E1. First, we confirmed that the levels of γ H2AX could be accurately measured by flow cytometry. As can be seen in Fig. 4.8 (top row), the amounts of γ H2AX were found to be 2.7 fold higher in cells expressing low-levels of E1 than in control cells (EYFP-E1 negative cells of the same transfected cell population) and up to 7.6 fold higher in those expressing high levels of E1. These results confirmed that the levels of γ H2AX increase as a function of E1 expression. Furthermore, this effect was specific to wild type E1 as only low levels of γ H2AX were detected in cells expressing the E1 NES/ATPase mutant protein (Fig. 4.8, second row). We then used this method to quantify the effect of E2 and the viral origin on E1-induced γ H2AX activation. Specifically, we co-transfected C33A cells with a vector expressing EYFP-E1 with or without a plasmid encoding E2 and one containing the origin, in the same ratios as those used in our standard transient DNA replication assay. We also co-transfected increasing amounts of E2, or E2 plus the origin, at levels 2-, 4- and 8-fold higher than those used in the DNA replication assay in order to favor complex formation between E1 and E2. Only the results obtained under standard replication conditions (1X) and those obtained with an 8-fold excess (8X) of E2 in presence or absence of the origin are presented in Fig. 4.8.

These experiments revealed that the E1-induced activation of γ H2AX decreased as a function of the amount of E2 and origin transfected (Compare 1X and 8X in Fig. 4.8). At 8X E2 and ori, the activation of γ H2AX was reduced close to background levels, even in cells expressing high levels of EYFP-E1. Results obtained with intermediate amounts of E2 (2X and 4X) indicated that its inhibitory effect on γ H2AX induction was dose-dependent (data not shown). E1-induced γ H2AX levels were decreased by E2 alone, in absence of the origin, but not by the origin alone (Fig. 4.8). This effect of E2 was found to be dependent of its interaction with E1 as it was diminished by the E39Q substitution in E2 which reduces its ability to interact with E1 and to support transient DNA replication by approximately 50-60%, under our standard assay conditions ((24) and data not shown). Finally, we confirmed by confocal microscopy that the induction by E1 of pChk2, a downstream effector of the ATM pathway, is also attenuated by E2 (data not shown). Collectively, the aforementioned results indicate that E2 significantly reduces, but does not completely eliminate, the E1-induced DDR.

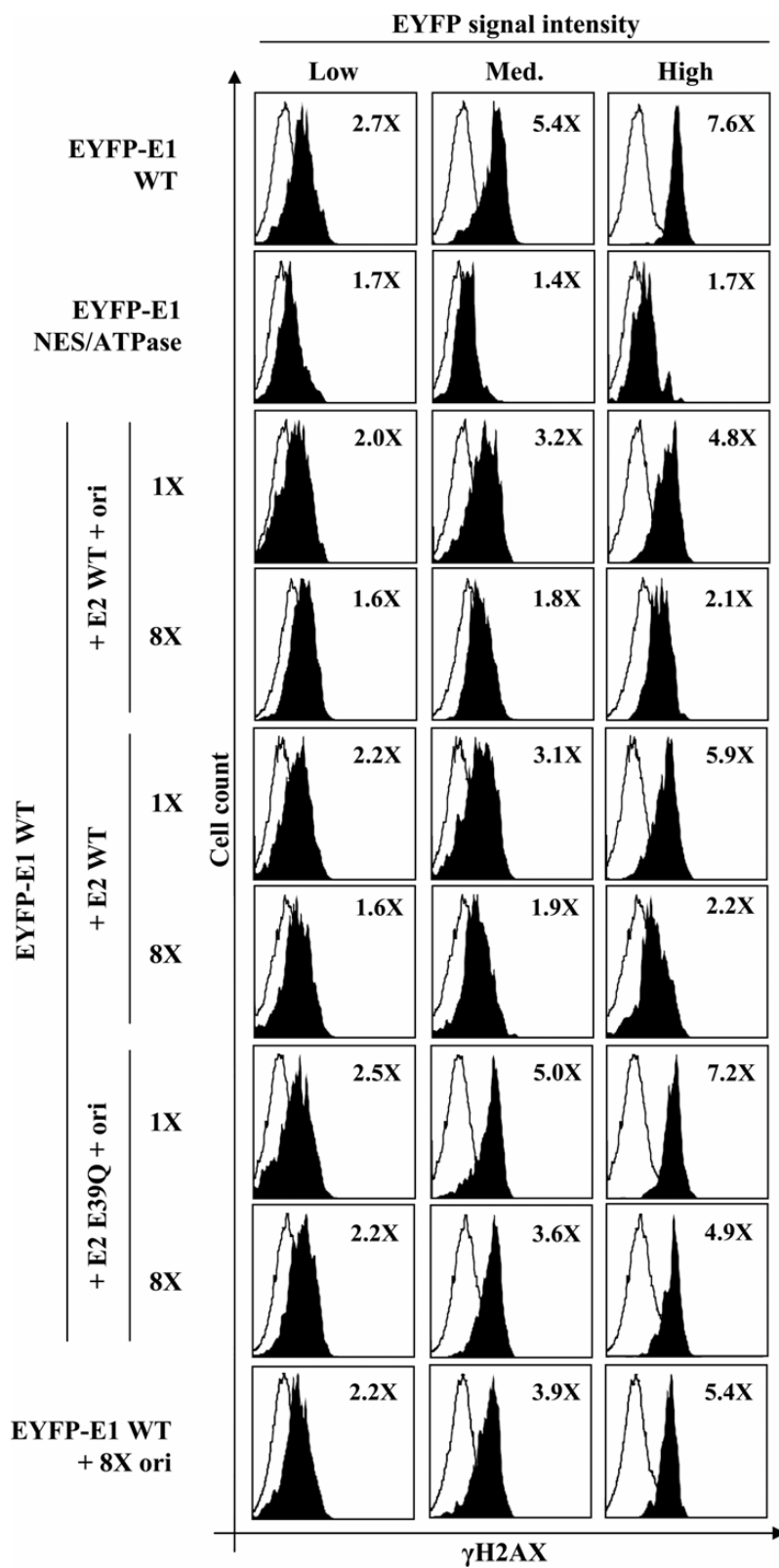


Figure 4.8. E2 and the viral origin reduce the E1-induced DDR.

γ H2AX levels in cells transiently expressing wild type EYFP-E1 or the NES/ATPase mutant derivative, with or without E2, and containing or lacking the viral origin, as indicated. γ H2AX levels were quantified by flow cytometry. For each sample, γ H2AX levels were determined as a function of EYFP-E1 expression (low, medium or high EYFP-E1 expressing cells; filled histograms) and the non-EYFP-expressing cells of the same cell population were used as an internal control (opened histograms). For each condition, the fold increase in γ H2AX activation is indicated in the upper right corner and was obtained by dividing the average value of activation measured for the EYFP-E1 positive cells by that of the controls cells.

4.3.4.9 Cells expressing E1 and E2 are arrested in very early S-phase.

The finding that E2 attenuates the E1-induced DDR prompted us to investigate if it could also alleviate the S-phase arrest caused by E1. To do so, we performed the same experiments as above with a gradient of E2, with or without the origin, but this time monitored both cell cycle progression and DNA synthesis. Cells were transfected with E1 and increasing amounts of E2 or E2 plus ori and, 24 h later, tested for their ability to carry out DNA synthesis using a one-hour pulse with BrdU. BrdU incorporation was then plotted as a function of the cell cycle as previously described (Fig. 4.5C) and the percentage of cells in G1, S and G2 quantified using the gates shown for the mock transfected cells in Fig. 4.9A. Quantification was performed on cells transfected with 1X and 8X E2 (Fig. 4.9A), with or without the ori, and numbers obtained are presented in the histogram of Fig. 4.9B (upper panel). From this analysis, we determined that E2, but not the origin alone, lead to a dose-dependent accumulation of E1-expressing cells in G1 (blue arrow in Fig. 4.9B) and a concomitant decrease of cells in S-phase (red arrow). Note that we show in the following section that cells expressing E1 and increasing amounts of E2 can still replicate the ori-containing plasmid, indicating that they are in S-phase rather than in G1. Given this result and the fact that the flow cytometry analysis cannot distinguish between cells in G1

from those in very early S, it is likely that cells expressing E1 and E2 are arrested very early in S-phase, close to the G1/S boundary, rather than in G1 per se. In similar experiments, we found that the ability of E1 and E2 to cause cell cycle arrest in G1/very early S was slightly enhanced in the presence of the origin and, importantly, that it was not observed with the E39Q E2 mutant (Fig. 4.9B). This last result suggested that cell cycle arrest in G1/very early S-phase is dependent on complex formation between E1 and E2 and, by inference, that it is not caused by E2 alone. To substantiate the notion that E2 is not sufficient to cause this cell cycle arrest, we determined the effect of wild type E2 in cells expressing an E1 NES/ATPase mutant that does not interfere with cell cycle progression. As anticipated, only 10% of the cells expressing E2 and the mutant E1 accumulated in G1 (Suppl. Fig. 4.7 and Fig. 4.9B lower panel). Importantly and in contrast to the results obtained with wild type E1, this weak cell cycle inhibitory effect was also observed with E39Q E2 (Fig. 4.9B), suggesting that it was independent of complex formation between E1 and E2. From these results, we conclude that E2 only has a modest effect on cell cycle progression, a result supported by the observation that it does not prevent cellular proliferation in a colony formation assay (Fig. 4.9C). Collectively, the results presented above indicate that complex formation between E1 and E2 causes cells to arrest in G1/very early S. The evidence supporting the hypothesis that E1- and E2-expressing cells are arrested in very early S, rather than in G1, is presented below.

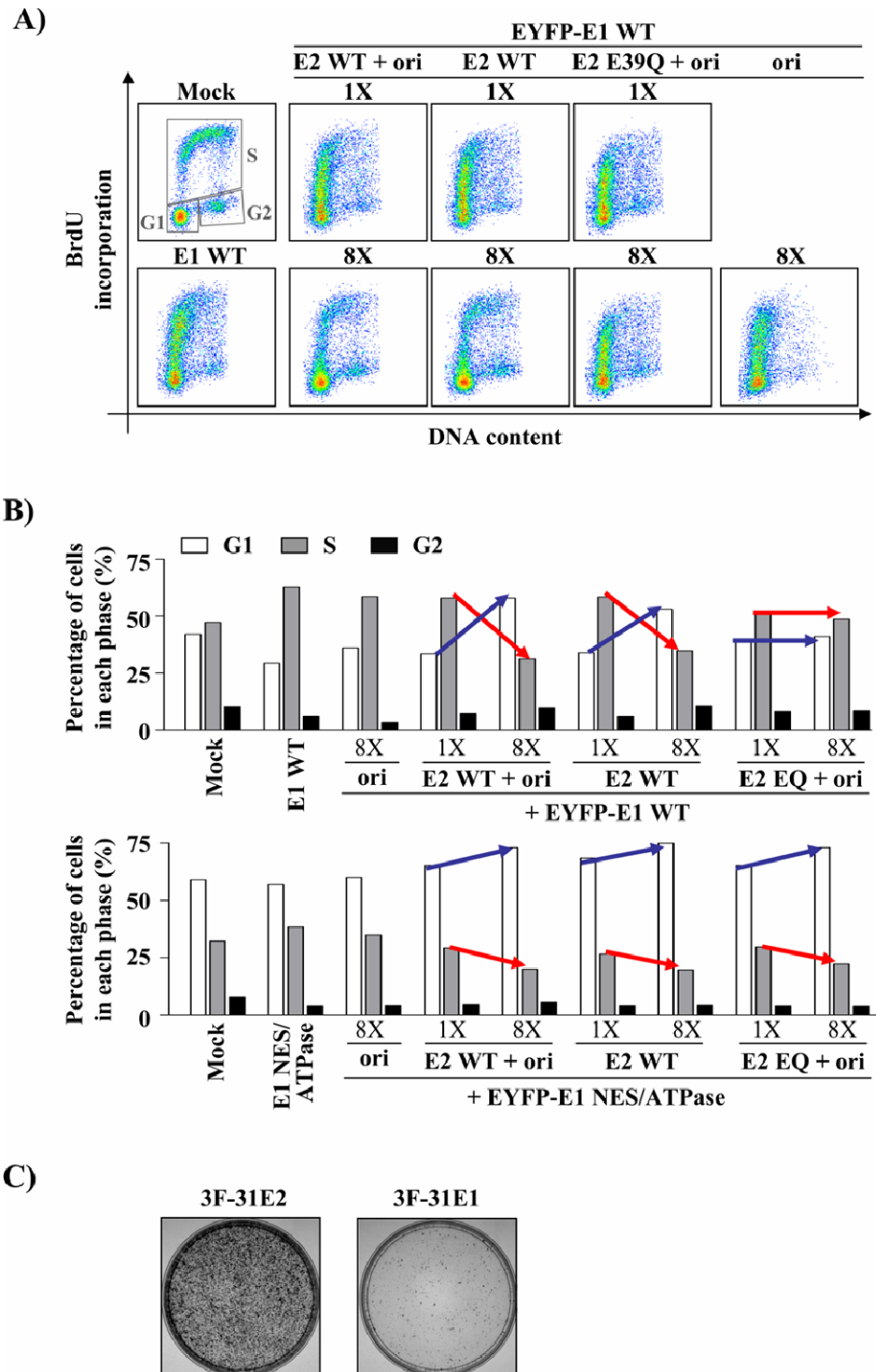


Figure 4.9. E2 and the viral origin modulate the cell cycle arrest induced by E1.

Scatter plots representing the levels of BrdU incorporated in EYFP-E1 expressing cells throughout the cell cycle. BrdU incorporation and DNA content of cells transiently expressing EYFP-E1, with or without E2, and containing or lacking the viral origin, as indicated, were determined by flow cytometry. (A) Scatter plots obtained with cells transfected with a wild type E1 expression vector, either alone or together with two different amounts (1X and 8X) of wild type or E39Q E2 expression vector and the origin, as indicated. (B) Proportion of cells in G1, S and G2 were quantified from the samples shown in (A) and those shown in Suppl. Fig. 4.7 (transfected with an EYFP-E1 NES/ATPase mutant expression plasmid). Gates showed in the Mock transfected sample were used to quantify the cell cycle distribution of each sample and the results reported in a histogram. Results obtained with cells expressing EYFP-E1 are shown in the upper panel while those obtained with cells expressing the NES/ATPase mutant E1 are shown in the lower panel. The blue and the red arrows highlight the concomitant changes in the proportion of cells in G1 and S-phase cells, respectively, brought about by the increased amounts of E2 with or without the origin. (C) CFA performed with 3F-HPV31 E2 or with 3F-HPV31 E1 expression vectors. Cells were selected in G418-containing medium before staining.

4.3.4.10 Transient HPV DNA replication neither requires nor is affected by a DDR.

The results presented in Fig. 4.9 indicated that E2, when expressed in high amounts, reduces the DDR caused by E1 to almost background levels and causes an accumulation of E1-expressing cells in G1/very early S-phase. To determine if these effects would impinge on viral DNA replication, we set out to test the effect of increasing amounts of E2 and the origin on E1-catalyzed DNA replication, using our luciferase assay. First, we used confocal fluorescence microscopy to examine the intracellular localization of EYFP-E1 under our standard DNA replication assay conditions or in the presence of an 8-fold excess of E2 and the origin. Under standard conditions, we confirmed that E1 is localized primarily into large nuclear foci (Fig. 4.10A), as previously reported (23, 79). When E2 and the ori were present in excess, EYFP-E1 was still localized into nuclear foci but of a smaller size. Whether these smaller foci form in G1 and become larger during S-phase is currently under

investigation, Importantly, we confirmed that γ H2AX was strongly induced under standard DNA replication conditions and significantly reduced in presence of excess E2 and ori, as anticipated from the flow cytometry quantification showed in Fig. 4.8. Interestingly, we noted that part of the remaining γ H2AX signal observed at 8X was localized within these foci (Fig. 4.10A). Next, we performed the luciferase DNA replication assay in cells transfected with a constant and limiting amount of EYFP-E1 and a 1-, 2-, 4- or 8-fold excess of E2 and the ori. As controls, the same conditions were used in absence of E2 to prevent DNA replication. As expected, these control transfections gave rise to increasingly higher Fluc/Rluc ratios proportional to the amount of transfected ori-plasmid (which contains the CMV-Fluc reporter gene) but they did not increased at 48 and 72 h post-transfection confirming the lack of replication (Fig. 4.10B, No E2). In contrast, the levels of transient DNA replication in cells expressing E1 and E2 constantly increased over time, even in presence of an excess of E2 and ori (Fig. 4.10B, E2 WT). Thus, viral DNA replication can take place in E1-expressing cells containing an excess of E2 and ori, indicating that these cells must be in very early S-phase rather than late G1 and, furthermore, that viral DNA replication occurs independently of a robust DDR (which is attenuated by high concentrations of E2). To ascertain the latter suggestion, we tested the effect of an ATM inhibitor (KU-55933) and of a Chk2 inhibitor (Chk2 Inhibitor II) on transient DNA replication. Neither inhibitor had a dramatic effect on HPV DNA replication, at concentrations up to 10 μ M, in contrast to the nucleotide analog gemcitabine, which was used as a positive control (Fig. 4.10C). Collectively, these findings indicate that HPV DNA replication not only occurs independently of a DDR (at high concentrations of E2 and ori) but, remarkably, that it remains unabated in the face of a DDR and checkpoint response (at low concentrations of E2 and ori), as demonstrated recently by King et al. (39).

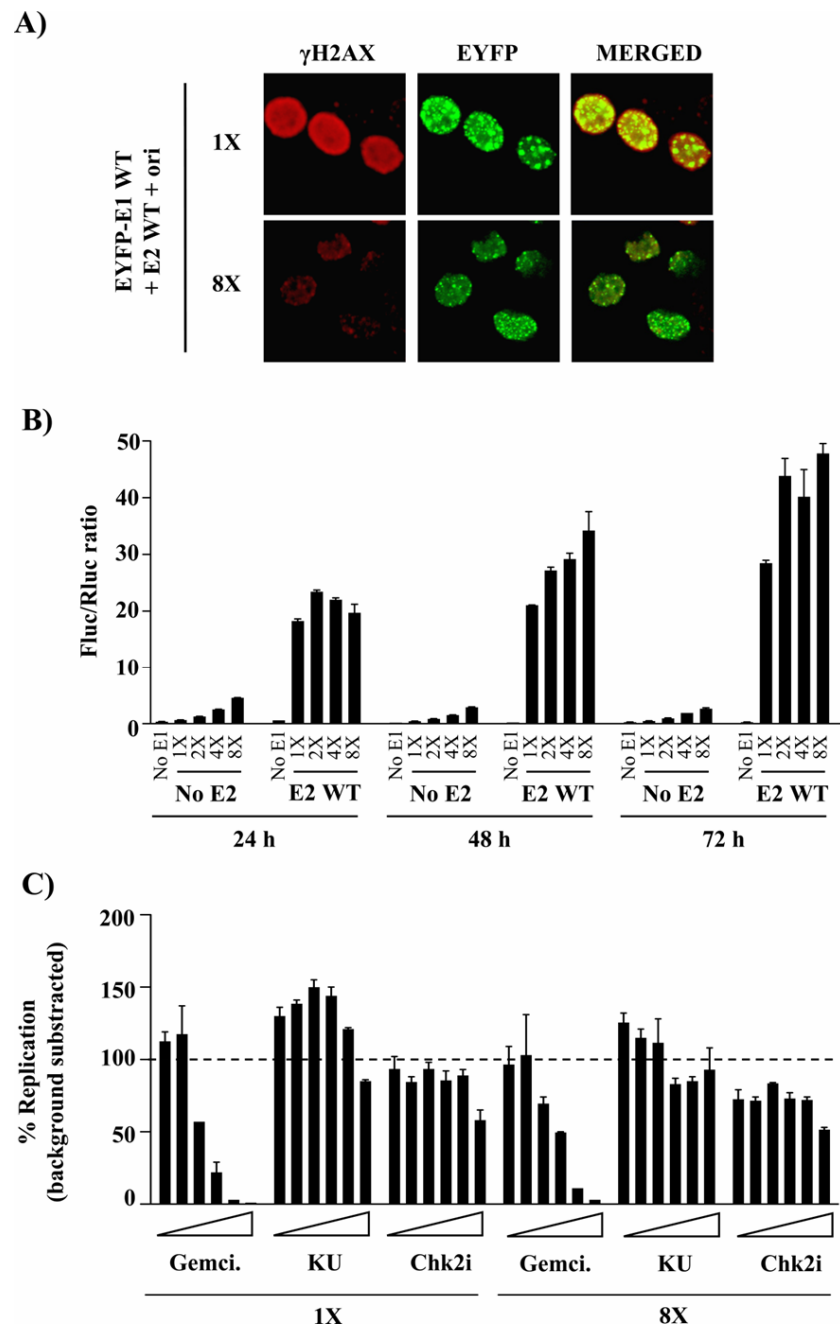


Figure 4.10. Effect of increasing amounts of E2 and the origin on E1-catalyzed DNA replication.

(A) Activation of γ H2AX in cells transfected with an EYFP-E1 expression plasmid and two different amounts (1X and 8X) of wild type E2 expression vector plus the origin.

Twenty four hours post-transfection, E1-expressing cells were fixed, stained for γ H2AX, mounted, and visualized by 40X fluorescence confocal microscopy. (B) Transient DNA replication activity of E1 in presence of increasing amounts of E2 and the origin. DNA replication activity of EYFP-E1 was determined 24, 48 and 72 h post-transfection. Cells were transfected with 5 ng of EYFP-E1 expression plasmid and increasing amounts of wild type E2 expression vector plus the origin (E2 WT), as indicated (1X, 2X, 4X and 8X). Background signal was measured in absence of E2 (5 ng of E1 and increasing amounts of ori-plasmid) (No E2) or in absence of E1 (No E1). Replication activities are reported as Fluc/Rluc ratios (left panel) or as the same ratios for which the background signal was subtracted (right panel). (C) Effects of ATM pathway inhibitors on viral DNA replication. Transient HPV DNA replication assays were performed under standard condition (1X) or in presence of an excess of E2 and the origin (8X). The ATM inhibitor KU-55933 (KU) and the Chk2 inhibitor II (Chk2i) were tested at increasing concentrations ranging from 0.156 to 10 μ M. Gemcitabine (Gemci., from 1.56 to 100 nM) and 0.1% DMSO were used as positive and negative controls, respectively. DNA replication levels (Fluc/Rluc ratios) from which background signals were subtracted are reported as a percentage of the activity measured in the presence of DMSO, which was set at 100%.

4.3.4.11 Keratinocytes expressing an NES-defective E1 mutant genome show increased levels of γ H2AX.

We previously reported that human keratinocytes immortalized with a mutant HPV31 genome encoding an NES-defective E1 is poorly maintained as an episome and is gradually lost upon cellular division (i.e. upon several cell passages). This and other results, including those presented herein, led us to suggest that nuclear accumulation/retention of E1 is detrimental to cell proliferation. As we show here that this anti-proliferative effect of E1 is accompanied by a DDR, we set out to determine if a similar DDR was induced in keratinocytes containing the E1 NES mutant genome. To do so, we compared the levels of γ H2AX in keratinocytes immortalized with the mutant genome or wild type HPV31, using immortalized cells at an early passage in which the E1 NES mutant genomes is still

maintained as an episome, albeit in lower amounts (23). As can be seen in Fig. 4.11, higher levels of γ H2AX were indeed induced by the E1 NES mutant as compared to wild type, thus confirming that high levels of E1 in the nucleus is sufficient to induce a DDR.

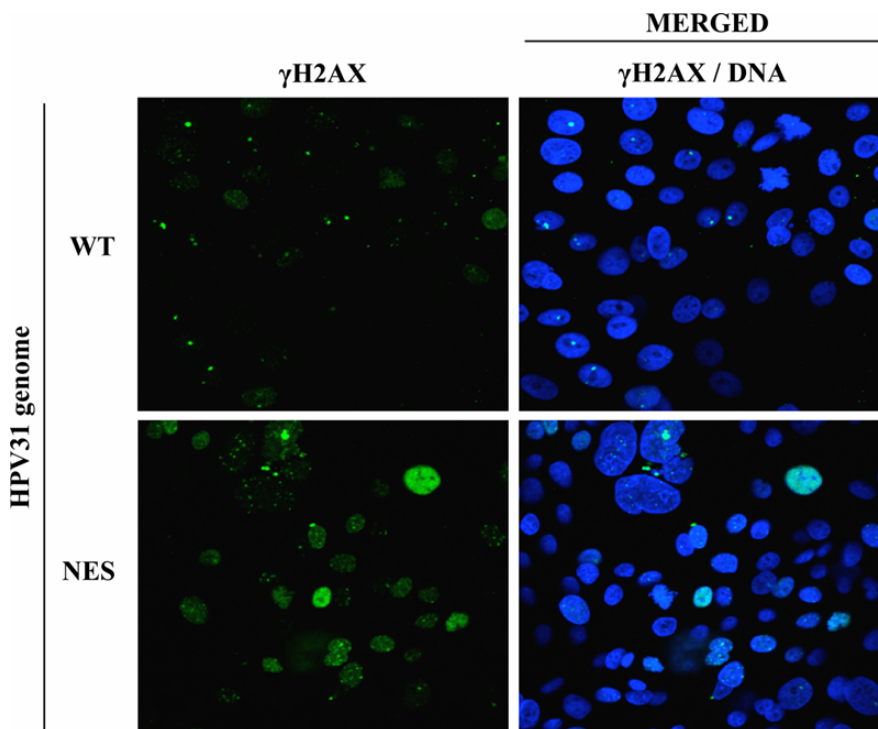


Figure 4.11. γ H2AX activation in keratinocytes immortalized with a wild type or E1 NES mutant genome.

Early passage keratinocytes immortalized with the indicated HPV31 genome were fixed and stained with an antibody against γ H2AX. Nuclei (DNA) were stained with DAPI.

4.3.5 Discussion

In this study, we report that the anti-proliferative activity of E1 is conserved in HPV11, -31, -16 and in BPV and that it requires the origin-binding and ATPase activities of the protein. We provide evidence that E1 induces a cell cycle arrest independently of the viral oncogenes E6 and E7, as the block was also detected in HeLa cells, and independently of p53, since it was observed in cells that express either wild type (U2OS) or the R275C

mutant p53 (C33A) (15, 16). Furthermore, we show that the arrest takes place during the early events of S-phase, when BrdU is incorporated to DNA and PCNA has not yet assembled into large foci. Interestingly, this arrest is accompanied by the induction of a DDR and the activation of the ATM pathway since E1-expressing cells exhibit elevated levels of γ H2AX, pATM ser1981 and pChk2 thr68. We also show that complex formation between E1 and E2 reduces the levels of γ H2AX induced by E1 and leads to a redistribution of E1-expressing cells to an earlier part of S-phase, close to the G1/S boundary. Importantly, we present evidence that transient viral DNA replication is neither affected by nor is dependent on a DDR. The biological significance of these findings is highlighted by the observation that keratinocytes immortalized with an HPV31 genome encoding an NES mutant E1 show drastically higher levels of γ H2AX than cells maintaining a wild type episome, suggesting that nuclear export of E1 is indeed required to alleviate the activation of a DDR in infected cells.

4.3.5.1 Induction of a cell cycle arrest and activation of a DDR by E1.

In a recent study (23), we reported that sustained accumulation of E1 in the nucleus is detrimental to cellular proliferation. Here, we show that E1 induces a cell cycle block in early S-phase that is accompanied by the induction of a DDR and that both events require the highly conserved origin-binding and ATPase activities of E1 (11, 20, 21, 43, 48). Accordingly, we found that E1 from low-risk (-11) and high-risk (-31 and -16) HPV types, as well as from bovine papillomavirus (BPV) were all able to induce cell cycle arrest, inhibit cellular proliferation and induce a DDR (albeit to different extents (Suppl. Table 4.1)).

We previously showed that an HPV11 E1 fragment comprising the OBD and C-terminal ATPase domain is sufficient to replicate DNA in vitro, indicating that it can assemble into a functional helicase (2). In this study, the findings that an analogous fragment of HPV31 E1 has anti-proliferative activity and supports low levels of transient DNA replication raise the possibility that E1 can assemble onto host DNA and unwind it

non-specifically. This non specific unwinding activity may account for the ability of E1 to induce cell cycle arrest and a concomitant DDR. These effects appear to be specific to E1, however, as they were not observed with the related Large T antigen helicase from SV40, whose origin-binding and ATPase domains are structurally and functionally similar to those of E1 (11, 48). Indeed, we observed that Large T antigen was unable to interfere with cellular proliferation in CFA and only induced low levels of DDR markers as compared to E1 (Suppl. Fig. 4.8). One of the main differences between E1 and large T antigen is that the former has a higher non-specific DNA-binding activity, at least in vitro (unpublished results and (81, 84)). Accordingly, E1 has been reported to be capable of replicating a DNA template that does not contain the viral origin (8), indicating that it can efficiently bind and unwind non-viral DNA. These observations further support the possibility that E1 can unwind host DNA non-specifically, thus accounting for its capacity to interfere with cell cycle progression and to induce a DDR. Consistent with this hypothesis, we found that the formation of a complex between E1 and E2, which has been reported to inhibit the non-specific DNA-binding activity of E1 (8, 68, 74), greatly reduces its capacity to induce a DDR (Fig. 4.8). On the other hand, the inability of E2 and the origin to relieve the cell cycle block induced by E1 and restore cellular proliferation suggest that the non-specific DNA-binding/unwinding activity of E1 is not sufficient to induce cell cycle arrest, although we cannot rule out the possibility that E2 does not completely eliminate the non-specific activity of E1. Regardless, the finding that E2 is unable to prevent the deleterious effect of E1 on cellular proliferation, despite being able to greatly reduce the levels of γ H2AX and pChk2, strongly suggests that the anti-proliferative effect of E1 is independent of a robust DDR (Fig. 4.8 and 4.9). Accordingly, we observed in CFAs that E1 can inhibit the proliferation of ATM-deficient cells (Suppl. Fig. 4.9) and, furthermore, that E1 can still arrest cell cycle progression in S-phase in C33A cells treated with ATM or Chk2 inhibitors (KU-55933 and Chk2i) (data not shown). Thus, the cell cycle arrest induced by E1 is independent of the activation of the ATM kinase.

4.3.5.2 Possible mechanisms by which E1 blocks cell cycle progression.

Although the exact mechanism by which E1 interferes with cell cycle progression remains unknown, several hypotheses can be drawn from the existing literature. For instance, the depletion of cellular DNA replication factors or of components of the origin firing machinery by siRNA has been shown to arrest the progression of the cell cycle in S-phase (52, 56, 80, 90). Given that the OBD and ATPase domain of E1, which are required to induce cell cycle arrest, have been reported to interact with the polymerase α -primase, topoisomerase I and RPA (reviewed in (78)), it is possible that E1, by competing for these factors, makes them unavailable for host DNA synthesis. Alternatively or in addition, E1 may also interfere with the firing of host origins in early S-phase, as previously reported for the Rep78 helicase from adeno-associated virus (AAV) (7). Rep78 has been suggested to interfere with cell cycle progression by interacting with Cdc25A and inhibiting its phosphatase activity, which is required for the firing of origins (7, 67). Noteworthy, Rep78 also induces a DDR which, similarly to what we observed with E1, is not sufficient to block cell cycle progression. However, if Cdc25A was inactivated by E1, we would anticipate that Cdk2, a well characterized Cdc25A substrate, would also be inactive and thus unable to phosphorylate E1 and prevent its nuclear export. The finding that E1 is nuclear in E1-arrested cells indicates that it has been phosphorylated by Cdk2 and, we surmise, that Cdc25A must be active in these cells. Therefore, while it is possible that E1 sequesters Cdc25A away from the origin firing complexes, it unlikely inhibits its phosphatase activity. Whether E1 interacts with Cdc25A or other proteins such as CDC45 and Dbf4/cdc7 (reviewed in (67)), which are also required for the firing of host origins, remains to be investigated.

4.3.5.3 Possible mechanisms by which E1 induces a DDR.

We have shown that activation of γ H2AX occurs soon after the expression of E1 and can be prevented by high concentrations of E2. Typically, the activation of γ H2AX and the subsequent activation of the ATM pathway is triggered by double-stranded breaks

(DSBs) in the host DNA and by the activation of cell cycle checkpoints (reviewed in (4)). As our results demonstrate, induction of a DDR is dependent of the origin-binding and ATPase activities of E1 and can be reduced by E2, consistent with the non-specific unwinding of host DNA by E1 being a source of DSBs. In addition to causing DSBs, it is possible that E1 triggers a DDR by interacting directly with components of the DNA repair machinery, such as the MRN complex whose Mre11, Rad50 and Nbs1 subunits colocalize with HPV18 and -11 E1 in cells ((35) and Thomas Broker, personal communication). Indeed, it has recently been shown that the tethering of these proteins to DNA is sufficient to induce a DDR in absence of DSB (72). Activation of γ H2AX into defined nuclear foci is considered a hallmark of DSBs whereas its pan-nuclear activation has been associated with apoptosis during S-phase (17). Our results with an E1 CBM mutant suggest that both phenomena can happen in E1-expressing cells, depending on the nuclear levels of E1. Indeed, we found that in cells expressing the E1 CBM mutant, which accumulates only at low levels in the nucleus and does not arrest cell cycle progression (23), γ H2AX is localized in discrete nuclear foci. Furthermore, when the nuclear accumulation of this E1 mutant was increased by inhibiting its nuclear export using leptomycin B (LMB), or by inhibiting its NES, γ H2AX staining became pan-nuclear (Fig. 4.7 and data not shown). On the basis of these observations, we propose that the accumulation of γ H2AX into nuclear foci results from the induction of DSB by E1 and, furthermore, that its pan-nuclear distribution triggered by higher E1 concentrations arises from the accumulation of such foci combined with the cells being permanently arrested in S-phase, and possibly undergoing apoptosis.

4.3.5.4 Activation of an ATM-dependent DDR is not required for the replication activity of E1.

An ATM-dependent DDR is activated by many double-stranded DNA viruses, for different reasons. For example, similarly to HPV, Epstein-Barr Virus (EBV) activates the ATM pathway but does not rely on its activation to replicate its genome (41). In contrast, the activation of ATM is required for the phosphorylation of SV40 large T antigen and for

the efficient replication of viral DNA (70). Kadaja et al (35, 37) reported that replication of integrated HPV genomes by E1 and E2 leads to the induction of the ATM pathway and, to a lesser extent, of the ATR pathway and to the recruitment of ATM, Chk2, ATRIP, pChk1, Ku70/80 and of the MRN complex at these integration sites. In this study, we show that E1 is sufficient to activate the ATM pathway and that viral DNA replication does not require its activation. Importantly, we show that HPV DNA replication still occurs in presence of a DDR, a finding that is in agreement with the recent study of King et al. (39) which showed that replication of a HPV origin-containing plasmid by E1 and E2 from HPV11 and -16 is not affected by treatment of the cells with 50 μ M of etoposide during 24 h. Finally, our observation that HPV DNA replication can occur independently of the activation of the ATM pathway is consistent with the previous observation by one of groups (C.A.M and L.A.L) that maintenance of the HPV31 episome in immortalized keratinocytes is unaffected by the ATM inhibitor KU-55933 (54). In this same study, it was found that despite being unnecessary for genome maintenance, the ATM pathway is required for amplification of the viral episome in differentiated keratinocytes, in part to induce the activity of caspase-3/7 and proteolytic cleavage of the N-terminal domain of E1 (53, 54). This study also showed that activation of the ATM-dependent DDR in differentiating keratinocytes immortalized with the HPV31 genome was dependent on E6 and E7, suggesting that viral oncogenes contribute significantly to the activation of this pathway during amplification of the viral genome (54).

Although our first observation that nuclear accumulation of E1 leads to the activation of a DDR was made in transfected cells under conditions where E1 is expressed at high levels, a similar DDR activation was observed in immortalized keratinocytes expressing an NES mutant E1 from the HPV31 episome. As such, these results suggest that the accumulation of E1 in the nucleus of infected cells is sufficient to induce a DDR. As nuclear accumulation of E1 has been shown to be detrimental to cellular proliferation, our findings are consistent with a model where sustained accumulation of E1 in the nucleus induces an S-phase arrest which, in turn, induces apoptosis (pan-nuclear γ H2AX).

Consistent with this model, Jolly et al. recently reported that leptomycin B, which inhibits the Crm1-exportin pathway essential for the nuclear export of E1 (23), increases apoptosis in a cell line maintaining the HPV16 episome (34).

Collectively, our study suggests that both the nuclear accumulation and the non-specific unwinding activity of E1 need to be tightly regulated by the nuclear export of E1 and by its interaction with E2, respectively, in order to avoid the premature activation of the ATM pathway in undifferentiated keratinocytes. Our results are consistent with a model where cell cycle arrest and induction of a DDR would be prevented during the episomal maintenance phase of the viral life cycle in undifferentiated keratinocytes but both required for the amplification of the viral genome in the upper layers of the epithelium. Failure to adequately control the nuclear accumulation and activity of E1 in the lower layers of an infected epithelium may lead to the induction of undesired DNA breaks in the host genome that are recombinogenic and could favor integration of the viral genome. Thus, failure to properly regulate the nuclear accumulation and activity of E1 may be a more important contributor to HPV-induced carcinogenesis than previously suspected.

4.3.6 Acknowledgements

We thank Nozomi Sakakibara and Allison McBride for sharing 713 data before publication and all members of the Archambault laboratory for critical reading of the manuscript and for helpful discussions. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research and from the National Cancer Institute to J.A and L.A.L, respectively. A.F.-T. and M.L. hold a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), respectively. CAM is supported by a K99 Pathway to Independence Award from the National Cancer Institute.

4.3.7 References

1. Abbate, E. A., J. M. Berger, and M. R. Botchan. 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 18:1981-1996.
2. 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* 272:137-50.
3. 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* 325:70-3.
4. Bartek, J., and J. Lukas. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13:738-47.
5. Bartek, J., and J. Lukas. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 490:117-22.
6. Bernard, H. U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, 736 H. Hausen, and E. M. de Villiers. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70-9.
7. Berthet, C., K. Raj, P. Saudan, and P. Beard. 2005. How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13634-9.
8. Bonne-Andrea, C., F. Tillier, G. D. McShan, V. G. Wilson, and P. Clertant. 1997. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J.Virol.* 71:6805-6815.

9. Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D. J. Chen. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-7.
10. Chow, L. T., and Broker, R. 1997. Small DNA tumor viruses. In *Viral pathogenesis*. N. Nathanson (ed.) pp. 267-301, Philadelphia: Lippencott-Raven Publ.
11. Clertant, P., and I. Seif. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 311:276-9.
12. 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.
13. 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.
14. 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 759 repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J Virol* 82:1271-83.
15. Crook, T., D. Wrede, J. A. Tidy, W. P. Mason, D. J. Evans, and K. H. Vousden. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with humanpapillomavirus-negative tumours. *Lancet* 339:1070-3.
16. Crook, T., D. Wrede, and K. H. Vousden. 1991. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 6:873-5.

17. de Feraudy, S., I. Revet, V. Bezrookove, L. Feeney, and J. E. Cleaver. 2010. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6870-5.
18. de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
19. 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* 78:13954-65.
20. Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. Stenlund, and L. Joshua-Tor. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell* 6:149-58.
21. Enemark, E. J., and L. Joshua-Tor. 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* 442:270-5.
22. Fradet-Turcotte, A., K. Brault, S. Titolo, P. M. Howley, and J. Archambault. 2009. Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. *Virology* 395:190-201.
23. Fradet-Turcotte, A., C. Moody, L. A. Laimins, and J. Archambault. 782 2010. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol* 84:11747-60.
24. 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.

25. 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* 91:12398-402.
26. 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.
27. Frattini, M. G., H. B. Lim, and L. A. Laimins. 1996. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3062-7.
28. Gissmann, L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldovsky, H. G. Schnurch, and H. H. zur. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:560-563.
29. 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.
30. Hebner, C. M., and L. A. Laimins. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 16:83-97.
31. Hickman, A. B., and F. Dyda. 2005. Binding and unwinding: SF3 805 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol* 15:77-85.
32. Hoffmann, R., B. Hirt, V. Bechtold, P. Beard, and K. Raj. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* 80:4431-9.

33. James, J. A., C. R. Escalante, M. Yoon-Robarts, T. A. Edwards, R. M. Linden, and A. K. Aggarwal. 2003. Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure* 11:1025-35.
34. Jolly, C. E., L. J. Gray, J. L. Parish, S. Lain, and C. S. Herrington. 2009. Leptomycin B induces apoptosis in cells containing the whole HPV 16 genome. *Int J Oncol* 35:649-56.
35. Kadaja, M., H. Isok-Paas, T. Laos, E. Ustav, and M. Ustav. 2009. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PloS Pathog* 5:e1000397.
36. Kadaja, M., T. Silla, E. Ustav, and M. Ustav. 2009. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384:360-8.
37. Kadaja, M., A. Sumerina, T. Verst, M. Ojarand, E. Ustav, and M. Ustav. 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J* 26:2180-91.
38. Kastan, M. B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-23.
39. 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.
40. Krek, W., and J. A. DeCaprio. 1995. Cell synchronization. 828 *Methods Enzymol* 254:114-24.
41. Kudoh, A., M. Fujita, L. Zhang, N. Shirata, T. Daikoku, Y. Sugaya, H. Isomura, Y. Nishiyama, and T. Tsurumi. 2005. Epstein-Barr virus lytic replication elicits

- ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* 280:8156-63.
42. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
 43. Li, D., R. Zhao, W. Lilyestrom, D. Gai, R. Zhang, J. A. DeCaprio, E. Fanning, A. Jochimiak, G. Szakonyi, and X. S. Chen. 2003. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* 423:512-8.
 44. Lin, B. Y., T. Ma, J. S. Liu, S. R. Kuo, G. Jin, T. R. Broker, J. W. Harper, and L. T. Chow. 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 275:6167-74.
 45. 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.
 46. Lusky, M., J. Hurwitz, and Y. S. Seo. 1994. The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:8895-8899.
 47. Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:382-7.
 48. Mansky, K. C., A. Batiza, and P. F. Lambert. 1997. Bovine 851 papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol* 71:7600-8.

49. 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.
50. Modesti, M., and R. Kanaar. 2001. DNA repair: spot(light)s on chromatin. *Curr Biol* 11:R229-32.
51. 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.
52. Montagnoli, A., P. Tenca, F. Sola, D. Carpani, D. Brotherton, C. Albanese, and C. Santocanale. 2004. Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells. *Cancer Res* 64:7110-6.
53. Moody, C. A., A. Fradet-Turcotte, J. Archambault, and L. A. Laimins. 2007. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19541-6.
54. Moody, C. A., and L. A. Laimins. 2009. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog* 5:e1000605.
55. Morin, G., A. Fradet-Turcotte, P. Di Lello, F. Bergeron-Labrecques, J. Omichinski, and J. Archambault. 2011. The papillomavirus E1 helicase contains intrinsically disordered domain that is required for efficient viral DNA replication. In Press.
56. Moyer, S. E., P. W. Lewis, and M. R. Botchan. 2006. 874 Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10236-41.

57. Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J.Virol.* 78:11451-11460.
58. Oguro, M., C. Suzuki-Hori, H. Nagano, Y. Mano, and S. Ikegami. 1979. The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* 97:603-7.
59. 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.
60. Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon, and W. M. Bonner. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-16.
61. Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-68.
62. 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.
63. Schermelleh, L., A. Haemmer, F. Spada, N. Rosing, D. Meilinger, U. Rothbauer, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt. 2007. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance 896 of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 35:4301-12.
64. Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez, and S. Wacholder. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer *Lancet* 370:890-907.

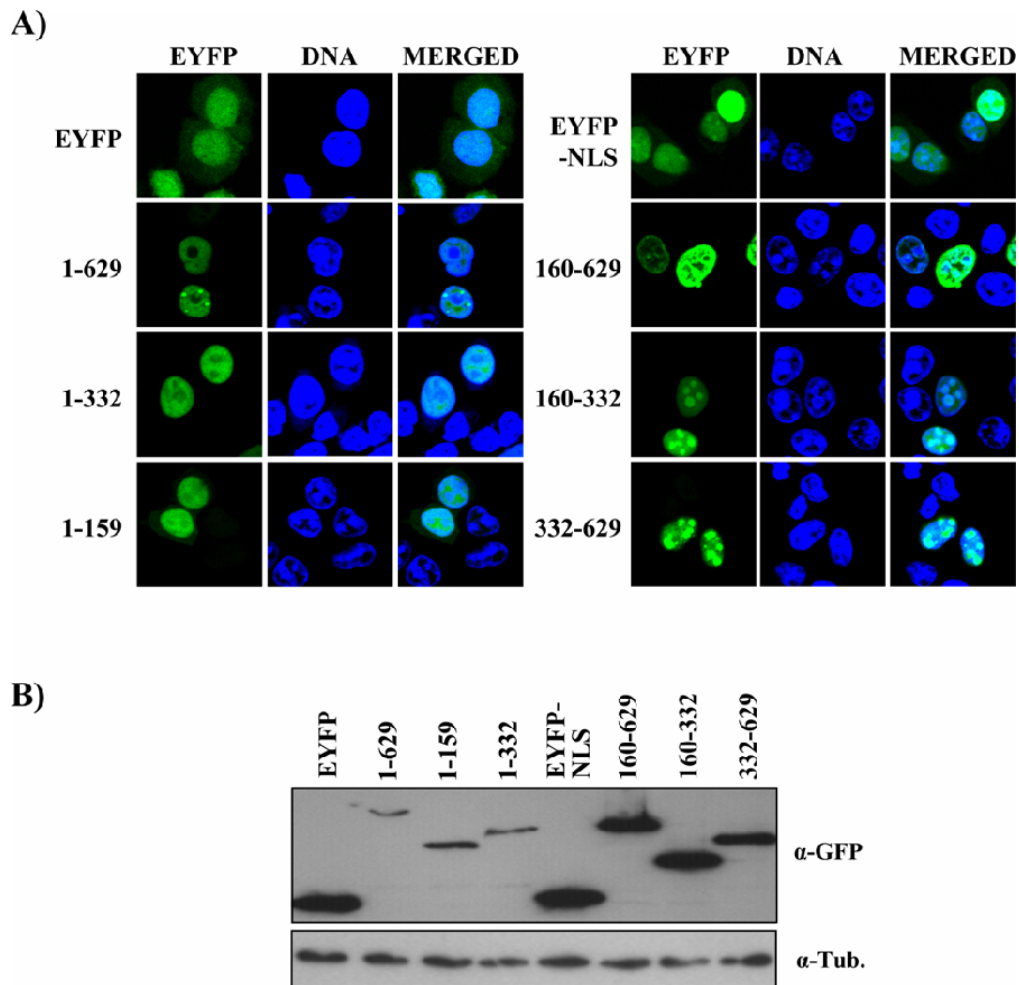
65. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Mol.Cell* 20:377-389.
66. Schuck, S., and A. Stenlund. 2005. Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* 79:8661-4.
67. Sclafani, R. A., and T. M. Holzen. 2007. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* 41:237-80.
68. Sedman, J., and A. Stenlund. 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *Embo J* 14:6218-28.
69. Sengupta, S., and C. C. Harris. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:44-55.
70. Shi, Y., G. E. Dodson, S. Shaikh, K. Rundell, and R. S. Tibbetts. 2005. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) is a T-antigen kinase that controls SV40 viral replication in vivo. *J Biol Chem* 280:40195-200.
71. Smart, D. J., H. D. Halicka, G. Schmuck, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, and G. M. Williams. 2008. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res* 641:43-7.
72. Soutoglou, E., and T. Misteli. 2008. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320:1507-10.
73. Sporbert, A., P. Domaing, H. Leonhardt, and M. C. Cardoso. 919 2005. PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting Okazaki fragment maturation proteins. *Nucleic Acids Res* 33:3521-8.

74. Stenlund, A. 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *Embo J* 22:954-63.
75. Stenlund, A. 2003. Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:777-85.
76. 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):1651-8.
77. Sun, Y. N., J. Z. Lu, and D. J. McCance. 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216:219-22.
78. Sverdrup, F., and G. Myers. 1997. The E1 proteins. In *Human papillomavirus*. G. Myers, C. Baker, K. Münger, F. Sverdrup, A. McBride and H.-U. Bernard (eds). Published by theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico. Chapter III, p.37-53.
79. 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* 73:1001-9.
80. Taricani, L., F. Shanahan, and D. Parry. 2009. Replication stress activates DNA polymerase alpha-associated Chk1. *Cell Cycle* 8:482-9.
81. Titolo, S., K. Brault, J. Majewski, P. W. White, and J. Archambault. 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77:5178-91.

82. 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.
83. 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.
84. Titolo, S., E. Welchner, P. W. White, and J. Archambault. 2003. Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy. *J.Virol.* 77:5512-5518.
85. White, P. W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M., Fazekas, M. G. Cordingley, and J. Archambault. 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J.Biol.Chem.* 276:22426-22438.
86. Wilson, V. G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24:275-290.
87. Woodman, C. B., S. I. Collins, and L. S. Young. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22.
88. Yasugi, T., M. Vidal, H. Sakai, P. M. Howley, and J. D. Benson. 1997. Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with 965 cellular proteins. *J Virol* 71:5942-51.

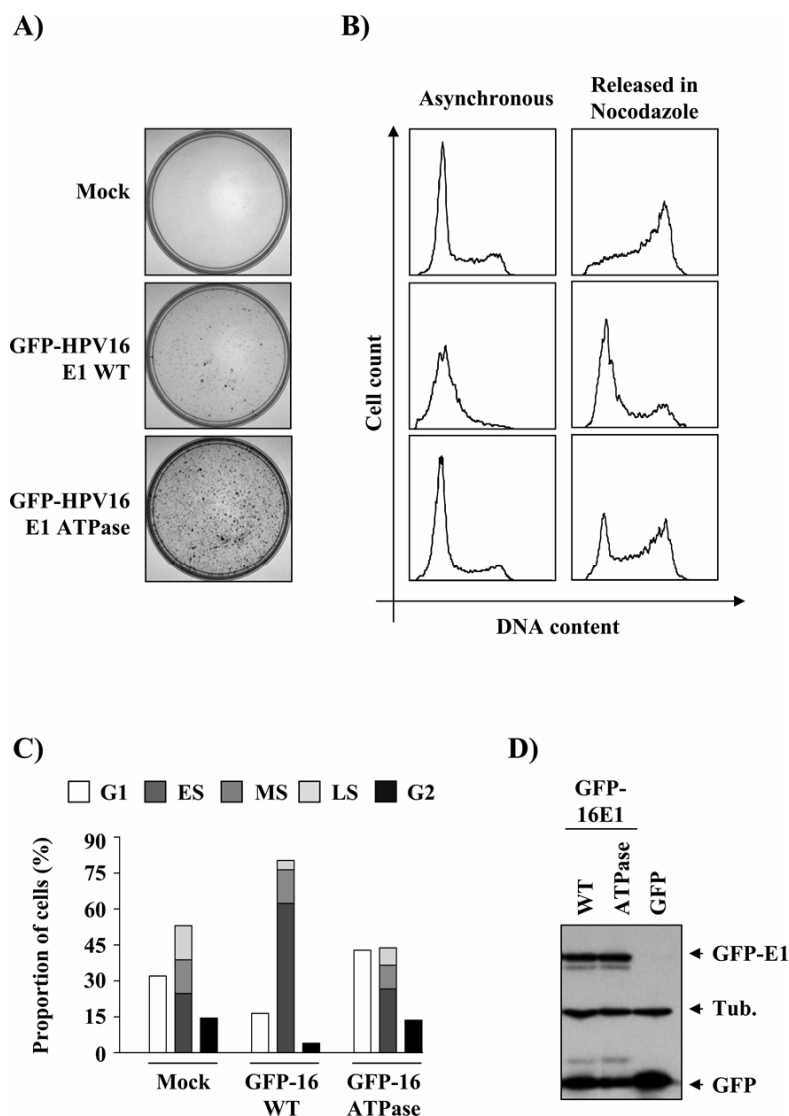
89. Yu, J. H., B. Y. Lin, W. Deng, T. R. Broker, and L. T. Chow. 2007. Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 E1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. *J Virol* 81:5066-78.
90. Zegerman, P., and J. F. Diffley. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* 467:474-8.
91. Zhou, B. B., and S. J. Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-9.
92. zur Hausen, H., and E. M. de Villiers. 1994. Human papillomaviruses. *Annu Rev. Microbiol* 48:427-47.

4.3.8 Supplementary data



Supplementary Figure 4.1. Nuclear accumulation and expression levels of E1 fragments.

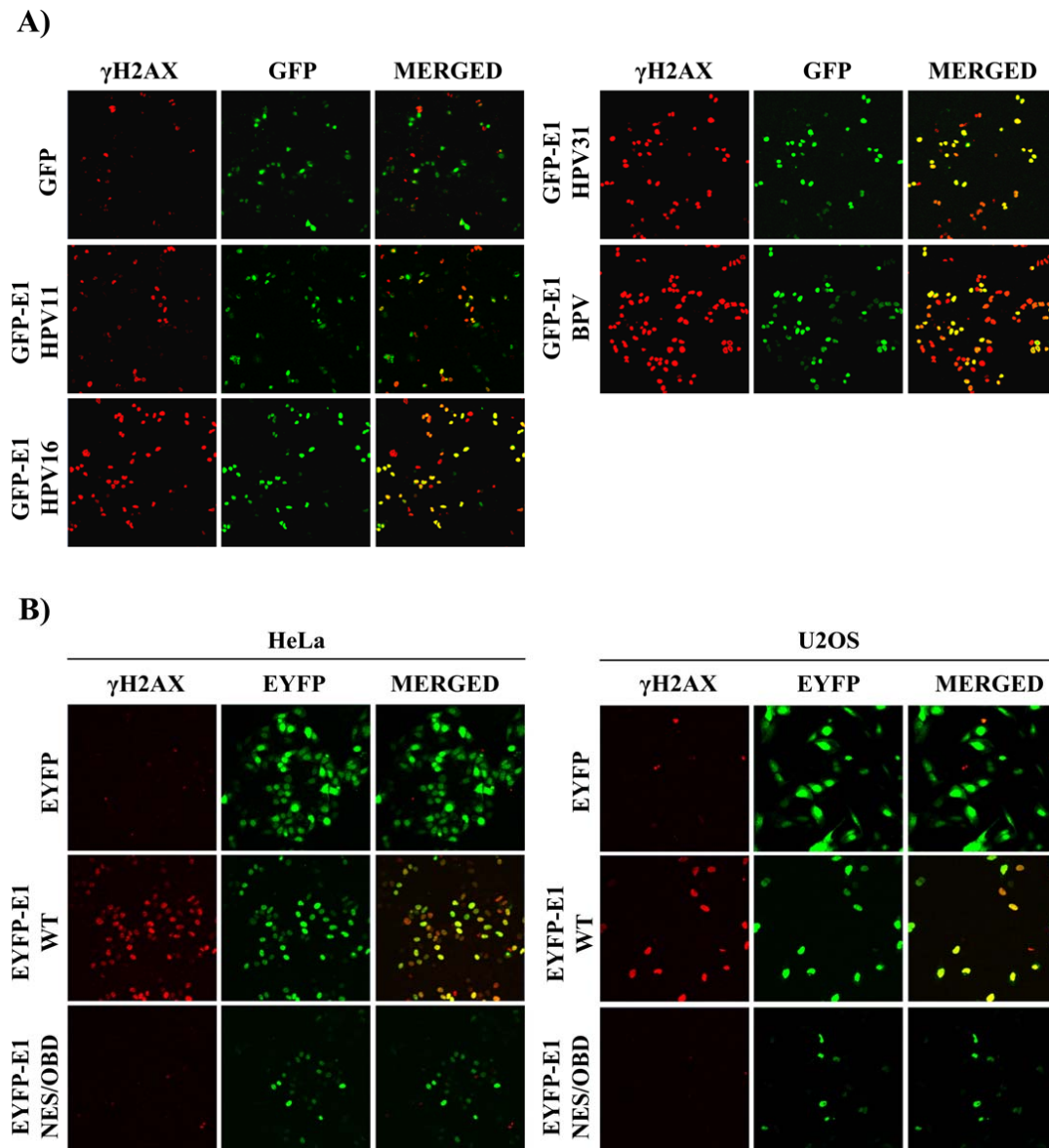
(A) Intracellular localization of the different HPV31 E1 fragments shown in Fig. 4.2. Twenty four hours post-transfection, cells were fixed, mounted, and visualized by 40X fluorescence confocal microscopy. Nuclei (DNA) were stained with TO-PRO-3. (B) Western blot showing the expression levels of each E1 fragment detected using an anti-GFP antibody (α -GFP). Tubulin was used as a loading control (α -Tub.).



Supplementary Figure 4.2. The anti-proliferative activity of HPV16 E1 is abolished by mutation of its ATPase domain.

(A-C) Cellular proliferation and cell cycle progression of cells transiently expressing GFP-HPV16 E1 and the ATPase mutant derivative (G482D) (87). CFAs were performed as described for Fig. 4.1. Cell cycle analyses were performed 48 h posttransfection as described in Fig 4.1. (D) Western blot analysis in which E1 proteins

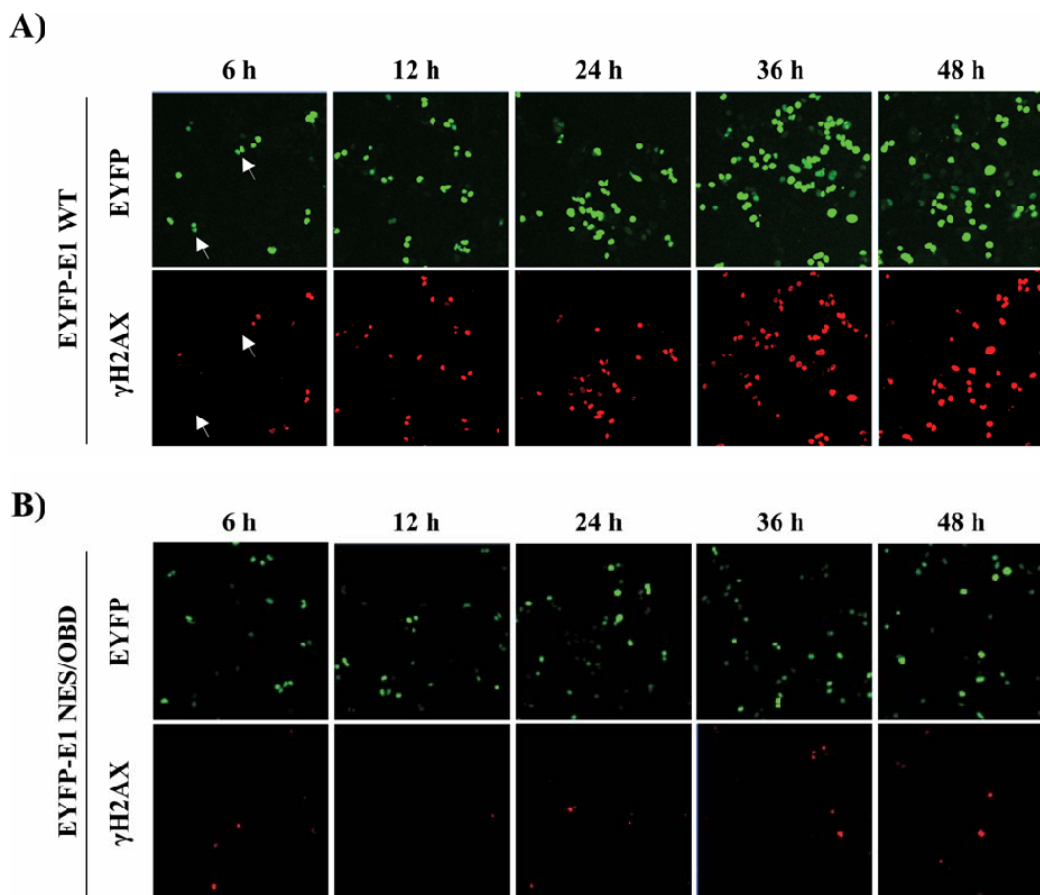
were detected using an anti-GFP antibody (α -GFP) and tubulin was used as a loading control (α -Tub.).



Supplementary Figure 4.3. The ability of E1 to induce a DDR is conserved in HPV31, -16, -11 and BPV E1 and independent of E6, E7 and p53.

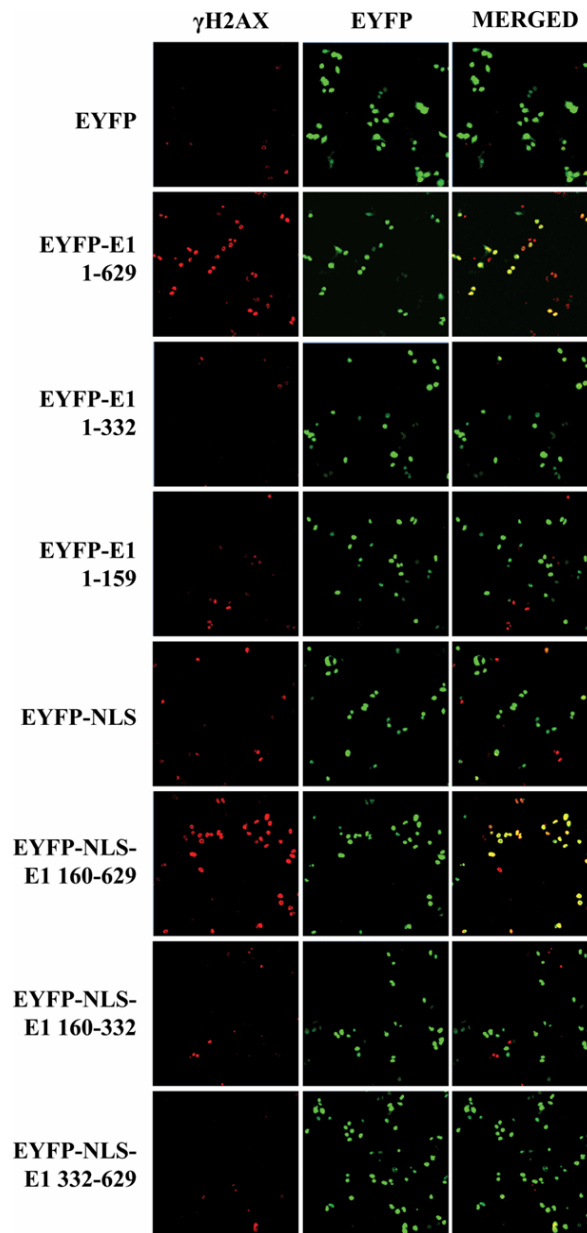
(A) The ability of E1 to induce a DDR is conserved in HPV31, -16, -11 and BPV E1. The activation of γ H2AX activation was analyzed in C33A cells expressing the indicated

GFP or GFP-E1 proteins. To analyze γ H2AX activation, cells were fixed 24 hr post-transfection, stained for γ H2AX, mounted, and visualized by 20X fluorescence confocal microscopy. (B) The ability of E1 to induce a DDR is independent of E6, E7 and p53. γ H2AX activation was analyzed as described in A in HeLa and U2OS cells expressing either wild type EYFP-31E1, an ATPase mutant derivative or EYFP alone.



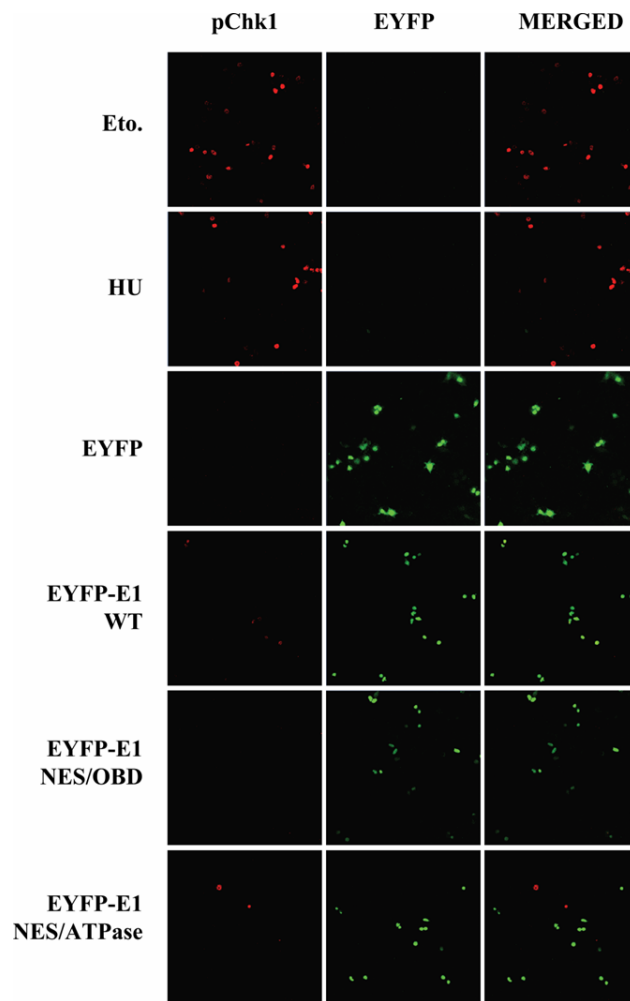
Supplementary Figure 4.4. Increased expression of E1 over time correlates with an increased activation of γ H2AX.

Activation of γ H2AX was analyzed in C33A cells expressing the indicated EYFP-E1 wild type (A) or NES/OBD mutant protein (B). At each of the indicated time points, the activation of γ H2AX and expression of EYFP-E1 were visualized by fluorescence microscopy as described in Fig. 4.6.



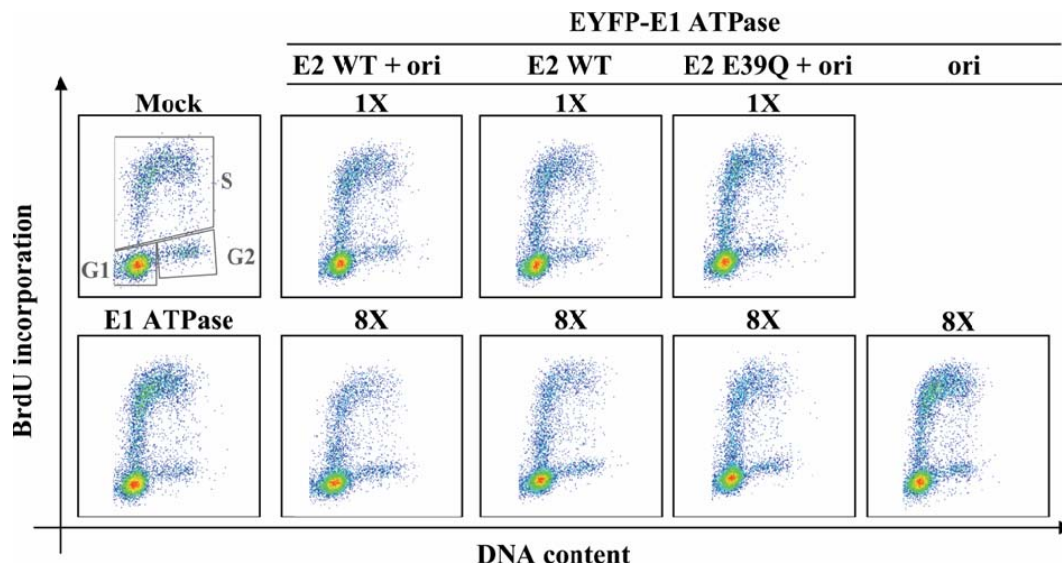
Supplementary Figure 4.5. Activation of γ H2AX by E1 requires both its origin-binding and ATPase activities.

Activation of γ H2AX was analyzed in C33A cells expressing the indicated fragment of E1 fused to either EYFP or nuclear (EYFP-NLS). Twenty four hours post-transfection, cells were fixed, stained for γ H2AX, mounted, and visualized by 20X fluorescence confocal microscopy.



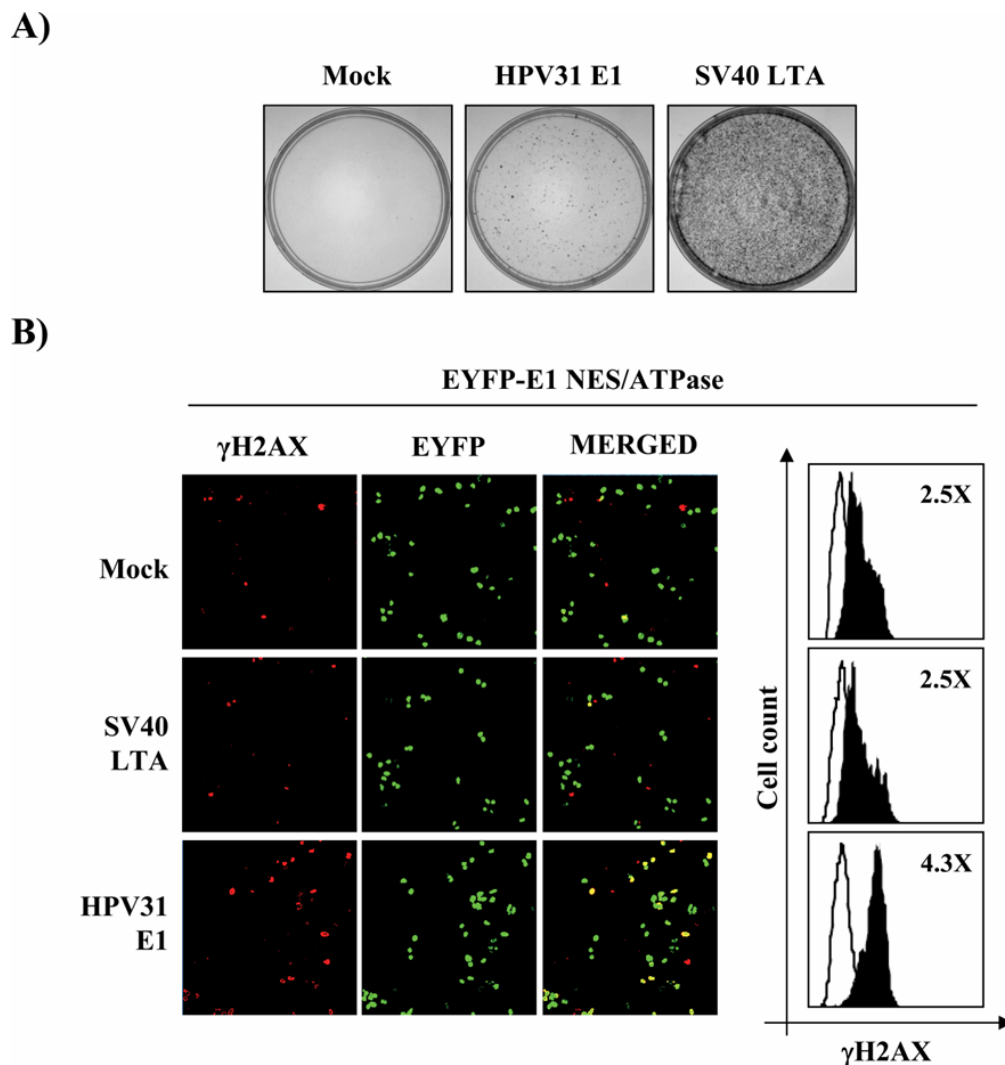
Supplementary Figure 4.6. E1 does not activate Chk1.

The phosphorylation of Chk1 on serine 345 (pChk1) was analyzed in C33A cells expressing the indicated wild type or mutant EYFP-E1 proteins or EYFP alone. Twenty four hours post-transfection, cells were fixed and stained with an antibody against phosphoserine 345 of Chk1. Mounted cells were then visualized by 20X confocal fluorescence microscopy. Cells treated for 24 h with 50 μ M of etoposide (Eto.) or 2 mM of hydroxyurea (HU) were used as positive controls.



Supplementary Figure 4.7. E2 and the viral origin do not affect the progression of the cell cycle.

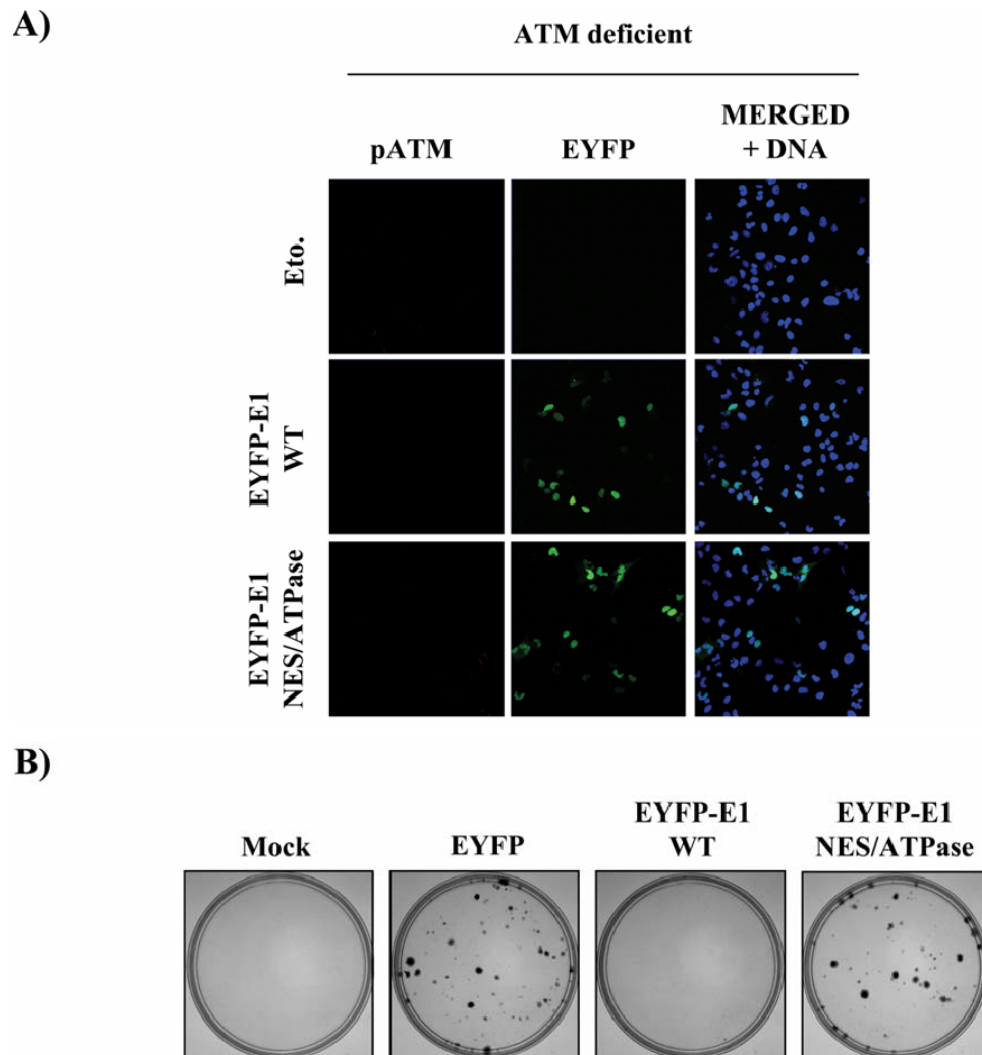
Incorporation of BrdU throughout the cell cycle was determined as described in Fig. 4.9. Scatter plots obtained with cells transfected with a vector expressing the NES/ATPase E1 mutant protein, either alone or together with two different amounts (1X and 8X) of wild type or E39Q E2 expression vector and the origin, as indicated.



Supplementary Figure 4.8. SV40 Large T antigen does not inhibit cellular proliferation and induces only low-levels of γ H2AX.

(A) CFA performed with 3F-HPV31-E1 or untagged Large T antigen (LTA) constructs. Cells containing the plasmid expressing the indicated protein were selected in G418-containing medium before staining. (B) The activation of γ H2AX in cells expressing the EYFP-E1 NES/ATPase mutant alone, or co-expressing either Large T antigen or 3F-HPV31 E1, was analyzed by microscopy and flow cytometry analysis as described in Fig. 4.6A and 4.8, respectively. As HPV31 E1 and Large T antigen were not tagged with a

fluorescent protein, they were co-transfected with the EYFP-E1 NES/ATPase mutant protein, which does not affect cell cycle progression and only served as a marker of the transfected cells (Fig. 4.3B).



Supplementary Figure 4.9. E1 inhibits the proliferation of ATM-deficient cells.

(A) Confirmation that E1 does not activate the phosphorylation of ATM in ATM-deficient cells. The activation of the ATM kinase was analyzed by detecting its level of

phosphorylation on serine 1981 in C33A cells expressing either the wild type or the NES/ATPase mutant E1 protein. Twenty four hours post-transfection, cells were fixed and stained with an antibody against phosphoserine-1981 of ATM. Mounted cells were then visualized by 20X confocal fluorescence microscopy. Cells treated for 24 h with 50 μ M of etoposide (Eto.) were used as negative and positive controls. (B) CFA performed with cells expressing EYFP alone or the indicated EYFP-E1 proteins carrying mutations in the NES motif and in the ATPase domain, as described in the text. Cells were selected in G418-containing medium before staining.

Supplementary Table 4.1. Activation of γ H2AX by E1 from different papillomaviruses

Protein Expressed	γH2AX fold activation*
GFP	2.7X
GFP-HPV31 E2	2.3X
GFP-HPV31 E1	6.9X
GFP-HPV11 E1	4.2X
GFP-BPV E1	6.2X
GFP-HPV16 E1	7.0X

* The activation of γ H2AX in cells expressing the indicated GFP fusion protein was determined by FACS as described in Fig. 4.8.

Chapitre 5 - Discussion

L'accumulation nucléaire de la protéine E1 des VPH est nécessaire à la réplication de l'épisome au cours de trois phases du cycle viral : l'établissement, le maintien et l'amplification du génome. Les mécanismes qui régissent la réplication de l'ADN au cours de ces différentes phases sont encore peu connus. Ainsi, les études présentées dans cette thèse ont été réalisées dans le but d'éclaircir les mécanismes qui contrôlent le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine E1 et le rôle de l'export nucléaire au cours des différentes phases de réplication de l'ADN. Grâce à ces études, nous avons démontré que la sumoylation n'est pas nécessaire à l'accumulation nucléaire de E1 et que la phosphorylation de deux sérines localisées dans sa région N-terminale inhibe son export au cytoplasme. De plus, nous avons établi que l'export nucléaire de E1 est essentiel au maintien du génome dans les kératinocytes non différenciés, mais qu'il n'est pas nécessaire pour l'amplification du génome dans les kératinocytes différenciés. En fait, nous avons découvert que l'accumulation de E1 au noyau interfère avec la prolifération cellulaire. De manière plus précise, notre étude a permis de montrer que l'accumulation de E1 au noyau induit un arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase S et que cet arrêt peut être prévenu par l'export nucléaire de E1. Au cours de la troisième étude présentée dans cette thèse, nous avons également établi qu'une accumulation soutenue de E1 au noyau induit une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM. La caractérisation de ce phénomène a permis de démontrer que la réplication de l'ADN viral est indépendante de la voie de réponse aux dommages à l'ADN. De plus, contrairement à l'arrêt de cycle cellulaire, l'activation de cette voie par E1 peut être prévenue par E2, ce qui suggère que les deux événements sont distincts. Finalement, nous avons montré que l'export nucléaire de E1 prévient l'activation de la voie de réponse aux dommages autant dans les lignées cellulaires que dans les kératinocytes primaires immortalisés. Dans l'ensemble, bien que l'accumulation nucléaire de E1 soit essentielle à la réplication de l'ADN des VPH, nos études suggèrent que l'export nucléaire de la protéine E1 est nécessaire à la prévention de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'activation de la voie de dommages à l'ADN dépendante de ATM qui sont induits lorsque cette accumulation est non contrôlée.

5.1. Régulation de l'export de E1 au cytoplasme

5.1.1 Sumoylation

5.1.1.1 Transport nucléo-cytoplasmique de E1

Tel que mentionné au chapitre 1, le transport nucléo-cytoplasmique de certaines protéines cellulaires est régulé par leur sumoylation (Gareau and Lima, 2010; Pichler and Melchior, 2002). Plusieurs laboratoires, incluant le notre, ont démontré que E1 est capable d'interagir avec Ubc9, la seule enzyme de conjugaison de la voie de sumoylation (Rangasamy and Wilson, 2000; Yasugi and Howley, 1996). Bien que la sumoylation de E1 ait été rapportée *in vitro* et *in vivo* (Hsu et al., 2007; Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta et al., 2005), le rôle de cette modification sur le transport nucléo-cytoplasmique de E1 était encore imprécis.

Au chapitre 2, nous avons démontré que la voie de sumoylation n'est pas requise pour l'accumulation nucléaire de E1. Comme cette étude a été réalisée en partie avec la protéine E1 du VPH 11, l'interaction de celle-ci avec Ubc9 a tout d'abord été caractérisée dans un système double hybride chez *Saccharomyces cerevisiae* ainsi qu'en GST-pulldown. En accord avec ce qui a été publié précédemment, nous avons établi que les acides aminés de la région d'oligomérisation de la protéine E1 du VPH 11 (353-435) sont suffisants pour l'interaction de E1 avec Ubc9 *in vitro*. *In vivo*, l'OBD et le domaine C-terminal en entier sont requis pour permettre cette interaction. En fait, l'utilisation de mutants de E1 qui sont incapables de s'oligomériser ou de lier l'ATP a permis de démontrer que ces deux fonctions de E1 sont nécessaires à son interaction avec Ubc9 *in vivo*. L'analyse de la localisation intracellulaire des mutants en question ainsi que d'autres mutants similaires chez la protéine E1 du VPH 16 nous a ensuite permis de démontrer que les protéines E1 qui sont incapables d'interagir avec Ubc9, sont toutes capables d'entrer au noyau. Ainsi, l'interaction entre E1 et Ubc9 n'est pas essentielle à l'accumulation nucléaire de E1. Un rôle possible de la voie de sumoylation au cours de l'accumulation nucléaire de E1 a ensuite été réfuté via

l'utilisation de la protéine Gam1 de l'adénovirus CELO. En fait, comme cette protéine permet d'interférer avec la voie de sumoylation en inhibant l'activité de SAE1/SAE2 et en induisant la dégradation de SAE1/SAE2 et de Ubc9 (Chiocca, 2007), son utilisation a permis de démontrer que l'import des protéines E1 de type sauvage du VPH 11, du VPH 16 et du VPB au noyau n'est pas affecté par l'inhibition de la voie de sumoylation. Dans cette étude, la capacité de Gam1 à inhiber la voie de la sumoylation a été confirmée via l'utilisation de la protéine PML, dont l'accumulation dans des *foci* nucléaires dépend de la voie de sumoylation. De manière plus précise, nous avons démontré que la protéine PML est complètement relocalisée dans de larges *foci* intra- et péri-nucléaires lorsqu'elle est exprimée en présence de Gam1.

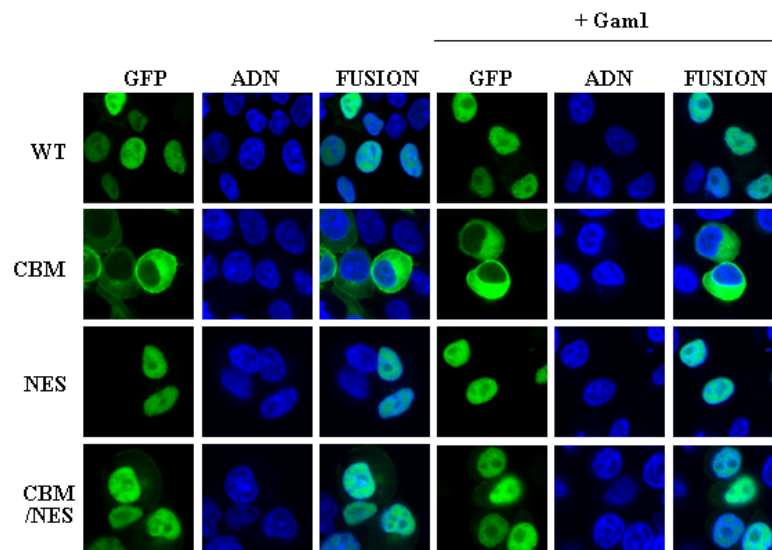


Figure 5.1. *L'inhibition de la voie de sumoylation par Gam1 n'affecte pas l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 11 dans les C33A.*

Les protéines GFP-VPH E1 1-190 de type sauvage (WT : Wild Type) ou mutantes utilisées dans chaque condition sont indiquées à gauche de chaque série GFP-ADN-FUSION. Chaque protéine a été transfectée seule ou avec la protéine Gam1 (+ Gam1) dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 2. (Expérience; A. Fradet-Turcotte, Construction des plasmides; D^r C. D'Abramo).

Basé sur les observations mentionnées ci-dessus, nous avons conclu que la voie de sumoylation n'est pas requise pour l'accumulation de E1 au noyau. Bien que cette étude ait porté sur le rôle de la sumoylation dans l'accumulation nucléaire de E1, des résultats obtenus avec un mutant CBM de E1, qui est constamment exporté au cytoplasme, suggèrent que la voie de sumoylation n'est pas requise pour l'export nucléaire de E1. En fait, nous avons observé que l'accumulation cytoplasmique d'un fragment de la région N-terminale de E1 du VPH 11 (1-190) ayant un CBM muté n'est pas affectée par la présence de Gam1 (Fig. 5.1). D'autres analyses seront nécessaires pour déterminer si l'export nucléaire de la protéine E1 entière est aussi indépendante de la voie de sumoylation.

5.1.1.2 Interaction de E1 avec Ubc9

Il est difficile de déterminer le rôle de l'interaction de E1 avec Ubc9 puisque toutes les mutations abolissant cette interaction inhibent aussi des fonctions essentielles de E1 (telles que sa capacité à s'oligomériser et à lier l'ATP). Avant la publication de notre étude, il avait été suggéré que l'interaction entre E1 et Ubc9 était essentielle à la réplication de l'ADN du VPH 16. Cette hypothèse était en fait basée sur l'étude de *Yasugi et al* qui avait démontré que le mutant S330R du VPH 16 est incapable de répliquer l'ADN dans un essai de réplication transitoire. À l'époque, il avait aussi été démontré que la seule déficience de ce mutant était de ne plus interagir avec Ubc9. Toutefois, au cours de l'étude présentée dans cette thèse, nous avons découvert que cette mutation affecte la liaison de E1 à l'ADN, et donc, que ce mutant ne peut être utilisé pour déterminer le rôle de l'interaction entre E1 et Ubc9 au cours de la réplication. L'identification d'un mutant de E1 qui affecte uniquement son interaction avec Ubc9 serait nécessaire afin de déterminer le rôle de celle-ci au cours du cycle viral.

Chez le VPB, il a été démontré que les protéines mutantes K514A/R de E1 du VPB qui ne peuvent pas être sumoylées sont incapables de répliquer l'ADN dans un essai de réplication transitoire (mutant K514A ou R). Toutefois, l'étude présentée au chapitre 2 démontre que les mêmes mutations chez la protéine du VPH 11 n'ont aucun effet sur les

fonctions de réplication de E1 (mutant K559A/R). Il semble donc que la sumoylation de E1 sur ces acides aminés ne soit pas essentielle à la réplication de l'ADN viral. Cette affirmation est également appuyée par le fait que la protéine E1 réplique efficacement son ADN dans les C33A, une lignée cellulaire dans laquelle E1 n'est pas efficacement sumoylée (contrairement à PML). Malgré cette observation, il est toujours possible que la sumoylation de E1 soit nécessaire au cours du maintien de l'épisome ou de son amplification dans les cellules différenciées. D'autres études seront nécessaires pour investiguer cette possibilité. Finalement, il est important de noter que compte tenu du fait que les cellules exprimant E1 de manière transitoire sont arrêtées en phase S (Chapitres 3 et 4), il est possible que la protéine E1 soit sumoylée dans une autre phase du cycle cellulaire.

5.1.2 Phosphorylation

5.1.2.1 Phosphorylation de sérines localisées dans la région N-terminale de E1.

Selon le type de papillomavirus, la phosphorylation inhibe ou active l'export de E1 au cytoplasme. En fait, chez le VPH à bas risque de type 11, il a été démontré que la phosphorylation de la région N-terminale de E1 par la cycline E/A-Cdk2 inhibe son export nucléaire, tandis que la phosphorylation de la protéine E1 du VPB l'augmente (Deng et al., 2004; Hsu et al., 2007). Les protéines E1 des VPH à haut risque oncogénique n'ont que deux des trois sérines retrouvées dans la région N-terminale des protéines E1 des VPH à bas risque (Fig. 1.14 et annexe 1). Ainsi, au cours de l'étude de l'export nucléaire de la protéine E1 présentée au chapitre 3, nous avons investigué le rôle de ces sérines dans le contrôle du transport intracellulaire de la protéine E1 du VPH 31, un VPH à haut risque oncogénique. Ainsi, nous avons d'abord démontré que l'accumulation nucléaire de la protéine E1 du VPH 31 est dépendante de son interaction avec la cycline E-A/Cdk2. Nous avons ensuite confirmé que cet export nucléaire requiert le NES de E1 et l'exportine Crm1. En plus des deux sérines qui sont localisées dans la région N-terminale (S92 et S106), trois autres sites consensus de phosphorylation par les complexes cycline E-A/Cdk2 sont retrouvés chez la protéine E1 du VPH 31 (T169, T316 et T506). Par une approche de

mutagenèse, les cinq sites consensus ont été mutés individuellement ou en groupes afin de déterminer leur influence sur la localisation cellulaire de E1. Ainsi, il nous a été possible de déterminer que l'export nucléaire de E1 est inhibé par la phosphorylation des deux sérines localisées dans la région N-terminale de E1. Puisque la mutation des autres sites consensus en alanine n'a aucun effet sur la localisation cellulaire de E1, nous avons conclu que phosphorylation de T169, T316 et T506 n'est pas nécessaire à l'accumulation nucléaire de E1.

Au cours de cette étude, nous avons démontré que la sérine localisée dans le NES de E1 inhibe l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31. Chez plusieurs VPH, la conservation du NES de E1 concorde avec une conservation de son motif R-x-L (CBM), ce qui suggère que le rôle majeur de la phosphorylation de cette sérine est de contrôler l'export nucléaire de E1. En ce sens, chez les protéines E1 des VPH 33, 39, 52, 58, 67 et 70, la perte du NES est accompagnée de la perte partielle ou complète du motif CBM, et dans presque tous les cas, de la perte de la sérine localisée dans le motif NES.

Contrairement à la sérine décrite ci-dessus, les sérines localisées en N-terminal du NES (S89 et S93 chez le VPH 11) ne sont pas toujours conservées. Selon la conservation du NES, du CBM et des sites putatifs de phosphorylation localisés dans la région N-terminale de E1, les VPH peuvent être regroupé en 5 grandes classes (décrites à l'annexe 1). Parmi ces classes, les protéines E1 d'un grand nombre de VPH n'ont conservé qu'une seule des sérines de la région N-terminale (Classe 2-6, annexe 1). De plus, chez les VPH de la classe 6 (VPH 33, 39, 58 et 67), les protéines E1 ne contiennent aucune des sérines normalement localisées dans la région N-terminale. Bien que notre étude ait démontré que la sérine 92 est phosphorylée par la cycline E/Cdk2, il est possible que d'autres kinases assurent la phosphorylation des sérines retrouvées en N-terminal du NES. En ce sens, chez les protéines E1 où le CBM est muté (VPH 26, 69, 33 et 58), les sites présumptifs de phosphorylation par la Cdk2 sont remplacés par S-Q ou S-x-x-x-x-E/D (Annexe 1). Ainsi, ces sites ressemblent plutôt à des sites présumptifs de phosphorylation par Chk2 (S/T-Q) ou de CK2 (S/T-x-x-E/D). Au cours de travaux futurs, il serait intéressant de déterminer la

localisation intracellulaire de types de VPH n'ayant pas de NES et de CBM, et de déterminer si d'autres kinases sont capables de phosphoryler les sérines équivalentes à S89 et S93 du VPH 11. L'identification du rôle de ces sérines dans la régulation de la localisation intracellulaire des protéines E1 n'ayant pas de CBM et de NES serait utile afin de déterminer leur rôle au cours du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine E1.

5.1.2.2 Phosphorylation d'une thréonine localisée dans l'OBD de E1.

Chez la protéine E1 du VPB, la substitution d'une sérine potentiellement phosphorylée par la cycline E-A/Cdk2 en phosphomimétique (S283E) inhibe la réplication de l'ADN viral. Il a été proposé que l'export de E1 au cytoplasme est nécessaire à cette inhibition (Hsu et al., 2007). Dans l'OBD des protéines E1 des VPH à haut risque, on retrouve également un site de phosphorylation présomptif de la Cdk2 (T316 chez VPH 31) (Fig. 1.15). Au cours de l'étude présentée au chapitre 3, il a été établi que la substitution de cette thréonine en alanine chez la protéine E1 du VPH 31 n'influence pas l'export de la protéine au cytoplasme. Cependant, au cours d'une étude qui a été réalisée dans notre laboratoire, nous avons démontré que la substitution de cette thréonine par un acide aminé mimant la phosphorylation (phosphomimétique : aspartate ou glutamate) (T316D et T316E) induit la relocalisation d'environ 25% de la protéine EYFP-31E1 au cytoplasme (Fig. A4-1 et tableau A4-1 de l'annexe 4). Nous avons aussi établi que cette accumulation est due à une augmentation de l'export nucléaire des protéines T316D/E puisqu'elle peut être inhibée par l'introduction d'une mutation additionnelle dans le NES dans ces protéines (NES/T316D et NES/T316E). Donc, tout comme il a été observé chez la protéine E1 du VPB, la substitution de la thréonine de l'OBD par un phosphomimétique augmente son export au cytoplasme.

Afin de mieux caractériser l'export nucléaire induit par T316D, nous avons introduit cette mutation dans des protéines EYFP-31E1 où le CBM est muté en alanine ou dans lesquelles les sérines de la région N-terminale ont été substituées en alanine (S92A, S106A ou SSAA) ou en aspartate (S92D, S106D ou SSDD). Ensuite, l'analyse de la localisation

intracellulaire de ces protéines a été faite par microscopie confocale. Tel que démontré à la figure A4-2, la mutation T316D augmente l'export nucléaire de E1 lorsque les deux sérines de la région N-terminale sont non phosphorylées (SSAA et CBM) ou que l'une ou l'autre est phosphorylée (S92A ou S106A). De plus, nous avons remarqué que T316D augmente davantage l'export nucléaire de la protéine S106A, que l'export nucléaire de S92A (S92A : 2X et S106A : 3.6X), suggérant que la phosphorylation de S106 inhibe plus efficacement l'export nucléaire. Ces résultats sont donc en accord avec le rôle principal de S106 dans l'inhibition de l'export nucléaire de E1. Lorsque l'une ou l'autre des sérines est mutée en aspartate, T316D contribue toujours à l'export nucléaire de E1. Toutefois, lorsque les deux sérines de la région N-terminale de E1 sont mutées en aspartate, T316D ne promeut plus l'export nucléaire de E1 (Fig. A4-2 et tableau A4-2, annexe 4). Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation de la thréonine T316 ne suffit pas à promouvoir l'export nucléaire de E1 lorsque les sérines S92 et S106 sont phosphorylées. Cela suggère également que ces sérines doivent être obligatoirement déphosphorylées afin que E1 puisse être exportée au cytoplasme (Section 6).

Chez le VPB, la protéine E1 mutante S283E est incapable de répliquer l'ADN et il a été proposé que cette inhibition serait induite par l'augmentation de l'export nucléaire de E1. Ainsi, nous avons voulu déterminer si les protéines du VPH 31 E1 mutantes T316D/E étaient également incapables de répliquer l'ADN. Pour ce faire, nous avons utilisé l'essai de réplication transitoire décrit précédemment (Annexe 5). Le mutant T316A a été utilisé comme contrôle positif afin de s'assurer que la substitution de la thréonine pour un autre acide aminé n'était pas nuisible aux fonctions de la protéine. De plus, des protéines E1 incapables de lier l'ADN (mutant OBD : K265A/R267A et NES/OBD) ont été utilisées comme contrôles négatifs. Cette expérience nous a permis de démontrer que, contrairement à la protéine EYFP-31E1 T316A, les protéines EYFP-31E1 T316D et T316E sont incapables de répliquer efficacement l'ADN *in vivo* (Fig. A4-3A, annexe 4). En fait, tout comme les mutants OBD et NES/OBD, le mutant T316D abolit totalement l'activité de réplication de E1. Le mutant T316E demeure, quant à lui, capable de soutenir environ 50%

des niveaux de réplication de l'ADN obtenus avec la protéine de type sauvage. La raison de cette différence est inconnue, mais dans les deux cas l'introduction d'une charge négative dans l'OBD de E1 induit une perte de ses fonctions de réplication. Afin de déterminer si l'inhibition de la réplication de l'ADN par T316D/E pouvait être attribuée à leur l'export nucléaire plus élevé, nous avons investigué la capacité des mutants NES/T316D et NES/T316E, qui ne sont pas exportés au cytoplasme, à répliquer l'ADN. Contre toute attente, nous avons observé que ces deux mutants sont toujours incapables de répliquer l'ADN, démontrant ainsi que cette inhibition est indépendante de l'export nucléaire de la protéine E1. Bien que nous ne connaissions toujours pas la raison exacte de cette inhibition, nous avons démontré que les protéines E1 NES-T316D/E sont toujours relocalisées dans des *foci* en présence de E2 dans les C33A (Fig. A4-3B, annexe 4), ce qui suggère que la présence d'un phosphomimétique dans l'OBD de E1 n'influence pas son interaction avec E2.

Une des raisons possibles pouvant expliquer l'incapacité des protéines E1 NES-T316D/E à répliquer l'ADN est que l'introduction de phosphomimétiques dans l'OBD de E1 inhibe son interaction avec l'ADN. Par ailleurs, tout comme pour les mutants T316D/E, nous avons observé qu'un mutant de E1 ne liant plus l'ADN (K267A/R267A) est davantage exporté au cytoplasme (Fig. A4.4 et à la tableau A4.4, annexe 4). À l'instar du mutant OBD, il est possible que l'augmentation de l'export nucléaire des mutants T316D/E soit due à leur incapacité d'interagir avec l'ADN. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que les mutants T316D/E et NES/T316D/E interfèrent moins que les protéines E1 de type sauvage ou T316A avec la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Fig. A4-5 et tableau A4-5, annexe 4). De façon similaire aux résultats obtenus dans l'essai de réplication transitoire de l'ADN, le mutant T316D a un effet plus prononcé dans ces expériences. Finalement, nous avons aussi tenté de déterminer l'effet de la substitution de T316 en phosphomimétique sur les fonctions de liaison à l'ADN de l'OBD de E1 en produisant des formes mutantes de l'OBD chez *E. coli*. Cependant, dans ce contexte, toute substitution de la thréonine (même en alanine) inhibe la liaison de l'OBD à

l'ADN. Il est néanmoins peu probable que le même phénomène ait lieu dans la protéine entière puisque la protéine mutante T316A est capable de répliquer efficacement l'ADN *in vivo*. Cette observation suggère que la structure de la protéine entière n'est pas démesurément affectée par la mutation de la thréonine 316 (Fig. A4-3.A, annexe 4). D'autres études seront donc nécessaires pour déterminer si les mutants T316D/E sont capables ou non de lier l'ADN. Il est également possible que ces mutations affectent d'autres fonctions de E1 et ces possibilités devront également être investiguées.

Pour l'instant, aucune donnée ne permet d'avancer si la thréonine 316 est vraiment phosphorylée *in vivo*. D'autres expériences seront nécessaires afin de répondre à cette question. Néanmoins, l'analyse de la localisation de S283 dans la structure de l'OBD de la protéine E1 du VPB liée sur l'ADN et de T383 dans la structure de l'OBD de la protéine E1 du VPH 18 suggère que ces acides aminés seraient accessibles aux solvants (Fig. A4-6, annexe 4). L'ensemble de ces résultats est intégré dans un modèle présenté au chapitre 6.

5.2 L'export nucléaire prévient les fonctions anti-prolifératives de E1

La principale découverte liée aux études présentées dans cette thèse est que l'export nucléaire de E1 est d'une part essentiel au maintien du génome dans les kératinocytes en prolifération, et d'autre part, qu'il contrecarre les effets négatifs de E1 sur le cycle cellulaire ainsi que sur la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM. Les fonctions anti-prolifératives de la protéine E1 ont d'abord été identifiées au cours de l'étude présentée au chapitre 3. Au cours de celle-ci, nous avons observé que le génome contenant une protéine E1 dans laquelle le NES est muté (VPH 31-NES) est rapidement perdu au cours de la prolifération des kératinocytes non différenciés. Par conséquent, le confinement de la protéine E1 au noyau inhibe le maintien de l'épisome. Ce qui s'est avéré le plus étonnant dans cette étude est que le génome VPH 31-NES peut encore être amplifié au cours de la différenciation des kératinocytes. Cette observation, jumelée au fait que la

protéine E1 contenant une mutation dans son NES est toujours capable de répliquer l'ADN dans un essai de réplication transitoire, démontre que la perte du génome VPH 31-NES n'est pas due à une perte de fonction de réplication de l'ADN de la protéine E1-NES. En fait, nous avons découvert que l'accumulation nucléaire de E1 induit un arrêt de la prolifération cellulaire, soulevant l'hypothèse que cette fonction de E1 est responsable de l'inhibition du maintien du génome VPH 31-NES dans les kératinocytes non différenciés. En ce sens, puisque l'amplification a lieu dans des cellules différenciées maintenues en phase S grâce aux actions coordonnées de E6 et E7, celle-ci n'est pas affectée par les fonctions anti-prolifératives de E1.

Au cours de l'étude présentée au chapitre 4, notre but était de mieux comprendre les fonctions anti-prolifératives de E1. Les résultats obtenus suggèrent que l'arrêt a lieu au début de la phase S. En fait, l'arrêt se fait à un moment où l'ADN cellulaire a commencé à être synthétisé (incorporation de BrdU) et où PCNA ne forme pas encore de larges *foci* nucléaires, représentatifs de la phase tardive de la phase S. Bien que les mécanismes menant à l'arrêt du cycle cellulaire par E1 soient encore inconnus, on sait que la progression du cycle cellulaire peut être bloquée par des protéines de E1 de différents PV ainsi que par les VPH à bas risque. De plus, grâce à des études de mutagenèse, nous avons démontré que les fonctions de réplication (liaison à l'ADN et activité ATPase) de E1 sont requises pour ses fonctions anti-prolifératives. Bien que nous ayons déterminé que E1 induise l'activation d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM, nous avons également déterminé que l'arrêt de cycle cellulaire ne dépend pas de l'activation de cette voie. En fait, l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN induite par E1 peut être réduite par la protéine E2 sans toutefois rétablir la prolifération cellulaire. Tel que discuté au chapitre 4, l'inhibition du cycle cellulaire par E1 peut être causée de plusieurs manières. Par exemple, puisque E1 interagit avec la polymérase α -primase, il est possible que la séquestration de celle-ci par E1 soit suffisante pour induire l'arrêt du cycle cellulaire. L'accumulation nucléaire de E1 dans les cellules arrêtées en phase S suggère que les complexes cycline E-A/Cdk2 sont toujours actifs, et donc, que E1

n'induit pas d'arrêt de cycle cellulaire via l'activation d'inhibiteur de Cdk (p21 ou p27) ou en inhibant l'activité des phosphatases activatrices des Cdk (CDC25) (Fig. 1.16). Dans le même ordre d'idée, cet arrêt n'est pas induit par la séquestration de ces complexes cycline/Cdk puisque le mutant CBM/NES de E1, qui est incapable d'interagir avec les cyclines, est toujours en mesure d'interférer avec la progression du cycle cellulaire. Afin de déterminer de manière exacte dans quelle phase E1 bloque la progression cellulaire, il sera important de déterminer quel complexe cycline/Cdk est actif. Ceci pourrait être adressé en déterminant l'état de phosphorylation de la protéine pRb ou en déterminant la capacité de complexes cycline/Cdk immunoprécipités de cellules exprimant E1 à phosphoryler l'histone H1. Cette information permettra de déterminer quelles voies sont activées ou inhibées lorsque E1 interfère avec la progression du cycle cellulaire.

En plus d'inhiber la progression du cycle cellulaire, nous avons démontré que l'accumulation de E1 au noyau induit l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN double brin (phosphorylation de γ H2AX) et que cette activation est aussi inhibée par l'export nucléaire de E1 (Chapitre 4). De manière plus précise, nous avons observé que l'accumulation nucléaire de E1 augmente la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) ainsi que la phosphorylation des kinases ATM et Chk2 (pATM et pChk2) (Fig. 1.19). Tout comme pour l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, les fonctions de réplication de l'ADN de E1 sont requises. Toutefois, la liaison de E2 au niveau du domaine C-terminal de E1 inhibe seulement l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, ce résultat suggère que E1 doit interagir de manière non spécifique avec l'ADN de l'hôte afin d'activer cette voie. Telle que discutée au chapitre 4, l'activation de la voie ATM peut être causée par l'introduction de bris d'ADN double brin ou par le recrutement de protéines telles que Mre11, Nbs1, MDC1 et ATM à l'ADN (Soutoglou and Misteli, 2008; Yeung and Durocher, 2008). Dans les deux modes d'activation, la liaison de E1 à l'ADN serait nécessaire, donc le mécanisme par lequel E1 active la voie ATM reste à être défini. Finalement, bien que la voie de ATR ne soit pas autant activée que la voie de ATM dans les cellules exprimant E1, la faible activation de Chk1 observée dans nos expériences concorde

avec l'expression de E1. Une explication possible est que l'activation de Chk1 soit due à un phénomène appelé « résection de l'ADN », au cours duquel un des brins d'ADN originant de la cassure de types doubles brins est enlevé par l'activité nucléase de ExoI (Fig. 1.19). En accord avec le fait que E1 bloque les cellules en phase S, il a été démontré que la résection de l'ADN suite à l'induction d'une cassure dans l'ADN double brin est spécifique à la phase S (Section 1.5.3). Cette observation suggère que E1 induit un bris dans l'ADN double brin et que la réparation de ce bris se fasse via la résection des brins d'ADN endommagés.

Enfin, nos études ont démontré que la réplication de l'ADN viral peut avoir lieu en présence de dommages à l'ADN. Cette découverte est en accord avec les résultats publiés précédemment par *King et al* qui démontrent que la réplication du VPH de type 11 n'est pas affectée par la présence d'etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase I qui induit des dommages de type double brin dans l'ADN (King et al., 2010). De plus, nos résultats démontrent que l'activation de la voie ATM n'est pas nécessaire à la réplication de l'ADN viral. Cette observation est en accord avec l'étude de *Moody et al* qui démontre que l'épisome viral peut être maintenu dans les kératinocytes en différenciation en présence d'inhibiteur de ATM ou de Chk2 (Moody and Laimins, 2009). L'activation de cette voie est nécessaire à l'amplification de l'ADN viral dans les kératinocytes différenciés, mais elle inhibe la réplication de l'ADN de l'hôte dans les cellules en prolifération. Donc, puisque l'activation de cette voie dans les cellules en prolifération serait néfaste pour la prolifération cellulaire des kératinocytes maintenant le génome viral, nous proposons qu'une des fonctions de l'export nucléaire de E1 soit de prévenir cette activation.

Chapitre 6 - Conclusions et perspectives

6.1 Interaction de E1 avec Ubc9

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans l'étude présentée au chapitre 2 démontrent que E1 interagit avec Ubc9, mais que cette interaction ne semble pas servir à la sumoylation de la protéine virale, du moins en phase S du cycle cellulaire. Le fait que des protéines E1 mutantes incapables de lier l'ATP et de s'oligomériser ne soient pas en mesure d'interagir avec Ubc9 suggère que l'interaction a lieu lorsque E1 est assemblé sur l'ADN (Fig. 6.1). Il s'avère donc possible que Ubc9 interagisse avec le double hexamère de E1 et que cette interaction soit essentielle à la réplication de l'ADN viral. Dans une telle optique, il est envisageable que cette interaction mène à la sumoylation de E1 ou que le recrutement de Ubc9 à l'origine par E1 permette de moduler la sumoylation des facteurs de la réplication ou de la réparation de l'ADN de l'hôte (Fig. 6.1). À titre d'exemple, il a été démontré que Ubc9 et la sumoylation de PCNA seraient importants pour prévenir la recombinaison au cours de la réplication de l'ADN chez la levure (Branzei et al., 2006; Ulrich et al., 2005). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que le p80, une protéine cellulaire qui lie la région N-terminal de E1, inhibe l'ubiquitination de PCNA en formant un complexe avec USP1. La dé-ubiquitination de PCNA inhibe l'activation de voies de réparation de l'ADN. Il est donc possible que l'interaction de E1 avec p80 et/ou Ubc9 serve à empêcher l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Lee et al., 2010). Finalement, il a aussi été démontré que la sumoylation de PCNA durant la phase S est nécessaire à la réparation de l'ADN au niveau de la fourche de réplication via la voie de réparation TLS (*TransLesion DNA Synthesis*) (Halas et al., 2011; Shaheen et al., 2010). Ainsi, selon le contexte cellulaire, il est aussi possible que E1 module l'activation ou l'inhibition de cette voie de réparation en modulant la sumoylation de PCNA. Finalement, il a récemment été démontré que Ubc9, ainsi que les sumoylation E3-ligases PIAS1 et 4, sont recrutées aux sites de dommages à l'ADN. Celles-ci seraient en fait nécessaires à l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN en assurant la sumoylation de 53BP1 et BRCA1, une modification essentielle à la formation d'un complexe stable de

l'ubiquitine E3-ligase RNF168 aux sites de dommages (Galanty et al., 2009). La formation de ce complexe permet l'ubiquitination de H2A nécessaire au recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN (Panier and Durocher, 2009). Puisque nos plus récentes études démontrent que E1 active la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM, il est possible que l'interaction de E1 avec Ubc9 régule l'activation de cette voie en modulant la sumoylation de ses composantes (Fig. 6.1). Comme l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN est essentielle à l'amplification du génome dans les kératinocytes différenciés, l'interaction de E1 et Ubc9 pourrait donc être importante durant les étapes tardives du cycle viral. En ce sens, une étude suggère que l'expression des protéines de la voie de sumoylation (SAE1/SAE2, Ubc9, SENP1 ainsi que les SUMO 2 et 3) augmente en fonction de la différenciation des kératinocytes (Deyrieux et al., 2007).

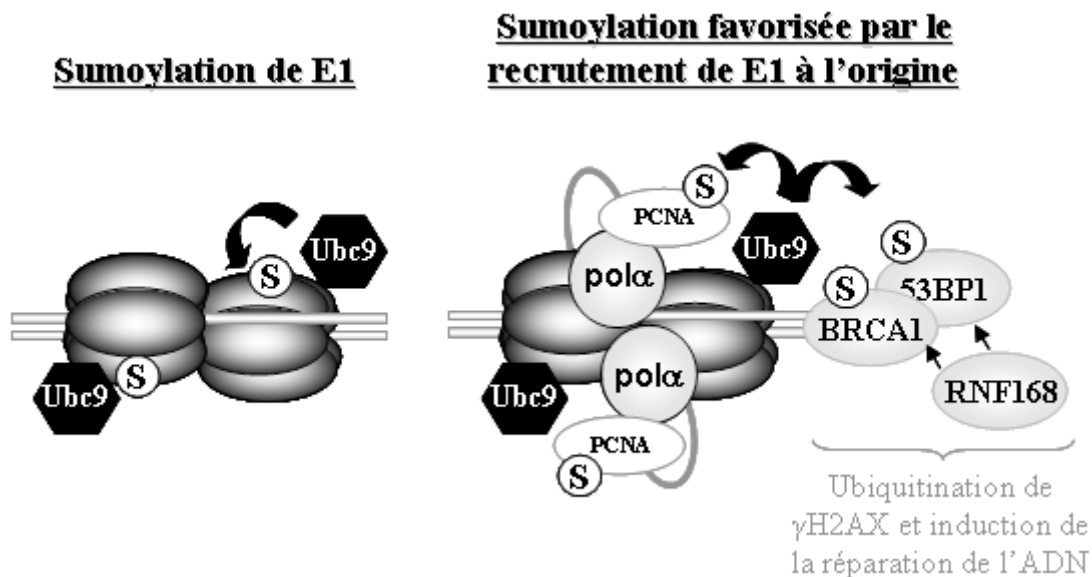


Figure 6.1. Modèle des rôles potentiels de l'interaction de E1 avec Ubc9.

Telle que décrite dans le texte, l'interaction entre Ubc9 et E1 pourrait servir soit à la sumoylation de E1, soit à la modulation de la sumoylation de facteurs de réplication (PCNA) ou de réparation de l'ADN (BRCA1 et 53BP1). La sumoylation de BRCA1 et 53BP1

est essentielle à la formation d'un complexe de réparation permettant l'ubiquitination de γ H2AX, elle-même nécessaire au recrutement des autres facteurs de réparation de l'ADN.

6.2 Transport intracellulaire

L'étude présentée au chapitre 3 a clairement démontré que l'export nucléaire de la protéine E1 est inhibé par la phosphorylation de sérines localisées dans sa région N-terminale par les complexes cycline E-A/Cdk2 (Fig. 6.2). Ces résultats suggèrent que l'export nucléaire de E1 est inhibé au cours de la phase G1/S du cycle cellulaire, ce qui concorde avec la phase de réplication de l'ADN de l'hôte. Puisque notre étude suggère également que E1 doit être exportée au cytoplasme au cours des autres phases du cycle cellulaire afin de permettre la prolifération cellulaire, de nouvelles interrogations sur les mécanismes de contrôle du transport intracellulaire de E1 sont soulevées (Fig. 6.2). Par exemple, le fait que la phosphorylation des sérines de la région N-terminale de E1 inhibe son export nucléaire implique qu'elles doivent être déphosphorylées afin de promouvoir celle-ci. La phosphatase capable de dé-phosphoryler ces sérines devra donc être identifiée (Fig. 6.2). L'étude présentée à l'annexe 4 soulève aussi l'hypothèse que la phosphorylation de la thréonine 316 pourrait être nécessaire à l'export nucléaire de E1. De futures études seront donc nécessaires afin de déterminer si cette phosphorylation a lieu *in vivo*. Dans un tel cas, la kinase responsable devra être identifiée. Parmi les kinases qui pourraient être responsables de la phosphorylation de l'OBD de E1, la cycline A/Cdk2, la cycline A/Cdk1 et la cycline B/Cdk1 pourraient être des candidats potentiels. En effet, nous avons démontré que la protéine E1 interagit avec la cycline A et il a été démontré que la cycline B/Cdk1 est en mesure de phosphoryler la protéine E1 du VPH 11 (Chapitre 3 et (Ma et al., 1999)). Dans tous les cas, la phosphorylation de la T316 par ces complexes cycline/Cdk permettrait de jumeler l'export nucléaire de E1 à la fin de la période de réplication de l'ADN de l'hôte en augmentant l'export nucléaire de la protéine à la fin de la phase S ou durant la phase G2 (Fig. 1.16). En plus des mécanismes qui régulent l'export nucléaire de E1, les mécanismes contrôlant l'import ainsi que l'importine responsable de ce processus demeurent inconnus.

Ceux-ci devront donc être identifiés (Fig. 6.2). Finalement, puisque les résultats du groupe de C. Bonne-Andrea démontrent que la protéine E1 du VPB est dégradée dans le noyau au cours de la réplication de l'ADN viral, il est possible que son export au cytoplasme augmente sa stabilité (Malcles et al., 2002; Mechali et al., 2004). Il serait intéressant d'identifier les mécanismes de dégradation de la protéine E1 nucléaire et de déterminer si l'export nucléaire de E1 augmente sa stabilité.

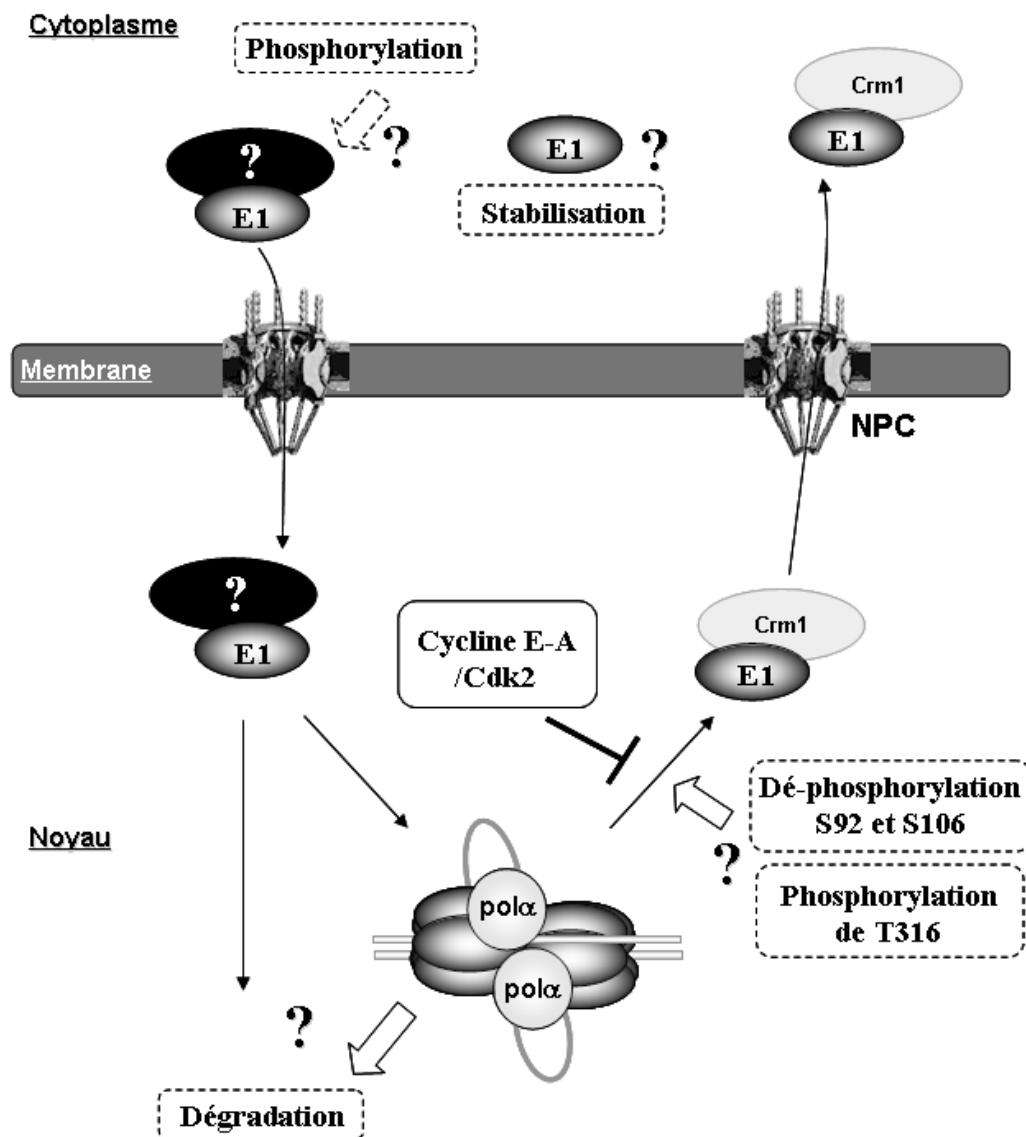


Figure 6.2. Contrôle du transport nucléo-cytoplasmique de E1.

L'export nucléaire de E1 via la voie dépendante de l'exportine Crm1 est inhibé par la phosphorylation de E1 par la cycline E-A/Cdk2. Les autres mécanismes régulant l'export nucléaire de E1 (ex. : la déphosphorylation des sérines de la région N-terminale de E1), tout comme ceux qui régulent son import (phosphorylation de E1), sont peu connus. Les mécanismes de dégradation de E1 ou de stabilisation devront aussi être identifiés. Tous les mécanismes inconnus sont entourés d'une boîte pointillée. La structure des NPC provient de Nakielny et al. (1997) Curr Opin Cell Biol (Nakielny and Dreyfuss, 1997)

6.3 Arrêt de la progression du cycle cellulaire et activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM

Les études présentées dans cette thèse suggèrent que les niveaux d'accumulation nucléaire de E1 contrôlent le mode de répllication de l'ADN du VPH (Fig. 6.3). Ainsi, lorsque la concentration nucléaire de E1 est faible, l'ADN viral est répliqué de manière coordonnée avec la répllication de l'ADN de l'hôte. Ce mode de répllication est essentiel au maintien de l'épisome dans les kératinocytes en prolifération et permet de répliquer l'ADN une fois (ordonnée) ou quelques fois (aléatoire) par cycle cellulaire (Section 1.5.2.1). Dans les cellules en différenciation, l'augmentation de l'expression de E1 suite à l'activation du promoteur p742 dans les cellules en différenciation et l'augmentation de l'activité de Cdk2 induite par E7 mène tous deux à l'augmentation de la concentration nucléaire de E1. Dans ces conditions, l'activation de la voie de dommages à l'ADN est requise et la répllication de l'ADN viral a lieu dans des cellules bloquées en phase S, où l'ADN de l'hôte n'est plus répliqué (Fig. 6.3) (Moody and Laimins, 2009). Finalement, nous proposons que lorsque l'accumulation nucléaire de E1 n'est pas contrôlée par son export nucléaire et que son activité de liaison non spécifique à l'ADN n'est pas inhibée par E2, l'induction de dommages dans l'ADN de l'hôte par E1 pourrait contribuer à la carcinogénicité des VPH en favorisant l'intégration du génome viral (Fig. 6.3).

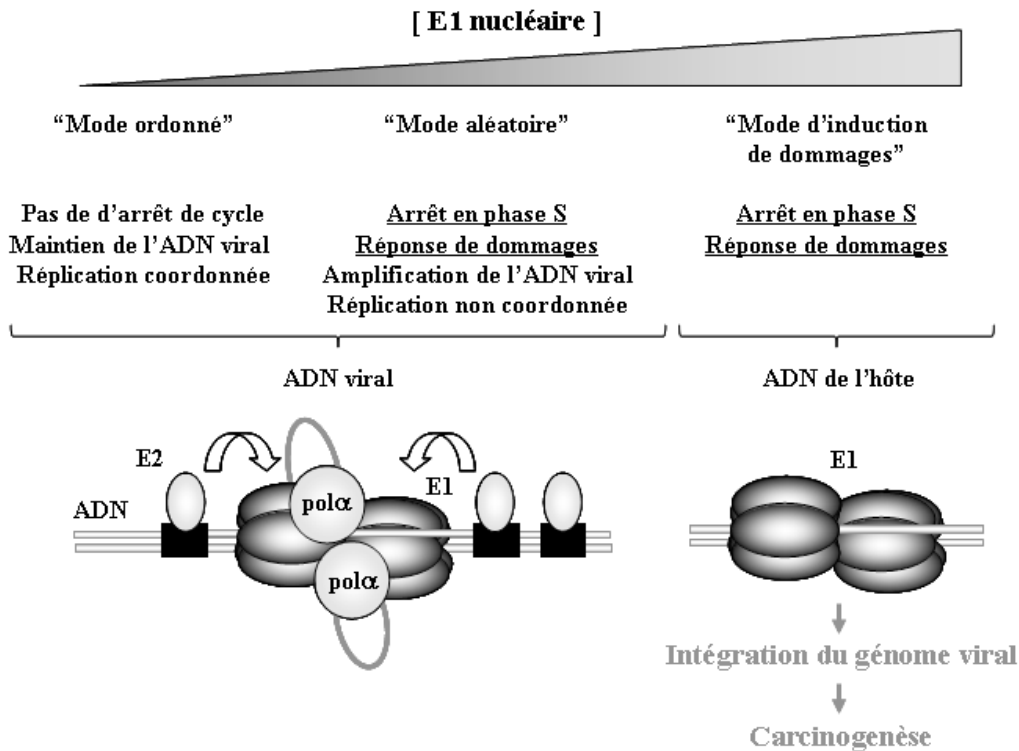


Figure 6.3. Modèle du rôle de l’accumulation nucléaire de E1 dans la réplication virale.

La concentration intranucléaire de E1 est représentée par un triangle gris dans le haut de la figure. À faible concentration, l’ADN viral est répliqué à de faibles niveaux selon un mode ordonné ou aléatoire, tandis qu’à forte concentration l’ADN viral est répliqué dans des cellules bloquées en phase S. Ce mode de réplication requiert également le clivage de la région N-terminale de E1 par les caspase-3/-7. Lorsque l’accumulation nucléaire de E1 n’est pas contrôlée par son export nucléaire et que sa liaison non spécifique à l’ADN n’est pas contrôlée par E2, E1 induit des dommages à l’ADN en se liant au génome de l’hôte. Ce mode est appelé « mode d’induction de dommages » et pourrait contribuer à la carcinogénicité du VPH en favorisant l’intégration du génome viral dans celui de l’hôte.

Plusieurs questions devront être répondues dans le futur. Par exemple, au cours du cycle viral, l’établissement du génome dans le noyau des cellules infectées requiert une

amplification initiale du génome. Puisque la prolifération des kératinocytes est ensuite nécessaire pour le maintien du génome dans ces cellules, des mécanismes permettant d'inhiber cette amplification et d'enclencher un processus de maintien du génome doivent exister. De plus, bien que nous ayons démontré que E1 induise la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de ATM, nous ne savons toujours pas si cette activation est nécessaire au cours de l'amplification ou si c'est plutôt une activité de E1 qui doit être inhibée au cours du cycle viral. Chose certaine, l'activation soutenue de cette voie est non compatible avec la progression du cycle cellulaire et doit à tout prix être évitée dans les cellules en prolifération. En ce sens, nous avons démontré que deux mécanismes contribuent à l'inhibition de l'activation de cette voie par E1 : l'export nucléaire de E1 ainsi que sa liaison à E2. L'activation de la voie ATM peut être causée par l'introduction de bris double brin de l'ADN, ou en absence de bris par le recrutement à l'ADN de protéines telles que MRE11, RAD50, NBS1 (Soutoglou and Misteli, 2008). Par conséquent, il sera important de déterminer de quelle manière E1 active une réponse aux dommages à l'ADN. De plus, comme l'activation de cette voie doit être inhibée au cours de la maintenance de l'épisome dans les kératinocytes en prolifération, il serait intéressant de déterminer si d'autres fonctions de E1, telles que son interaction avec p80 ou avec Ubc9, sont nécessaires à ce contrôle. Précisons que, l'interaction de E1 avec p80 est essentielle seulement dans les couches basales de l'épithélium et que le domaine de E1 responsable de son interaction avec p80 est clivé suite à la différenciation des kératinocytes. De plus, il a récemment été démontré que p80 interagit avec les dé-ubiquitinasés USP1, 12 et 46, et que l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN peut être inhibée par la dé-ubiquitination des histones aux sites de dommages (Cohn et al., 2009; Nakada et al., 2010; Panier and Durocher, 2009). Pour ces raisons, il est possible que E1 recrute p80 à l'ADN afin d'inhiber l'activation de la voie ATM dans les cellules non différenciées. De manière plus générale, il sera important de définir par quel mécanisme la voie de réponse aux dommages à l'ADN contribue à l'amplification du génome au cours du cycle viral. Ces études permettront de comprendre davantage les mécanismes qui contrôlent la réplication de l'ADN viral *in vivo*.

Bibliographie

- Abbate, E.A., Berger, J.M., and Botchan, M.R. (2004). The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* 18, 1981-1996.
- Abbate, E.A., Voitenleitner, C., and Botchan, M.R. (2006). Structure of the Papillomavirus DNA-Tethering Complex E2:Brd4 and a Peptide that Ablates HPV Chromosomal Association. *Mol Cell* 24, 877-889.
- ACS (2006). American Cancer Society. Atlanta: Cancer Facts and Figures 2006. Available from: <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecuredpdf>.
- ACS (2010). American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2010. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-026238pdf>.
- Alberts, B. (2003). DNA replication and recombination. *Nature* 421, 431-435.
- Alexander, K.A., and Phelps, W.C. (1996). A fluorescence anisotropy study of DNA binding by HPV-11 E2C protein: a hierarchy of E2-binding sites. *Biochemistry* 35, 9864-9872.
- Allen-Hoffmann, B.L., Schlosser, S.J., Ivarie, C.A., Sattler, C.A., Meisner, L.F., and O'Connor, S.L. (2000). Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J Invest Dermatol* 114, 444-455.
- Alvisi, G., Rawlinson, S.M., Ghildyal, R., Ripalti, A., and Jans, D.A. (2008). Regulated nucleocytoplasmic trafficking of viral gene products: a therapeutic target? *Biochim Biophys Acta* 1784, 213-227.
- Amin, A.A., Titolo, S., Pelletier, A., Fink, D., Cordingley, M.G., and Archambault, J. (2000). Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272, 137-150.
- Androphy, E.J., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1987). Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325, 70-73.
- Angeletti, P.C., Kim, K., Fernandes, F.J., and Lambert, P.F. (2002). Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 76, 3350-3358.
- Araki, H. (2010). Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 22, 766-771.
- Ashrafi, G.H., Haghshenas, M., Marchetti, B., and 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, 2105-2112.

- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23, 4709-4716.
- Auborn, K.J., Little, R.D., Platt, T.H., Vaccariello, M.A., and 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, 7340-7344.
- Ault, K.A. (2007). Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 369, 1861-1868.
- Auster, A.S., and Joshua-Tor, L. (2004). The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem* 279, 3733-3742.
- Baker, C.C., Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61, 962-971.
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., and Brown, J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60, 1445-1456.
- Baranska, S., Konopa, G., and Wegrzyn, G. (2002). Directionality of lambda plasmid DNA replication carried out by the heritable replication complex. *Nucleic Acids Res* 30, 1176-1181.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792-804.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 490, 117-122.
- Batson, A., Meheus, F., and Brooke, S. (2006). Chapter 26: Innovative financing mechanisms to accelerate the introduction of HPV vaccines in developing countries. *Vaccine* 24 Suppl 3, S219-225.
- Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D., and zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 11, 4607-4617.
- Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi, Y., Angel, P., and Zur Hausen, H. (1995). A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 69, 1-12.

- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.R., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., and Laimins, L.A. (1991). Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* *65*, 2254-2260.
- Berg, M., and Stenlund, A. (1997). Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* *71*, 3853-3863.
- Bernard, H.U. (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* *7*, 219-237.
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., and de Villiers, E.M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* *401*, 70-79.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* *108*, 345-356.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* *14*, 159-169.
- Bezerra, A.L., Lopes, A., Landman, G., Alencar, G.N., Torloni, H., and Villa, L.L. (2001a). Clinicopathologic features and human papillomavirus dna prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. *Am J Surg Pathol* *25*, 673-678.
- Bezerra, A.L., Lopes, A., Santiago, G.H., Ribeiro, K.C., Latorre, M.R., and Villa, L.L. (2001b). Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer* *91*, 2315-2321.
- Bhattacharjee, B., and Sengupta, S. (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* *354*, 280-285.
- Bian, X.L., Rosas-Acosta, G., Wu, Y.C., and 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* *81*, 2899-2908.
- Blachon, S., Bellanger, S., Demeret, C., and Thierry, F. (2005). Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* *280*, 36088-36098.
- Blachon, S., and Demeret, C. (2003). The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* *85*, 813-819.
- Boggio, R., and Chiocca, S. (2005). Gam1 and the SUMO pathway. *Cell Cycle* *4*, 533-535.
- Boggio, R., Colombo, R., Hay, R.T., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2004). A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell* *16*, 549-561.

- Boner, W., Taylor, E.R., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M.S., and Morgan, I.M. (2002). A Functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J Biol Chem* 277, 22297-22303.
- Bonne-Andrea, C., Santucci, S., Clertant, P., and Tillier, F. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J Virol* 69, 2341-2350.
- Bonne-Andrea, C., Tillier, F., McShan, G.D., Wilson, V.G., and Clertant, P. (1997). Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol* 71, 6805-6815.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., Campo, M.S., and Venuti, A. (2010). 1st International Workshop on Papillomavirus E5 Oncogene-a report. *Virology* 408, 135-137.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J., and Shah, K.V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55, 244-265.
- Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., and 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, 796-802.
- Bosch, F.X., Munoz, N., de Sanjose, S., Izarzugaza, I., Gili, M., Viladiu, P., Tormo, M.J., Moreo, P., Ascunze, N., Gonzalez, L.C., *et al.* (1992). Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 52, 750-758.
- Botchan, M., Berg, L., Reynolds, J., and Lusky, M. (1986). The bovine papillomavirus replicon. *Ciba Found Symp* 120, 53-67.
- Botchan, M., and Berger, J. (2010). DNA replication: making two forks from one prereplication complex. *Mol Cell* 40, 860-861.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7, 495-507.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.M., Storey, A., and Banks, L. (1994). The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 203, 73-80.
- Brandsma, J.L., Shlyankevich, M., Zelterman, D., and Su, Y. (2007a). Therapeutic vaccination of rabbits with a ubiquitin-fused papillomavirus E1, E2, E6 and E7 DNA vaccine. *Vaccine* 25, 6158-6163.

- Brandsma, J.L., Shlyankevich, M., Zhang, L., Slade, M.D., Goodwin, E.C., Peh, W., and Deisseroth, A.B. (2004). Vaccination of rabbits with an adenovirus vector expressing the papillomavirus E2 protein leads to clearance of papillomas and infection. *J Virol* *78*, 116-123.
- Brandsma, J.L., Shlyankevich, M., Su, Y., Roberts, A., Rose, J.K., Zelterman, D., and Buonocore, L. (2007b). Vesicular stomatitis virus-based therapeutic vaccination targeted to the E1, E2, E6, and E7 proteins of cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol* *81*, 5749-5758.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 208-219.
- Branzei, D., Sollier, J., Liberi, G., Zhao, X., Maeda, D., Seki, M., Enomoto, T., Ohta, K., and Foiani, M. (2006). Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell* *127*, 509-522.
- Braun, K.A., Lao, Y., He, Z., Ingles, C.J., and Wold, M.S. (1997). Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry* *36*, 8443-8454.
- Bream, G.L., Ohmstede, C.A., and Phelps, W.C. (1993). Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J Virol* *67*, 2655-2663.
- Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* *18*, 2449-2458.
- Brown, D.R., Shew, M.L., Qadadri, B., Neptune, N., Vargas, M., Tu, W., Juliar, B.E., Breen, T.E., and Fortenberry, J.D. (2005). A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* *191*, 182-192.
- Brun, J., Chiu, R.K., Wouters, B.G., and Gray, D.A. (2010). Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells. *BMC Res Notes* *3*, 85.
- Bryan, J.T., and Brown, D.R. (2000). Association of the human papillomavirus type 11 E1(E4) protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* *277*, 262-269.
- Bryan, J.T., and Brown, D.R. (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* *281*, 35-42.
- Buchakjian, M.R., and Kornbluth, S. (2010). The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 715-727.
- Buck, C.B., Day, P.M., Thompson, C.D., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2006a). Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1516-1521.

- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* 78, 751-757.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2005). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* 79, 2839-2846.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Roberts, J.N., Muller, M., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2006b). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog* 2, e69.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Campbell, K.S., Mullane, K.P., Aksoy, I.A., Stubdal, H., Zalvide, J., Pipas, J.M., Silver, P.A., Roberts, T.M., Schaffhausen, B.S., and DeCaprio, J.A. (1997). DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev* 11, 1098-1110.
- Campo, M.S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89, 249-261.
- Campo, M.S., Graham, S.V., Cortese, M.S., Ashrafi, G.H., Araibi, E.H., Dornan, E.S., Miners, K., Nunes, C., and Man, S. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 407, 137-142.
- Campos, S.K., and Ozbun, M.A. (2009). Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes. *PloS one* 4, e4463.
- Castella, S., Bingham, G., and Sanders, C.M. (2006a). Common determinants in DNA melting and helicase-catalysed DNA unwinding by papillomavirus replication protein E1. *Nucleic Acids Res* 34, 3008-3019.
- Castella, S., Burgin, D., and Sanders, C.M. (2006b). Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the bovine papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res* 34, 3731-3741.
- Castellsague, X., Bosch, F.X., and Munoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89, 191-199.
- CDC Center for Disease Control and Prevention. www.cdc.gov.
- Chan, H.M., Smith, L., and La Thangue, N.B. (2001). Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 20, 6152-6163.
- Chan, S.Y., Delius, H., Halpern, A.L., and Bernard, H.U. (1995). Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 69, 3074-3083.

- Chang, Y.E., Pena, L., Sen, G.C., Park, J.K., and Laimins, L.A. (2002). Long-term effect of interferon on keratinocytes that maintain human papillomavirus type 31. *J Virol* 76, 8864-8874.
- Chao, S.F., Rocque, W.J., Daniel, S., Czyzyk, L.E., Phelps, W.C., and Alexander, K.A. (1999). Subunit affinities and stoichiometries of the human papillomavirus type 11 E1:E2:DNA complex. *Biochemistry* 38, 4586-4594.
- Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D., and Seeburg, P.H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 299, 529-534.
- Chen, G., and Stenlund, A. (1998). Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol* 72, 2567-2576.
- Chen, G., and Stenlund, A. (2001). The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *J Virol* 75, 292-302.
- Chen, G., and 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, 7712-7720.
- Chen, Y.H., Huang, L.H., and Chen, T.M. (1996). Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 651-659.
- Chiang, C.M., Dong, G., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992a). Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* 66, 5224-5231.
- Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992b). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5799-5803.
- Chiocca, S. (2007). Viral control of the SUMO pathway: Gam1, a model system. *Biochem Soc Trans* 35, 1419-1421.
- Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H., and Gissmann, L. (1993). Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 67, 6742-6752.
- Clark, R., Lane, D.P., and Tjian, R. (1981). Use of monoclonal antibodies as probes of simian virus 40 T antigen ATPase activity. *J Biol Chem* 256, 11854-11858.
- Clertant, P., and Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 311, 276-279.
- Clower, R.V., Fisk, J.C., and Melendy, T. (2006a). Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 80, 1584-1587.

- Clower, R.V., Hu, Y., and Melendy, T. (2006b). Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology* 348, 13-18.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- Coggin, J.R., and Zur Hausen, H. (1979). Workshop on Papillomaviruses and Cancer. *Cancer Res* 39, 545-546.
- Cohn, M.A., Kee, Y., Haas, W., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2009). UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *J Biol Chem* 284, 5343-5351.
- Cohn, M.A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T.T., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2007). A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* 28, 786-797.
- Collins, S.I., Constandinou-Williams, C., Wen, K., Young, L.S., Roberts, S., Murray, P.G., and Woodman, C.B. (2009). Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res* 69, 3828-3832.
- Conger, K.L., Liu, J.S., Kuo, S.R., Chow, L.T., and Wang, T.S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274, 2696-2705.
- Conrad, M., Bubb, V.J., and Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67, 6170-6178.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193-204.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., and Conti, E. (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Ann Rev Biochem* 76, 647-671.
- Cooper, C.S., Upmeyer, S.N., and Winokur, P.L. (1998). Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions. *Virology* 241, 312-322.
- Cote-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D'Abramo, C.M., Lehoux, M., Joubert, S., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., and Archambault, J. (2008). Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J Virol* 82, 1271-1283.
- Cricca, M., Venturoli, S., Leo, E., Costa, S., Musiani, M., and Zerbini, M. (2009). Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods* 158, 180-183.

- Crusius, K., Auvinen, E., and Alonso, A. (1997). Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15, 1437-1444.
- Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A. (2000). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* 20, 65-69.
- Cueille, N., Nougarede, R., Mechali, F., Philippe, M., and Bonne-Andrea, C. (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* 72, 7255-7262.
- Culp, T.D., Budgeon, L.R., Marinkovich, M.P., Meneguzzi, G., and 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, 8940-8950.
- Daniel, B., Mukherjee, G., Seshadri, L., Vallikad, E., and Krishna, S. (1995). Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol* 76 (Pt 10), 2589-2593.
- Dasgupta, S., Zabielski, J., Simonsson, M., and Burnett, S. (1992). Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *J Mol Biol* 228, 1-6.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14252-14257.
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72, 142-150.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- del Mar Pena, L.M., and Laimins, L.A. (2001). Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J Virol* 75, 10005-10013.
- Del Vecchio, A.M., Romanczuk, H., Howley, P.M., and Baker, C.C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* 66, 5949-5958.
- Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 71, 9343-9349.
- Demeret, C., Garcia-Carranca, A., and Thierry, F. (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22, 168-175.

- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., and Thierry, F. (1998). The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* 242, 378-386.
- Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., and Thierry, F. (1995). Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res* 23, 4777-4784.
- Deng, W., Jin, G., Lin, B.Y., Van Tine, B.A., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2003). mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* 77, 10213-10226.
- Deng, W., Lin, B.Y., Jin, G., Wheeler, C.G., Ma, T., Harper, J.W., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2004). Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 78, 13954-13965.
- Derkey, C.S. (1995). Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121, 1386-1391.
- Deyrieux, A.F., Rosas-Acosta, G., Ozbun, M.A., and Wilson, V.G. (2007). Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* 120, 125-136.
- Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P., and Rheinwald, J.G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* 20, 1436-1447.
- DiMaio, D., and Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20, 7866-7873.
- DiPaolo, J.A., Burkhardt, A., Doniger, J., Pirisi, L., Popescu, N.C., and Yasumoto, S. (1986). In vitro models for studying the molecular biology of carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 14, 417-423.
- Disbrow, G.L., Hanover, J.A., and Schlegel, R. (2005). Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol* 79, 5839-5846.
- Dixon, E.P., Pahel, G.L., Rocque, W.J., Barnes, J.A., Lobe, D.C., Hanlon, M.H., Alexander, K.A., Chao, S.F., Lindley, K., and Phelps, W.C. (2000). The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270, 345-357.
- Dollard, S.C., Chow, L.T., Kreider, J.W., Broker, T.R., Lill, N.L., and Howett, M.K. (1989). Characterization of an HPV type 11 isolate propagated in human foreskin implants in nude mice. *Virology* 171, 294-297.

- Dollard, S.C., Wilson, J.L., Demeter, L.M., Bonnez, W., Reichman, R.C., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992). Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Genes Dev* 6, 1131-1142.
- Donaldson, M.M., Boner, W., and Morgan, I.M. (2007). TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *J Virol* 81, 4338-4342.
- Dong, X., Biswas, A., Suel, K.E., Jackson, L.K., Martinez, R., Gu, H., and Chook, Y.M. (2009). Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* 458, 1136-1141.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.
- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Naphine, S., Sterling, J., Winter, G., and Griffin, H. (1997). Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 238, 40-52.
- Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M., and Crawford, L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 178, 254-262.
- Dornreiter, I., Erdile, L.F., Gilbert, I.U., von Winkler, D., Kelly, T.J., and Fanning, E. (1992). Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J* 11, 769-776.
- Duensing, S., and Munger, K. (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 62, 7075-7082.
- Durst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R.T., Boukamp, P., Fusenig, N.E., and Gissmann, L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1, 251-256.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.
- Egawa, K. (2003). Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207, 251-254.
- Eladad, S., Ye, T.Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M.J., and Ellis, N.A. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14, 1351-1365.

- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R., and Dobner, T. (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11312-11317.
- Enemark, E.J., Chen, G., Vaughn, D.E., Stenlund, A., and Joshua-Tor, L. (2000). Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell* *6*, 149-158.
- Enemark, E.J., and Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* *442*, 270-275.
- Enemark, E.J., Stenlund, A., and Joshua-Tor, L. (2002). Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *EMBO J* *21*, 1487-1496.
- Fang, L., Meyers, C., Budgeon, L.R., and Howett, M.K. (2006). Induction of productive human papillomavirus type 11 life cycle in epithelial cells grown in organotypic raft cultures. *Virology* *347*, 28-35.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Family Papillomaviridae* Elsevier, 239-255.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., and Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* *21*, 1205-1209.
- Fehrmann, F., Klumpp, D.J., and Laimins, L.A. (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* *77*, 2819-2831.
- Fertey, J., Ammermann, I., Winkler, M., Stoger, R., Iftner, T., and Stubenrauch, F. (2010). Interaction of the papillomavirus E8--E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* *84*, 9505-9515.
- Fertey, J., Hurst, J., Straub, E., Schenker, A., Iftner, T., and 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*, 2918-2926.
- Flores, E.R., Allen-Hoffmann, B.L., Lee, D., Sattler, C.A., and 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*, 344-354.
- Flores, E.R., and 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*, 7167-7179.

- Florin, L., Becker, K.A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J Virol* *80*, 6691-6696.
- Florin, L., Schafer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2002). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology* *295*, 97-107.
- Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 109-131.
- Fouts, E.T., Yu, X., Egelman, E.H., and Botchan, M.R. (1999). Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem* *274*, 4447-4458.
- Fradet-Turcotte, A., and Archambault, J. (2007). Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses. *Antivir Ther* *12*, 431-451.
- Fradet-Turcotte, A., and Archambault, J. (Données non-publiées).
- Fradet-Turcotte, A., Brault, K., Titolo, S., Howley, P.M., and Archambault, J. (2009). Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. *Virology* *395*, 190-201.
- Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L.A., and Archambault, J. (2010a). Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *J Virol* *84*, 11747-11760.
- Fradet-Turcotte, A., Morin, G., Lehoux, M., Bullock, P.A., and Archambault, J. (2010b). Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* *399*, 65-76.
- Fradet-Turcotte, A., Vincent, C., Joubert, S., Bullock, P.A., and Archambault, J. (2007). Quantitative analysis of the binding of simian virus 40 large T antigen to DNA. *J Virol* *81*, 9162-9174.
- Franco, E.L., Villa, L.L., Sobrinho, J.P., Prado, J.M., Rousseau, M.C., Desy, M., and Rohan, T.E. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* *180*, 1415-1423.
- Frattini, M.G., and 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*, 12398-12402.
- Frattini, M.G., and Laimins, L.A. (1994b). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* *204*, 799-804.
- Frattini, M.G., Lim, H.B., Doorbar, J., and Laimins, L.A. (1997). Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates. *J Virol* *71*, 7068-7072.

- Frattini, M.G., Lim, H.B., and 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*, 3062-3067.
- Frazer, I.H. (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* *384*, 410-414.
- Freeman, A.K., and Monteiro, A.N. (2010). Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Commun Signal* *8*, 27.
- Frisch, M., Fenger, C., van den Brule, A.J., Sorensen, P., Meijer, C.J., Walboomers, J.M., Adami, H.O., Melbye, M., and Glimelius, B. (1999). Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* *59*, 753-757.
- Gagnon, D., Joubert, S., Senechal, H., Fradet-Turcotte, A., Torre, S., and Archambault, J. (2009). Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol* *83*, 4127-4139.
- Gai, D., Li, D., Finkielstein, C.V., Ott, R.D., Taneja, P., Fanning, E., and Chen, X.S. (2004). Insights into the oligomeric states, conformational changes, and helicase activities of SV40 large tumor antigen. *J Biol Chem* *279*, 38952-38959.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* *462*, 935-939.
- Gammoh, N., Grm, H.S., Massimi, P., and Banks, L. (2006). Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J Virol* *80*, 1787-1797.
- Gammoh, N., Isaacson, E., Tomaic, V., Jackson, D.J., Doorbar, J., and Banks, L. (2009). Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene* *28*, 2299-2304.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 861-871.
- Garland, S.M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Harper, D.M., Leodolter, S., Tang, G.W., Ferris, D.G., Steben, M., Bryan, J., *et al.* (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* *356*, 1928-1943.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Jr., Ustav, M., and 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*, 3315-3329.
- Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C., and Lambert, P.F. (2003). Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* *77*, 2832-2842.

- Gewirtzman, A., Bartlett, B., and Tyring, S. (2008). Epidermodysplasia verruciformis and human papilloma virus. *Curr Opin Infect Dis* 21, 141-146.
- Gilbert, D.M., and Cohen, S.N. (1987). Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* 50, 59-68.
- Gillette, T.G., Lusky, M., and 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, 8846-8850.
- Gillitzer, E., Chen, G., and Stenlund, A. (2000). Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J* 19, 3069-3079.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75, 1565-1570.
- Gissmann, L., Boshart, M., Durst, M., Ikenberg, H., Wagner, D., and zur Hausen, H. (1984). Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 83, 26s-28s.
- Gissmann, L., deVilliers, E.M., and zur Hausen, H. (1982a). Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* 29, 143-146.
- Gissmann, L., Diehl, V., Schultz-Coulon, H.J., and zur Hausen, H. (1982b). Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 44, 393-400.
- Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983a). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 560-563.
- Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur, H.H. (1983b). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 560-563.
- Giuliano, A.R., Anic, G., and Nyitray, A.G. (2010). Epidemiology and pathology of HPV disease in males. *Gynecol Oncol* 117, S15-19.
- Giuliano, A.R., Harris, R., Sedjo, R.L., Baldwin, S., Roe, D., Papenfuss, M.R., Abrahamsen, M., Inserra, P., Olvera, S., and Hatch, K. (2002). Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 186, 462-469.
- Gloss, B., and Bernard, H.U. (1990). The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol* 64, 5577-5584.

- Gloss, B., Bernard, H.U., Seedorf, K., and Klock, G. (1987). The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 6, 3735-3743.
- Gonzalez, A., Bazaldua-Hernandez, C., West, M., Woytek, K., and 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, 245-253.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., and Wolf, Y.I. (1990). A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett* 262, 145-148.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K.U., and 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, 2339-2349.
- Green, H., Rheinwald, J.G., and Sun, T.T. (1977). Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Prog Clin Biol Res* 17, 493-500.
- Grm, H.S., Massimi, P., Gammoh, N., and Banks, L. (2005). Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 24, 5149-5164.
- Gu, W., Li, M., Zhao, W.M., Fang, N.X., Bu, S., Frazer, I.H., and Zhao, K.N. (2004). tRNASer(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes. *Nucleic Acids Res* 32, 4448-4461.
- Guervilly, J.H., Renaud, E., Takata, M., and Rosselli, F. (2011). USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet* 20, 2171-2181.
- Gundersen, J.H., and Nichols, S. (1994). LEEP: early experience with a new approach to cervical lesions. *Wis Med J* 93, 58-62.
- Habel, L.A., Van Den Eeden, S.K., Sherman, K.J., McKnight, B., Stergachis, A., and Daling, J.R. (1998). Risk factors for incident and recurrent condylomata acuminata among women. A population-based study. *Sex Transm Dis* 25, 285-292.
- Hadaschik, D., Hinterkeuser, K., Oldak, M., Pfister, H.J., and Smola-Hess, S. (2003). The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol* 77, 5253-5265.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., and Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9, 680-689.

- Halas, A., Podlaska, A., Derkacz, J., McIntyre, J., Skoneczna, A., and Sledziewska-Gojska, E. (2011). The roles of PCNA SUMOylation, Mms2-Ubc13 and Rad5 in translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *80*, 786-797.
- Han, Y., Loo, Y.M., Militello, K.T., and Melendy, T. (1999). Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* *73*, 4899-4907.
- Hanif, I.M., Hanif, I.M., Shazib, M.A., Ahmad, K.A., and Pervaiz, S. 2010. Casein Kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design. In *J Biochem Cell Biol* *42*, 1602-1605.
- Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 519-529.
- Harper, J.W., and Adams, P.D. (2001). Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* *101*, 2511-2526.
- Hartley, K.A., and Alexander, K.A. (2002). Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication. *J Virol* *76*, 5014-5023.
- Heino, P., Zhou, J., and Lambert, P.F. (2000). Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology* *276*, 304-314.
- Herdman, M.T., Pett, M.R., Roberts, I., Alazawi, W.O., Teschendorff, A.E., Zhang, X.Y., Stanley, M.A., and 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*, 2341-2353.
- Hickman, A.B., and Dyda, F. (2005). Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 77-85.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., and Raj, K. (2006). Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* *80*, 4431-4439.
- Holmgren, S.C., Patterson, N.A., Ozbun, M.A., and Lambert, P.F. (2005). The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* *79*, 3938-3948.
- Holt, S.E., and 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*, 6525-6532.
- Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O., and Bogers, J.P. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal* *7*, 11.

- Hsu, C.Y., Mechali, F., and Bonne-Andrea, C. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* 81, 384-394.
- Hu, Y., Clower, R.V., and Melendy, T. (2006). Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J Virol* 80, 4363-4371.
- Huang, T.T., Nijman, S.M., Mirchandani, K.D., Galardy, P.J., Cohn, M.A., Haas, W., Gygi, S.P., Ploegh, H.L., Bernards, R., and D'Andrea, A.D. (2006). Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol* 8, 339-347.
- Hubert, W.G. (2005). Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol* 79, 5914-5922.
- Hubert, W.G., and 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, 2263-2273.
- Hughes, F.J., and Romanos, M.A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 21, 5817-5823.
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W., and 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, 9737-9747.
- Hummel, M., Hudson, J.B., and Laimins, L.A. (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 66, 6070-6080.
- Hummel, M., Lim, H.B., and 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, 3381-3388.
- Hung, C.F., Ma, B., Monie, A., Tsen, S.W., and Wu, T.C. (2008). Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opin Biol Ther* 8, 421-439.
- IARC (2007). Human papillomas virus, International Agency for Research on Cancer *Volume 90*.
- IARC (2008). International Agency for Research on Cancer, Cancer Fact sheet, Global cancer statistics 2008. Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>.
- Ikenberg, H., Gissmann, L., Gross, G., Grussendorf-Conen, E.I., and zur Hausen, H. (1983). Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer* 32, 563-565.

- Ilves, I., Kivi, S., and Ustav, M. (1999). Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* 73, 4404-4412.
- Insinga, R.P., Dasbach, E.J., and Elbasha, E.H. (2005). Assessing the annual economic burden of preventing and treating anogenital human papillomavirus-related disease in the US: analytic framework and review of the literature. *Pharmacoeconomics* 23, 1107-1122.
- Jagu, S., Kwak, K., Garcea, R.L., and Roden, R.B. (2011). Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine* 28, 4478-4486.
- Jans, D.A., and Hubner, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* 76, 651-685.
- Jenkins, O., Earnshaw, D., Sarginson, G., Del Vecchio, A., Tsai, J., Kallender, H., Amegadzie, B., and 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.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B.L., and Lambert, P.F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69, 2989-2997.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Ann Rev Biochem* 74, 283-315.
- Johnston, K.B., Monteiro, J.M., Schultz, L.D., Chen, L., Wang, F., Ausensi, V.A., Dell, E.C., Santos, E.B., Moore, R.A., Palker, T.J., *et al.* (2005). Protection of beagle dogs from mucosal challenge with canine oral papillomavirus by immunization with recombinant adenoviruses expressing codon-optimized early genes. *Virology* 336, 208-218.
- Jones, P.H., Simons, B.D., and Watt, F.M. (2007). Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell? *Cell Stem Cell* 1, 371-381.
- Joo, H.Y., Jones, A., Yang, C., Zhai, L., Smith, A.D.t., Zhang, Z., Chandrasekharan, M.B., Sun, Z.W., Renfrow, M.B., Wang, Y., *et al.* 2011. Regulation of Histone H2A and H2B Deubiquitination and Xenopus Development by USP12 and USP46. *J Biol Chem* 286, 7190-7201.
- Joo, H.Y., Jones, A., Yang, C., Zhai, L., Smith, A.D.t., Zhang, Z., Chandrasekharan, M.B., Sun, Z.W., Renfrow, M.B., Wang, Y., *et al.* (2011). Regulation of Histone H2A and H2B Deubiquitination and Xenopus Development by USP12 and USP46. *J Biol Chem* 286, 7190-7201.
- Joura, E.A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C.M., Perez, G., Koutsky, L.A., Garland, S.M., Harper, D.M., Tang, G.W., Ferris, D.G., *et al.* (2007). Efficacy of a

- quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* *369*, 1693-1702.
- Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., and Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* *274*, 5810-5822.
- Kabsch, K., and Alonso, A. (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* *76*, 12162-12172.
- Kabsch, K., Mossadegh, N., Kohl, A., Komposch, G., Schenkel, J., Alonso, A., and Tomakidi, P. (2004). The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology* *47*, 48-56.
- Kadaja, M., Isok-Paas, H., Laos, T., Ustav, E., and Ustav, M. (2009a). Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog* *5*, e1000397.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., and Ustav, M. (2009b). Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* *384*, 360-368.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., and Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J* *26*, 2180-2191.
- Kalantari, M., Calleja-Macias, I.E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H.A., Wiley, D.J., and Bernard, H.U. (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* *78*, 12762-12772.
- Kamper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J.T., and Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* *80*, 759-768.
- Karanam, B., Jagu, S., Huh, W.K., and Roden, R.B. (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol* *87*, 287-299.
- Kaur, P., and Li, A. (2000). Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* *114*, 413-420.
- Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* *24*, 1680-1694.

- Kee, Y., Yang, K., Cohn, M.A., Haas, W., Gygi, S.P., and D'Andrea, A.D. (2010). WDR20 regulates activity of the USP12 x UAF1 deubiquitinating enzyme complex. *J Biol Chem* 285, 11252-11257.
- Kemp, T.J., Hildesheim, A., Safaeian, M., Dauner, J.G., Pan, Y., Porras, C., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Herrero, R., and Pinto, L.A. (2011). HPV16/18 L1 VLP vaccine induces cross-neutralizing antibodies that may mediate cross-protection. *Vaccine* 29, 2011-2014.
- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661, 3-38.
- Kikuchi, K., Taniguchi, A., and Yasumoto, S. (1996). Induction of the HPV16 enhancer activity by Jun-B and c-Fos through cooperation of the promoter-proximal AP-1 site and the epithelial cell type--specific regulatory element in fibroblasts. *Virus Genes* 13, 45-52.
- Kim, K., Angeletti, P.C., Hassebroek, E.C., and Lambert, P.F. (2005). Identification of cis-acting elements that mediate the replication and maintenance of human papillomavirus type 16 genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 79, 5933-5942.
- Kim, K., Garner-Hamrick, P.A., Fisher, C., Lee, D., and Lambert, P.F. (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 77, 12450-12459.
- Kim, K., and Lambert, P.F. (2002). E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology* 293, 10-14.
- King, L.E., Fisk, J.C., Dornan, E.S., Donaldson, M.M., Melendy, T., and Morgan, I.M. (2010). Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling. *Virology* 406, 95-102.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67, 6929-6936.
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P., and Auvinen, E. (2008). Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27, 2532-2541.
- Klucsevsek, K., Wertz, M., Lucchi, J., Leszczynski, A., and Moroianu, J. (2007). Characterization of the nuclear localization signal of high risk HPV16 E2 protein. *Virology* 360, 191-198.
- Klumpp, D.J., and Laimins, L.A. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 257, 239-246.

- Klumpp, D.J., Stubenrauch, F., and 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*, 8186-8194.
- Knight, G.L., Pugh, A.G., Yates, E., Bell, I., Wilson, R., Moody, C.A., Laimins, L.A., and Roberts, S. (2011). A cyclin-binding motif in human papillomavirus type 18 (HPV18) E1^{E4} is necessary for association with CDK-cyclin complexes and G2/M cell cycle arrest of keratinocytes, but is not required for differentiation-dependent viral genome amplification or L1 capsid protein expression. *Virology* *412*, 196-210.
- Korzeniewski, N., Spardy, N., Duensing, A., and Duensing, S. (2010). Genomic instability and cancer: Lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett* *305*, 113-122.
- Koss, L.G., and Durfee, G.R. (1955). Cytological changes preceding the appearance of in situ carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* *8*, 295-301.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* *102*, 3-8.
- Krawczyk, E., Hanover, J.A., Schlegel, R., and Supryniewicz, F.A. (2008a). Karyopherin beta3: a new cellular target for the HPV-16 E5 oncoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* *371*, 684-688.
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F.A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D.P., Hanover, J., and Schlegel, R. (2008b). Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* *173*, 682-688.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9112-9117.
- Kumar, A., Meinke, G., Reese, D.K., Moine, S., Phelan, P.J., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Bohm, A., and Bullock, P.A. (2007). Model for T-antigen-dependent melting of the simian virus 40 core origin based on studies of the interaction of the Beta-hairpin with DNA. *J Virol* *81*, 4808-4818.
- Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L.M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G.F., Wazer, D.E., *et al.* (2002). Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* *22*, 5801-5812.
- Kuo, S.R., Liu, J.S., Broker, T.R., and 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*, 24058-24065.
- Kusumoto-Matsuo, R., Kanda, T., and Kukimoto, I. (2011). Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes Cells* *16*, 23-33.

- Kutay, U., and Guttinger, S. (2005). Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* 15, 121-124.
- Kwak, K., Yemelyanova, A., and Roden, R.B. (2010). Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Immunol* 23, 244-251.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.
- Lace, M.J., Anson, J.R., Thomas, G.S., Turek, L.P., and Haugen, T.H. (2008). The E8--E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J Virol* 82, 10841-10853.
- Lacey, C.J. (2005). Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol* 32 *Suppl 1*, S82-90.
- Lacey, C.J., Lowndes, C.M., and 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.
- Lambert, S., and Carr, A.M. (2005). Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* 87, 591-602.
- Lange, A., Mills, R.E., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J Biol Chem* 283, 12926-12934.
- Lawrence, T., Puel, A., Reichenbach, J., Ku, C.L., Chapgier, A., Renner, E., Minard-Colin, V., Ouachee, M., and Casanova, J.L. (2005). Autosomal-dominant primary immunodeficiencies. *Curr Opin Hematol* 12, 22-30.
- Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., and Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 348-370.
- Lazo, P.A. (1987). Structure, DNaseI hypersensitivity and expression of integrated papilloma virus in the genome of HeLa cells. *Eur J Biochem* 165, 393-401.
- Lee, A.Y., and Chiang, C.M. (2009). Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability. *J Biol Chem* 284, 2778-2786.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543-558.

- Lee, C., and 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, 12366-12377.
- Lee, D., Kim, H., Lee, Y., and Choe, J. (1997). Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res* 52, 97-108.
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G.V., and Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* 399, 487-491.
- Lee, J.W., Choi, H.S., Gyuris, J., Brent, R., and Moore, D.D. (1995). Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 243-254.
- Lee, K.Y., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1998). Transcription factor YY1 represses cell-free replication from human papillomavirus origins. *J Virol* 72, 4911-4917.
- Lee, K.Y., Yang, K., Cohn, M.A., Sikdar, N., D'Andrea, A.D., and 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, 10362-10369.
- Lee, M.G., and Nurse, P. (1987). Cell cycle genes of the fission yeast. *Sci Prog* 71, 1-14.
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., and 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, 19-25.
- Lehman, C.W., and Botchan, M.R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4338-4343.
- Lehman, C.W., King, D.S., and Botchan, M.R. (1997). A papillomavirus E2 phosphorylation mutant exhibits normal transient replication and transcription but is defective in transformation and plasmid retention. *J Virol* 71, 3652-3665.
- Lehoux, M., D'Abramo, C.M., and Archambault, J. (2009). Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* 12, 268-280.
- Leng, X., and 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., and Hella, M. (2002). Functional analysis of a carboxyl-terminal phosphorylation mutant of the bovine papillomavirus E1 protein. *J Mol Biol* 316, 599-609.

- Lentz, M.R., Pak, D., Mohr, I., and 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, 1414-1423.
- Lentz, M.R., Stevens, S.M., Jr., Raynes, J., and Elkhoury, N. (2006). A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virology* 3, 13.
- Li, R., and Botchan, M.R. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-1221.
- Li, R., and 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, 7051-7055.
- Lim, D.A., Gossen, M., Lehman, C.W., and Botchan, M.R. (1998). Competition for DNA binding sites between the short and long forms of E2 dimers underlies repression in bovine papillomavirus type 1 DNA replication control. *J Virol* 72, 1931-1940.
- Lin, B.Y., Makhov, A.M., Griffith, J.D., Broker, T.R., and 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, 6592-6604.
- Lin, Z., Yemelyanova, A.V., Gambhira, R., Jagu, S., Meyers, C., Kirnbauer, R., Ronnett, B.M., Gravitt, P.E., and Roden, R.B. (2009). Expression pattern and subcellular localization of human papillomavirus minor capsid protein L2. *Am J Pathol* 174, 136-143.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1995). The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 270, 27283-27291.
- Liu, J.S., Kuo, S.R., Makhov, A.M., Cyr, D.M., Griffith, J.D., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1998). Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 273, 30704-30712.
- Liu, X., Schuck, S., and Stenlund, A. (2007). Adjacent residues in the E1 initiator beta-hairpin define different roles of the beta-hairpin in Ori melting, helicase loading, and helicase activity. *Mol Cell* 25, 825-837.
- Liu, X., Schuck, S., and Stenlund, A. (2010). Structure-based mutational analysis of the bovine papillomavirus E1 helicase domain identifies residues involved in the nonspecific DNA binding activity required for double trimer formation. *J Virol* 84, 4264-4276.
- Liu, X., and 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, 1912-1919.

- Liu, Y., You, H., Chiriva-Internati, M., Korourian, S., Lowery, C.L., Carey, M.J., Smith, C.V., and Hermonat, P.L. (2001). Display of complete life cycle of human papillomavirus type 16 in cultured placental trophoblasts. *Virology* 290, 99-105.
- Ljungman, M. (2005). Activation of DNA damage signaling. *Mutat Res* 577, 203-216.
- Longhese, M.P., Bonetti, D., Manfrini, N., and Clerici, M. (2010). Mechanisms and regulation of DNA end resection. *EMBO J* 29, 2864-2874.
- Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004). The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78, 3533-3541.
- Longworth, M.S., Wilson, R., and Laimins, L.A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 24, 1821-1830.
- Loo, Y.M., and Melendy, T. (2004). Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78, 1605-1615.
- Lu, J.Z., Sun, Y.N., Rose, R.C., Bonnez, W., and McCance, D.J. (1993). Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 67, 7131-7139.
- Lusky, M., and 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, 6363-6367.
- Lusky, M., Hurwitz, J., and Seo, Y.S. (1994). The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8895-8899.
- Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., and Harper, J.W. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 382-387.
- Mach, H., Volkin, D.B., Troutman, R.D., Wang, B., Luo, Z., Jansen, K.U., and Shi, L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci* 95, 2195-2206.
- Madsen, B.S., Jensen, H.L., van den Brule, A.J., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2008a). Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer* 122, 2827-2834.
- Madsen, B.S., van den Brule, A.J., Jensen, H.L., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. (2008b). Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis--population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 2683-2691.

- Majewski, S., and Jablonska, S. (1997). Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* 36, 659-685; quiz 686-658.
- Malcles, M.H., Cueille, N., Mechali, F., Coux, O., and Bonne-Andrea, C. (2002). Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* 76, 11350-11358.
- Manhart, L.E., and Koutsky, L.A. (2002). Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dise* 29, 725-735.
- Mansky, K.C., Batiza, A., and Lambert, P.F. (1997). Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol* 71, 7600-7608.
- Masclé, X.H., Germain-Desprez, D., Huynh, P., Estéphan, P., and Aubry, M. (2007). Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem* 282, 10190-10202.
- Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V., and Banks, L. (1999). Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 18, 7748-7754.
- Masterson, P.J., Stanley, M.A., Lewis, A.P., and 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, 7407-7419.
- Matovina, M., Sabol, I., Grubisic, G., Gasperov, N.M., and Grce, M. (2009). Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol* 113, 120-127.
- Matunis, M.J. (2002). On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications. *Mol Cell* 10, 441-442.
- Maufort, J.P., Shai, A., Pitot, H.C., and Lambert, P.F. (2010). A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 70, 2924-2931.
- Maufort, J.P., Williams, S.M., Pitot, H.C., and Lambert, P.F. (2007). Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res* 67, 6106-6112.
- May, M., Dong, X.P., Beyer-Finkler, E., Stubenrauch, F., Fuchs, P.G., and Pfister, H. (1994). The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 13, 1460-1466.
- McBride, A.A., Byrne, J.C., and 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, 510-514.

- McIntosh, P.B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D.J., Griffin, H.M., and Doorbar, J. (2010). E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci* *123*, 2810-2822.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Bromberg-White, J.L., and Meyers, C. (2005). The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle. *Virology* *338*, 61-68.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.W., and Munger, K. (2008). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J Virol* *82*, 8695-8705.
- McLaughlin-Drubin, M.E., and Munger, K. (2009). Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res* *143*, 195-208.
- McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., Spindler, J.E., Mitra, R., and McBride, A.A. (2006). Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* *80*, 9530-9543.
- McShan, G.D., and 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., and Wilson, V.G. (2000). Contribution of bovine papillomavirus type 1 E1 protein residue 48 to replication function. *J Gen Virol* *81*, 1995-2004.
- Mechali, F., Hsu, C.Y., Castro, A., Lorca, T., and Bonne-Andrea, C. (2004). Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol* *78*, 2615-2619.
- Mechali, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 728-738.
- Meggio, F., and Pinna, L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* *17*, 349-368.
- Meinke, G., Phelan, P., Moine, S., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Bullock, P.A., and Bohm, A. (2007). The Crystal Structure of the SV40 T-Antigen Origin Binding Domain in Complex with DNA. *PLoS Biol* *5*, e23.
- Meinke, G., Phelan, P.J., Fradet-Turcotte, A., Bohm, A., Archambault, J., and Bullock, P.A. (2010). Structure-Based Analysis of the Interaction between Sv40 T-Antigen Origin Binding Domain and Single Stranded DNA. *J Virol* *85*, 818-827.
- Melchior, F., and Hengst, L. (2002). SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* *1*, 245-249.
- Melendy, T., Sedman, J., and Stenlund, A. (1995). Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* *69*, 7857-7867.
- Melnikow, J. (1995). Electrosurgical loop excision of the cervical transformation zone. *The J Fam Pract* *41*, 503-504.

- Mendoza, R., Gandhi, L., and 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*, 3789-3798.
- Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B., and Laimins, L.A. (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* *257*, 971-973.
- Meyers, C., Mayer, T.J., and Ozbun, M.A. (1997). Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* *71*, 7381-7386.
- Middleton, K., Peh, W., Southern, S., Griffin, H., Sotlar, K., Nakahara, T., El-Sherif, A., Morris, L., Seth, R., Hibma, M., *et al.* (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* *77*, 10186-10201.
- Mitchell, M.F., Tortolero-Luna, G., Cook, E., Whittaker, L., Rhodes-Morris, H., and Silva, E. (1998). A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* *92*, 737-744.
- Miura, S., Kawana, K., Schust, D.J., Fujii, T., Yokoyama, T., Iwasawa, Y., Nagamatsu, T., Adachi, K., Tomio, A., Tomio, K., *et al.* (2010). CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol* *84*, 11614-11623.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009a). FANCD2 hurdles the DNA interstrand crosslink. *Cell* *139*, 1222-1224.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009b). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Ann Rev Genet* *43*, 223-249.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* *129*, 665-679.
- Moody, C.A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., and Laimins, L.A. (2007). Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19541-19546.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2009). Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog* *5*, e1000605.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* *10*, 550-560.
- Moore, R.A., Santos, E.B., Nicholls, P.K., White, K.L., Anderson, D.M., Lloyd, A., Topley, P., Romanos, M., Thomsen, L., Parmar, V., *et al.* (2002). Intraepithelial DNA

- immunisation with a plasmid encoding a codon optimised COPV E1 gene sequence, but not the wild-type gene sequence completely protects against mucosal challenge with infectious COPV in beagles. *Virology* *304*, 451-459.
- Mooring, C.E., O'Rourke, P.K., and Kimble, R.M. (2011). Large loop excision of transformation zone procedures used in the management of cytological abnormalities of the cervix. *Aust N Z J Obst Gynaecol* *51*, 109-113.
- Morgan, I.M., and 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., and 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*, 5287-5300.
- Muller, F., Seo, Y.S., and Hurwitz, J. (1994). Replication of bovine papillomavirus type 1 origin-containing DNA in crude extracts and with purified proteins. *J Biol Chem* *269*, 17086-17094.
- Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E., and Howley, P.M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* *8*, 4099-4105.
- Munk, C., Svare, E.I., Poll, P., Bock, J.E., and Kjaer, S.K. (1997). History of genital warts in 10,838 women 20 to 29 years of age from the general population. Risk factors and association with Papanicolaou smear history. *Sex Transm Dis* *24*, 567-572.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Tafur, L., Izarzugaza, I., Gili, M., Viladiu, P., Navarro, C., Martos, C., Ascunce, N., *et al.* (1992). The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* *52*, 743-749.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A.B., and Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* *24 Suppl 3*, S3/1-10.
- Myers, G., Bernard, H.-U., Delius, H., Favre, M., Icenogel, J., Van Ranst, M., and Wheeler, C. (1994). *Human Papillomaviruses 1994: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*. Los Alamos, NM, Los Alamos National Laboratory.
- Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y.C., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., *et al.* (2010). Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* *466*, 941-946.
- Nakahara, T., Nishimura, A., Tanaka, M., Ueno, T., Ishimoto, A., and Sakai, H. (2002). Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* *76*, 10914-10920.

- Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., and Lambert, P.F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* *79*, 13150-13165.
- Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 420-429.
- Nguyen, V.Q., Co, C., Irie, K., and Li, J.J. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* *10*, 195-205.
- Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* *411*, 1068-1073.
- Niimi, A., Brown, S., Sabbioneda, S., Kannouche, P.L., Scott, A., Yasui, A., Green, C.M., and Lehmann, A.R. (2008). Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16125-16130.
- O'Connor, M.J., Tan, S.H., Tan, C.H., and Bernard, H.U. (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol* *70*, 6529-6539.
- Oelze, I., Kartenbeck, J., Crusius, K., and Alonso, A. (1995). Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol* *69*, 4489-4494.
- Oestergaard, V.H., Langevin, F., Kuiken, H.J., Pace, P., Niedzwiedz, W., Simpson, L.J., Ohzeki, M., Takata, M., Sale, J.E., and Patel, K.J. (2007). Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair. *Mol Cell* *28*, 798-809.
- Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* *6*, 575-597.
- Oh, J.M., Kim, S.H., Cho, E.A., Song, Y.S., Kim, W.H., and Juhnn, Y.S. (2010). Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* *31*, 402-410.
- Oh, S.T., Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J Virol* *78*, 2620-2626.
- Okoye, A., Cordano, P., Taylor, E.R., Morgan, I.M., Everett, R., and Campo, M.S. (2005). Human papillomavirus 16 L2 inhibits the transcriptional activation function, but not the DNA replication function, of HPV-16 E2. *Virus Res* *108*, 1-14.
- Orth, G., Favre, M., and Croissant, O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* *24*, 108-120.
- Ozbun, M.A. (2002). Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *J Gen Virol* *83*, 2753-2763.

- Ozbun, M.A., and Meyers, C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* *71*, 5161-5172.
- Ozbun, M.A., and Meyers, C. (1998a). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* *248*, 218-230.
- Ozbun, M.A., and Meyers, C. (1998b). Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* *72*, 2715-2722.
- Palefsky, J. (2007). Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med* *15*, 130-133.
- Panier, S., and Durocher, D. (2009). Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* *8*, 436-443.
- Papanicolaou, G.N. (1942). A New Procedure for Staining Vaginal Smears. *Science* *95*, 438-439.
- Parish, J.L., Bean, A.M., Park, R.B., and Androphy, E.J. (2006a). ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell* *24*, 867-876.
- Parish, J.L., Kowalczyk, A., Chen, H.T., Roeder, G.E., Sessions, R., Buckle, M., and Gaston, K. (2006b). E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *J Virol* *80*, 4580-4590.
- Park, J., Cho, N.H., Choi, J.K., Feng, P., Choe, J., and Jung, J.U. (2003). Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol* *77*, 9041-9051.
- Park, J., Lee, B.S., Choi, J.K., Means, R.E., Choe, J., and Jung, J.U. (2002). Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* *17*, 221-233.
- Park, J.S., Kim, E.J., Kwon, H.J., Hwang, E.S., Namkoong, S.E., and 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*, 6764-6769.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M.R., and Mohr, I.J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8700-8704.
- Park, R.B., and Androphy, E.J. (2002). Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* *76*, 11359-11364.

- Partridge, J.M., Hughes, J.P., Feng, Q., Winer, R.L., Weaver, B.A., Xi, L.F., Stern, M.E., Lee, S.K., O'Reilly, S.F., Hawes, S.E., *et al.* (2007). Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis* *196*, 1128-1136.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., and McCance, D.J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* *18*, 5061-5072.
- Paternoster, D.M., Cester, M., Resente, C., Pascoli, I., Nanhorngue, K., Marchini, F., Boccagni, P., Cillo, U., Ribaldone, R., Amoroso, E., *et al.* (2008). Human papilloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia in transplanted patients. *Transplant Proc* *40*, 1877-1880.
- Patterson, N.A., Smith, J.L., and Ozbun, M.A. (2005). Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol* *79*, 6838-6847.
- Pattillo, R.A., Husa, R.O., Story, M.T., Ruckert, A.C., Shalaby, M.R., and Mattingly, R.F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* *196*, 1456-1458.
- Peh, W.L., Brandsma, J.L., Christensen, N.D., Cladel, N.M., Wu, X., and Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* *78*, 2142-2151.
- Peh, W.L., Middleton, K., Christensen, N., Nicholls, P., Egawa, K., Sotlar, K., Brandsma, J., Percival, A., Lewis, J., Liu, W.J., *et al.* (2002). Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* *76*, 10401-10416.
- Pichler, A., and Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* *3*, 381-387.
- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., and Ustav, M. (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* *15*, 1-11.
- Pim, D., and Banks, L. (2010). Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *Apmis* *118*, 471-493.
- Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* *61*, 1061-1066.
- Pittayakhajonwut, D., and Angeletti, P.C. (2008). Analysis of cis-elements that facilitate extrachromosomal persistence of human papillomavirus genomes. *Virology* *374*, 304-314.

- Pittayakhajonwut, D., and Angeletti, P.C. (2010). Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. *Virology* 7, 123.
- Pospiech, H., Grosse, F., and Pisani, F.M. (2010). The initiation step of eukaryotic DNA replication. *Subcell Biochem* 50, 79-104.
- Pray, T.R., and Laimins, L.A. (1995). Differentiation-dependent expression of E1-E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology* 206, 679-685.
- Rader, J.S., Golub, T.R., Hudson, J.B., Patel, D., Bedell, M.A., and Laimins, L.A. (1990). In vitro differentiation of epithelial cells from cervical neoplasias resembles in vivo lesions. *Oncogene* 5, 571-576.
- Raghuram, N., Carrero, G., Th'ng, J., and Hendzel, M.J. (2009). Molecular dynamics of histone H1. *Biochem Cell Biol* 87, 189-206.
- Raj, K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J., and Beard, P. (2004). E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 78, 7199-7207.
- Rajkumar, T., Sabitha, K., Vijayalakshmi, N., Shirley, S., Bose, M.V., Gopal, G., and Selvaluxmy, G. (2011). Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. *BMC cancer* 11, 80.
- Rangasamy, D., and Wilson, V.G. (2000). Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* 275, 30487-30495.
- Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A., and Wilson, V.G. (2000). SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275, 37999-38004.
- Ravnan, J.B., Gilbert, D.M., Ten Hagen, K.G., and Cohen, S.N. (1992). Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *J Virol* 66, 6946-6952.
- Regan, J.A., and Laimins, L.A. (2008). Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J Virol* 82, 10042-10051.
- Regnier, M., Vaigot, P., Darmon, M., and Prunieras, M. (1986). Onset of epidermal differentiation in rapidly proliferating basal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 87, 472-476.
- Reh, H., and Pfister, H. (1990). Human papillomavirus type 8 contains cis-active positive and negative transcriptional control sequences. *J Gen Virol* 71 (Pt 10), 2457-2462.
- Reinhardt, H.C., and Yaffe, M.B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 21, 245-255.

- Remm, M., Remm, A., and Ustav, M. (1999). Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J Virol* *73*, 3062-3070.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1522-1527.
- Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., Coutlee, F., and Franco, E.L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *12*, 485-490.
- Riddel, C., Rashid, R., and Thomas, V. (2011). Ungual and periungual human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma: A review. *J Am Acad Der* *64*, 1147-1153.
- Rigoni, S. (1987). Statistical facts about cancers on which Doctor Rigoni-Stern based his contribution to the Surgeons' Subgroup of the IV Congress of the Italian Scientists on 23 September 1842. (translation). *Stat Med* *6*, 881-884.
- Roberts, J.M., and Weintraub, H. (1988). Cis-acting negative control of DNA replication in eukaryotic cells. *Cell* *52*, 397-404.
- Roberts, J.N., Buck, C.B., Thompson, C.D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med* *13*, 857-861.
- Roberts, S., Ashmole, I., Gibson, L.J., Rookes, S.M., Barton, G.J., and 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*, 6432-6445.
- Roberts, S., Ashmole, I., Rookes, S.M., and 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*, 3554-3562.
- Robinson, N.P., and Bell, S.D. (2005). Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J* *272*, 3757-3766.
- Rocque, W.J., Porter, D.J., Barnes, J.A., Dixon, E.P., Lobe, D.C., Su, J.L., Willard, D.H., Gaillard, R., Condreay, J.P., Clay, W.C., *et al.* (2000). Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif* *18*, 148-159.
- Roden, R.B., Kirnbauer, R., Jenson, A.B., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1994). Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* *68*, 7260-7266.
- Rogers, A.J., Loggen, M., Lee, K., and Angeletti, P.C. (2008). Varying efficiency of long-term replication of papillomaviruses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* *381*, 6-10.

- Romanczuk, H., Thierry, F., and Howley, P.M. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *Journal of virology* 64, 2849-2859.
- Rosas-Acosta, G., Langereis, M.A., Deyrieux, A., and Wilson, V.G. (2005). Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology* 331, 190-203.
- Rosas-Acosta, G., and Wilson, V.G. (2008). Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein. *Virology* 373, 149-162.
- Rubin, M.A., Kleter, B., Zhou, M., Ayala, G., Cubilla, A.L., Quint, W.G., and Pirog, E.C. (2001). Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol* 159, 1211-1218.
- Ruesch, M.N., and Laimins, L.A. (1998). Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 250, 19-29.
- Ruesch, M.N., Stubenrauch, F., and Laimins, L.A. (1998). Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J Virol* 72, 5016-5024.
- Russell, J., and Botchan, M.R. (1995). cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J Virol* 69, 651-660.
- Saikia, P., Fensterl, V., and 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, 13036-13039.
- Sailaja, G., Watts, R.M., and Bernard, H.U. (1999). Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers. *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1715-1724.
- Sakai, H., Yasugi, T., Benson, J.D., Dowhanick, J.J., and Howley, P.M. (1996). Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J Virol* 70, 1602-1611.
- Sampson, D.A., Wang, M., and Matunis, M.J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 21664-21669.
- Sanchez, I.E., Dellarole, M., Gaston, K., and 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 research* *36*, 756-769.
- Sanders, C.M., and Stenlund, A. (1998). Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J* *17*, 7044-7055.
- Sanders, C.M., and Stenlund, A. (2000). Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* *275*, 3522-3534.
- Sanders, C.M., and Stenlund, A. (2001). Mechanism and requirements for bovine papillomavirus, type 1, E1 initiator complex assembly promoted by the E2 transcription factor bound to distal sites. *J Biol Chem* *276*, 23689-23699.
- Sapp, M., and Day, P.M. (2009). Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* *384*, 400-409.
- Sarafi, T.R., and 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*, 385-396.
- Scheffner, M., and Whitaker, N.J. (2003). Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol* *13*, 59-67.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., and Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* *370*, 890-907.
- Schiller, J.T., Day, P.M., and Kines, R.C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol* *118*, S12-17.
- Schlecht, N.F., Kulaga, S., Robitaille, J., Ferreira, S., Santos, M., Miyamura, R.A., Duarte-Franco, E., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L., *et al.* (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* *286*, 3106-3114.
- Schneider, M.A., Spoden, G.A., Florin, L., and Lambert, C. (2011). Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell Microbiol* *13*, 32-46.
- Schoop, V.M., Mirancea, N., and Fusenig, N.E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* *112*, 343-353.
- Schuck, S., and Stenlund, A. (2005a). Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell* *20*, 377-389.
- Schuck, S., and Stenlund, A. (2005b). Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* *79*, 8661-8664.

- Schuck, S., and Stenlund, A. (2006). Surface mutagenesis of the bovine papillomavirus E1 DNA binding domain reveals residues required for multiple functions related to DNA replication. *J Virol* *80*, 7491-7499.
- Schwartzman, J.B., Adolph, S., Martin-Parras, L., and 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*, 3078-3086.
- Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* *314*, 111-114.
- Sclafani, R.A., and Holzen, T.M. (2007). Cell cycle regulation of DNA replication. *Ann Rev Genet* *41*, 237-280.
- Sedman, J., and Stenlund, A. (1995). Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* *14*, 6218-6228.
- Seif, I. (1984). Sequence homology between the large tumor antigen of polyoma viruses and the putative E1 protein of papilloma viruses. *Virology* *138*, 347-352.
- Senechal, H., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., and Archambault, J. (2007). Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* *358*, 10-17.
- Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M., and Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 702-706.
- Shaheen, M., Shanmugam, I., and Hromas, R. (2010). The Role of PCNA Posttranslational Modifications in Translesion Synthesis. *J Nucleic acids* *2010*, Article ID 761217.
- Shai, A., Brake, T., Somoza, C., and Lambert, P.F. (2007). The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res* *67*, 1626-1635.
- Shefer, A., Markowitz, L., Deeks, S., Tam, T., Irwin, K., Garland, S.M., and Schuchat, A. (2008). Early experience with human papillomavirus vaccine introduction in the United States, Canada and Australia. *Vaccine* *26 Suppl 10*, K68-75.
- Shen, T.H., Lin, H.K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular cell* *24*, 331-339.
- Shi, Y., Lee, J.S., and Galvin, K.M. (1997). Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* *1332*, F49-66.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* *3*, 155-168.

- Smith, J.L., Campos, S.K., Wandering-Ness, A., and 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, 9505-9512.
- Soutoglou, E., and Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320, 1507-1510.
- Staiano-Coico, L., Higgins, P.J., Darzynkiewicz, Z., Kimmel, M., Gottlieb, A.B., Pagan-Charry, I., Madden, M.R., Finkelstein, J.L., and Hefton, J.M. (1986). Human keratinocyte culture. Identification and staging of epidermal cell subpopulations. *J Clin Invest* 77, 396-404.
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24 *Suppl 1*, S16-22.
- Stanley, M. (2010a). Introduction. The human papillomavirus VLP vaccines. *Gynecol Oncol* 118, S1.
- Stanley, M. (2010b). Prospects for new human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis* 23, 70-75.
- Stanley, M.A. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* 130, 266-276.
- Stanley, M.A., Browne, H.M., Appleby, M., and Minson, A.C. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* 43, 672-676.
- Steger, G., and Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 71, 50-58.
- Stenlund, A. (2003). E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J* 22, 954-963.
- Stevenson-Lindert, L.M., Fowler, P., and Lew, J. (2003). Substrate specificity of CDK2-cyclin A. What is optimal? *J Biol Chem* 278, 50956-50960.
- Stoppler, M.C., Straight, S.W., Tsao, G., Schlegel, R., and McCance, D.J. (1996). The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223, 251-254.
- Storey, A., Piccini, A., Massimi, P., Bouvard, V., and 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.
- Straight, S.W., Herman, B., and McCance, D.J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 69, 3185-3192.
- Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., and 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, 4521-4532.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., and Laimins, L.A. (2000). The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* 74, 1178-1186.
- Stubenrauch, F., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9, 379-386.
- Stubenrauch, F., Lim, H.B., and Laimins, L.A. (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol* 72, 1071-1077.
- Stubenrauch, F., Straub, E., Fertey, J., and Iftner, T. (2007). The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins. *Int J Cancer* 121, 2284-2292.
- Stubenrauch, F., Zobel, T., and Iftner, T. (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 75, 4139-4149.
- Stunkel, W., and Bernard, H.U. (1999). The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol* 73, 1918-1930.
- Stunkel, W., Huang, Z., Tan, S.H., O'Connor, M.J., and Bernard, H.U. (2000). Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J Virol* 74, 2489-2501.
- Su, T.T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Ann Rev Genet* 40, 187-208.
- Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* 16, 345-351.
- Sullivan, C.S., and Pipas, J.M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 179-202.
- Sun, X.Y., Frazer, I., Muller, M., Gissmann, L., and Zhou, J. (1995). Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology* 213, 321-327.
- Sun, Y., Han, H., and 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., and 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, 219-222.

- Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., and Schlegel, R. (2008). HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* 27, 1071-1078.
- Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Simic, V., and Schlegel, R. (2005). Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16? *Virology* 332, 102-113.
- Supryniewicz, F.A., Krawczyk, E., Hebert, J.D., Sudarshan, S.R., Simic, V., Kamonjoh, C.M., and Schlegel, R. (2010). The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification. *J Virol* 84, 10619-10629.
- Sverdrup, F., and Khan, S.A. (1994). Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol* 68, 505-509.
- Sverdrup, F., and Khan, S.A. (1995). Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol* 69, 1319-1323.
- Swindle, C.S., and Engler, J.A. (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* 72, 1994-2001.
- Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A., and Chow, L.T. (1999). Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* 73, 1001-1009.
- Szarewski, A. (2010). HPV vaccine: Cervarix. *Expert Opin Biol Ther* 10, 477-487.
- Tachibana, K.E., Gonzalez, M.A., and Coleman, N. (2005). Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol* 205, 123-129.
- Taichman, L.B., Reilly, S.S., and LaPorta, R.F. (1983). The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. *J Invest Dermatol* 81, 137s-140s.
- Tan, S.H., Baker, C.C., Stunkel, W., and Bernard, H.U. (2003). A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology* 305, 486-501.
- Tan, S.H., Bartsch, D., Schwarz, E., and Bernard, H.U. (1998). Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J Virol* 72, 3610-3622.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2010). Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma* 119, 565-574.

- Tang, L., Nogales, E., and Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol* 102, 122-128.
- Taniguchi, A., Kikuchi, K., Nagata, K., and Yasumoto, S. (1993). A cell-type-specific transcription enhancer of type 16 human papillomavirus (HPV 16)-P97 promoter is defined with HPV-associated cellular events in human epithelial cell lines. *Virology* 195, 500-510.
- Terenzi, F., Saikia, P., and Sen, G.C. (2008). Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *EMBO J* 27, 3311-3321.
- Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279, 28257-28265.
- Thierry, F., and Demeret, C. (2008). Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. *Cell Death Diff* 15, 1356-1363.
- Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8449-8454.
- Thomas, J.T., Oh, S.T., Terhune, S.S., and Laimins, L.A. (2001). Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol* 75, 7564-7571.
- Thorland, E.C., Myers, S.L., Gostout, B.S., and Smith, D.I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22, 1225-1237.
- Thorner, L.K., Lim, D.A., and Botchan, M.R. (1993). DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol* 67, 6000-6014.
- Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P.W., and Archambault, J. (2003a). Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* 77, 5178-5191.
- Titolo, S., Pelletier, A., Pulichino, A.M., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Cordingley, M.G., and Archambault, J. (2000). Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 74, 7349-7361.
- Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Amin, A., Cordingley, M.G., and Archambault, J. (1999). Role of the ATP-binding domain of the

- human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* 73, 5282-5293.
- Titolo, S., Welchner, E., White, P.W., and Archambault, J. (2003b). Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy. *J Virol* 77, 5512-5518.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., and Alonso, A. (2000a). Connexin 43 expression is downregulated in raft cultures of human keratinocytes expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Cell Tissue Res* 301, 323-327.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., and Alonso, A. (2000b). 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, 407-412.
- Traut, H.F., and Papanicolaou, G.N. (1943). Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med* 59, 121-122.
- Trimble, C.L., and Frazer, I.H. (2009). Development of therapeutic HPV vaccines. *Lancet Oncol* 10, 975-980.
- Turek, L.P., Byrne, J.C., Lowy, D.R., Dvoretzky, I., Friedman, R.M., and Howley, P.M. (1982). Interferon induces morphologic reversion with elimination of extrachromosomal viral genomes in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7914-7918.
- Ulrich, C., Hackethal, M., Meyer, T., Geusau, A., Nindl, I., Ulrich, M., Forschner, T., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2008). Skin infections in organ transplant recipients. *J Dtsch Dermatol Ges* 6, 98-105.
- Ulrich, H.D., Vogel, S., and Davies, A.A. (2005). SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4, 1699-1702.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., and Stenlund, A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 10, 4321-4329.
- Valle, G.F., and 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 Den Eeden, S.K., Habel, L.A., Sherman, K.J., McKnight, B., Stergachis, A., and Daling, J.R. (1998). Risk factors for incident and recurrent condylomata acuminata among men. A population-based study. *Sex Transm Dis* 25, 278-284.
- van Hamont, D., van Ham, M.A., Struik-van der Zanden, P.H., Keijser, K.G., Bulten, J., Melchers, W.J., and Massuger, L.F. (2006). Long-term follow-up after large-loop excision of the transformation zone: evaluation of 22 years treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 16, 615-619.

- Van Ranst, M., Fuse, A., Fiten, P., Beuken, E., Pfister, H., Burk, R.D., and Opdenakker, G. (1992a). Human papillomavirus type 13 and pygmy chimpanzee papillomavirus type 1: comparison of the genome organizations. *Virology* 190, 587-596.
- Van Ranst, M., Kaplan, J.B., and Burk, R.D. (1992b). Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73 (Pt 10), 2653-2660.
- Van Ranst, M., Tachezy, R., Pruss, J., and Burk, R.D. (1992c). Primary structure of the E6 protein of *Micromys minutus* papillomavirus and *Mastomys natalensis* papillomavirus. *Nucleic Acids Res* 20, 2889.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.I., Calisher, C.H., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., *et al.* (2002). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* Academic Press New-York San Diego.
- Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L., and Reiffers, J. (2001). [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother* 5, 109-129.
- Villa, L.L., Costa, R.L., Petta, C.A., Andrade, R.P., Paavonen, J., Iversen, O.E., Olsson, S.E., Hoyer, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., *et al.* (2006). High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 95, 1459-1466.
- Voitenleitner, C., and Botchan, M. (2002). E1 protein of bovine papillomavirus type 1 interferes with E2 protein-mediated tethering of the viral DNA to mitotic chromosomes. *J Virol* 76, 3440-3451.
- von Knebel Doeberitz, M., Rittmuller, C., Aengeneyndt, F., Jansen-Durr, P., and Spitkovsky, D. (1994). Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 68, 2811-2821.
- von Knebel Doeberitz, M., Rittmuller, C., zur Hausen, H., and Durst, M. (1992). Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 51, 831-834.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Ann Rev Biochem* 67, 721-751.
- Wang, H.K., Duffy, A.A., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2009). Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes Dev* 23, 181-194.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P.J., Walker, P.A., Laskey, P., *et al.* (2004a). 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, 821-833.
- Wang, W., Fang, Y., Sima, N., Li, Y., Li, W., Li, L., Han, L., Liao, S., Han, Z., Gao, Q., *et al.* (2011). Triggering of death receptor apoptotic signaling by human papillomavirus 16 E2 protein in cervical cancer cell lines is mediated by interaction with c-FLIP. *Apoptosis* 16, 55-66.
- Wang, X.M., Jansen, K.U., and McClements, W.L. (2003). DNA replicative functions of highly-expressed, codon-optimized human papillomavirus proteins E1 and E2. *J Virol Methods* 108, 83-90.
- Wang, Y., Coulombe, R., Cameron, D.R., Thauvette, L., Massariol, M.J., Amon, L.M., Fink, D., Titolo, S., Welchner, E., Yoakim, C., *et al.* (2004b). Crystal structure of the E2 transactivation domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor. *J Biol Chem* 279, 6976-6985.
- Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P.L., Clarke, A.R., and Gaston, K. (2000). The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 87-94.
- Weinstock, H., Berman, S., and Cates, W., Jr. (2004). Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 36, 6-10.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S., and 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, 3878-3884.
- Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.
- West, M., Flanery, D., Woytek, K., Rangasamy, D., and Wilson, V.G. (2001). Functional mapping of the DNA binding domain of bovine papillomavirus E1 protein. *J Virol* 75, 11948-11960.
- West, M., and Wilson, V.G. (2002). Hydrophobic residue contributions to sequence-specific DNA binding by the bovine papillomavirus helicase E1. *Virology* 296, 52-61.
- White, P.W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M.G., and Archambault, J. (2001). Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276, 22426-22438.
- Wiley, D., and Masongsong, E. (2006). Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv* 61, S3-14.
- Wilson, R., Fehrmann, F., and Laimins, L.A. (2005). Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *Journal of virology* 79, 6732-6740.

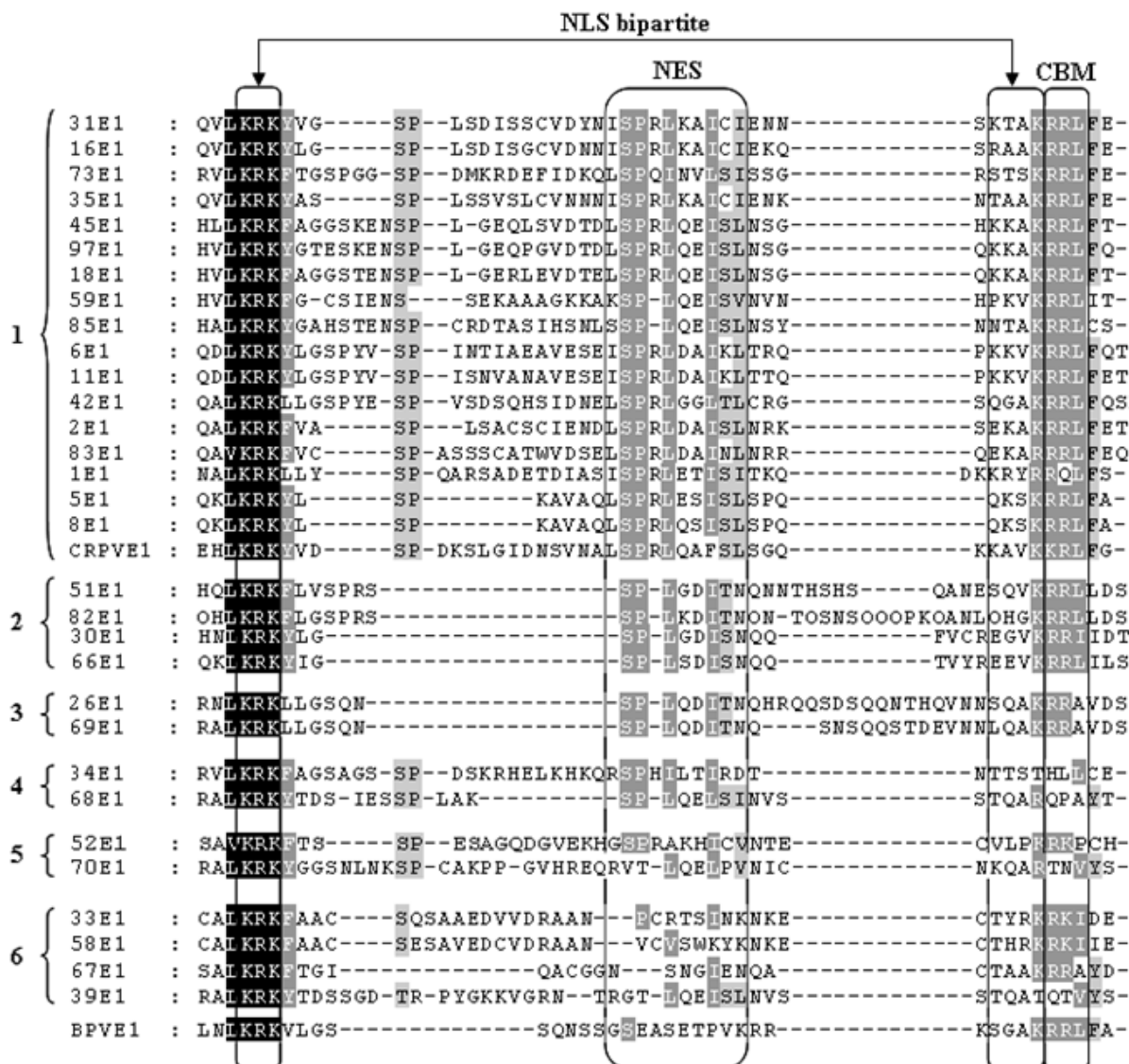
- Wilson, R., Ryan, G.B., Knight, G.L., Laimins, L.A., and Roberts, S. (2007). The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology* 362, 453-460.
- Wold, M.S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Ann Rev Biochem* 66, 61-92.
- Woodman, C.B., Collins, S.I., and Young, L.S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7, 11-22.
- Wooldridge, T.R., and Laimins, L.A. (2008). Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding. *Virology* 374, 371-380.
- Woytek, K.J., Rangasamy, D., Bazaldua-Hernandez, C., West, M., and Wilson, V.G. (2001). Effects of mutations within two hydrophilic regions of the bovine papillomavirus type 1 E1 DNA-binding domain on E1-E2 interaction. *J Gen Virol* 82, 2341-2351.
- Wu, S.Y., Lee, A.Y., Hou, S.Y., Kemper, J.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Chiang, C.M. (2006). Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* 20, 2383-2396.
- Wu, X., Xiao, W., and Brandsma, J.L. (1994). Papilloma formation by cottontail rabbit papillomavirus requires E1 and E2 regulatory genes in addition to E6 and E7 transforming genes. *J Virol* 68, 6097-6102.
- Xouri, G., Dimaki, M., Bastiaens, P.I., and Lygerou, Z. (2007). Cdt1 interactions in the licensing process: a model for dynamic spatiotemporal control of licensing. *Cell Cycle* 6, 1549-1552.
- Xue, Q., Wang, H., and Wang, J. (2010). Recurrent respiratory papillomatosis: an overview. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 1051-1054.
- Yan, J., Reichenbach, D.K., Corbitt, N., Hokey, D.A., Ramanathan, M.P., McKinney, K.A., Weiner, D.B., and Sewell, D. (2009). Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen. *Vaccine* 27, 431-440.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D.A., Nohaile, M., and Botchan, M. (1993). The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5086-5090.
- Yardimci, H., Loveland, A.B., Habuchi, S., van Oijen, A.M., and Walter, J.C. (2010). Uncoupling of sister replisomes during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* 40, 834-840.
- Yasugi, T., Benson, J.D., Sakai, H., Vidal, M., and Howley, P.M. (1997a). Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins. *J Virol* 71, 891-899.

- Yasugi, T., and Howley, P.M. (1996). Identification of the structural and functional human homolog of the yeast ubiquitin conjugating enzyme UBC9. *Nucleic Acids Res* *24*, 2005-2010.
- Yasugi, T., Vidal, M., Sakai, H., Howley, P.M., and Benson, J.D. (1997b). Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins. *J Virol* *71*, 5942-5951.
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R., and Howley, P.M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* *119*, 361-366.
- Yeung, M., and Durocher, D. (2008). Engineering a DNA damage response without DNA damage. *Genome Biol* *9*, 227.
- You, J. (2010). Papillomavirus interaction with cellular chromatin. *Biochim Biophys Acta* *1799*, 192-199.
- Yu, J.H., Lin, B.Y., Deng, W., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2007a). 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*, 5066-5078.
- Yu, T., Peng, Y.C., and Androphy, E.J. (2007b). Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis. *J Virol* *81*, 1736-1745.
- Zachow, K.R., Ostrow, R.S., Bender, M., Watts, S., Okagaki, T., Pass, F., and Faras, A.J. (1982). Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature* *300*, 771-773.
- Zanardi, T.A., Stanley, C.M., Saville, B.M., Spacek, S.M., and Lentz, M.R. (1997). Modulation of bovine papillomavirus DNA replication by phosphorylation of the viral E1 protein. *Virology* *228*, 1-10.
- Zanotti, K.M., and Belinson, J. (2002). Update on the diagnosis and treatment of human papillomavirus infection. *Cleve Clin J Med* *69*, 948, 951-945, 956 passim.
- Zhang, B., Chen, W., and 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*, 437-442.
- Zhang, B., Li, P., Wang, E., Brahmi, Z., Dunn, K.W., Blum, J.S., and Roman, A. (2003). The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* *310*, 100-108.
- Zheng, Z.M., and Baker, C.C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* *11*, 2286-2302.

- Zhou, J., Sun, X.Y., Davies, H., Crawford, L., Park, D., and Frazer, I.H. (1992). Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* 189, 592-599.
- Zimet, G.D., and Rosenthal, S.L. (2010). HPV vaccine and males: issues and challenges. *Gynecol Oncol* 117, S26-31.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., and O'Connor, M.J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 73, 6209-6219.
- Zimmermann, H., Koh, C.H., Degenkolbe, R., O'Connor, M.J., Muller, A., Steger, G., Chen, J.J., Lui, Y., Androphy, E., and Bernard, H.U. (2000). Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* 81, 2617-2623.
- Zobel, T., Iftner, T., and Stubenrauch, F. (2003). The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. *Mol Cell Biol* 23, 8352-8362.
- Zou, N., Lin, B.Y., Duan, F., Lee, K.Y., Jin, G., Guan, R., Yao, G., Lefkowitz, E.J., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2000). The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 74, 3761-3770.
- Zou, N., Liu, J.S., Kuo, S.R., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1998). The carboxyl-terminal region of the human papillomavirus type 16 E1 protein determines E2 protein specificity during DNA replication. *J Virol* 72, 3436-3441.
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36, 794.
- zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384, 260-265.

Annexe 1 - Alignement du module de transport de la protéine E1 de différents papillomavirus

Note : Dans cet alignement, les acides aminés conservés dans toutes les protéines E1 sont soulignés en noir, ceux conservés dans plus de 80% des protéines sont soulignés en gris foncé et ceux conservés dans 60 à 80% des protéines sont soulignés en gris pâle. Selon la conservation du NES, CBM et des sites présomptifs de phosphorylation, les régions N-terminales des protéines E1 sont regroupées en 6 classes. Ainsi, les régions N-terminales de la classe 1 ont les mêmes éléments que les protéines des VPH 31 et 11. Ceux de la classe 2 n'ont pas la sérine équivalente à S92 chez le VPH 31. Ceux de la classe 3 ont un CBM partiellement muté, leur S92 est absente et ils contiennent un site consensus de Chk2. Ceux de la classe 4 ont un NES mais n'ont pas de CBM. Ceux de la classe 5 n'ont ni NES, ni CBM, mais ils ont toujours la S92. Finalement, ceux de la classe 6 n'ont ni NES, ni CBM, ni sites présomptifs de phosphorylation par la Cdk2. Certaines régions N-terminales de cette dernière classe contiennent un site présomptif de phosphorylation par la CK2.



Annexe 2 - Tableau de tous les mutants de E1 présentés dans la thèse

Note : Dans ce tableau, les acides aminés identifiés en gris sont susceptibles d'être importants pour les fonctions de E1, cependant ceux-ci n'ont jamais été mutés.

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée	Références	
N-terminal			
W17/F18	W17A/F18A	VPH 31	(Cote-Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte et al., 2010b)
	W17A/F18A	VPH 11	(Cote-Martin et al., 2008)
V20/E21	V20A/E21A	VPH 31	(Cote-Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte et al., 2010b)
	V20A/E21A	VPH 11	(Cote-Martin et al., 2008)
V23/I24	V23A/I24A	VPH 31	(Cote-Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte et al., 2010b)
	I23A/V24A	VPH 11	(Cote-Martin et al., 2008)
D25A/R26A	E25A/H26A	VPH 11	(Cote-Martin et al., 2008)
T28/G29	T28A/G29A	VPH 11	(Cote-Martin et al., 2008)
T43	T43A	VPH 31	(Morin et al., 2011)
	T43E	VPH 31	(Morin et al., 2011)
M47/F50/I51	M47A/F50A/I51A	VPH 31	(Morin et al., 2011)
D49	D49A	VPH 31	(Morin et al., 2011)
D46	D46A	VPH 31	(Morin et al., 2011)
Pas d'équivalent	S48A	VPB	(McShan and Wilson, 1997, 2000)
	S48E	VPB	(McShan and Wilson, 2000)
D52	D52A	VPH 31	(Morin et al., 2011)
K85/R86	K85G/R86G	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
K85/R86/K87/ K119/T120/K122	K83A/R84AK85A/ K120A/K121A/K123A	VPH 11	(Yu et al., 2007a)
Pas d'équivalent	S89A	VPH 11	(Deng et al., 2004)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
Pas d'équivalent	S89D	VPH 11	(Deng et al., 2004)
Pas d'équivalent	S89A/L110A/I113L	VPH 11	(Deng et al., 2004)
Pas d'équivalent	S90N	VPB	(Lusky and Fontane, 1991)
Pas d'équivalent	S91A	VPB	(Lusky and Fontane, 1991)
S92	S92A	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
S92	S92D	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
S92	S93A	VPH 11	(Deng et al., 2004)
S92	S93D	VPH 11	(Deng et al., 2004)
S92/L109A/L112A	S93A/L110A/I113L	VPH 11	(Deng et al., 2004)
S106	S106A	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
	S106D	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
	S107A	VPH 11	(Deng et al., 2004)
	S107D	VPH 11	(Deng et al., 2004)
S106/L109A/L112A	S107A/L110A/I113L	VPH 11	(Deng et al., 2004)
L109/I112	L110A/I113L	VPH 11	(Deng et al., 2004)
	L109A/I112L	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
R123/R124/L125	R124A/R125A/L126A	VPH 11	(Deng et al., 2004)
	R123A/R124A/L125A	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
R123/R124/L125/ L109/I112	R123A/R124A/L125A/ L109A/I112L	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
Pas d'équivalent	T102A	VPB	(Lusky and Fontane, 1991)
T169	T169A	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
	T169D	VPH 31	(Fradet-Turcotte and Archambault, Données non-publiées)
OBD			
S181	K157A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
K184	T160A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
A185	V161A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
A186	F162A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
M187	K163A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L188	L164A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
G189	G165A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
K190	L166A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
K192	K168A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
E193	S169A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L194	L170A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
G196	L172A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
V197	C173A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S198	S174A	VPB	(Lee et al., 1999)
F199	F175S	VPB	(West and Wilson, 2002)
S198/S199	S225P/F226S	VPH 18	(Lee et al., 1999)
M200	H176A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
E201	D177A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
I203/R204	I224M/R225D	VPH 11	(Titolo et al., 1999)
R204	R180A	VPB	(Thorner et al., 1993)
F206	F182	VPB	(Enemark et al., 2000)
Q207	K183A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
	K228A	VPH 11	(Fradet-Turcotte et al., 2009)
S208/V312	N184Y/K288R	VPB	(West et al., 2001)
N209	D185G	VPB	(West et al., 2001)
	D185A	VPB	(Gonzalez et al., 2000)
K210	K186A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
S211	T187A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
T212	T188A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Schuck and Stenlund, 2006; Woytek et al., 2001)
C213	N189A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
T214	Q190A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
W216	W192	VPB	(Enemark et al., 2000)
C217	V193M	VPB	(West et al., 2001; West and Wilson, 2002)
A220	V196A	VPB	(West and Wilson, 2002)
F221	F197L	VPB	(West and Wilson, 2002)
	F197A	VPB	(West and Wilson, 2002)
T226	V202R	VPB	(Enemark et al., 2000)
G230	G230R	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010b)
	G257R	VPH 18	(Auster and Joshua-Tor, 2004)
	A251R	VPH 11	(Titolo et al., 2003a)
	A206R	VPB	(Schuck and Stenlund, 2005b)
Q236	K212A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
Y238	Q214A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
C239	C215A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L240	S216A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
Y241	F217A	VPB	(West and Wilson, 2002)
S246	K222A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
L247	R223A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
A248	S224A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
C249	H225A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S250	E226A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
W251	G227A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
G252	G228A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
F261	F237L	VPB	(West et al., 2001; West and Wilson, 2002)
	F237A	VPB	(West and Wilson, 2002)
K262	N238A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
C263	T239A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
K265	K241A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Woytek et al., 2001)
	K241E	VPB	(West et al., 2001)
K265/R267	K286A/R288A	VPH 11	(Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999)
	K241A/R243A	VPB	(Thorner et al., 1993)
R267	R243K	VPB	(West et al., 2001)
T269	T245	VPB	(Enemark et al., 2000)
I270	V246A	VPB	(West and Wilson, 2002)
	V246D	VPB	(West and Wilson, 2002)
E271	R247A	VPB	(Thorner et al., 1993)
K272	N248	VPB	(Enemark et al., 2000)
E271/K272	A292A/R293E	VPH 11	(Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999)
L273	L249A	VPB	(West and Wilson, 2002)
K276	N252A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L278	L305K	VPH 18	(Lee et al., 1999)
I280	V256A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S281	R257A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
T282	E258A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
N283	E259A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
C284	C260A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
P289	P265	VPB	(Enemark et al., 2000)
P290/L292/L299	P266A/I268A/L275A	VPB	(Thorner et al., 1993)
K291	K267A	VPB	(Woytek et al., 2001)
L292	I268S	VPB	(West and Wilson, 2002)
	I268A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
R293	R269A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S294	G270A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
T295	L271A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
A296	S272A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L299	L275P	VPB	(Thorner et al., 1993)
	L275A	VPB	(Thorner et al., 1993)
Y300	F276A	VPB	(West and Wilson, 2002)
W301	W277G	VPB	(West and Wilson, 2002)
Y302	F278S	VPB	(West and Wilson, 2002)
	F278A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
R303	K279A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006; Woytek et al., 2001)
T304	S280A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
G305	S281A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
M306	L282A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S307	S283A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
N308	P284A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S310	S330R	VPH 16	(Fradet-Turcotte et al., 2009; Yasugi et al., 1997b)
	S331R	VPH 11	(Fradet-Turcotte et al., 2009)
	T286A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
D311	L287A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
V312	K288A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
Y313	H289A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
G314	G290A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
T316	T316A	VPH 31	(Fradet-Turcotte et al., 2010a)
	T316D	VPH 31	(Fradet-Turcotte and Archambault, Données non-publiées)
E318	E294A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
W319	W295A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
	W295R	VPB	(Mansky et al., 1997)
I320	I296A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
E321	R297A	VPB	(Gonzalez et al., 2000; Schuck and Stenlund, 2006)
T324	T300A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
V325	T301A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
L326	L302A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
Q327	N303A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
H328	E304A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
S329	S305A	VPB	(Schuck and Stenlund, 2006)
C-terminal			
Y357	F378A	VPH 11	(Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
Y359	Y380A	VPH 11	(Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
N368	N389A	VPH 11	(Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
N368/A369	N344H/A345E N395H/A396E	VPB VPH 18	(Mansky et al., 1997) (Lee et al., 1999)
A369	A390G	VPH 11	(Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
C370/L373	R346A/L349A	VPB	(Mechali et al., 2004)
F372	F393A	VPH 11	(Fradet-Turcotte et al., 2010b; Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
N376	N352A	VPB	(Liu et al., 2010)
S377	S353A	VPB	(Liu et al., 2010)
Q378	Q399A	VPH 11	(Titolo et al., 2000; White et al., 2001)
K380	K356A	VPB	(Liu et al., 2010)
K383	K359A	VPB	(Liu et al., 2010)
H391/Y392	H418E/Y419H	VPH 18	(Lee et al., 1999)
Y392	Y412F	VPH 16	(Yasugi et al., 1997b)
R394	R370T	VPB	(Mansky et al., 1997)
D418	D438G	VPH 16	(Yasugi et al., 1997b)
W419	W439R W439L	VPH 16 VPH 16	(Yasugi et al., 1997b) (Yasugi et al., 1997b)
R427	R454	VPH 18	(Abbate et al., 2004)
L444, K445	L420P/K421A	VPB	(Rangasamy and Wilson, 2000)
V447	T468A	VPH 11	(Deng et al., 2004)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
P448	P424S	VPB	(Lusky and Fontane, 1991)
K449	K425A	VPB	(Liu and Stenlund, 2010)
G457	G478A, S, V	VPH 11	(Titolo et al., 1999)
A458	P479S	VPH 11	(Lin et al., 2002; Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999)
	P434S	VPB	(Lusky and Fontane, 1991)
G462	G482D	VPH 16	(Yasugi et al., 1997b)
K463	K484A	VPH 11	(Titolo et al., 1999; White et al., 2001)
	K484H	VPH 11	(Titolo et al., 1999; White et al., 2001)
	K484I	VPH 11	(Titolo et al., 1999; White et al., 2001)
	K484R	VPH 11	(Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 1999; White et al., 2001)
	K484M	VPH 11	(Titolo et al., 1999)
	K484E	VPH 11	(Titolo et al., 1999)
	K484Q	VPH 11	(Titolo et al., 1999)
	K439A	VPB	(Liu and Stenlund, 2010)
S464	S440A	VPB	(Liu and Stenlund, 2010)
L470	L446K	VPB	(Mansky et al., 1997)
L474	L494Q	VPH 16	(Yasugi et al., 1997b)
G476	G496R	VPH 16	(Yasugi et al., 1997b)
S480	S456A	VPB	(Liu et al., 2010)
N483	N459A	VPB	(Liu et al., 2010)
K485	K461A	VPB	(Liu et al., 2010)
F488	F509A	VPH 11	(Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999)
	F464A	VPB	(Castella et al., 2006a; Liu et al., 2010)
	F464L	VPB	(Castella et al., 2006a)
	F464C	VPB	(Mansky et al., 1997)
	F464W	VPB	(Castella et al., 2006a)
W489	W465A	VPB	(Castella et al., 2006a)
W489	W465F	VPB	(Castella et al., 2006a)
L490	L466H	VPB	(Mansky et al., 1997)
	L466A	VPB	(Castella et al., 2006a)
D502	D478A	VPB	(Liu and Stenlund, 2010)
	D523N	VPH 11	(Dixon et al., 2000; Rocque et al., 2000)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée	Références
D503	D479A	VPB (Liu and Stenlund, 2010)
D502/D503	D529A/D530A D523A/D524A	VPH 18 (Abbate et al., 2004) VPH 11 (Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001)
T506	T506A T506D	VPH 31 (Fradet-Turcotte et al., 2010a) VPH 31 (Fradet-Turcotte and Archambault, Données non-publiées)
N513	T490A	VPB (Liu et al., 2010)
Y514	Y491A	VPB (Liu et al., 2010)
R516	R493L R493M R493E	VPB (Liu and Stenlund, 2010) VPB (Liu and Stenlund, 2010) VPB (Liu and Stenlund, 2010)
D520/G521	D497A/G498A	VPB (Mansky et al., 1997)
D520	D542N D497A	VPH 11 (Dixon et al., 2000; Rocque et al., 2000) VPB (Liu and Stenlund, 2010)
N522	Y499A	VPB (Liu and Stenlund, 2010)
D528	D504A	VPB (Liu et al., 2010)
V529	R505A	VPB (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2010)
K530	K506A K506E	VPB (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2007, 2010) VPB (Castella et al., 2006a)
H531	H507A H507L H507F	VPB (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2007, 2010) VPB (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2007) VPB (Castella et al., 2006a; Liu et al., 2007)
K532	K508L	VPB (Liu et al., 2010)
M535/L537/ L542/L543/I544	L555A/L557A/ L563A/L564A/V565A	VPH 11 (Yu et al., 2007a)
K538	K559A K559R K514	VPH 11 (Fradet-Turcotte et al., 2009) VPH 11 (Fradet-Turcotte et al., 2009) VPB (Rangasamy et al., 2000)
K538	K514	VPB (Rangasamy et al., 2000)
P540	P516S	VPB (Lusky and Fontane, 1991)
T545	T566A	VPH 11 (Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001)

Numérotation du VPH31	Mutation(s) originale(s) et PV dans lequel elle a été identifiée		Références
N547	N523I N568A N523A	VPB VPH 11 VPB	(Mansky et al., 1997) (Titolo et al., 2000; Titolo et al., 1999; White et al., 2001) (Liu and Stenlund, 2010)
Y558	Y534A	VPB	(Liu and Stenlund, 2010)
R562	R589A R538A	VPH 18 VPB	(Abbate et al., 2004) (Liu et al., 2007)
F566/F568	F587A/F589A	VPH 11	(Yu et al., 2007a)
F566	F542V	VPB	(Mansky et al., 1997)
N588	N609A	VPH 11	(White et al., 2001)
T596	L617A	VPH 11	(White et al., 2001)

Annexe 3 - Rôle de la région N-terminale dans la liaison de E1 à l'ADN

Note : La conception des expériences présentées dans cette annexe a été faite en collaboration avec Michaël Lehoux. Nous avons tous deux participé à la construction des fragments de protéines ainsi qu'à leur production dans *E. coli* et à leur purification. Je me suis personnellement occupée de la production des sondes d'ADN fluorescentes ainsi que de la réalisation, de l'analyse et de la détermination des constantes de dissociation des essais de liaison à l'ADN.

A3.1 La région N-terminale de la protéine E1 n'influence pas sa capacité à lier et à dimériser sur une sonde d'ADN double brin.

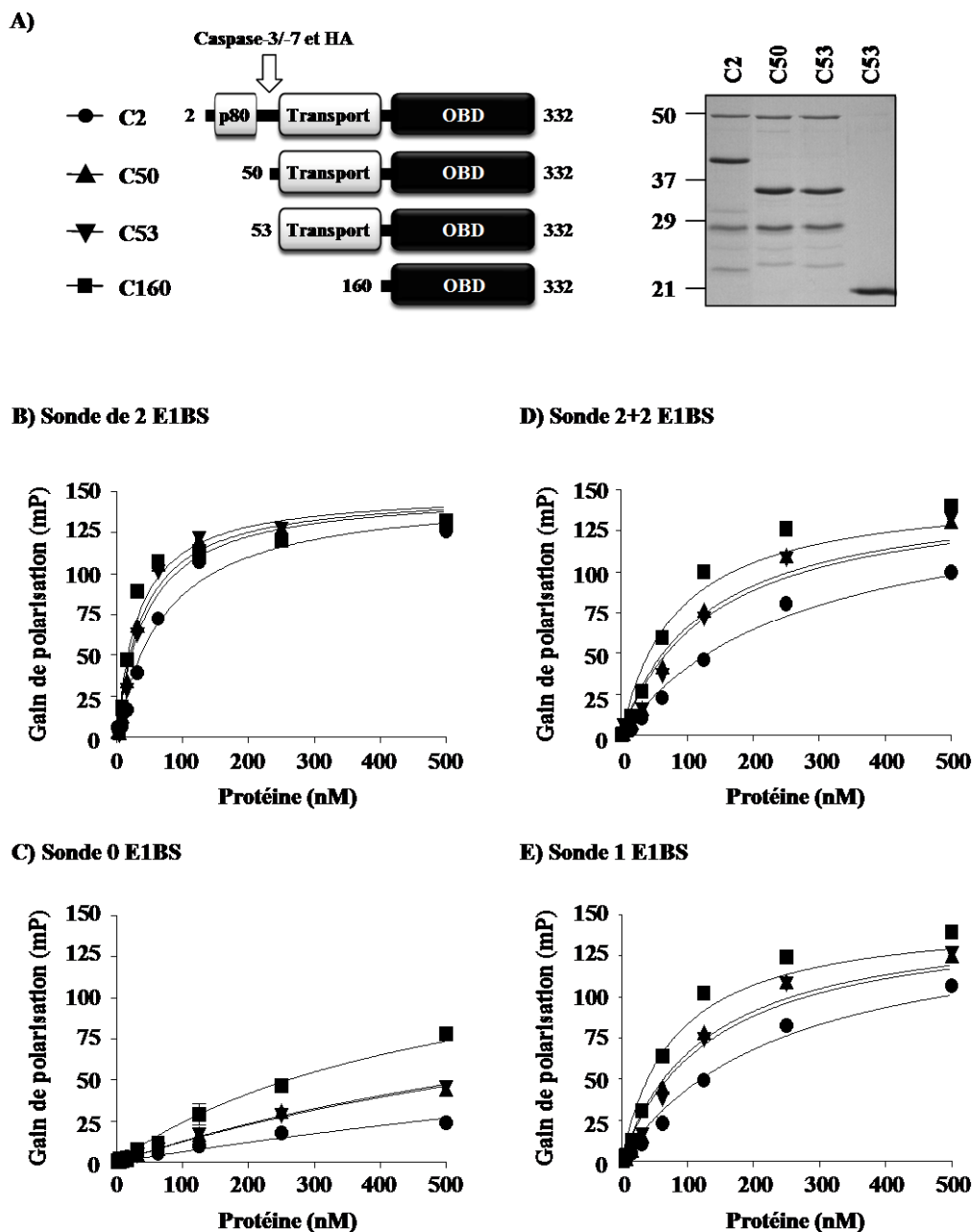


Figure A3.1 Affinité des fragments de E1 du VPH 31 pour diverses sondes d'ADN.

(A) Le panneau de gauche est une représentation schématique des fragments de E1 utilisés dans cette étude. Ceux-ci contiennent le domaine de liaison à l'origine (OBD) de E1 seul (C160) ou en fusion avec la totalité (C2) ou une partie (C50, C53) de sa région N-terminale. Dans cette région, le site clivé par les caspase-3/-7 et l'hélice amphipatique (HA) sont identifiés par une flèche, tandis que les régions de transport et de liaison à p80 sont indiquées par des boîtes blanches. Chacun de ces fragments a été produit en fusion avec la protéine GST dans *E. coli* et purifié selon la méthode décrite à l'annexe 5. Subséquemment, un clivage à la thrombine a été utilisé pour enlever la portion GST. Un gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie présenté dans le panneau de droite montre les protéines purifiées obtenues. Un total de 2 µg de protéines a été analysé sur gel et la position des marqueurs de poids moléculaires utilisés dans cette expérience est indiquée à gauche du gel. (B) Courbes de saturations obtenues en utilisant les fragments de E1 décrits en (A) et une sonde d'ADN contenant deux sites de liaison à E1 (2 E1BS). Pour chaque protéine, la courbe de saturation a été obtenue via l'utilisation d'un gradient de concentration de protéines (0 à 500 nM) et d'une concentration constante de la sonde (10 nM). L'essai de liaison a été réalisé dans un tampon contenant 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 1mM DTT et 0.01% NP-40. Les autres courbes de saturations présentées en (C), (D) et (E) ont été obtenues de la même façon qu'en B) mais en utilisant des sondes ne contenant pas de E1BS ((C), 0 E1BS) ou contenant deux E1BS éloignés de 2 pb sur lesquelles E1 ne peut pas dimériser ((D), 2+2 E1BS) ou encore contenant un seul E1BS ((E), 1 E1BS). Les séquences nucléotidiques des sondes utilisées ainsi que les constantes de dissociation déterminées à partir de chaque courbe de saturation sont présentées aux tableaux ci-dessous.

Tableau A3.1 Sondes fluorescentes d'ADN double brin utilisées dans cette étude

Nom de la sonde	Séquence nucléotidique*
0 E1BS	5'-F-GGTCAGTTAATAACAAAGGGC-3'
1 E1BS	5'-F-GG<u>A</u>CTTAATAACAAAGGGC-3'
2 E1BS	5'-F-GGACTT<u>A</u>AATAATGGGC-3'
2+2 E1BS	5'-F-GGACTTAATA<u>AA</u>AATAATGGGC-3'

*La séquence d'un seul des deux brins d'ADN est indiquée. Chacun des E1BS est souligné. La lettre F indique la position du fluorophore.

Tableau A3.2 Constantes de dissociation (K_D) en nM obtenues dans cette étude

Protéine	Sonde			
	2 E1BS	2+2 E1BS	1 E1BS	0 E1BS
C2	72 ± 4	265 ± 10	241 ± 10	> 500
C50	39 ± 3	128 ± 8	129 ± 8	> 500
C53	45 ± 3	139 ± 10	140 ± 9	> 500
C160	33 ± 3	84 ± 7	80 ± 6	~ 500

Annexe 4 - Rôle de l'acide amine T316 dans l'export nucléaire de la protéine E1 du VPH 31

Note : J'ai suis personnellement responsable de la conception des études présentées dans cette annexe. Au point de vue technique, je me suis occupée de la construction des plasmides d'expression, de l'analyse de l'expression des protéines par immunobuvardage de type Western, des essais de réplication transitoire de l'ADN, du montage de la figure A4.4 à l'aide du logiciel *Pymol*, des analyses de prolifération cellulaire, des analyses du cycle cellulaire ainsi que des analyses de microscopie confocale présentées aux figures A4.1, A4.2. Une partie de l'analyse de la localisation cellulaire des protéines EYFP-31 E1 de la figure A4.1 et les analyses de la figure A4.3 et A4.6 ont été réalisées par Fanny Bergeron-Labrecque.

A4.1 La substitution de la thréonine 316 (T316) par un phosphomimétique augmente l'export nucléaire de E1.

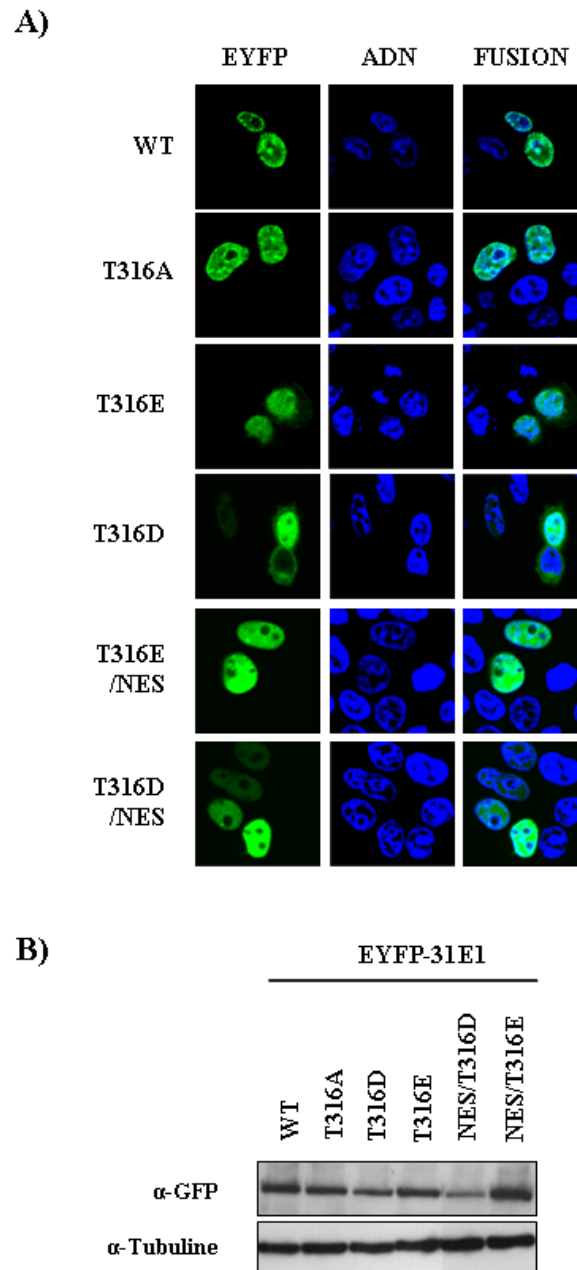


Figure A4.1 Localisation intracellulaire de EYFP-31E1 de type sauvage ou contenant une substitution au niveau de sa thréonine 316.

(A) Les protéines EYFP-31E1 de type sauvage (WT) ou mutantes analysées sont indiquées à gauche de chaque série de trois images nommées EYFP-ADN-FUSION. Afin de faire l'analyse de la localisation cellulaire de ces protéines par microscopie, des cellules de la lignée C33A transfectées durant 24 h par des vecteurs d'expression spécifiques à ces protéines ont été fixées avec de la para-formaldehyde et leur ADN a été coloré avec du TO-PRO-3. Ensuite, elles ont été montées sur des lamelles de microscopes dans du milieu de montage (Vectashield) et visualisées à l'aide d'un microscope confocal de type LSM 710.

(B) Analyse de l'expression des protéines EYFP-31E1 utilisées dans cette étude par immunobuvardage de type Western. Vingt-quatre heures posttransfection, les C33A transfectées avec des vecteurs d'expression spécifiques aux protéines EYFP-31E1 ont été lysées dans du tampon de lyse (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 01% Triton). Suite à l'ajout de tampon de Laemmli, les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE. Finalement, les protéines fusionnées à la EYFP ont été détectées par un anticorps α -GFP, et la tubuline, qui est utilisée à titre de contrôle de chargement, a été détectée par un anticorps α -Tubuline.

Tableau A4.1 Quantification de la localisation intracellulaire des protéines EYFP-31E1 de la figure A4.1

EYFP-31E1	%N	%NC	%C
WT	92	7	1
T316A	93	7	0
T316E	72	27	2
T316D	71	26	3
T316E/NES	93	7	0
T316D/NES	94	6	0

^a Les pourcentages de cellules dans lesquelles la protéine EYFP-31E1 est retrouvée uniquement au noyau (N), au noyau et au cytoplasme (NC) et uniquement au cytoplasme (C) ont été calculés à partir d'au moins 100 cellules exprimant EYFP.

A4.2 L'export nucléaire induit par la substitution de la thréonine 316 (T316) est réduit lorsque les sérines 92 et 106 sont remplacées par des aspartates.

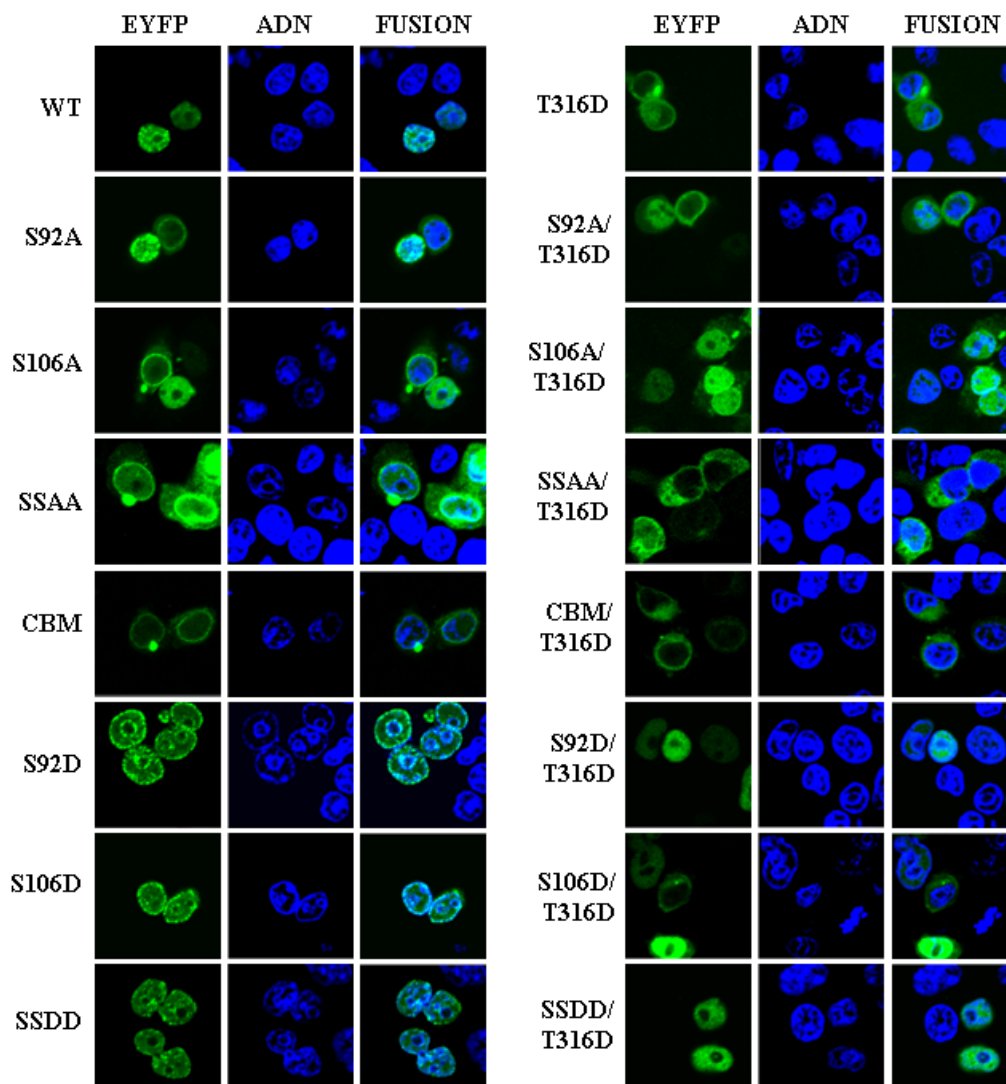


Figure A4.2 Effet de l'introduction d'un phosphomimétique à l'acide aminé T316 du VPH 31 lorsque les sérines de la région N-terminale (S92 et S106) sont substituées par des alanines ou des aspartates.

Les protéines E1 de type sauvage (WT) ou mutantes fusionnées à EYFP analysées sont indiquées à gauche de chaque série de trois images nommées EYFP-ADN-FUSION. La préparation des cellules pour l'analyse de la localisation intracellulaire de la protéine EYFP-E1 a été réalisée de la même façon que celle décrite à la figure A4.1.

Tableau A4.2 Localisation intracellulaire des protéines EYFP-31E1 de la figure A4.2

EYFP-31E1	%N	%NC	%C
WT	96	4	0
T316D	69	28	3
S92A	82	15	3
S92A + T316D	65	32	3
S106A	84	16	1
S106A + T316D	37	58	5
SSAA	5	83	12
SSAA + T316D	1	88	11
CBM	2	13	86
CBM + T316D	0	26	74
S92D	91	9	0
S92D + T316D	83	17	0
S106D	98	2	0
S106D + T316D	86	13	1
SSDD	99	0	1
SSDD + T316D	97	3	0

^a Les pourcentages de cellules dans lesquelles la protéine EYFP-31E1 est retrouvée uniquement dans le noyau (N), dans le noyau et dans le cytoplasme (NC) et uniquement dans le cytoplasme (C) ont été calculés à partir d'au moins 100 cellules exprimant EYFP.

A4.3 La substitution de la thréonine 316 (T316) par un aspartate inhibe les fonctions de réplication de E1, indépendamment de son effet sur l'export nucléaire.

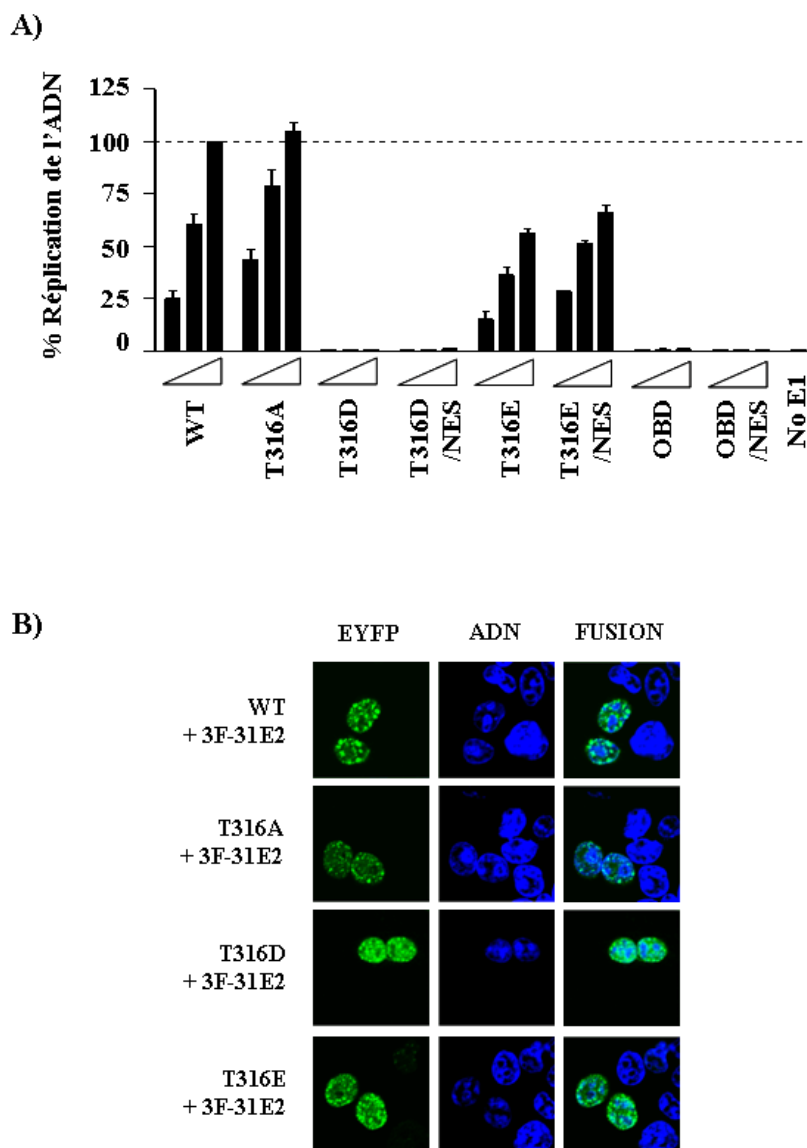


Figure A4.3 La protéine EYFP-31E1 T316D est incapable de répliquer l'ADN viral dans un essai de réplication transitoire mais est toujours en mesure d'interagir avec la protéine E2.

(A) L'activité de réplication de chacune des protéines EYFP-31E1 de type sauvage (WT) ou mutantes a été déterminée grâce à l'essai de réplication transitoire basé sur l'utilisation de la firefly luciférase décrite à l'annexe 5. Brièvement, 1.25, 2.5 et 5 ng de vecteur d'expression spécifiques à EYFP-31E1 ont été transfectés dans les C33A avec 10 ng de vecteur d'expression de la protéine E2 fusionnée à un épitope 3xFlag (3F-31E2), 2.5 ng d'un vecteur contenant à la fois l'origine de réplication et une cassette d'expression pour la firefly luciférase puis, 0.5 ng d'un vecteur d'expression de la Renilla luciférase. Les niveaux de réplication ont été quantifiés 72 h posttransfection via la détection des activités luciférases par la trousse de détection Dual-Glo de Promega. L'activité de réplication est rapportée en pourcentage du niveau de réplication qui a été obtenu avec 5 ng de la protéine EYFP-31E1 de type sauvage. (B) Relocalisation de E1 dans des foci nucléaires en présence de E2. Des C33A ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression de la protéine EYFP-31E1 de type sauvage ou mutante et le vecteur d'expression de la protéine E2 décrit en (A). La préparation des cellules et l'analyse de la localisation cellulaire de E1 ont été réalisées tel que décrit à la figure A4.1.

A4.4 La substitution de K265A/R267R augmente l'export nucléaire de la protéine E1

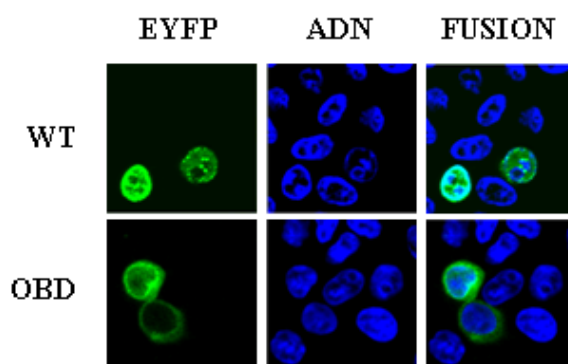


Figure A4.4 Une protéine E1 incapable de lier l'ADN (Mutant K265A/R267A) est exportée davantage au cytoplasme que la protéine de type sauvage.

Localisation de EYFP-31E1 de type sauvage ou mutante dans le domaine de liaison à l'ADN (OBD-K265A/R267A). Les protéines E1 de type sauvage ou mutante fusionnées à EYFP qui ont été utilisées dans chaque condition sont indiquées à gauche de chaque série de trois images nommées EYFP-ADN-FUSION. Les C33A transfectées avec des vecteurs d'expression pour ces protéines ont été préparées pour l'analyse de la localisation intracellulaire de EYFP-31E1 tel que décrit à la figure A4.1 A.

Tableau A4.4 Quantification de la localisation intracellulaire des protéines EYFP-31E1 de la figure A4.2

EYFP-31E1	%N	%NC	%C
WT	94	6	0
OBD*	85	13	2

^a Les pourcentages de cellules dans lesquelles la protéine EYFP-31E1 est retrouvée uniquement au noyau (N), au noyau et au cytoplasme (NC) et uniquement au cytoplasme (C) ont été calculés à partir d'au moins 100 cellules exprimant EYFP.

* Dans les mêmes conditions, 95% de la protéine NES/OBD est localisée au noyau (Chapitre 4).

A4.5 La substitution de la thréonine 316 (T316) par un aspartate empêche la protéine E1 d'interférer avec la prolifération cellulaire.

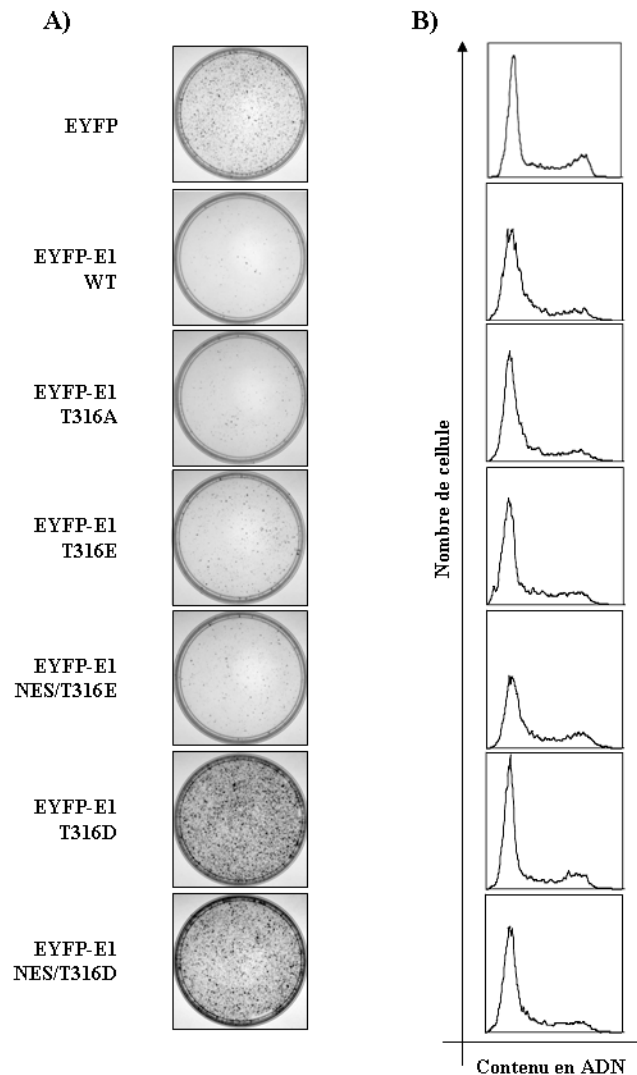


Figure A4.5 La protéine EYFP-31E1 T316D est incapable d'inhiber la prolifération cellulaire et de bloquer la progression du cycle cellulaire en phase S.

(A) La capacité de E1 à inhiber la prolifération cellulaire a été testée dans des essais de formation de colonies. Pour se faire, des C33A ont été transfectées avec un vecteur contenant à la fois une cassette d'expression pour la protéine EYFP-31E1 indiquée

à gauche de chaque figure et un gène de résistance à la néomycine (G418). Suite à une sélection de quatre semaines dans un milieu de culture contenant 500 µg/ml G418, les colonies obtenues ont été colorées avec du bleu de méthylène. (B) Analyse de la progression du cycle cellulaire. Des C33A asynchronisées exprimant de manière transitoire les protéines EYFP-31E1 ont été trypsinisées 48 h posttransfection et leur ADN a été coloré avec du Hoechst. Leur contenu en ADN (2N vs 4N) a ensuite été analysé par cytométrie en flux. Le profil du cycle cellulaire de chaque échantillon est représenté par un histogramme et le pourcentage de cellules retrouvé dans chaque phase du cycle cellulaire est indiqué dans au tableau A4.5.

Tableau A4.5 Distribution du cycle cellulaire des C33A exprimant les protéines EYFP-31E1 présentées à la figure A4.5.

Protéine exprimée	%G0/G1	%S	%G2/M	Intra S		
				(Comp. E-M-L ^a)		
EYFP	37	43	20	58	28	14
EYFP-31E1 WT	29	63	8	78	14	8
EYFP-31E1 T316A	38	52	10	75	15	10
EYFP-31E1 T316E	43	46	11	52	30	17
EYFP-31E1 NES/T316E	26	60	14	67	22	12
EYFP-31E1 T316D	52	36	12	53	25	22
EYFP-31E1 T316D/NES	40	53	7	68	17	15

* 5000 cellules colorées au Hoechst et exprimant ou non la EYFP ont été comptées et sélectionnées pour l'analyse respective des cellules transfectées et non transfectées avec un vecteur d'expression spécifique à la EYFP.

^a Les pourcentages de cellules au début (E, early), au milieu (M, mid) et à la fin (L, late) de la phase S ont été estimés à l'aide du logiciel d'analyse Modfit.

A4.6 Localisation de sites présumptifs de phosphorylation par les complexes cycline/Cdk dans l'OBD des protéines E1 du VPB et du VPH 18.

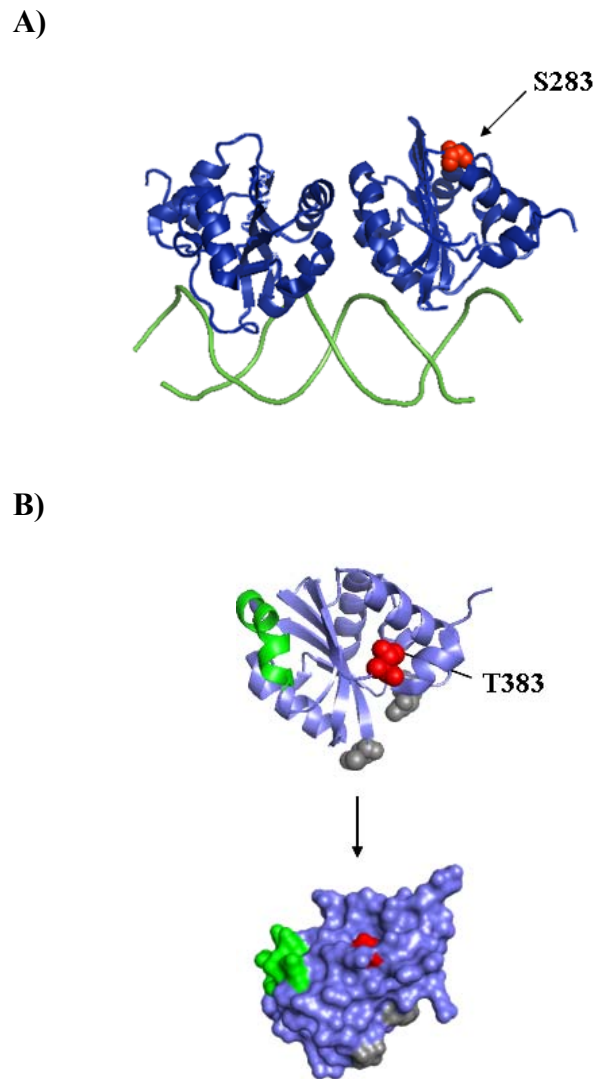


Figure A4.6 Structures des OBD des protéines E1 du VPB et du VPH 18.

(A) Représentation en ruban de la structure de deux OBD de la protéine E1 du VPB liés sur un ADN contenant l'origine de répllication (PDB, IKSX) (Enemark et al., 2002). La

structure des protéines est représentée à l'aide de rubans bleus tandis que la double hélice d'ADN est représentée en vert. La sérine 283 qui inhibe l'activité de réplication de E1 du VPB lorsqu'elle est substituée pour un glutamate est indiquée en rouge. (B) Structure de l'OBD de la protéine E1 du VPH18 orientée de la même façon que les protéines du VPB présentées en (A) (PDB, IR9W) (Auster and Joshua-Tor, 2004). Le haut de la figure constitue une représentation de type ruban tandis que le bas constitue une représentation de surface. La localisation de la thréonine 383 est indiquée en rouge et l'hélice α_3 nécessaire à la dimérisation de la protéine est colorée en vert. Finalement, puisque la boucle de liaison à l'ADN n'apparaît pas dans la structure, ses deux extrémités sont représentées en gris.

Annexe 5 - Développement d'un essai quantitatif et à haut-débit de la réplication de l'ADN des papillomavirus et des polyomavirus

Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication

Cet article a été publié en 2010 dans *Virology*, 399(1):65-76

5.1 Mise en contexte de l'article

Au cours des études présentées dans cette thèse, nous avons besoin de déterminer l'activité de réplication des diverses protéines E1 mutantes créées. La réplication de l'ADN des papillomavirus peut être récapitulée dans des essais de réplication transitoires. Dans ce type d'essai, des vecteurs d'expression des protéines virales E1 et E2 sont transfectés dans les cellules de mammifères avec un troisième vecteur contenant l'origine de réplication. La réplication de ce vecteur peut ensuite être quantifiée par des méthodes d'immunobuvardage de type Southern ou par qPCR. Dans les deux cas, l'ADN répliqué doit préalablement être extrait des cellules et purifié par une extraction de type phénol/chloroforme. Comme ces méthodes de détection sont laborieuses, nous avons développé un essai de réplication transitoire de l'ADN basé sur l'activité de la luciférase, qui permet de quantifier la réplication sans avoir à extraire et à purifier l'ADN répliqué. Dans ce type d'essai, l'origine de réplication se trouve en cis d'une cassette d'expression pour le gène de la *firefly* luciférase. Ainsi, l'activité luciférase est proportionnelle au niveau de réplication de l'ADN. Ce type d'essai a été utilisé aux chapitres 3 et 4 de cette thèse.

A5.2 Contribution des co-auteurs

Geneviève Morin et **moi** sommes co-auteurs de cet article. Nous avons contribué de façon égale aux expériences qui ont permis le développement de cet essai de réplication.

Michaël Lehoux a contribué à la production des protéines E1 de type sauvage et mutante G230R chez *E. coli* ainsi qu'à la caractérisation de leur affinité de liaison à l'ADN présentée à la Fig. 7 A-D. De plus, il a construit les vecteurs d'expression pour les protéines E1 mutantes incapables d'interagir avec p80. Bien que Geneviève et moi ayons fait l'expérience présentée à la figure 6, Michaël Lehoux a été le premier à tester ces mutants dans l'essai de réplication transitoire.

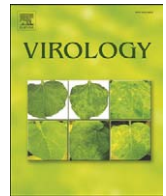
D^r Peter A. Bullock nous a fait part de ses commentaires et suggestions sur la portion SV40 de cet article. D^r Bullock a également fourni les vecteurs d'expression pour l'antigène grand T ainsi que le vecteur contenant l'origine de réplication de SV40.

D^r Jacques Archambault a supervisé le projet et a écrit l'article avec moi.



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication

Amélie Fradet-Turcotte^{a,b,1}, Geneviève Morin^{a,b,1}, Michaël Lehoux^{a,b},
Peter A. Bullock^c, Jacques Archambault^{a,b,*}

^a Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada

^b Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

^c Department of Biochemistry, Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2009

Returned to author for revision

17 November 2009

Accepted 17 December 2009

Available online xxxx

Keywords:

Polyomavirus

Papillomavirus

DNA replication

Luciferase

SV40

HPV31

High-throughput

Cell-based assay

Small molecule inhibitors

ABSTRACT

Polyoma- and papillomaviruses genome replication is initiated by the binding of large T antigen (LT) and of E1 and E2, respectively, at the viral origin (ori). Replication of an ori-containing plasmid occurs in cells transiently expressing these viral proteins and is typically quantified by Southern blotting or PCR. To facilitate the study of SV40 and HPV31 DNA replication, we developed cellular assays in which transient replication of the ori-plasmid is quantified using a firefly luciferase gene located in cis to the ori. Under optimized conditions, replication of the SV40 and HPV31 ori-plasmids resulted in a 50- and 150-fold increase in firefly luciferase levels, respectively. These results were validated using replication-defective mutants of LT, E1 and E2 and with inhibitors of DNA replication and cell-cycle progression. These quantitative and high-throughput assays should greatly facilitate the study of SV40 and HPV31 DNA replication and the identification of small-molecule inhibitors of this process.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Small DNA tumor viruses such as polyoma- and papillomaviruses rely widely on the host cell DNA replication machinery to replicate their double-stranded viral genome. Eukaryotic DNA replication is a complex process that is initiated by several factors including the origin recognition complex (ORC), Cdt1, Cdc6 and the mini-chromosome maintenance (MCM) complex, the alleged cellular replicative helicase (Johnson and O'Donnell, 2005; Masai et al., 2005; Nishitani and Lygerou, 2002). In contrast, small DNA tumor viruses like polyoma- and papillomaviruses encode a single initiator protein that performs multiple functions during viral genome replication. A well-studied example is the large T antigen (LT) of simian virus 40 (SV40). This multifunctional initiator protein can successively recognize the viral origin of replication, assemble into a double hexamer that melts and unwinds the DNA ahead of the replication fork, and interact with the host DNA replication factors such as polymerase α -primase, replication protein A (RPA) and topoisomerase I (reviewed in (Borowiec et al.,

1990; Bullock, 1997)). The analogous protein from papillomavirus, E1, has similar activities but also requires the viral protein E2 to initiate viral DNA replication *in vivo* (reviewed in Hebner and Laimins, 2006). Papillomavirus E2 is both a replication and transcription factor that binds with high affinity to sites in the viral origin (Androphy et al., 1987). As a replication factor, E2 interacts directly with E1 to recruit it to the origin and favor its assembly into a double hexamer (Blitz and Laimins, 1991; Lusky et al., 1994; Mohr et al., 1990).

LT and E1 are structurally related members of the helicase superfamily III (SF3) (Clertant and Seif, 1984; Hickman and Dyda, 2005; Mansky et al., 1997). The C-terminal domains of LT and E1 have ATPase/helicase activity and are sufficient for oligomerization into hexamers (Li et al., 2003; Titolo et al., 2000; White et al., 2001). The central part of both proteins contains an origin-binding domain (OBD) which recognizes specific sequences in the origin (McVey et al., 1989b; Simmons et al., 1990a; Titolo et al., 2003a, 2003b; Wun-Kim et al., 1993). The OBDs of LT and E1 differ in their primary amino acid sequence but share a common fold. Interestingly, while the LT OBD can bind with high-affinity to its target binding site as a monomer, the E1 OBD needs to dimerize to achieve comparable affinity and specificity (Fradet-Turcotte et al., 2007; Titolo et al., 2003a, 2003b). Crystal structures of the bovine papillomavirus (BPV) and human papillomavirus (HPV) 18 E1 OBDs have revealed the nature of the

* Corresponding author. Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal (Quebec), Canada H2W 1R7. Fax: +1 514 987 5741.

¹ Both authors contributed equally to this work.

dimerization interface and mutations that disrupt this interface have been shown to impair viral DNA replication (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2002; Schuck and Stenlund, 2005; Titolo et al., 2003a). Both LT and E1 also differ substantially in their N-terminal regions, although in either case these contain regulatory elements. The N-terminal domain of LT contains a unique J-domain required for replication *in vivo* (Sullivan and Pipas, 2002), a monopartite nuclear localization signal (NLS) (Kalderon et al., 1984a, 1984b) and several phosphorylation sites for different kinases that modulate either the nuclear import of LT (Rihs et al., 1991) or its assembly into a double hexamer at the origin (Cegielska et al., 1994; Moarefi et al., 1993; Mohr et al., 1987; Scheidtmann et al., 1984; Schneider and Fanning, 1988; Virshup et al., 1989, 1992; Weisshart et al., 1999). As for the N-terminal domain of E1, it contains a bi-partite NLS, a Crm1-dependant nuclear export signal (NES), and a binding site for cyclin A/E-cdk2, which regulates E1 nucleo-cytoplasmic shuttling by phosphorylation (Deng et al., 2004; Ma et al., 1999). In addition, this domain of E1 contains a binding site for the cellular protein p80, necessary for optimal viral DNA replication (Cote-Martin et al., 2008), and a caspase-3/7 cleavage site required for amplification of the viral genome in differentiated keratinocytes (Moody et al., 2007).

Expression of LT and E1/E2 has been shown to be sufficient to support replication of a plasmid encompassing their cognate origin in transiently transfected cells. This type of assay has been used extensively to define specific DNA sequences required for origin-function *in vivo*. For SV40, the 64-bp core (nt 5193 to 34) was identified as the minimal origin however, replication was shown to be maximal when the adjacent 21-bp repeat region was included (Bergsma et al., 1982; Lee-Chen and Woodworth-Gutai, 1986). The middle portion of the core contains four binding sites for LT (5'-GAGGC-3'), arranged as two pairs of inverted repeats. This middle region known as site II is flanked on one side by an AT-rich region and on the other by the early palindrome (EP) (Borowiec et al., 1990; Bullock et al., 1997; Deb et al., 1987; DeLucia et al., 1983; Parsons et al., 1990; Tegtmeyer et al., 1983). Similarly, the HPV origin (nt 7721 to 100 for HPV31 (Frattini and Laimins, 1994)) was found to contain four

binding sites for E1 (5'-ATTGTT-3'), also arranged as two pairs of inverted repeats, together with an AT-rich region (Chen and Stenlund, 2001; Holt and Wilson, 1995; Lee et al., 1997; Mendoza et al., 1995; Sun et al., 1996; Titolo et al., 2003a; Ustav et al., 1991). In addition and specific to HPV, the origin of replication contains three binding sites for the E2 protein (5'-ACCN₆GGT-3') (Androphy et al., 1987).

Replication of an origin-containing plasmid (ori-plasmid) by LT, or E1/E2, in transiently transfected cells is typically detected by Southern blotting or PCR (Del Vecchio et al., 1992; Taylor and Morgan, 2003). In these assays, plasmid replication can be detected from either total or low-molecular weight DNA (i.e. Hirt-extracted DNA) that has been digested with *DpnI* to restrict any input transfected ori-plasmid that failed to replicate and thus retained a methylation pattern characteristic of bacteria. The numerous steps involved in these transient DNA replication assays have limited their use for high-throughput studies such as those involving the characterization of large number of mutations or the screening of chemical or siRNA libraries. To overcome this limitation, we have developed facile and quantitative assays of SV40 and HPV31 DNA replication that rely on a dual-luciferase readout to measure the amount of replicated origin DNA directly from transfected cells.

Results and discussion

Development of a novel SV40 DNA replication assay based on a dual-luciferase readout

To facilitate the study of SV40 DNA replication, we set out to develop a cellular assay in which transient replication of an origin-containing plasmid (ori-plasmid) by large T antigen (LT) would result in increased expression of a firefly luciferase (Fluc) reporter gene encoded on the same ori-plasmid. A previous study has demonstrated that LT could boost the expression of several genes, including Fluc, present in cis of the SV40 origin (de Chasseval and de Villartay, 1992), thus making it likely that this strategy could be adapted to quantify SV40 DNA replication. First, we constructed a plasmid containing both

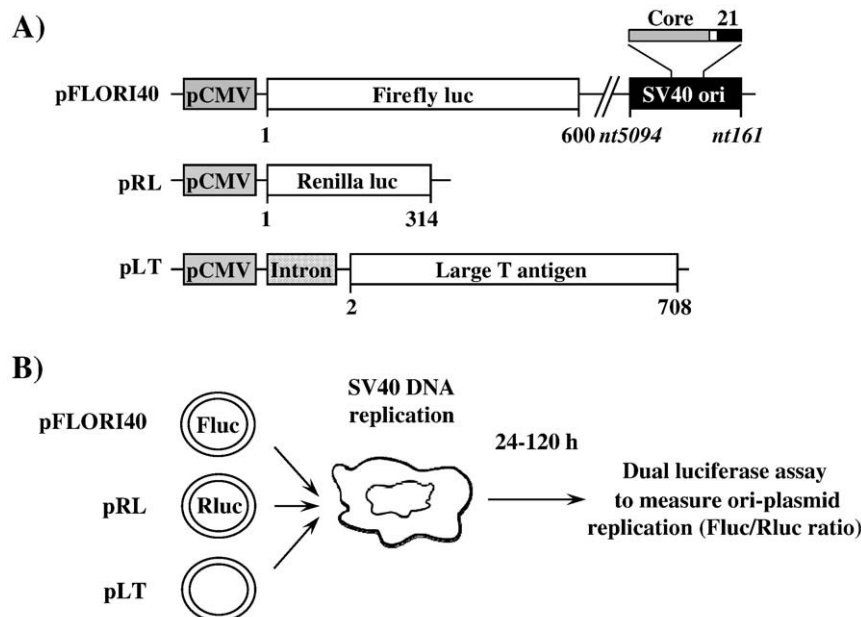


Fig. 1. Principle of the luciferase SV40 DNA replication assay. (A) Schematic representation of the three plasmids used in the assay. The name of each plasmid is written on the left. The location of the SV40 origin of replication is represented by a black box with the position of the core (grey) and 21 bp-repeat regions (black) enlarged above. The nucleotide (nt) sequence boundaries of the origin are indicated. The locations of the CMV promoter and intron are indicated by dark and light grey boxes, respectively. The coding regions of firefly and Renilla luciferase as well as those of LT are indicated by white boxes. Amino acid boundaries of each protein are indicated below each box. (B) Schematic representation of the assay. A plasmid expressing SV40 LT (pLT) is co-transfected in cells along with a second plasmid containing the SV40 origin of replication (pFLORI40) and a firefly luciferase reporter gene. A third plasmid expressing Renilla luciferase (pRL) is also transfected as an internal control to normalize for variations in transfection efficiency. Viral DNA replication is measured using a dual-luciferase assay, at different times post-transfection.

the SV40 origin of replication (nucleotides 5094–161) (Buchman et al., 1981) and a firefly luciferase reporter gene expressed from the CMV promoter (pFLORI40, Fig. 1A). For LT expression, we used the previously described plasmid pCMV-T-ag (Campbell et al., 1997) referred herein as pLT for short, Fig. 1A) in which LT is expressed from the CMV promoter. A third plasmid encoding Renilla luciferase (Rluc) expressed from the CMV promoter (pRL, Fig. 1A) was also constructed as an internal control to correct for differences in transfection efficiencies. In principle, co-transfection of these plasmids into cells should result in LT-catalyzed replication of the ori-plasmid, which in turn should increase specifically the expression of firefly luciferase but not that of Renilla (Fig. 1B). To verify this assumption, we co-transfected the pFLORI40 (2.5 ng), pLT (12.5 ng) and pRL (0.5 ng) plasmids in 5×10^4 C33A cervical carcinoma cells, in duplicates, and measured the amounts of firefly and Renilla luciferase activities at different time points post-transfection (Fig. 2A). As a negative control, pLT was co-transfected with a firefly luciferase vector lacking the SV40 origin (Ori-). C33A cells were used in this study because they support both SV40 and HPV DNA replication and allow a direct comparison of both DNA replication assays and inhibitors thereof. The

results from these experiments are presented in Fig. 2A as the ratio of firefly (Fluc) to Renilla (Rluc) luciferase activity measured 24, 48, 72, 96 and 120 h post-transfection. High Fluc/Rluc ratios were obtained only from cells transfected with the origin-containing plasmid (Ori+) and not from those transfected with the negative control (Ori-). The Fluc/Rluc ratios gradually increased at 24 and 48 h and reached a maximum at 72 h. Consistent with this observation, we determined by Western blotting that the levels of LT reached a maximum at 48 h post-transfection and then diminished at later time points (96 and 120 h; Fig. 2B). During the development of this assay, we noticed that the maximal level of SV40 DNA replication was occasionally reached at 96 rather than 72 h post-transfection (see Fig. 2C as an example). However, because the assay always remained linear up to 72 h, we chose this time point for all subsequent experiments. Collectively, these results indicate that the high Fluc/Rluc ratios are dependent on the presence of the SV40 origin on the Fluc plasmid and establish a correlation between the increase in Fluc/Rluc values and the expression levels of LT. From this data, we surmised that the high Fluc/Rluc ratios were the result of LT-catalyzed replication of the ori-plasmid.

Dependence of the assay on large T antigen expression

To more rigorously examine the dependence of the assay on the expression levels of LT, we transfected cells with a gradient of pLT (12.5, 25, 50 and 100 ng) while keeping the amount of the other two plasmids constant (Fig. 2C). Cells not transfected with pLT were used as a negative control. These experiments were performed in duplicates and luciferase activities measured at different time points post-transfection. These studies revealed that the Fluc/Rluc ratios were proportional to the quantity of transfected LT expression vector for the three lowest amounts (12.5, 25 and 50 ng) but then reached a plateau. Throughout the development of this assay, we observed that the Fluc levels could be increased by as much as 50-fold by LT (Fig. 2). As expected, the Rluc levels remained relatively constant when 50 ng or less of pLT vector was used (data not shown). Altogether, these results indicate that the Fluc/Rluc ratio is proportional to the expression levels of LT and further support the notion that increases of the Fluc/Rluc ratio occur as a consequence of ori-plasmid replication.

Validation of the assay with mutant large T antigens

To validate that the Fluc/Rluc ratio increases as a function of plasmid replication, we tested in the luciferase assay several LT mutant proteins whose molecular defects have been previously reported in the literature. Each mutant was tested in three different amounts (2.5, 6.25, and 12.5 ng of pLT), in duplicates and on several days. A representative experiment is shown in Fig. 3A. LT mutants that were previously shown to be defective for double hexamer assembly (T124A) (McVey et al., 1989a, 1993, 1996; Moarefi et al., 1993; Schneider and Fanning, 1988; Weisshart et al., 1999) or DNA binding (N153S) (Simmons et al., 1990b, 1993) were inactive in our luciferase assay, as anticipated. We next tested the effect of the T199A substitution in the OBD, which was previously shown to affect transient DNA replication when combined with other substitutions (P200L and S206F or T182I and H192T) (Welsh et al., 1986) but was never tested on its own. We found that T199A LT retained approximately 20% activity relative to the wild-type protein. Fluc/Rluc values were also reduced to background levels by amino acid substitutions that abrogate the ATPase activity (K432A) or disrupt the essential β -hairpin (K512A/H513A and H513A alone) (Kumar et al., 2007) of LT. As a control, we verified by Western blotting that the different LT mutants were expressed at comparable levels (Fig. 3B). Together, these findings indicate that the DNA binding and helicase activities of LT are required to achieve high Fluc/Rluc ratios.

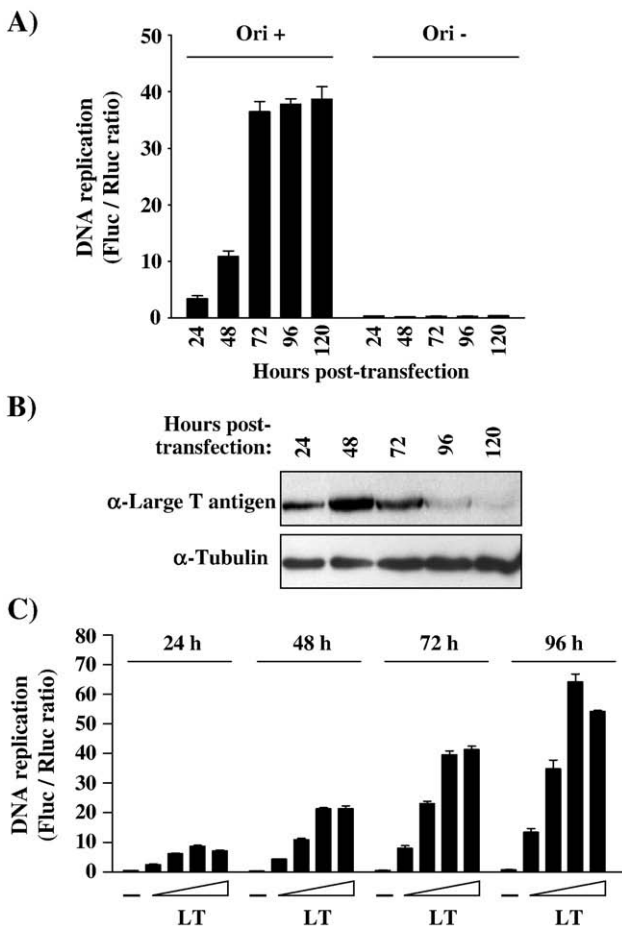


Fig. 2. Dependence of the SV40 DNA replication assay on time and expression of T antigen. (A) Replication of the SV40 origin-containing plasmid (Ori+), or of a similar plasmid lacking the origin (Ori-), as a function of time post-transfection (in hours). C33A cells were transfected with 12.5 ng of pLT together with 2.5 ng of pFLORI40 and 0.5 ng of RL, and luciferase activities measured at the indicated time points post-transfection. (B) Western blot showing the expression of LT at different time points post-transfection. Tubulin was used as a loading control. Note that the time-dependent increase in tubulin levels reflects the fact that cells continued to proliferate over the course of this 5-day assay. (C) Replication of the SV40 origin-containing plasmid by increasing amounts of pLT (12.5, 25, 50 and 100 ng). Cells transfected without the LT expression vector (-) were used as a negative control. Replication by a gradient of LT was determined at 24, 48, 72 and 96 h, as indicated.

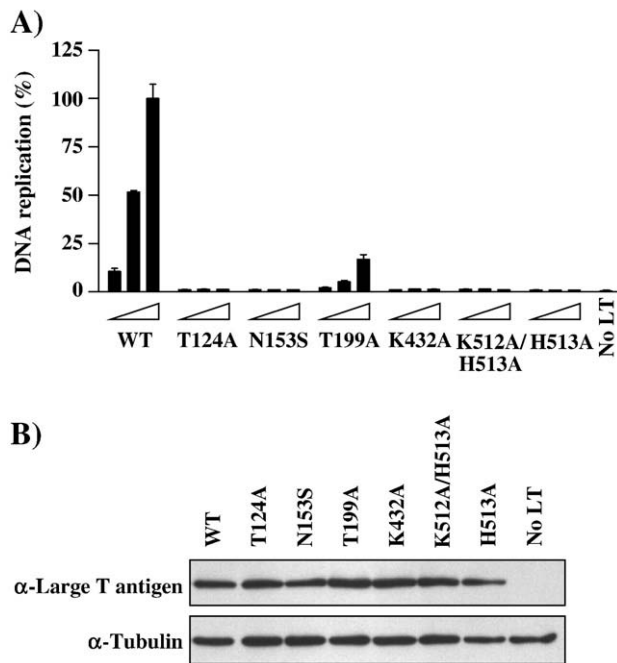


Fig. 3. Validation of the SV40 DNA replication assay using T antigen mutants. (A) Replication activity of mutant T antigens in C33A cells. Each mutant was tested in three different amounts of pLT (2.5, 6.25 and 12.5 ng). Cells transfected without LT expression vectors (No LT) was used as a negative control. Replication activity is reported as a percentage (%) of the Fluc/Rluc ratio obtained with 12.5 ng of the LT wild-type, which was set at 100. (B) Western blot showing the expression of the different T antigen mutant proteins. Tubulin was used as a loading control.

Development of a luciferase HPV31 DNA replication assay

Based on our success with SV40, we set out to establish a similar assay for HPV, which uses two proteins, E1 and E2, rather than a single one to initiate viral DNA replication. To do so, we constructed a plasmid containing the HPV31 origin of replication (nucleotides 7721–100) (Frattini and Laimins, 1994) and a firefly luciferase reporter gene expressed from the CMV promoter (pFLORI31, Fig. 4A). We also constructed expression vectors for HPV31 E1 and E2 tagged at their N-terminus with a triple-Flag (3F) epitope (p31E1 and p31E2, Fig. 4A). In these vectors, the coding sequences of E1 and E2 have been codon-optimized for expression in human cells and are transcribed from the CMV promoter. These three plasmids (2.5 ng pFLORI31, 10 ng p31E1, 10 ng p31E2), along with the pRL control plasmid described above (0.5 ng), were co-transfected, in duplicates, in 5×10^4 C33A cells and the amount of firefly and Renilla luciferase activities measured 24, 48, 72, 96 and 120 h post-transfection. As negative controls, cells were also transfected without E1, E2 or both. The results from these experiments are presented in Fig. 4B as the ratio of firefly to Renilla luciferase activities measured at each time point. High Fluc/Rluc ratios were obtained only from cells expressing both E1 and E2 and were readily detectable as early as 24 h post-transfection. Maximum DNA replication was reached at 72 h, consistent with the fact that E1 and E2 expression was maximal at 24 and 48 h post-transfection and then declined (Fig. 4C).

To further ascertain that the Fluc/Rluc ratios were dependent on expression of E1 and E2, we titrated the amount of p31E1 or p31E2 (from 0.01 ng to 25 ng) while keeping the amounts of the other three plasmids constant (Fig. 5). These experiments, performed in octuplicates, revealed that the Fluc levels increased proportionally to the amount of E1 and E2, in contrast to the Rluc levels which varied by two-fold or less (Figs. 5B and C). At high concentrations of E1 and E2, replication of the ori-plasmid (i.e. Fluc/Rluc ratio) could be increased by as much as 150-fold (Fig. 5A). Importantly, we also demonstrated

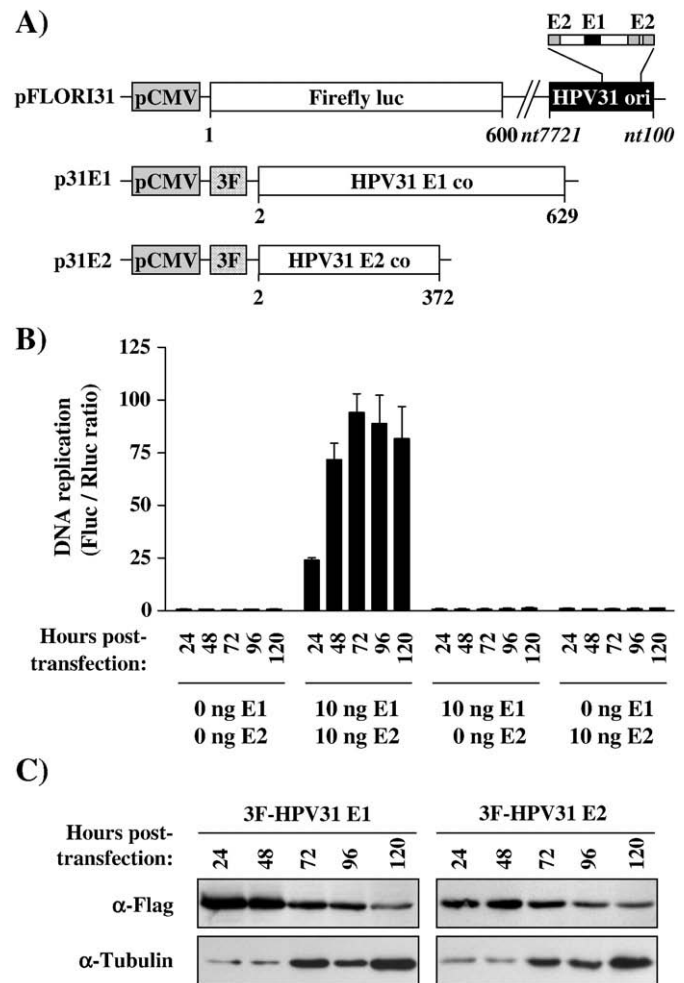


Fig. 4. Principle of the luciferase-based HPV31 DNA replication assay. (A) Schematic representation of the three HPV plasmids used in the luciferase assay. The name of each plasmid is written on the left. The location of the CMV promoter and 3F epitope are indicated as dark and light grey boxes, respectively. The coding regions of firefly and Renilla luciferase as well as those of codon-optimized (co) E1 and E2 are indicated by white boxes. Amino acid boundaries are indicated below each box. The location (black box) and nucleotide boundaries of the HPV31 origin of replication are indicated with the position of E1 (black) and E2 (grey) binding sites enlarged above. (B) DNA replication activities measured in C33A cells transfected with the indicated amount of E1 and E2 expression vectors together with 2.5 ng of pFLORI31 and 0.5 ng of pRL. DNA replication activities are expressed as Fluc/Rluc ratios and were determined at 24, 48, 72, 96 and 120 h post-transfection, as indicated. (C) Western blots showing the expression of E1 and E2 at different time points post-transfection. Tubulin was used as a loading control. Note that the time-dependent increase in tubulin levels reflects the fact that cells continued to proliferate over the course of this 5-day assay.

that the assay signal measured at the highest quantity of E1 and E2 (25 ng each) was dependent on the presence of the origin on the Fluc reporter plasmid (No ori, Fig. 5). Collectively, these results indicate that the Fluc/Rluc ratio is a good indicator of the amount of ori-plasmid replicated by E1 and E2.

Validation of the luciferase HPV31 DNA replication assay with E1 and E2 mutant proteins

To validate the luciferase assay, we tested the effect of amino acid substitutions in E1 and E2 that were previously characterized in a conventional (i.e. Southern-based) transient DNA replication assay.

(i) E1 mutants

Each mutant was tested at three different amounts (2.5, 5 and 10 ng of p31E1 together with 10 ng of p31E2) in duplicates and

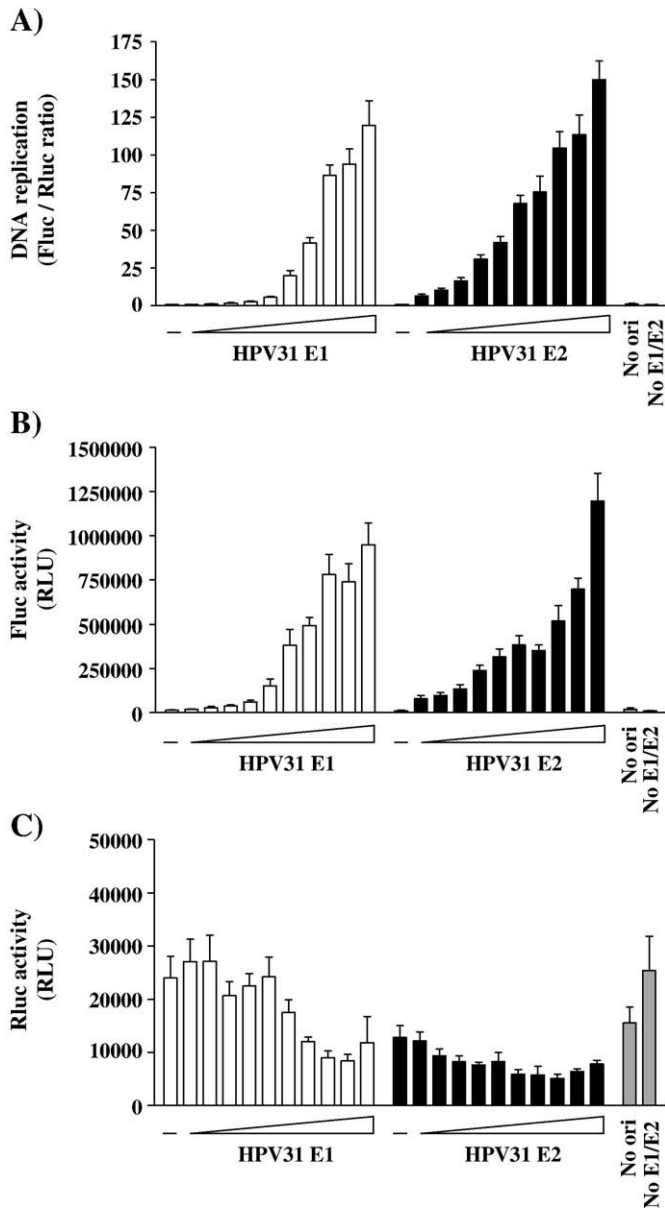


Fig. 5. Dependence of the HPV31 DNA replication assay on E1 and E2. (A) Replication of the HPV31 origin-containing plasmid in C33A cells transfected with increasing amounts of E1 (white bars) and E2 (black bars) expression vectors (2-fold increments ranging from 0.01 to 25 ng) as described in the text. Cells transfected without the E1 or E2 expression vector (–) were used as negative controls. Cells transfected without E1 and E2 expression vectors (No E1/E2) as well as cells transfected with E1 and E2 but with a plasmid lacking the origin (No ori) were used as controls and are represented as grey bars. (B) and (C) Firefly and Renilla luciferase values (reported as relative light units, RLU) that were used to calculate the ratios presented in (A).

on several days. A representative experiment is shown in Fig. 6A. As can be seen, E1 mutants that were previously shown to be defective for DNA binding (K265A/R267A) (Titolo et al., 2000, 2003b) or oligomerization and ATPase activity (F372A, K463A) (Titolo et al., 2000; White et al., 2001) were also defective in the luciferase assay. Furthermore, E1 mutants that are defective for interaction with the cellular protein p80 (W17A/F18A, V20A/E21A and V23A/I24A) showed a reduction of approximately 60% in replication activity in the luciferase assay, similarly to what we determined previously in a conventional assay (Cote-Martin et al., 2008). As controls, we verified that the different E1 mutants were expressed to comparable levels by Western blotting against the 3F epitope (Fig. 6B).

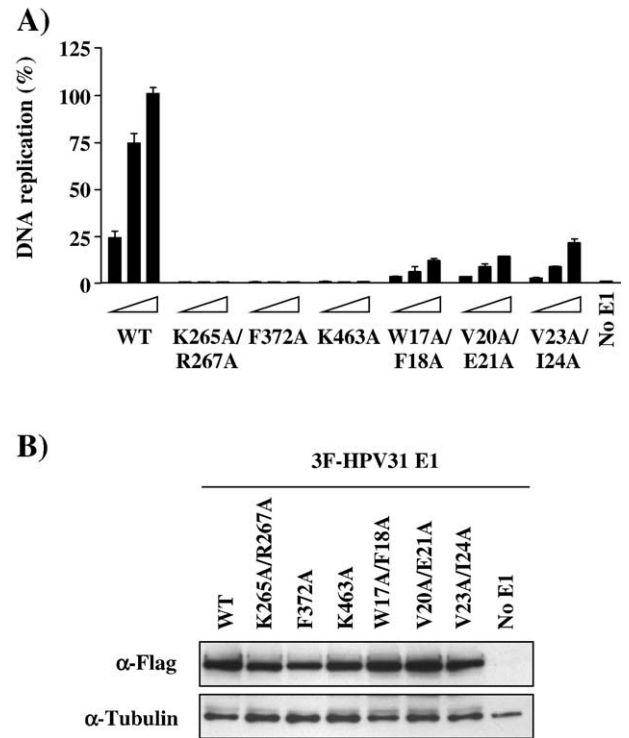


Fig. 6. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E1 mutants. (A) DNA replication activities of the indicated E1 mutants were tested using three different amounts of expression vector (2.5, 5 and 10 ng). Cells transfected without E1 expression vector (No E1) was used as a negative control. Replication activity is reported as a percentage (%) of the Fluc/Rluc ratio obtained with 10 ng of the E1 wild-type. (B) Anti-Flag Western blot showing the expression of E1 mutant proteins. Tubulin was used as a loading control.

We and others previously reported that the OBD from HPV11, 18 and BPV E1 can dimerize *in vitro* (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark et al., 2002; Schuck and Stenlund, 2005; Titolo et al., 2003a). Furthermore, we have shown for HPV11 that a dimerization-defective E1 mutant was capable of only low levels of replication (Titolo et al., 2003a). To determine if our assay is sensitive enough to detect low levels of replication and to assess the contribution of dimerization to transient DNA replication, we characterized an HPV31 E1 mutant carrying the amino acid substitution G230R that should prevent dimerization. G230 forms part of the OBD dimer interface and its change to arginine, a much bulkier and charged amino acid, is expected to prevent dimerization by steric hindrance and by inducing charge repulsion between adjacent OBDs. We first verified this assumption by testing the effect of the G230R substitution on the ability of the purified HPV31 OBD to bind and dimerize on DNA (Fig. 7A), using an *in vitro* DNA binding assay based on fluorescence polarization which we previously described (Fradet-Turcotte et al., 2007; Titolo et al., 2003a). Specifically, we measured the affinities of the wild-type and G230R OBDs for a fluorescein-labeled probe containing two E1 binding sites placed in an inverted orientation and separated by 3 bp (2 E1BS probe). We previously determined that the HPV11 and BPV E1 OBDs can bind and dimerize efficiently on this combination of sites which is found twice in the viral origin (Titolo et al., 2003a). As expected, the G230R mutant bound more weakly to this probe with a 7-fold lower affinity ($K_D = 281 \pm 12$ nM) than the wild-type OBD ($K_D = 40 \pm 3$ nM) (Fig. 7B). We then measured the affinities of both OBDs for a probe containing 2 E1BS spaced by 5 bp, instead of 3, to preclude dimerization (2+2 E1BS probe). Binding to this probe was found to be similar for both the wild-type ($K_D = 134 \pm 8$ nM) and mutant OBD ($K_D = 184 \pm 5$ nM) (Fig. 7C), thus indicating that the G230R substitution only affects dimerization and not the interaction of the OBD with a single binding site. Finally, we confirmed that binding of the wild-

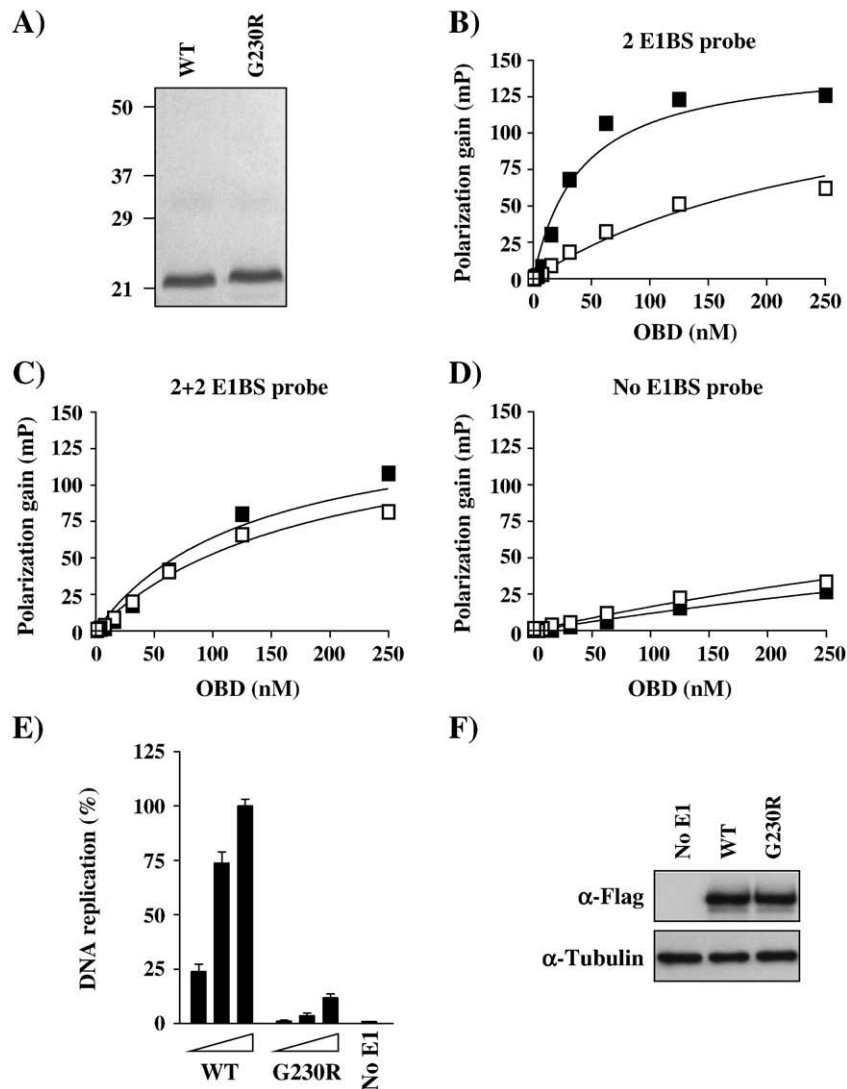


Fig. 7. Characterization of a dimerization-defective HPV31 E1 mutant. (A) Coomassie-stained SDS-PAGE showing the purified wild-type and G230R E1 OBDs. 3 μ g of each protein was loaded on the gel. (B-D) Fluorescence polarization DNA binding assays. Binding isotherms were performed with increasing concentrations of wild-type (filled squares) or G230R (open squares) OBD and 10 nM of fluorescent DNA probe either lacking (No E1BS probe (D)) or containing two E1 binding sites spaced by 3 bp (2 E1BS probe (B)) or 5 bp (2+2 E1BS probe (C)). Only a spacing of 3 bp allows dimerization of the OBD. Each binding isotherm was performed in triplicate. (E) DNA replication activities of wild-type and G230R E1 were tested using three different amounts of expression vector, as described in the text. (F) Anti-Flag Western blot showing the expression of E1 proteins. Tubulin was used as a loading control.

type and mutant OBDs binding *in vitro* as both proteins bound only weakly to a probe lacking a specific binding site (No E1BS probe, Fig. 7D). Next, we tested the effect of the G230R substitution on the ability of full-length HPV31 E1 to support transient HPV DNA replication *in vivo* using the luciferase assay. The G230R E1 mutant was severely defective in supporting viral DNA replication, showing a 8-fold reduction in activity compared to wild-type E1 (Fig. 7E). This defect was not due to a reduced expression of the mutant protein as it was expressed to comparable levels as wild-type E1, as determined by Western blotting (Fig. 7F). These results suggested that dimerization of the OBD enhances DNA binding *in vitro* and origin-replication *in vivo* to similar extents, namely by 7- and 8-fold respectively. These results highlight the critical role played by the OBD dimer interface in HPV DNA replication and indicate that the assay can measure accurately even low-levels of replication.

(ii) E2 mutants

E2 mutants were tested essentially as described above for E1 and using 1.0, 2.5 and 5.0 ng of p31E2 together with 25 ng of p31E1. A representative experiment is shown in Fig. 8A. The I73L substitution

in the E2 TAD that affects transactivation but not DNA replication had no effect in the luciferase assay (Baxter et al., 2005; Brokaw et al., 1996; Cooper et al., 1998; Ferguson and Botchan, 1996; Sakai et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998). This result is in complete agreement with a previous study on HPV31 E2 that showed little to no effect of the I73L substitution on transient DNA replication measured with a Southern-based assay (Stubenrauch et al., 1998). In contrast, the E39A and E39Q substitutions that affect E1-binding significantly reduced replication (Abbate et al., 2004; Ferguson and Botchan, 1996; Harris and Botchan, 1999; Sakai et al., 1996; Stubenrauch et al., 1998). Interestingly, low levels of replication were obtained with the E39 mutants suggesting that they are not completely defective for interaction with E1. A similar finding was previously reported for codon-optimized HPV11 E2 E39A (Wang et al., 2003). As controls, we verified that the different E2 mutants were expressed to comparable levels by Western blotting against the 3F epitope (Fig. 8B). Interestingly, we repeatedly observed that the E2 mutant E39A was less stable than the wild-type protein.

Altogether, the results obtained with E1 and E2 mutants described above provide additional evidence that the Fluc/Rluc ratio reflects

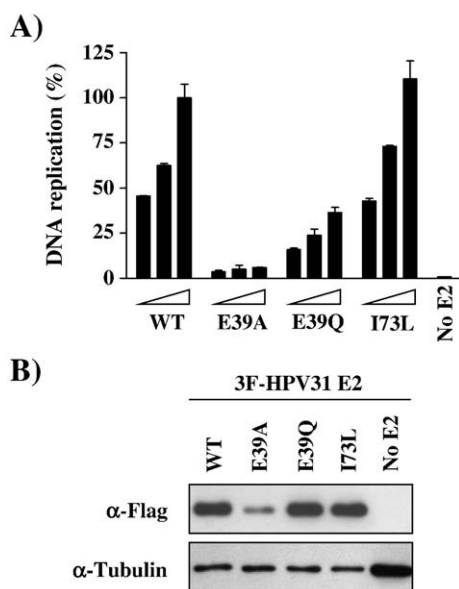


Fig. 8. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E2 mutants. (A) DNA replication activities of the indicated E2 mutants were tested using three different amounts of expression vector (1, 2.5 and 5 ng). Cells transfected without E2 expression vector (No E2) was used as a negative control. Replication activity is reported as a percentage (%) of the Fluc/Rluc ratio obtained with 5 ng of E2 wild-type. (B) Anti-Flag Western blot showing the expression of E2 mutant proteins. Tubulin was used as a loading control.

replication of the ori-plasmid. Furthermore, they indicate that the luciferase DNA replication assay behaves similarly as the conventional assay and is well suited for measuring accurately even low levels of DNA replication.

Luciferase activity increases as a function of ori-plasmid replication

The experiments presented above functionally validated the use of the luciferase readout to monitor SV40 and HPV31 DNA replication but did not directly correlate the increase in luciferase activity with replication of the ori-plasmid. To establish this correlation, we measured, in the same experiment, the levels of firefly luciferase activity originating from the ori-plasmid and the amount of replication of this plasmid by quantitative real-time PCR (qPCR). For the SV40 assay, C33A cells were transfected essentially as described above with the pFLORI40 plasmid and the LT expression vector (+LT). Cells transfected with the Fluc plasmid lacking the ori (pCI-Fluc; No ori), or with pFLORI40 but without the LT expression vector (No LT), were used as controls. 72 h post-transfection, both the levels of Fluc activity and the amount of replicated ori-plasmid were measured in parallel. Plasmid replication was determined by amplification of a portion of the Fluc open-reading frame from *DpnI*-digested total genomic DNA and the amount of amplified plasmid quantified using a 7-point standard curve (as described in Materials and methods). Fig. 9A (left panel) shows that high levels of replicated ori-plasmid were detected only in cells expressing LT and not in control cells, as expected. Importantly, these results paralleled those obtained by measuring the levels of Fluc activity by luminescence (Fig. 9A, right panel). Thus, only cells that contain significant amounts of replicated ori-plasmid express high levels of firefly luciferase activity. We also performed a similar analysis for the HPV31 assay. Once again, the levels of replicated (*DpnI*-resistant) HPV31 ori-plasmid were detected in high amounts only in cells expressing both E1 and E2 (+E1/+E2) (Fig. 9B, left panel). These same cells also expressed high levels of firefly luciferase (Fig. 9B, right panel). Collectively, the results presented above provide direct evidence that the levels of firefly luciferase activity are increased as a

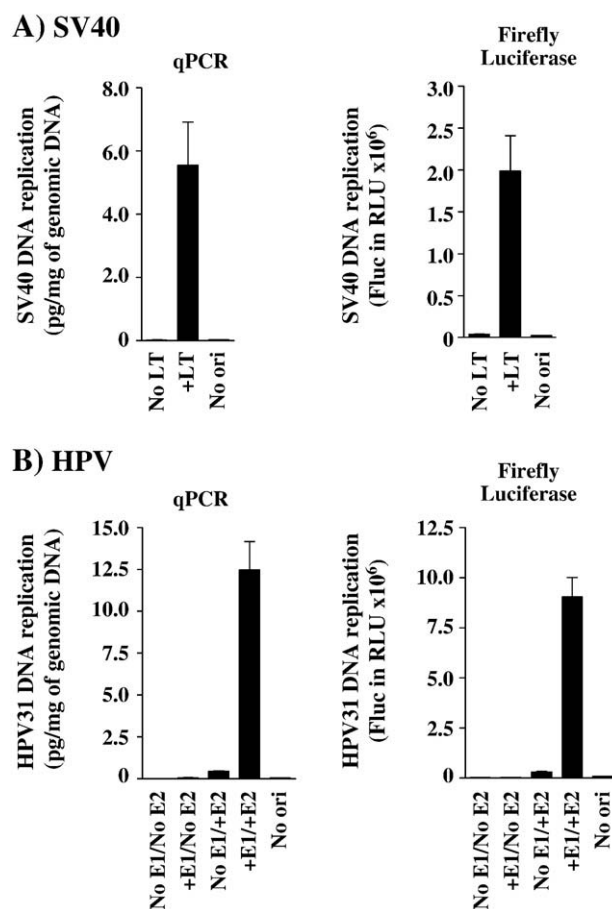


Fig. 9. Correlation between ori-plasmid replication and firefly luciferase expression. (A) Levels of SV40 plasmid replication measured by quantitative real-time PCR (qPCR) or determined by measuring levels of firefly luciferase activity. C33A cells were transfected with the pFLORI40 plasmid and the LT expression vector (+LT). As controls, cells were transfected without the LT expression vector (No LT) or with a similar plasmid lacking the ori (No ori). The amounts of DNA replication measured by qPCR are reported in pg of *DpnI*-resistant plasmid per mg of total genomic DNA. Firefly luciferase (Fluc) activity is reported in relative light units (RLU). (B) A similar analysis was performed for HPV31 DNA replication with the exception that cells were transfected with the pFLORI31 plasmid, or a similar plasmid lacking the ori (No ori), and with expression vectors for E1 and E2, as indicated.

function of ori-plasmid replication, in both the SV40 and HPV31 assays.

Inhibition of SV40 and HPV DNA replication by the cytidine analogue gemcitabine

To further validate the SV40 and HPV31 transient DNA replication assays and assess their potential for testing small molecule inhibitors, we investigated the effect of a known DNA replication inhibitor, gemcitabine, a cytidine analogue currently used for the treatment of several cancers (Fig. 10A) (Jiang et al., 2000; Mini et al., 2006). We first determined that both assays are tolerant to 0.1% DMSO, which was used as a vehicle in our study (data not shown). Increasing concentrations of gemcitabine (1.56 to 50 nM) were then tested. In order to minimize any potential cytotoxic effects of the drug, gemcitabine was added to transfected cells 24 h prior to measuring luciferase activities. As can be seen in Fig. 10B, gemcitabine inhibited both SV40 and HPV DNA replication in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of approximately 50 and ~12.5 nM, respectively. Gemcitabine decreased expression of the Fluc signal (Fig. 10C) and had no effect on the levels of Rluc (Fig. 10D), suggesting that it specifically affected viral DNA replication. To confirm this suggestion

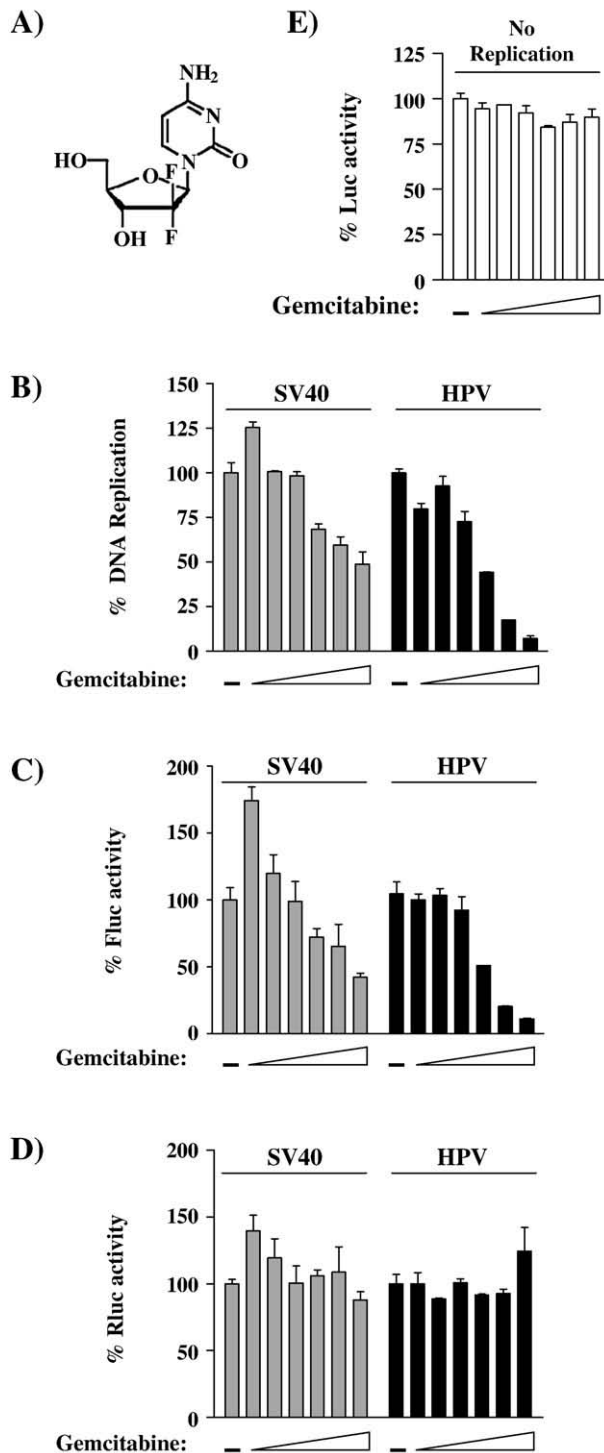


Fig. 10. Validation of the SV40 and HPV31 assays using the DNA replication inhibitor gemcitabine. (A) Structure of gemcitabine. (B) Replication activity measured in cells treated with increasing concentrations of gemcitabine (2-fold increments ranging from 1.56 to 50 nM) or treated with DMSO as a vehicle control (–). Replication activity is reported as a percentage (%) of the Fluc/Rluc ratio obtained in presence of DMSO only. (C and D) Firefly and Renilla luciferase values, reported as a percentage of the values obtained without gemcitabine (DMSO only), that were used to calculate the replication activity levels shown in (B). (E) Effect of gemcitabine on expression of CMV-Fluc in the absence of plasmid replication (No replication) is reported as a percentage (%) of the value obtained in absence of gemcitabine (DMSO only).

and rule out any non-specific effects of gemcitabine on expression of the Fluc reporter gene, we measured its activity in absence of viral DNA replication (i.e. in absence of viral proteins). Forty-fold higher

amounts of the ori-plasmid pFLORI31 were transfected in these experiments (without LT, E1 and E2 but together with pRL; no replication) in order to mimic the levels of firefly luciferase activity originating from a replicated ori-plasmid. Indeed, whereas SV40 and HPV DNA replication typically results in a firefly luciferase signal of 1 and 3×10^6 RLU, respectively, transfection of cells with a 40-fold excess of ori-plasmid (in absence of replication proteins) typically yields 2×10^6 RLU. Under these non-replicating conditions, gemcitabine had no effect on firefly luciferase expression, further demonstrating that it specifically inhibits LT- and E1/E2-dependent DNA replication and not expression of the Fluc reporter gene (Fig. 10E). As an example of a compound that affects DNA replication indirectly, we used the DNA intercalating agent Actinomycin D which blocks transcription. As expected, Actinomycin D affected the levels of both firefly and Renilla luciferase (data not shown). Thus, Renilla luciferase can also be used as a control to detect compounds that affect transcription from the CMV promoter. This is a particularly important control given that the CMV promoter is also used to drive expression of LT, E1 and E2. More generally, these data indicated that the luciferase assay is suitable for testing small molecule inhibitors and accurately measure their potency (IC_{50} determination).

Inhibition of SV40 and HPV DNA replication by chemical inhibitors of the cell cycle

SV40 and HPV DNA replication occurs during the S-phase of the cell cycle. We therefore anticipated that our assays would be sensitive to chemical inhibitors that cause cell cycle arrest and/or perturb S-phase. To verify this prediction, we measured the activity of several different inhibitors in the luciferase SV40 and HPV DNA replication assays (Table 1). As a control, they were also tested for their effect on CMV-Fluc expression in the absence of viral replication proteins (Table 1, Fluc expression (no replication)), as described above for gemcitabine. First, we examined the effect of hydroxyurea (HU), an inhibitor of ribonucleotide reductase that prevents S-phase progression (reviewed in (Krek and DeCaprio, 1995)). As anticipated, HU inhibited viral DNA replication ($IC_{50} = 1000$ and $250 \mu\text{M}$ for SV40 and HPV, respectively) with little effect on expression of CMV-Fluc ($IC_{50} > 2000 \mu\text{M}$). A similar pattern was found for mimosine, a commonly used inhibitor that blocks cells in late G1 near the G1/S-phase transition ($IC_{50} = 500$ and $250 \mu\text{M}$ for SV40 and HPV) (Gilbert et al., 1995; Hughes and Cook, 1996; Krek and DeCaprio, 1995; Krude, 1999; Wang et al., 2000; Watson et al., 1991). We also tested the activity of two HSP90 inhibitors, geldanamycin and its derivative 17-AAG, which have been reported to block cell-cycle progression in G1 (Bedin et al., 2004; Munster et al., 2001; Srethapakdi et al., 2000). We found that both compounds could prevent viral DNA replication (geldanamycin: $IC_{50} = 0.025$ and $0.05 \mu\text{M}$ for SV40 and HPV; 17-AAG: $IC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$ for both SV40 and HPV), with less of an effect on

Table 1

Activity of selected cell-cycle inhibitors on viral DNA replication. Inhibitors were tested in presence and absence of viral DNA replication as described in the text. DNA pol: DNA polymerases, RR: Ribonucleotide reductase. * Inhibitors were tested for their effect on expression of the firefly luciferase reporter gene in absence of viral DNA replication, using a 40-fold excess of Fluc ori-plasmid as described in the text.

Inhibitor	Cellular target	Cell cycle phase	IC_{50} (μM)		
			SV40	HPV31	Fluc expression * (no replication)
Gemcitabine	DNA pol/RR	S	0.05	0.012	>0.05
Hydroxyurea	RR	S	1000	250	>2000
Mimosine	Unknown	G1/S	500	250	>500
Geldanamycin	HSP90	G1	0.025	0.05	>0.2
17-AAG	HSP90	G1	0.5	0.5	>2.0
Lactacystin	Proteasome	G1-G2/M	1.25	1.25	>10

expression of CMV-Fluc. Finally, we investigated the effect of the proteasome inhibitor lactacystin, which was also reported to block S-phase entry by arresting cells either in G1 or G2/M phase (Katagiri et al., 1995; Keezer and Gilbert, 2002). Like the two HSP90 inhibitors, lactacystin inhibited viral DNA replication ($IC_{50} = 1.25 \mu\text{M}$ for both SV40 and HPV). Because the cell cycle inhibitory effect of geldanamycin and lactacystin is not as well documented in the literature as that of HU and mimosine, we verified that both compounds prevented S-phase entry under our assay conditions. Specifically, we determined by confocal fluorescence microscopy that geldanamycin and lactacystin could prevent the accumulation of PCNA (as a fusion to RFP) into nuclear foci characteristics of cells in S-phase (Supplementary Fig. 1) (Gorisch et al., 2008; Schermelleh et al., 2007; Sporbert et al., 2005). Collectively, these studies provided evidence that our luciferase assays are indeed measuring SV40 and HPV31 DNA replication that occurs during S-phase.

Concluding remarks

In this study, we described the development of novel assays to monitor SV40 and HPV31 DNA replication in transiently transfected cells. We established that replication of the ori-plasmid during S-phase results in increased luciferase expression and confirmed these findings using known replication-defective mutants of LT, E1 and E2, as well with small molecule inhibitors of DNA replication and cell-cycle progression. These assays offer several unique advantages over traditional Southern- or PCR-based assays. The major ones are probably that they require very few steps, do not rely on radioactivity and are quantitative, thus making them suitable for high-throughput studies. For example, these assays would be ideal to screen chemical libraries for new antiviral compounds or siRNA libraries to systematically identify host factors involved in viral DNA replication. In this respect, we have shown that these assays are highly suitable for chemical inhibitor testing and IC_{50} determination in 96-well plates. An important feature of these assays is the use of Renilla luciferase as an internal control to correct for variations in transfection efficiency and cell viability. Furthermore, since Renilla luciferase is expressed from the CMV promoter, like the firefly luciferase reporter and the viral replication proteins LT, E1 and E2, it can be used to detect inhibitors which indirectly affect viral DNA replication by changing expression of the viral proteins. Finally, the methods described in this manuscript should be directly applicable to other polyoma- and papillomaviruses. It is anticipated that these assays will facilitate the analysis of how different DNA tumor viruses replicate their genomes and the roles that replication factors play in this process.

Materials and methods

Plasmid constructions and mutagenesis

The plasmid to express SV40 Large T antigen, pCMV-T-ag (referred herein as pLT for short), has been described previously (Campbell et al., 1997). Plasmid pFLORI40, which contains a firefly luciferase gene under the control of the CMV promoter and the SV40 origin of replication, was constructed in two steps. First, the firefly luciferase (Fluc) gene from pGL3-basic (Promega) was inserted between the *XhoI* and *XbaI* restriction sites of pCI (Promega) to create pCI-Fluc. Second, a PCR fragment spanning the SV40 origin of replication (nucleotides 5094–161 of the complete genome according to the numbering system of Buchman et al. (1981), NCBI Reference Sequence: NC_001669.1) was inserted into the *DraIII* site of pCI-Fluc to generate pFLORI40. Primers used for the amplification of the SV40 origin were designed to encode *DraIII* restriction sites and were of the following sequence: 5'-CGCATCACGTAGTGCCTCCCGAGG-3' and 5'-CGCATCACTACGTGCCACTCTTCAAGACC-3'. The plasmids to ex-

press HPV31 E1 and E2 were obtained by inserting the codon-optimized genes, synthesized commercially (GenScript Corp.), between the *BamHI*–*EcoRI* sites (E1) or *BamHI*–*HindIII* sites (E2) of pCMV-3Tag-1a (Stratagene) to create in frame fusions with the triple-Flag (3F) epitope. The HPV origin-containing plasmid (pFLORI31) was constructed as described above for pFLORI40 with the difference that the PCR fragment spanning the HPV31 origin of replication (nucleotides 7721–100 of the complete genome according to numbering scheme of Frattini and Laimins, 1994 (Frattini and Laimins, 1994) NCBI Reference Sequence: J04353.1) was inserted into the *NgoMIV* site of pCI-Fluc to create pFLORI31. Primers used for the amplification of the HPV31 origin were designed to encode *NgoMIV* restriction sites, and were of the following sequence: 5'-CGCATGCCGGCAAAGTGC-TTTTAGGCACATATTTTG-3' and 5'-CGCATGCCGGCGTAGGTTTGCA-CAAAATACTATGTG-3'. Plasmid pRL coding for Renilla luciferase (Rluc) was constructed by inserting a PCR fragment encoding Rluc between the *Sall* and *NotI* sites of pCI. The following primers were used: 5'-CCACGTCGACGCCACCATGACCAGCAAGGTGTACG-3' and 5'-CCC GCGGCCGCTTATCTAGATCCGGTGATCC-3'. Site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details on their construction will be provided upon request.

Cell culture and transfections

C33A human cervical carcinoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 IU/ml of penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Transfections were performed using the Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen).

Luciferase DNA replication assay

C33A cells were plated 20 h before transfection in white flat-bottom 96-well plates (Corning) at a density of 25000 cells/well. The total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 100 ng with the empty vector (pCI) for the SV40 assay, and with (pCMV-3Tag-1a) for the HPV assay, as carrier DNA. For all experiments, 2.5 ng of the origin-containing plasmid pFLORI40 (Fluc) or pFLORI31 (Fluc) and 0.5 ng of pRL (Rluc) were transfected, along with the indicated amount of pLT or pE1 and pE2, respectively. The culture medium was changed 4 h post-transfection. Fresh media was added and firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) 24 to 120 h post-transfection.

Fluorescence polarization DNA binding assay

The wild-type and G230R HPV31 E1 OBDs were expressed as fusions to GST and purified from bacteria as described previously (Fradet-Turcotte et al., 2007). The duplex DNA probes were prepared by annealing a fluorescein-labeled oligonucleotide to its complementary oligonucleotide as described previously (Titolo et al., 2003a). 150 μl binding reactions were assembled in 96-well HTRF plates (Packard) using 10 nM fluorescein-labeled probe and the indicated concentrations of protein in the following buffer: 20 mM Tris (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.01% NP-40, and 1 mM DTT. Fluorescence readings were recorded and K_D values calculated as previously described (Fradet-Turcotte et al., 2007; Titolo et al., 2003a).

Quantitative PCR (qPCR) analysis

Approximately 1.2×10^6 C33A cells were transfected in 6-well plates with 60 ng of pFLORI40 and 300 ng of pLT for the SV40 DNA replication assay or with 60 ng pFLORI31, 240 ng of p31E1 and 240 ng of p31E2 for the HPV31 DNA replication assay. In both assays, 12 ng of

pRL were also transfected to reproduce the conditions used in the luciferase-based assay. The total quantity of plasmid DNA transfected was adjusted to 2400 ng with empty vector, either pCI for the SV40 assay or pCMV-3Tag-1a for the HPV31 assay, as carrier DNA. Total genomic DNA was extracted 72 h post-transfection using the DNeasy kit from Qiagen. This method of DNA isolation was found to yield more reproducible results than the commonly used Hirt-extraction protocol (Taylor and Morgan, 2003) (data not shown). To measure the amount of replicated pFLORI31 or pFLORI40, 25 μ l of total genomic DNA was digested with 10 units of *DpnI* (New England Biolabs) for 16 h in a final volume of 30 μ l. The digested DNA samples were then incubated for 30 min with 100 units of Exonuclease III (New England Biolabs) and the enzyme was heat inactivated at the end of the reaction by incubation at 70 °C for 30 min. The primers used to amplify an 80 bp-portion of the firefly luciferase gene present on the pFLORI40 (SV40 ori), pFLORI31 (HPV31 ori) or pCI-Fluc (No ori) plasmids as well as the probe used to detect the amplicon were synthesized according to unpublished sequences validated by Dr Iain Morgan (personal communication). These primers amplify a portion of Fluc that encompasses two *DpnI* sites and the probe, which is labeled with FAM and TAMRA at its 5' and 3' end, respectively, hybridizes to a region that overlaps these two *DpnI* sites. Real-time qPCR was performed using 4.5 μ l of a 5-fold dilution of digested genomic DNA, 900 nM of primers and 125 nM of probe in "PerfeCTa™ qPCR SuperMix, UNG, Low ROX" buffer (Quanta Biosciences, this buffer contains: dATP, dCTP, dGTP and dUTP; MgCl₂; AccuStart Taq DNA Polymerase; UNG; ROX reference dye and stabilizers). PCR reactions were performed on a real-time PCR system (Mx3005P, Stratagene) using the following PCR amplification conditions: 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, for 40 cycles. Quantification was performed using a 7-point standard curve of pCI-Fluc plasmid ranging from 10⁴ to 10⁻² pg (10-fold serial dilutions). Plasmid quantities were reported in pg per mg of total genomic DNA extracted. Each value is the average of at least three replicates.

Inhibitors

C33A cells were plated and transfected essentially as described for the luciferase DNA replication assay. For SV40, a constant amount of 12.5 ng of pLT was used in each well along with 2.5 ng of pFLORI40 and 0.5 ng of pRL plasmid. The culture medium was replaced 4 h post-transfection with fresh medium. The inhibitors were added 48 h post-transfection by changing the culture medium with fresh medium containing the inhibitor or vehicle alone (0.1% DMSO). Finally, fresh media was added again 72 h post-transfection and firefly and Renilla luciferase activities measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega). For HPV, the assay was essentially the same, but the inhibitors were added directly to the assay 4 h post-transfection and the firefly and Renilla luciferase activities were measured 24 h post-transfection. For both assays, two-fold serial dilutions of each inhibitor were assayed starting at a maximal concentration of 50 nM for gemcitabine, 2 mM for hydroxyurea, 500 μ M for mimosine, 0.2 μ M for geldanamycin, 2 μ M for 17-AAG and 10 μ M for lactacystin. Lactacystin was purchased from Cayman (Cat: 70980), geldanamycin and 17-AAG from BIOMOL international (Cat: EI-280 and EI-308, respectively) and both hydroxyurea and mimosine from Sigma-Aldrich (Cat: H8627 and M0253). Gemcitabine was a kind gift Dr. William W. Bachovchin, Tufts University.

Western blotting and antibodies

LT proteins were detected using a mouse monoclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology that recognizes an epitope located within residues 1–82 of the protein (Cat: sc-148). Flag-tagged E1 and E2 proteins were detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (M2-Flag antibody, Cat: F1804). β -tubulin was

detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (Cat: T0426). For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and detected using horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse secondary antibody from GE healthcare (Cat: NA931) and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Confocal fluorescence microscopy

8 \times 10⁵ C33A cells were transfected with 500 ng of RFP-PCNA expression plasmid (previously described in (Sporbert et al., 2005)) and grown on coverslips. Inhibitors were added 4 h post-transfection and cells were fixed 24 h later with 4% formaldehyde. Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100 M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, Canada) and analyzed using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss, Toronto, Canada).

Acknowledgments

We thank Dr. Maria Cardoso (Technische Universitat Darmstad) for the RFP-PCNA expression plasmid and Dr. Iain Morgan (University of Glasgow) for sharing qPCR conditions and reagents. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J.A. and from the National Institutes of Health (R01 GM055397) to P.A.B. A.F.-T. and M. L. hold studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and CIHR, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virol.2009.12.026.

References

- Abbate, E.A., Berger, J.M., Botchan, M.R., 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 18 (16), 1981–1996.
- Androphy, E.J., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325 (6099), 70–73.
- 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.
- Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K., McBride, A.A., 2005. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J. Virol.* 79 (8), 4806–4818.
- Bedin, M., Gaben, A.M., Saucier, C., Mester, J., 2004. Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int. J. Cancer.* 109 (5), 643–652.
- Bergsma, D.J., Olive, D.M., Hartzell, S.W., Subramanian, K.N., 1982. Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (2), 381–385.
- 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.
- Borowiec, J.A., Dean, F.B., Bullock, P.A., Hurwitz, J., 1990. Binding and unwinding-how T antigen engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell* 60 (2), 181–184.
- Brokaw, J.L., Blanco, M., McBride, A.A., 1996. Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J. Virol.* 70 (1), 23–29.
- Buchman, A.R., Burnett, L., Berg, P., 1981. Appendix A: The SV40 nucleotide sequence. In: Tooze, J. (Ed.), "DNA Tumor Viruses—Second Edition Revised". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 799–841.
- Bullock, P.A., 1997. The initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32 (6), 503–568.
- Bullock, P.A., Joo, W.S., Sreekumar, K.R., Mello, C., 1997. Initiation of SV40 DNA replication *in vitro*: analysis of the role played by sequences flanking the core origin on initial synthesis events. *Virology* 227 (2), 460–473.
- Campbell, K.S., Mullane, K.P., Aksoy, I.A., Studdal, H., Zalvide, J., Pipas, J.M., Silver, P.A., Roberts, T.M., Schaffhausen, B.S., DeCaprio, J.A., 1997. Dnaj/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev.* 11 (9), 1098–1110.
- Cegielska, A., Moarefi, I., Fanning, E., Virshup, D.M., 1994. T-antigen kinase inhibits

- determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 216 (1), 219–222.
- Taylor, E.R., Morgan, I.M., 2003. A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV-16 E1- and E2-mediated DNA replication. *Virology* 315 (1), 103–109.
- Tegtmeier, P., Lewton, B.A., DeLucia, A.L., Wilson, V.G., Ryder, K., 1983. Topography of simian virus 40 A protein–DNA complexes: arrangement of protein bound to the origin of replication. *J. Virol.* 46 (1), 151–161.
- Titolo, S., Pelletier, A., Pulichino, A.M., Brault, K., Wardrop, E., White, P.W., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J. Virol.* 74 (16), 7349–7361.
- Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P.W., Archambault, J., 2003a. 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., Welchner, E., White, P.W., Archambault, J., 2003b. Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy. *J. Virol.* 77 (9), 5512–5518.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., Stenlund, A., 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* 10 (13), 4321–4329.
- Virshup, D.M., Kauffman, M.G., Kelly, T.J., 1989. Activation of SV40 DNA replication *in vitro* by cellular protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 8 (12), 3891–3898.
- Virshup, D.M., Russo, A.A., Kelly, T.J., 1992. Mechanism of activation of simian virus 40 DNA replication by protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 12 (11), 4883–4895.
- Wang, G., Miskimins, R., Miskimins, W.K., 2000. Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1). *Exp. Cell Res.* 254 (1), 64–71.
- Wang, X.M., Jansen, K.U., McClements, W.L., 2003. DNA replicative functions of highly-expressed, codon-optimized human papillomavirus proteins E1 and E2. *J. Virol. Methods* 108 (1), 83–90.
- Watson, P.A., Hanauske-Abel, H.H., Flint, A., Lalande, M., 1991. Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border. *Cytometry* 12 (3), 242–246.
- Weisshart, K., Taneja, P., Jenne, A., Herbig, U., Simmons, D.T., Fanning, E., 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 (3), 2201–2211.
- Welsh, J.D., Swimmer, C., Cocke, T., Shenk, T., 1986. A second domain of simian virus 40 T antigen in which mutations can alter the cellular localization of the antigen. *Mol. Cell. Biol.* 6 (6), 2207–2212.
- White, P.W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M.G., Archambault, J., 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J. Biol. Chem.* 276 (25), 22426–22438.
- Wun-Kim, K., Upson, R., Young, W., Melendy, T., Stillman, B., Simmons, D.T., 1993. The DNA-binding domain of simian virus 40 tumor antigen has multiple functions. *J. Virol.* 67 (12), 7608–7611.

- simian virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123. *J. Virol.* 68 (1), 269–275.
- 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.
- Clertant, P., Seif, I., 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 311 (5983), 276–279.
- Cooper, C.S., Upmeyer, S.N., Winokur, P.L., 1998. Identification of single amino acids in the human papillomavirus 11 E2 protein critical for the transactivation or replication functions. *Virology* 241 (2), 312–322.
- Cote-Martin, A., Moody, C., Fradet-Turcotte, A., D'Abramo, C.M., Lehoux, M., Joubert, S., Poirier, G.G., Coulombe, B., Laimins, L.A., Archambault, J., 2008. Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. *J. Virol.* 82 (3), 1271–1283.
- Deb, S., Tsui, S., Koff, A., DeLucia, A.L., Parsons, R., Tegtmeyer, P., 1987. The T-antigen-binding domain of the simian virus 40 core origin of replication. *J. Virol.* 61 (7), 2143–2149.
- de Chasseval, R., de Villartay, J.P., 1992. High level transient gene expression in human lymphoid cells by SV40 large T antigen boost. *Nucleic Acids Res.* 20 (2), 245–250.
- DeLucia, A.L., Lewton, B.A., Tjian, R., Tegtmeyer, P., 1983. Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication. *J. Virol.* 46 (1), 143–150.
- 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.
- Deng, W., Lin, B.Y., Jin, G., Wheeler, C.G., Ma, T., Harper, J.W., Broker, T.R., Chow, L.T., 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J. Virol.* 78 (24), 13954–13965.
- 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.
- Ferguson, M.K., Botchan, M.R., 1996. Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J. Virol.* 70 (7), 4193–4199.
- Fradet-Turcotte, A., Vincent, C., Joubert, S., Bullock, P.A., Archambault, J., 2007. Quantitative analysis of the binding of simian virus 40 large T antigen to DNA. *J. Virol.* 81 (17), 9162–9174.
- Fratini, M.G., Laimins, L.A., 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204 (2), 799–804.
- Gilbert, D.M., Neilson, A., Miyazawa, H., DePamphilis, M.L., Burhans, W.C., 1995. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J. Biol. Chem.* 270 (16), 9597–9606.
- Gorisch, S.M., Sporbert, A., Stear, J.H., Grunewald, I., Nowak, D., Warbrick, E., Leonhardt, H., Cardoso, M.C., 2008. Uncoupling the replication machinery: replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis. *Cell Cycle* 7 (13), 1983–1990.
- Harris, S.F., Botchan, M.R., 1999. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* 284 (5420), 1673–1677.
- Hebner, C.M., Laimins, L.A., 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16 (2), 83–97.
- Hickman, A.B., Dydá, F., 2005. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (1), 77–85.
- 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.
- Hughes, T.A., Cook, P.R., 1996. Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp. Cell Res.* 222 (2), 275–280.
- Jiang, H.Y., Hickey, R.J., Abdel-Aziz, W., Malkas, L.H., 2000. Effects of gemcitabine and araC on *in vitro* DNA synthesis mediated by the human breast cell DNA synthesome. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45 (4), 320–328.
- Johnson, A., O'Donnell, M., 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 283–315.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., Smith, A.E., 1984a. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311 (5981), 33–38.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E., 1984b. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39 (3 Pt. 2), 499–509.
- Katagiri, M., Hayashi, M., Matsuzaki, K., Tanaka, H., Omura, S., 1995. The neuritegenesis inducer lactacystin arrests cell cycle at both G0/G1 and G2 phases in neuro 2a cells. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 48 (4), 344–346.
- Keezer, S.M., Gilbert, D.M., 2002. Sensitivity of the origin decision point to specific inhibitors of cellular signaling and metabolism. *Exp. Cell Res.* 273 (1), 54–64.
- Krek, W., DeCaprio, J.A., 1995. Cell synchronization. *Methods Enzymol.* 254, 114–124.
- Krude, T., 1999. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 247 (1), 148–159.
- Kumar, A., Meinke, G., Reese, D.K., Moine, S., Phelan, P.J., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Bohm, A., Bullock, P.A., 2007. Model for T-antigen-dependent melting of the simian virus 40 core origin based on studies of the interaction of the Beta-hairpin with DNA. *J. Virol.* 81 (9), 4808–4818.
- Lee-Chen, G.J., Woodworth-Gutai, M., 1986. Simian virus 40 DNA replication: functional organization of regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 6 (9), 3086–3093.
- 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.
- Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J.A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., Chen, X.S., 2003. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* 423 (6939), 512–518.
- 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.
- Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., Harper, J.W., 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (2), 382–387.
- Mansky, K.C., Batiza, A., Lambert, P.F., 1997. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J. Virol.* 71 (10), 7600–7608.
- Masai, H., You, Z., Arai, K., 2005. Control of DNA replication: regulation and activation of eukaryotic replicative helicase, MCM. *IUBMB Life* 57 (4–5), 323–335.
- McVey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D.R., Gluzman, Y., Beach, D., 1989a. Phosphorylation of large tumour antigen by cdc2 stimulates SV40 DNA replication. *Nature* 341 (6242), 503–507.
- McVey, D., Strauss, M., Gluzman, Y., 1989b. Properties of the DNA-binding domain of the simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* 9 (12), 5525–5536.
- McVey, D., Ray, S., Gluzman, Y., Berger, L., Wildeman, A.G., Marshak, D.R., Tegtmeyer, P., 1993. cdc2 phosphorylation of threonine 124 activates the origin-unwinding functions of simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 67 (9), 5206–5215.
- McVey, D., Woelker, B., Tegtmeyer, P., 1996. Mechanisms of simian virus 40 T-antigen activation by phosphorylation of threonine 124. *J. Virol.* 70 (6), 3887–3893.
- 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.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., Mazzei, T., 2006. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* 17 (Suppl. 5), v7–v12.
- Moarefi, I.F., Small, D., Gilbert, I., Hopfner, M., Randall, S.K., Schneider, C., Russo, A.A., Ramsperger, U., Arthur, A.K., Stahl, H., et al., 1993. Mutation of the cyclin-dependent kinase phosphorylation site in simian virus 40 (SV40) large T antigen specifically blocks SV40 origin DNA unwinding. *J. Virol.* 67 (8), 4992–5002.
- Mohr, I.J., Stillman, B., Gluzman, Y., 1987. Regulation of SV40 DNA replication by phosphorylation of T antigen. *EMBO J.* 6 (1), 153–160.
- 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.
- 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.
- Munster, P.N., Srethapakdi, M., Moasser, M.M., Rosen, N., 2001. Inhibition of heat shock protein 90 function by ansamycins causes the morphological and functional differentiation of breast cancer cells. *Cancer Res.* 61 (7), 2945–2952.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., 2002. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 7 (6), 523–534.
- Parsons, R., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P., 1990. Three domains in the simian virus 40 core origin orchestrate the binding, melting, and DNA helicase activities of T antigen. *J. Virol.* 64 (2), 509–518.
- Rihs, H.P., Jans, D.A., Fan, H., Peters, R., 1991. The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10 (3), 633–639.
- Sakai, H., Yasugi, T., Benson, J.D., Dowhanick, J.J., Howley, P.M., 1996. Targeted mutagenesis of the human papillomavirus type 16 E2 transactivation domain reveals separable transcriptional activation and DNA replication functions. *J. Virol.* 70 (3), 1602–1611.
- Scheidtmann, K.H., Hardung, M., Echle, B., Walter, G., 1984. DNA-binding activity of simian virus 40 large T antigen correlates with a distinct phosphorylation state. *J. Virol.* 50 (1), 1–12.
- Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rosing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., 2007. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 35 (13), 4301–4312.
- Schneider, J., Fanning, E., 1988. Mutations in the phosphorylation sites of simian virus 40 (SV40) T antigen alter its origin DNA-binding specificity for sites I or II and affect SV40 DNA replication activity. *J. Virol.* 62 (5), 1598–1605.
- Schuck, S., Stenlund, A., 2005. Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J. Virol.* 79 (13), 8661–8664.
- Simmons, D.T., Loeber, G., Tegtmeyer, P., 1990a. Four major sequence elements of simian virus 40 large T antigen coordinate its specific and nonspecific DNA binding. *J. Virol.* 64 (5), 1973–1983.
- Simmons, D.T., Wun-Kim, K., Young, W., 1990b. Identification of simian virus 40 T-antigen residues important for specific and nonspecific binding to DNA and for helicase activity. *J. Virol.* 64 (10), 4858–4865.
- Simmons, D.T., Upson, R., Wun-Kim, K., Young, W., 1993. Biochemical analysis of mutants with changes in the origin-binding domain of simian virus 40 tumor antigen. *J. Virol.* 67 (7), 4227–4236.
- Sporbert, A., Domaing, P., Leonhardt, H., Cardoso, M.C., 2005. PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting Okazaki fragment maturation proteins. *Nucleic Acids Res.* 33 (11), 3521–3528.
- Srethapakdi, M., Liu, F., Tavorath, R., Rosen, N., 2000. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest. *Cancer Res.* 60 (14), 3940–3946.
- Stubenrauch, F., Colbert, A.M., Laimins, L.A., 1998. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J. Virol.* 72 (10), 8115–8123.
- Sullivan, C.S., Pipas, J.M., 2002. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2), 179–202.
- Sun, Y.N., Lu, J.Z., McCance, D.J., 1996. Mapping of HPV-11 E1 binding site and

Annexe 6 - Revue de littérature sur le développement d'agents antiviraux contre le virus du papillome humain

Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses

Cet article a été publié en 2007 dans *Antiviral Therapy*, 12(4):431-51

A6.1 Mise en contexte de l'article

Cette revue de littérature décrit les avancées scientifiques dans le développement de petites molécules inhibitrices capables d'interférer avec la progression du cycle viral. Celle-ci est ajoutée à cette thèse dans le but de compléter les informations décrites dans la section 2.2.4 de l'introduction (Chapitre 1).

A6.2 Contribution des co-auteurs

J'ai fait la revue de littérature et j'ai rédigé cet article de revue de littérature.

D^r Jacques Archambault a été présent pour discuter de la littérature et il a grandement contribué à la rédaction de cet article de revue de littérature.

Review

Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses

Amélie Fradet-Turcotte^{1,2} and Jacques Archambault^{1,2*}

¹Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Infection by human papillomavirus (HPV) is extremely common and associated with the development of benign warts or malignant lesions of the skin and mucosa. Infection by a high-risk (oncogenic) anogenital HPV type, most often through sexual contacts, is the starting point of virtually all cases of cervical cancers and the majority of anal cancers. The same viral types are also increasingly being linked with a subset of head-and-neck and non-melanoma skin cancers. Although prophylactic vaccines are now available to protect against the four types most commonly found in cervical and anal cancers (HPV16 and HPV18) and anogenital warts (HPV6 and HPV11),

these neither protect against all genital HPVs nor are of therapeutic utility for already infected patients. Thus, the need for antiviral agents to treat HPV-associated diseases remains great, but none currently exist. This article reviews the recent progress made towards the development of antiviral agents to treat HPV infections, from target identification and validation to the discovery of lead compounds with therapeutic potential. Emphasis has been placed on novel low-molecular-weight compounds that antagonize HPV proteins or, alternatively, inhibit cellular proteins which have been usurped by papillomaviruses and are mediating their pathogenic effects.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA tumour viruses that infect keratinocytes of the differentiating epithelium of the skin and mucosa. Although most HPV infections remain asymptomatic, some result in the appearance of benign warts or more serious lesions that can progress to invasive cancer. It is now well established that infection by certain HPV types is a necessary event for the development of cervical cancer [1] and many anal cancers [2,3]. These viruses are also increasingly being associated with a subset of head-and-neck [4] and non-melanoma skin cancers [5]. More than 150 HPV types have been identified to date [6,7], each displaying a specific tropism for the epithelium of particular anatomical locations. For example, whereas HPV1 is found in plantar warts [8], HPV16 is found predominantly in the anogenital tract [9]. Approximately 30 HPV types infect the anogenital region. The oncogenic or high-risk types, such as HPV16, HPV18 and HPV31, are found in cancerous lesions and their precursors [10]. The low-risk types, including HPV6 and HPV11, cause benign genital warts (condylomas) or laryngeal papillomatosis [11], a rare but debilitating disease acquired by mother-to-child transmission of the virus during birth. Anogenital

HPV infections are very common [12]. Of the 50 million Pap tests performed annually in the USA, about 3.5 million require some form of follow up and more than 250,000 reveal the presence of a high-grade cancer precursor lesion. Annually, approximately 4,000 US women die of cervical cancer and 10,000 are diagnosed with the disease [13]. Benign genital warts, although not life-threatening, are also very common, being clinically apparent in 1% of the sexually active population. A study by the US Centers for Disease Control and Prevention indicated that HPV is second to HIV in its contribution to the total medical costs associated with treating sexually transmitted diseases [14]. The burden of HPV-associated diseases is far worse in developing countries, where more than 200,000 women die of cervical cancer every year because of a lack of adequate screening programmes [15].

Treatment and prevention of HPV infection

Current therapies for HPV-associated lesions are mostly ablative and cytotoxic in nature (cryotherapy, surgical excision, topical application of cytotoxic agents, etc; [16,17]), although genital warts

can be treated by topical application of the immunomodulator imiquimod [16] or the recently approved Polyphenon®E ointment made of catechins extracted from green tea [18]. As a prophylactic measure, a quadrivalent vaccine based on recombinant virus-like particles from HPV types 6, 11, 16 and 18 (Gardasil, Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) was recently approved in several countries including the USA [19–21]. To date, this vaccine has been shown to be safe and highly effective in preventing the development of pre-cancerous cervical lesions associated with HPV16 and HPV18, and genital warts caused by HPV6 and HPV11 [21]. An analogous bivalent vaccine directed against HPV16 and HPV18 (Cervarix, GlaxoSmithKline, Brentford, Middlesex, UK) was expected to be submitted for US Food and Drug Administration approval in 2007 [22]. However, because immunological cross-reactivity between HPV types is limited, these vaccines will not protect against all anogenital HPV types nor eliminate the need for Pap screening. Nevertheless, because they are effective against the most prevalent low- and high-risk types, they are expected to significantly reduce the disease burden associated with anogenital HPV infections.

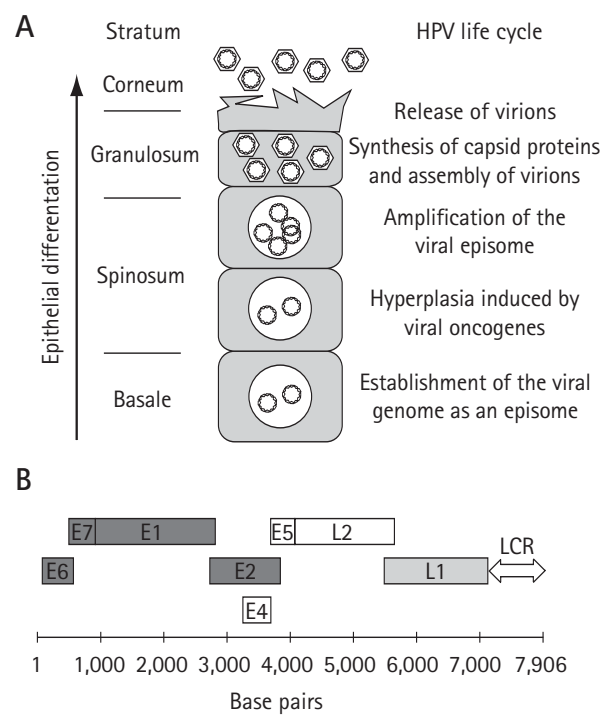
Surprisingly, there is no antiviral drug currently available for the treatment of HPV-associated diseases despite the high incidence of these viruses in the sexually active population (>50% of women [23]) and their well accepted aetiological role in the development of anogenital dysplasia and cancer. This article reviews the recent progress made towards the development of antiviral agents to treat HPV infections, from target identification and validation to the discovery of lead compounds with therapeutic potential. The emphasis has been placed on reports describing the identification of novel, low-molecular-weight (small molecule) compounds that bind and inhibit HPV proteins or, alternatively, that antagonize cellular proteins usurped by papillomaviruses and essential for their pathogenesis.

HPV proteins as candidate antiviral targets

Functions of E1 and E2 in replication of the viral episome

The life cycle of HPV is coupled to the cellular differentiation programme that keratinocytes undergo in the epithelium (Figure 1A). These viruses infect the basal cell layer where they establish their double-stranded DNA genome as a circular extrachromosomal element (episome) in the nucleus of infected cells (reviewed in [24]). Maintenance of the viral genome in 50–100 copies in basal cells is essential to the viral life cycle and its associated pathologies, thus making this process an attractive target for antiviral intervention. The HPV genome, slightly less than 8 kb in length, encodes eight

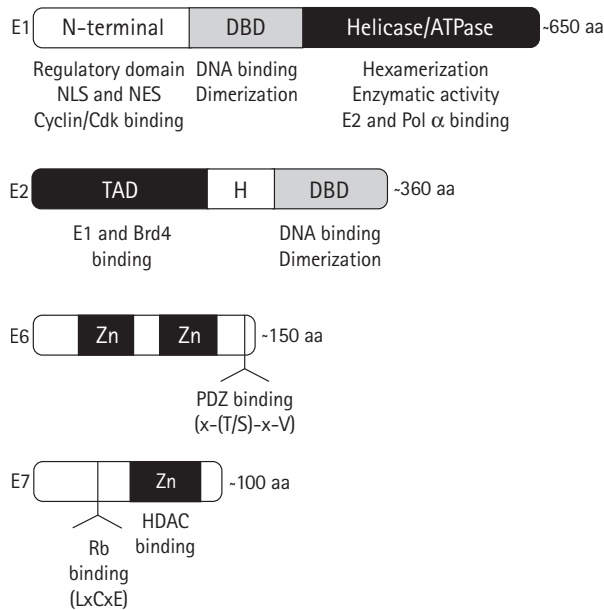
Figure 1. HPV life cycle and structure of the viral genome



(A) Schematic representation of the human papillomavirus (HPV) life cycle within a differentiating epithelium. The different epithelial strata are indicated on the left. The diagram at the centre represents a prototypical infected keratinocyte undergoing terminal differentiation and harbouring viral episomes within its nucleus. Specific viral life cycle events occurring in each stratum are summarized on the right. (B) The genome of HPV16 is diagrammed in linear form. The coding regions of the early and late viral proteins are indicated by open boxes. Proteins that have been validated as potential antiviral targets are dark grey. The L1 protein, which has been shown to be a valid target for a microbicide, is light grey. The long-control region (LCR), which contains the transcriptional enhancer and promoter regions as well as the origin of DNA replication, is indicated by a two-way arrow.

well characterized proteins (Figure 1B). The genome also contains a regulatory locus termed the long control region (LCR) that encompasses the origin of viral DNA replication as well as the promoter and enhancer sequences necessary for transcription of the early and late genes [24]. Efficient maintenance of the papillomavirus episome in infected cells depends on its proper replication during S phase and segregation to daughter cells at mitosis. Replication of the genome is accomplished by the viral E1 and E2 proteins in concert with the cellular DNA replication machinery. E1 is an initiator protein and the only viral protein with enzymatic activities (ATPase and 3'-5' helicase activities; Figure 2) [25]. E2 is a sequence-specific DNA-binding protein that can simultaneously bind to sites in the origin of replication (Figures 2, 3A and 3B) and to the E1 helicase. Through these interactions, E2 promotes the recruitment of E1 specifically at the

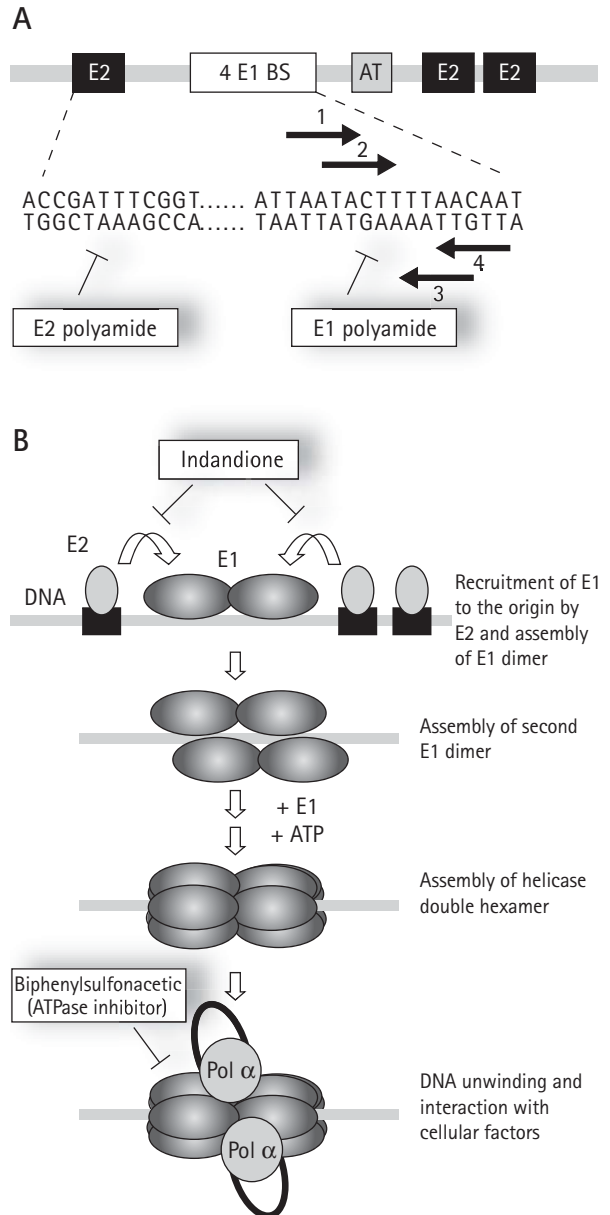
Figure 2. HPV early proteins as antiviral targets



The HPV early proteins E1, E2, E6 and E7 that have been validated as potential antiviral targets are represented by boxes. The locations of specific functional domains discussed in this review are indicated and their activities listed underneath. Because the length of each protein can vary slightly between viral types, an approximate length in amino acids (aa) is indicated at the right of each protein. DBD, DNA-binding domain; H, hinge region; HDAC, histone deacetylase; NES, nuclear export sequence; NLS, nuclear localization sequence; TAD, transactivation domain; Zn, zinc finger.

origin and facilitates its assembly into replication-competent double hexamers needed for bidirectional DNA unwinding (Figure 3B) [26–29]. Assembly of E1 into double hexamers probably proceeds through double dimer and double trimer intermediates [30,31]. During replication, E1 unwinds the DNA ahead of the replication forks and interacts with essential replication factors including the host polymerase α -primase, the single-stranded DNA-binding protein replication protein A and topoisomerase I [32–37]. In addition to being necessary for replication, E2 also has essential roles in regulating transcription of the viral genes and segregation of the episome at mitosis [38,39]. Reverse genetic experiments have shown that E1 and E2 are both essential for maintenance of the viral episome in primary human keratinocyte cultures [40] and for pathogenesis (that is, papilloma induction) in the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) infection model [41]. As a consequence of their essential functions, E1 and E2 are considered attractive targets for the development of antiviral agents. Presumably, E1 and E2 are also required for the amplification of the viral genome to >1,000 copies, which occurs in infected

Figure 3. Initiation of HPV DNA replication and inhibitors thereof



(A) Schematic representation of the minimal origin of viral DNA replication. Binding sites (BS) for E1 and E2 are indicated by white and black boxes, respectively. The location of an essential AT-rich region (AT) is indicated by a grey box. The nucleotide sequence of part of the HPV18 origin is given underneath. The left portion of this sequence contains a representative E2-binding site (ACCGN_ncGGT) and is the target of E2 polyamides. The right portion of the sequence contains the four E1 binding sites, shown by arrows, which are the target of E1 polyamides. (B) Schematic representation of the initiation of papillomavirus DNA replication. DNA replication is initiated by the recruitment of E1, by E2, to the viral origin. This step is blocked by the indandione class of inhibitors which bind to the E2 transactivation domain and prevent its interaction with E1. Assembly of a replication-competent double hexamer proceeds through the initial assembly of two E1 dimers on the two pairs of inverted E1 binding sites present in the origin. Conversion of this tetrameric E1 intermediate to an active double hexameric helicase requires additional E1 molecules as well as ATP to promote their oligomerization. E1 also interacts with host cell replication factors such as the polymerase α -primase (Pol α) to promote viral DNA replication. Biphenylsulfonacetic acid and other E1 ATPase inhibitors abrogate the helicase activity of E1 responsible for unwinding the origin and the DNA ahead of the two replication forks. All inhibitors are indicated in boxes.

cells that reach the upper layers of the epithelium (Figure 1A). Efficient amplification of the genome in organotypic raft cultures is also dependent on the action of E4 and E5 [24]. Although their exact molecular functions in this process remain unclear, it is believed that E4 and E5 promote amplification by modulating the activities of cell cycle regulatory proteins and growth factor receptors, respectively [24]. As for their roles in pathogenesis, reverse genetic experiments in the CRPV infection model have demonstrated that both are dispensable for papilloma induction [42,43], casting some doubts on the validity of inhibiting E4- and E5-mediated amplification of the viral episome as an antiviral strategy. Nevertheless, viral genome amplification is essential for expression of the late genes [44] encoding the capsid proteins L1 and L2, and thus for assembly of infectious virions (Figure 1A). It is therefore conceivable that amplification could be targeted for preventing transmission of the virus.

Role of E2 in transcriptional regulation and segregation of the viral episome

In addition to its role in viral DNA replication, E2 also serves as a transcription factor to regulate expression of the viral genes and as a segregation factor to ensure partitioning of the episome at mitosis [38,39]. E2 comprises two functional domains, an N-terminal transactivation domain (TAD) and a C-terminal DNA-binding/dimerization domain, separated by a hinge region. Both the TAD and DNA-binding domain (DBD) are necessary for E2 to modulate viral DNA replication, transcription and segregation [38,39,45,46]. As a transcription factor E2 can be either an activator or a repressor, depending on the promoter context, but is primarily a repressor of viral transcription initiated in the LCR [47–51]. As a segregation factor, E2 tethers the viral episome to mitotic chromatin [39,52–54], and/or the mitotic spindle [55,56]. The TAD of E2 binds to several cellular transcription factors including the long isoform of the bromodomain-containing protein 4, (Brd4) [57–59]. For some papillomavirus types, interaction with Brd4 was shown to be required for E2's transcriptional and tethering activities [45,57,60–64]. It is currently unclear whether all papillomavirus types rely on Brd4 for segregation of their genomes or whether some are capable of using alternative mechanisms [65–67]. For HPV31, mutations in the E2 TAD that abrogate its binding to Brd4 were shown to have little effect on replication and maintenance of the viral episome in keratinocytes or on its amplification upon cellular differentiation [57,58,68]. By contrast, very similar mutations in CRPV E2 completely abolished the ability of the mutant genome to induce papillomas in the rabbit infection model [69]. This latter finding suggests

that the interaction of E2 with Brd4 is essential for pathogenesis and thus warrants the search for small molecule inhibitors of the E2–Brd4 interaction as potential antiviral agents.

Finally, it is important to realize that inhibiting maintenance of the viral episome in infected cells might be a valuable antiviral strategy for treating lesions such as warts, in which the genome is maintained in episomal form, but not those in which the viral DNA has integrated into the host genome. Integration is detected in a majority of cervical and anal cancers and their high-grade precursors, despite the fact that it is not part of the normal viral life cycle [3,10]. Integration has often occurred in a way that disrupts the E2 open-reading frames, thus contributing to increased expression of the E6 and E7 oncogenes. In these cases, targeting E6 and E7 or the cellular proteins mediating their oncogenicity is clearly the only antiviral approach possible and is discussed below.

Activities of E6 and E7 needed for episomal maintenance and oncogenic transformation

The papillomavirus E6 and E7 proteins are small (<200 amino acids), zinc-finger-containing proteins (Figure 2) that target key cell-cycle-regulatory proteins to maintain infected keratinocytes in a proliferative state (reviewed in [7,24]). During the normal viral life cycle, these proteins act in concert to establish a cellular environment conducive to viral replication (Figure 4). Cell culture studies have shown that expression of E6 and E7 from high-risk HPV types is necessary and sufficient to immortalize primary keratinocytes [70,71], and that this immortalization process is dependent on the ability of E7 to stimulate quiescent cells to re-enter S phase and that of E6 to prevent the cellular growth arrest or apoptotic response brought about by this unscheduled DNA synthesis [24]. E7 from high-risk HPV types stimulates cells to undergo DNA synthesis by binding to Rb family members and promoting their degradation [72] whereas E6 prevents growth arrest and apoptosis by promoting degradation of the p53 tumour suppressor [73]. This capacity of high-risk E6 and E7 to antagonize the p53 and Rb pathways, respectively, is fundamental to their oncogenic properties. Importantly, continuous expression of E6 and E7 is needed for cervical carcinoma cells, such as HPV18-transformed HeLa cells, to maintain their transformed phenotypes [70]. Indeed, it has been shown that downregulation of E6 and E7 expression, by transfection of a functional E2 or by small interfering RNAs, results in restoration of the p53 and Rb pathways and the subsequent induction of cellular senescence [70,74–76]. These findings confirmed that antiviral approaches aimed at treating HPV-induced dysplasia should concentrate on inhibiting the oncogenic properties of E6 and E7 or those of cellular proteins mediating their effects.

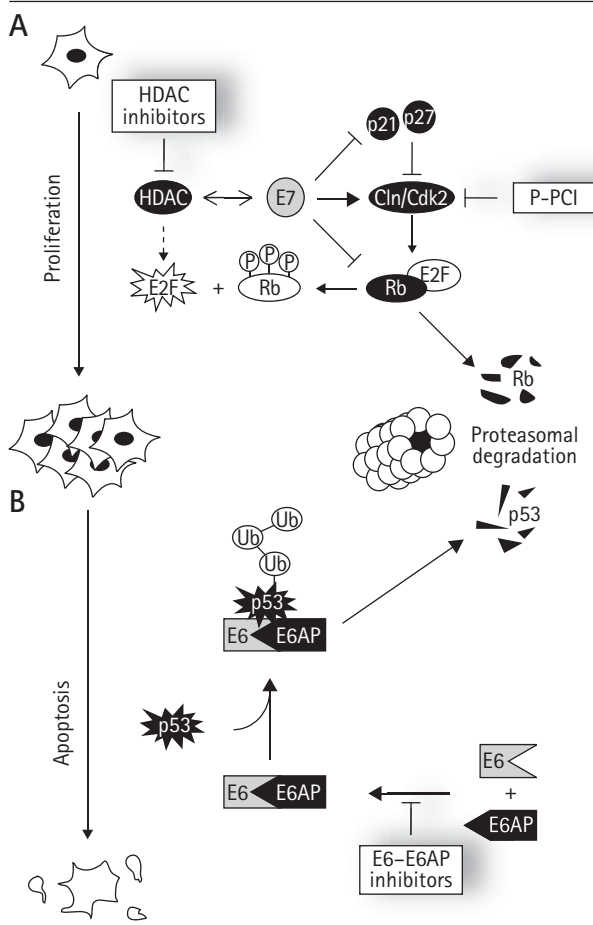
A few studies also investigated whether E6 and E7 are needed for maintenance of the viral episome in infected cells. For E7, two groups investigated whether its ability to bind Rb and related factors is necessary for episomal maintenance by mutating specific residues of the E7 LxCxE Rb-binding motif. One group observed for HPV31 that the mutant genome could still be maintained in primary HFK (human foreskin keratinocyte), albeit at a low copy number, even at early passages when most cells have presumably not begun to senesce [77]. In apparent contrast to

this, the other group observed, for HPV16, that the mutant genome could still be maintained episomally, in this case in the spontaneously immortalized NIKS cell line [78]. Whether this apparent discrepancy is due to a difference in the HPV types used for these studies or the use of primary HFK versus an already immortalized cell line is currently unknown. Regardless of the explanation, both studies did agree that the mutant genomes could not become amplified upon epithelial differentiation, clearly supporting a role for the LxCxE motif in this process. In addition, mutation of the E7 LxCxE motif in the context of the CRPV genome did not abrogate its ability to induce papillomas in rabbits, suggesting that the E7–Rb interaction is not essential for pathogenesis and as would be expected if it were primarily needed for genome amplification in the upper layers of the epithelium [79]. There is ample evidence that E7 has additional functions: it can interact with several cellular proteins other than Rb and its family members [24]. Of relevance to this review is the interaction of E7 from high-risk types with histone deacetylases (HDACs) [77], a class of proteins that has been the subject of intense drug discovery efforts in recent years for different therapeutic indications. In the case of HPV infections, reverse genetic experiments with viral genomes encoding three E7 mutant proteins specifically defective in HDAC binding revealed that the E7–HDACs interaction is necessary for maintenance of the HPV31 episome in primary HFK [77], thus validating it as a potential antiviral target.

As for E6, two of its activities have been intensively studied and inferred by mutational analysis to be valid drug targets; these are its ability to promote the degradation of p53 and its binding to PDZ-domain-containing proteins (reviewed in [73]). Both of these activities are characteristics of the E6 proteins from high-risk HPV types and are not observed for those of the low-risk types. To promote degradation of p53, a key mediator of E7-induced apoptosis, E6 usurps the cellular ubiquitin ligase E6-associated proteins (E6AP) to form a complex that is capable of stimulating the poly-ubiquitination of p53 and its subsequent degradation by the proteasome [73]. Viral genomes harbouring mutations in E6 that reduce binding to E6AP or prevent degradation of p53 by other means are unable to immortalize primary keratinocytes and cannot be maintained in primary HFK [80]. These and other findings reviewed elsewhere [24] suggested that preventing E6-mediated degradation of p53 would be a useful therapeutic approach; a suggestion that has indeed been validated recently with small molecule inhibitors of the E6–E6AP interaction (see below).

E6 from high-risk HPV types also interacts with the PDZ-domain containing proteins hDlg, hScribb, MUPP1

Figure 4. Effects of E7 and E6 on the Rb and p53 pathways and inhibitors thereof



Schematic diagram of how (A) E7 and (B) E6 promote cellular proliferation and inhibit apoptosis, respectively, by targeting the Rb and p53 pathways. The processes of cellular proliferation and apoptosis are indicated by downwards arrows on the left of the figure. E2F and Rb, two major effectors of cellular proliferation and apoptosis, are shown next to these arrows. (A) summarizes the key activities of E7 necessary for unscheduled E2F activation, namely its ability to promote hyperphosphorylation of Rb by inhibiting the cyclin (Cln)-dependent kinase (Cdk)2 inhibitors p21 and p27 and stimulating the activity of Cdk2, to promote the proteasomal degradation of pRb and to associate with histone deacetylases (HDAC). (B) summarizes how E6 of high-risk HPV types promotes the ubiquitination and proteasomal degradation of p53 by associating with the cellular ubiquitin (Ub) ligase E6-associated protein (E6AP). Specific inhibitors of the Rb pathway and of the E6–E6AP protein interaction are indicated in boxes. P-PCI, purine-derived pharmacological Cdk inhibitors.

and MAGI-1 to -3, to promote their proteasomal degradation [81–84]. These cellular proteins act as scaffolds for the assembly of multiprotein complexes at the plasma membrane and/or are involved in regulating various aspects of cell–cell contact and cell growth (hDlg and hScribb) [81,85–88]. Interestingly most of them have been shown to have tumour-suppressor activity in certain cellular contexts or in model organisms [81,86,89]. These proteins interact with E6 through a four amino acid motif, x-(T/S)-x-V (where x is any amino acid), located at its C-terminus. Deletion of this motif was shown to reduce, albeit not completely, maintenance of the HPV31 episome in primary HFK [90] and to abolish the ability of HPV16 E6 to induce epithelial hyperplasia when expressed in the epidermis of transgenic mice from the keratin 14 promoter [91,92]. Collectively, these results suggest that down-regulation of PDZ-domain-containing proteins by E6 underlies part of its oncogenic activity. Interfering with this process may therefore be a valuable approach for the treatment of high-risk HPV infections, although to our knowledge this has not yet been attempted.

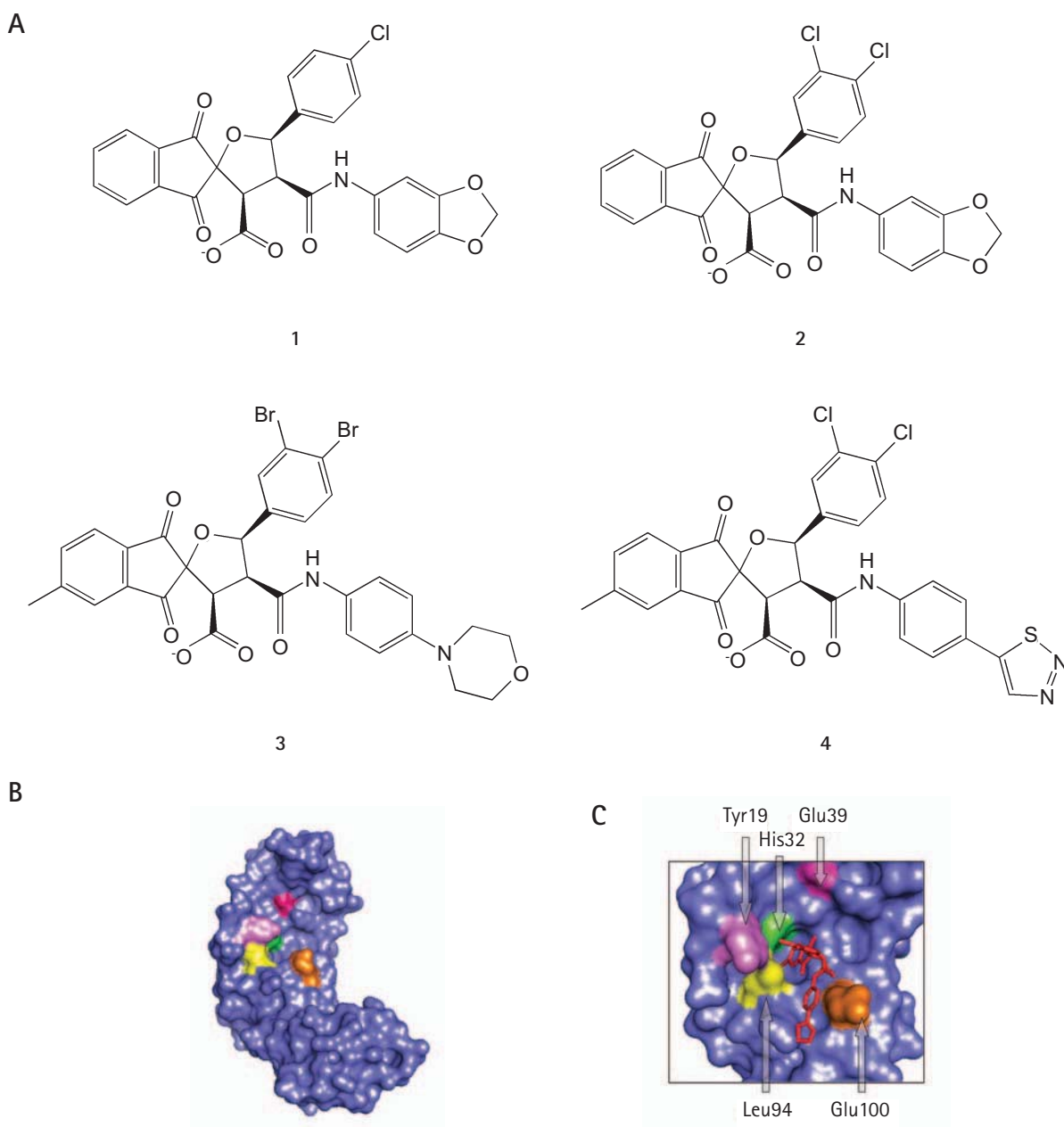
Inhibitors of E1- and E2-dependent viral DNA replication

E1–E2 protein interaction inhibitors

Papillomavirus DNA replication is initiated by the cooperative binding of E1 and E2 to the viral origin of replication (*ori*; Figure 3B). Formation of this ternary complex is an essential step towards the assembly of E1 double hexamers that have unwinding activity and are competent for replication [93,94]. Thus, preventing assembly of the initial E1–E2–*ori* complex represents an attractive antiviral strategy for the treatment of HPV lesions, in which the viral genome is maintained in episomal form, such as condylomas. Assembly of the E1–E2–*ori* complex depends on the interaction of E1 and E2 with DNA and on a critical protein–protein interaction between the TAD of E2 and the C-terminal helicase domain of E1 [27,40,93–98]. A small molecule inhibitor of the E1–E2 protein interaction has been identified by high-throughput screening of the Boehringer Ingelheim compound collection, using a scintillation proximity assay (SPA) that measures the cooperative binding of recombinant HPV11 E1 and E2 to radiolabelled origin DNA [99,100]. Medicinal chemistry efforts [99] led to the synthesis of more active analogues, such as inhibitors 1, 2 and 3 (Figure 5A), that antagonize assembly of the HPV11 E1–E2–*ori* complex with nanomolar potency *in vitro*. Structurally, these compounds comprise an indandione system spirofused onto an appropriately substituted tetrahydrofuran ring

and hence have been termed indandione inhibitors. Structure–activity relationship (SAR) studies highlighted the benefit of the indandione system and of the carboxylate moiety for potency. Mechanistic studies, including the use of isothermal titration calorimetry, showed that the indandione inhibitors bind reversibly to the TAD of E2 with a 1:1 stoichiometry. Crystal structures of both the HPV11 TAD and of a complex between this domain and inhibitor 4 were obtained at 2.5 and 2.4 Å resolution, respectively (Figure 5B and C) [101]. Inhibitor binding did not alter the protein backbone, but caused the movement of several amino acid side chains at the binding site, in particular those of Tyr19, His32, Leu94 and Glu100, the net result being the formation of a deep hydrophobic pocket that surrounds the indandione system of the inhibitor (Figure 5B and 5C). Satisfyingly, the structure also revealed that the carboxylate moiety, shown by SAR to be important for potency, makes hydrogen bonds with amides from the protein backbone. These key features of the crystal structure were validated biochemically, by photo-affinity labelling with a reactive inhibitor analogue and by mutagenesis of several residues lining the inhibitor-binding pocket [102]. Of particular interest was the finding that substitution of Glu100 for alanine resulted in a mutant E2 protein displaying a 10-fold increased binding affinity for the inhibitors, perhaps because the entropic cost associated with the movement of the Glu100 side chain had been removed. Although the indandione inhibitors showed potent activity against the E2 proteins of the two most prevalent low-risk types, HPV6 and HPV11, they were unfortunately inactive against those of the high-risk types HPV16, HPV18 and HPV31 [100]. This lack of inhibition was correlated with variation of specific amino acids in or near the inhibitor-binding pocket, including His32 which is replaced by a tyrosine in the E2 of most high-risk types [101]. A recent crystal structure of the HPV18 E2 TAD in complex with the ATPase domain of E1 has revealed that both proteins interact through a surface area of close to 1,000 Å², which includes the inhibitor-binding pocket [103]. Thus, the indandione inhibitors prevent the E1–E2 interaction by competing directly with E1 for binding to E2, rather than by an allosteric mechanism. The remarkable ability of the indandione inhibitors to antagonize a protein–protein interaction involving a relatively large contact area, a task usually considered unfeasible for a small molecule, provides a further incentive in the hunt for small molecule inhibitors of protein–protein interactions. Significantly, cell culture studies showed that the indandione inhibitors are also capable of antagonizing the E1–E2 interaction from HPV6 and HPV11 *in vivo*, in a two-hybrid-like system, and to inhibit HPV DNA replication in transiently

Figure 5. E1-E2 interaction inhibitors



(A) Structures of the indandione inhibitors 1, 2, 3 and 4, described in the text. These compounds inhibit the assembly of the HPV11 E1-E2-*ori* ternary complex *in vitro* with 50% inhibitory concentrations of 7.8, 0.35, 0.02 and 0.18 μM , respectively. (B) Surface representation of the crystal structure of the HPV11 E2 transactivation domain (TAD; Protein Data Bank accession number: 1R6K). (C) Portion of the crystal structure of the HPV11 E2 TAD in complex with compound 4 (PDB accession number: 1R6N) highlighting how the inhibitor (in red) binds on the surface of E2. In both (B) and (C), key residues of the inhibitor-binding pocket discussed in the text are coloured.

transfected cells with a potency approaching 1 μM for the most potent inhibitor tested, compound 3 [100]. It remains an enigma why the indandione inhibitors have comparable potencies against HPV6

and HPV11 proteins in cell culture given that *in vitro*, in an E1-E2-*ori*-complex-formation assay, they are 10- to 30-fold more active against the HPV11 proteins than those of HPV6. It is conceivable that

cellular proteins that interact with the E2 TAD, such as Brd4 [45], can influence the affinity of the inhibitor for E2 *in vivo*. Regardless of the explanation, the fact that these compounds can inhibit HPV6 and HPV11 genome replication in cells highlights, for the first time, the potential of E2 as a small molecule antiviral target for the treatment of genital warts and recurrent respiratory papillomatosis. It is hoped that the structural information available on the inhibitor-binding pocket will now stimulate the design of more active molecules [101].

E1 and E2 DNA-binding inhibitors

The papillomavirus origin of DNA replication contains specific binding sites for the viral E1 and E2 proteins (Figure 3A). Binding of E2 to its cognate sites is essential for initiation of DNA replication, transcriptional repression of the viral oncogenes and segregation of the episome at mitosis [38,39,104]. As for E1, its specific binding to four sites in the origin, arranged as two pairs of inverted repeats, is needed for its correct assembly into a replication-competent double hexamer [104–108]. As a potential antiviral approach, hindering the binding of E1 or E2 to DNA has been attempted using polyamides (Figure 3B) [109,110]. Initially developed by Dervan and co-workers [111], polyamides are small amide polymers comprising organized *N*-methylpyrrole and *N*-methylimidazole amino acids, which can bind to the minor groove of DNA in a sequence-specific manner. One class of polyamides was designed to inhibit the interaction of E2 with one of its cognate binding sites in the LCR [109]. Although E2 interacts with the major groove of DNA, these minor-groove binding polyamides were shown to prevent the DNA bend that is induced by E2 and needed for stabilizing its association with its target site [109,112,113]. Optimization of this first generation of compounds through the resolution of co-crystal structures of polyamide–DNA and E2–DNA complexes, quantitative DNase I footprinting and electromobility mobility shift assays culminated in the synthesis of an active analogue, PA1, which inhibited the binding of HPV18 E2 to DNA with a K_i of 2 nM in an *in vitro* binding assay [109]. Unfortunately, these compounds had no activity in cell culture assays, as they were unable to reach the nucleus of treated cells but rather accumulated primarily in the cytoplasm, a hurdle that will need to be overcome before these compounds can be developed further. An intriguing question of clinical importance is whether this class of compounds can also affect transcription of the viral oncogenes E6 and E7, in addition to interfering with viral DNA replication. In principle, these LCR-binding compounds could either increase transcription of E6/E7 by preventing E2

from binding to the LCR, or, alternatively, substitute for E2 and bring about repression of E6 and E7 expression. The future development of analogues that can reach the nucleus will be an important step towards addressing this question.

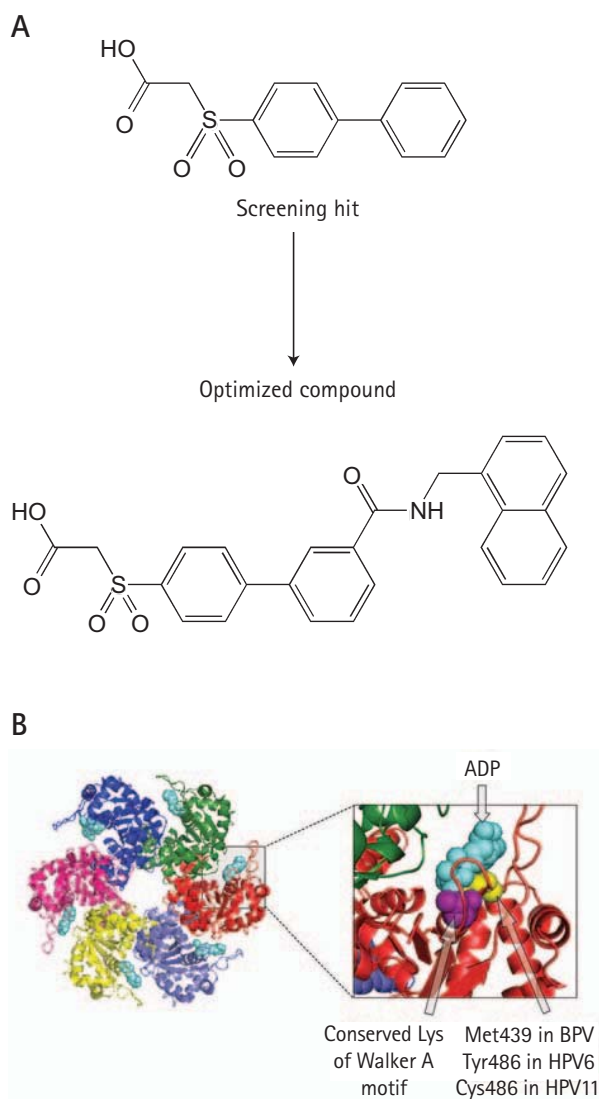
Specific polyamides have also been designed to inhibit the binding of E1 to origin DNA [110]. A brief report has described two specific imidazole–pyrrole polyamides which could significantly reduce the binding of HPV31 E1 to its cognate origin and lead to a more than 90%, dose-dependent loss of HPV31 episomes in cell cultures [110]. On the basis of these encouraging results with HPV31, similar polyamides are being developed against HPV16, the most prevalent type found in cervical cancers.

E1 ATPase and helicase inhibitors

E1 is one of the most conserved proteins among papillomaviruses and the only one with enzymatic activity [114,115]. This, coupled with the fact that viral DNA replication is absolutely dependent on E1, has contributed to making this protein an attractive target for the development of antiviral agents. During viral genome replication, E1 acts first as a DNA-binding protein to recognize the viral origin and subsequently as a helicase to unwind the DNA ahead of the replication fork [25,114,115]. The helicase activity of E1 is probably powered by ATP hydrolysis *in vivo*, although the enzyme can efficiently hydrolyse other nucleotides *in vitro* [116]. The helicase and ATPase activities of E1 are dependent on its assembly into hexamers and double hexamers and is encoded within its C-terminal half (Figure 2) [117–123]. The remaining portion of E1 contains the origin DNA-binding domain (DBD), located in the centre of the protein, and an N-terminal domain containing nuclear import and export sequences as well as phosphorylation sites for several regulatory kinases, including Cyclin A/E–Cdk2 (Figure 2). As expected from a domain with regulatory function, this N-terminal region is essential for E1 to support viral DNA replication *in vivo* but not *in vitro* [124].

Small molecule inhibitors of HPV6 E1 have been identified by high-throughput screening of the Boehringer Ingelheim compound collection using an ATPase assay based on a novel scintillation proximity detection methodology [125]. Structurally, this class of compounds is characterized by the presence of a biphenyl group substituted with a sulphonacetic acid moiety (Figure 6A) [126]. Early SAR studies showed that both the biphenyl and sulphonacetic acid pharmacophores were important for potency and hence both groups were subjected to chemical modification for optimization. Of particular interest was the discovery that addition of a 3'-carboxamide group on the

Figure 6. E1 ATPase inhibitors



(A) Structures of the initial biphenylsulphonacetic acid inhibitor (screening hit) and of the most potent optimized compound. These compounds inhibit the ATPase activity of human papillomavirus 6 (HPV6) E1 *in vitro* with 50% inhibitory concentrations of 2 mM and 4 nM, respectively. (B) Side view of the crystal structure of the hexameric C-terminal helicase domain of bovine papillomavirus (BPV1) E1 bound to ADP (light blue; PDB accession number 2GXA). The monomers are differentially coloured. The right side of the panel shows an enlarged view of the ATP-binding pocket. The conserved lysine of the Walker A motif is coloured purple. The amino acid shown to be important for the binding of the biphenylsulphonic acid inhibitors is coloured yellow.

biphenyl moiety significantly improved potency, yielding compounds capable of inhibiting the ATPase activity of HPV6 E1 with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 4 nM (optimized molecule, Figure 6) [126]. Studies on the mode of action of these compounds revealed that they act through a hyperbolic competitive mechanism, suggesting that they do not directly compete with ATP at the enzyme active site but

rather affect substrate binding by allosteric means [127]. As anticipated, these inhibitors could also inhibit the helicase activity of HPV6 E1 *in vitro*. Surprisingly, they were 2- to 10-fold less potent against the ATPase activity of HPV11 E1 than against that of HPV6, despite the high degree of sequence similarity between both enzymes. Taking advantage of this high level of conservation, chimeric proteins of HPV6 and HPV11 E1 were constructed to narrow down a region important for inhibitor activity. These studies led to the identification of Tyr486 in HPV6 E1 as being critical for inhibitor potency. In HPV11 E1, a cysteine residue is found at this position. Satisfyingly, substitution of this cysteine by a tyrosine in HPV11 E1 dramatically increased its sensitivity to biphenylsulphonacetic acid inhibitors without affecting its basic kinetic parameters, thereby highlighting the requirement for a tyrosine at this position for inhibitor binding [127]. In the crystal structure of the helicase domain of HPV18 and bovine papillomavirus (BPV) E1, Tyr486 (Tyr492 in HPV18 E1 and Met439 in BPVE1) is located close to the conserved lysine of the Walker A motif, which binds the triphosphate tail of ATP (Figure 6B) [103]. It was speculated that interaction of the inhibitor with Tyr486 might indirectly reduce binding of ATP at the active site, a mechanism that would account for the allosteric mode of action of these inhibitors. Interestingly, this class of inhibitors was also found to be active against the E1 protein of a high-risk virus, HPV18, albeit at a reduced potency. Notwithstanding these encouraging characteristics, the biphenylsulphonacetic acid inhibitors do have some undesired properties that will need to be addressed before their full potential can be realized. In particular, the stability of the sulphonylacetic moiety, which has a propensity to undergo decarboxylation in some conditions, needs to be increased. Perhaps of even greater importance is the fact that the current most potent compounds are not active in a cell-based assay of HPV DNA replication [126], activity being an obvious prerequisite for further development of these molecules. Given that the activity of these compounds varies as a function of the ATP concentration, which can be relatively high *in vivo*, achieving cellular activity will most certainly require the synthesis of more potent compounds. This task would benefit from structural studies aimed at identifying the precise inhibitor-binding pocket on E1 and how it relates to Tyr486. At this stage, the biphenylsulphonacetic acid inhibitors should be viewed as an interesting starting point for further medicinal chemistry efforts as they have proven the concept that the E1 ATPase activity of low- and high-risk HPV types E1 is open to inhibition by small molecules.

Inhibitors of the ATPase activity of HPV11 E1 have also been disclosed in a patent from Roche [128]. It is

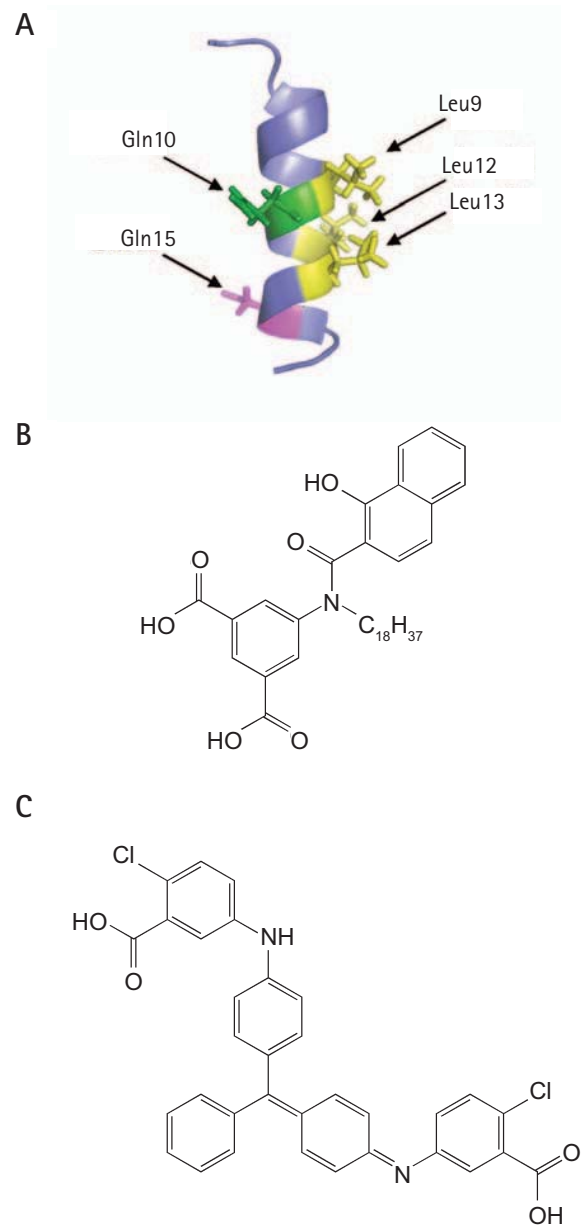
currently difficult to assess the true potential of these benzodiazepine derivatives as their activity against E1 either *in vitro* or in cell-based assays of HPV DNA replication has not been reported.

Inhibitors of E6-mediated p53 degradation

As mentioned above, one of the primary functions of high-risk E6 is to induce the degradation of the tumour-suppressor protein p53 as a means of preventing the growth arrest and/or apoptosis triggered by E7-induced, unscheduled DNA synthesis. To do so, E6 associates with the cellular E3 ubiquitin ligase E6AP to form a complex capable of binding p53 and promoting its ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome (Figure 4; reviewed in [73]). From a therapeutic standpoint, it is expected that blocking the association of E6 with E6AP in high-risk HPV-infected cells will lead to an increase in p53 levels and trigger cell-cycle arrest or apoptosis in response to E7. Efforts to develop small molecule inhibitors of the E6–E6AP interaction have benefited from the knowledge that E6 interacts with E6AP, as well as other host cell proteins including E6BP and paxilin, through a short sequence motif present in these target proteins [129]. Sequence comparison led to the identification of the following consensus binding motif, Lxx ϕ Lsh, where xx is a dipeptide in which one of the residues is an aspartate, glutamate, asparagine or glutamine, ϕ is a hydrophobic residue, s is a small amino acid (alanine or glycine), and h is usually an aspartate, asparagine, glutamate or glutamine [130]. Mutagenesis of this motif revealed the critical importance of the three leucine residues (where ϕ is leucine) for E6 binding [129]. In addition, two charged residues are highly conserved amongst E6-interacting proteins that might be important for binding as they could potentially make hydrogen bonds with residues on E6. These features led to the suggestion that E6AP and other Lxx ϕ Lsh-containing proteins interact with E6 through a ‘charge leucine’ binding motif [129,130]. To date no precise binding interface has been mapped on E6 but mutagenesis experiments have indicated that both zinc fingers are required for interaction with E6AP. On that basis, it has been suggested that the binding pocket for E6AP on E6 lies, at least in part, at the junction of both metal-binding domains [130]. Significantly, an 18-residue peptide encompassing the Lxx ϕ Lsh motif of E6AP was found to inhibit the binding of full-length E6AP to HPV16 E6 with an IC_{50} of 10 μ M *in vitro*, raising the possibility that a peptidomimetic approach might be feasible [131,132]. Unfortunately, more potent derivatives of this peptide have proven difficult to obtain [132]. Subsequent efforts were therefore focused on understanding the chemical nature of the E6–E6AP peptide interface. First, the structure of the E6-binding

peptide lead was obtained by NMR [132]. This structure revealed that this peptide folds as an α -helix, with the three leucine residues (Leu9, Leu12 and Leu13) and the two negatively charged residues (Gln10 and Glu15) implicated in E6 binding being on opposite faces of the helix (Figure 7A) [129]. This solved structure, coupled with extensive mutagenesis of the E6AP peptide,

Figure 7. E6–E6AP interaction inhibitors



(A) NMR structure of the E6-associated protein (E6AP; PDB accession number: IEQX). The positions of the three leucine residues important for binding to E6 as well as those of the two conserved charged residues are indicated by arrows. (B) Structure of the most potent E6–E6AP inhibitor (IC_{50} of ~ 17 μ M *in vitro*). (C) Structure of the E6–E6AP inhibitor active in a cell-based p53-degradation assay. This compound leads to a more than 4-fold increase in the levels of p53 when used at a concentration of 500 μ M.

allowed for a pharmacophore model to be created that was comprised of three hydrophobic centres representing the leucine residues, two hydrophilic centres representing the charged residues and an exclusion sphere accounting for the need for a small glycine residue at position 14 of the E6AP peptide [129]. This model was used for *in silico* screening of the National Cancer Institute (NCI) and Sigma-Aldrich chemical collections in order to identify small molecules that would fit these attributes and thus could possibly bind to E6 [130]. The most interesting virtual hits were then obtained and their potency assessed in an *in vitro* E6–E6AP binding assay as well as in *in vitro* and *in vivo* p53-degradation assays [130]. Five unrelated compounds were identified that showed significant activity *in vitro*. These compounds appeared to be specific as they were inactive in a counter assay based on the binding of HPV16 E7 to p107 [130]. Of these five compounds, two are of particular interest for differing reasons. One, shown in Figure 7B, is attractive because it is the most potent inhibitor identified *in vitro* (IC₅₀ of ~17 μM in an E6–E6AP binding assay) and it conforms to Lipinski's five rules of drug likeliness [130,133]. The other (Figure 7C), despite being less potent *in vitro*, is interesting because it showed activity *in vivo*, in a cell-based p53-degradation assay. Specifically, it led to an approximately fourfold increase in the levels of p53 when used at a concentration of 500 μM [130]. These encouraging findings prove the concept that E6-mediated p53 degradation can be inhibited by small molecules. Further optimization of these inhibitors would greatly benefit from structural studies aimed at understanding how these compounds bind to E6. The availability of one or more E6–inhibitor complex structures would not only help validating the pharmacophore model but also permit visualization of the inhibitor-binding pocket and pinpoint the surface of E6 involved in interacting with LxxϕLsh-motif-containing proteins. The recently reported structure of free E6 is one important step in this direction [134].

Inhibitors of cellular proteins targeted by HPV gene products

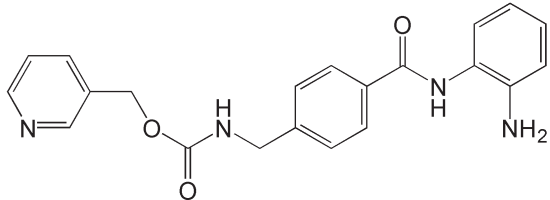
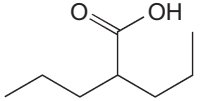
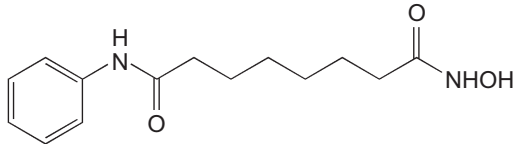
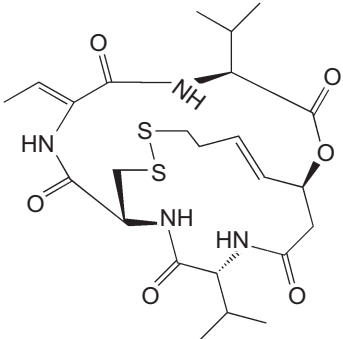
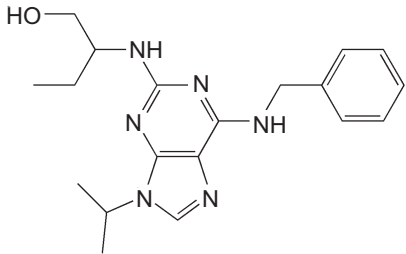
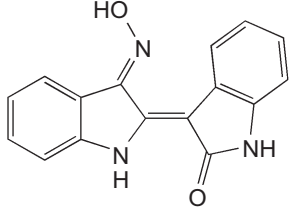
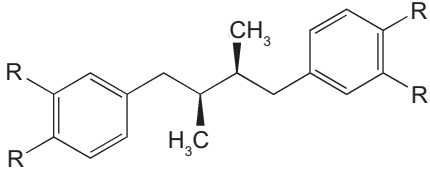
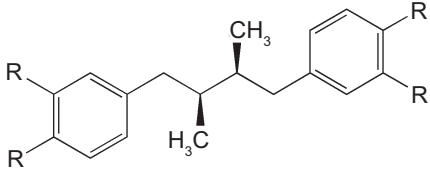
HDAC inhibitors

The HPV E7 oncogene induces hyperproliferation of infected cells primarily by abrogating the functions of Rb and its family members p107 and p130, thereby causing an uncontrolled activation of E2F transcription factors and a concomitant increase in the transcription of proliferation-associated genes [24,135]. The hyperproliferative and immortalizing functions of E7 have also been linked to its capacity to associate with class I histone deacetylases (HDAC1 and HDAC2) (Figure 4

[77]. E7 binds indirectly to HDAC through Mi2β, a member of the nucleosome remodeling and histone deacetylation complex (NURD) [77,136,137]. This specific E7–Mi2β–HDAC interaction is mediated by the C-terminal zinc-binding domain of E7 and has been shown to be essential for several processes including the long-term maintenance of the viral episome in infected/transfected cells and extension of the cellular life span of undifferentiated keratinocytes [77]. Binding to HDAC is essential for E7 to modulate the transcription of E2F2 [77,136] and the immunomodulatory protein interferon regulatory factor (IRF)-1 [138]. HDACs generally inhibit gene transcription by decreasing the acetylation state of histones. To modulate the transcription of its target genes, E7 may therefore either sequester HDAC away from the promoter of E2F2 genes or recruit HDAC to the promoters of IRF-1 target genes such as IFN-β. Specific HDAC inhibitors could therefore be used to interfere with different cellular processes involved in HPV pathogenesis. HDAC inhibitors were originally found to induce the differentiation and/or growth arrest and apoptosis of various cancer cell lines (colon, prostate and ovarian) [139]. These inhibitors were also found to hinder the growth of HPV-immortalized cells by a number of mechanisms. These include restoring Cdk2 inhibitory function by increasing the transactivation of the p21 and p27 Cdk inhibitors (CDKI) [140,141] and restoring IRF-1 functions in immune responses [138]. More recently, HDAC inhibitors have also been found to induce apoptosis through an Rb–E2F–p73-mediated but p53-independent pathway [142].

Up to now, HDAC inhibitors have been grouped into five distinct classes on the basis of their chemical structure [143–145]. As listed in Table 1, these include short-chain fatty acids [146], hydroxamic acids [147–149], benzamide derivatives [150], epoxyketones and cyclic peptides [151] and hybrid molecules thereof [146,152]. Most of these compounds inhibit HDAC from both classes I and II to various degrees and with little specificity, by binding to their Zn-binding catalytic domain [146,152–154]. However, most are inactive against the class III enzymes which use nicotinamide adenine dinucleotide rather than zinc for catalysis [152]. Cell culture studies with some of these inhibitors demonstrated that butyrate (a short chain fatty acid) and trichostatin-A (a hydroxamic acid) can halt proliferation of cervical cancer cells [140,141] and that valproic acid reduces by 50% the growth of cervical and head-and-neck cancer cell lines at a concentration of 1 mM [155]. Phase I or II clinical trials with some HDAC inhibitors have now been initiated including some with valproic acid, which is already used clinically as an anticonvulsive drug [146,156]. Thus far, a Phase I clinical study has shown

Table 1. Inhibitors of cellular proteins mediating HPV pathogenesis

Target	Compound	Structure	Potency, IC ₅₀	Reference
HDAC	Benzamides		5 μM	[150]
	Short-chain fatty acids		0.4 mM*	[146]
	Hydroxamic acids		0.28 μM*	[147–149]
	Cyclic peptides and epoxyketones		<5 nM	[151]
Cdk2	Roscovitine		0.7 μM*	[169,170]
	Indirubin-3-oxime		0.25–0.44 μM*	[169,171]
Sp1	Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid (M4N) (R=OCH ₃)		28 μM*	[182,186]
	Tetraacetyl nordihydroguaiaretic acid (R=O(C=O)CH ₃)		11 μM	[182]

For each class of inhibitors, only a single representative molecule is presented along with its structure and reported potency. For histone deacetylase (HDAC) inhibitors, the representative molecules of each chemical class are: benzanamide (MS-275), short-chain fatty acid (valproic acid), hydroxamic acid (suberoylanilide [SAHA]) and cyclic peptides (depsipeptide). The indicated potencies of these HDAC inhibitors are those measured with *in vitro* histone deacetylation assays. Potencies of the Cdk2 inhibitors are those reported using *in vitro* kinase assays. Potencies of the Sp1 inhibitors are those measured in reporter gene (luciferase) cell-based assays. *Molecules that have been tested on human papillomavirus (HPV)-infected cells or cervical cancer tissues.

that oral administration of magnesium valproate reduced the tumour-associated deacetylase (HDAC) activity in 8 of 12 cervical cancer patients treated [157]. Derivatives of valproic acid that are 10 times more potent *in vitro* have now been identified but, unfortunately, these have not even been tested yet on HPV-containing cells [146]. In recent years, it has become evident that HDAC I and II affect many different cellular pathways, a fact that probably underlies the pleiotropic effects of current HDAC inhibitors [145]. In the future, it may become desirable to identify inhibitors that are selective for HDAC I over HDAC II or vice versa, to achieve a more targeted therapeutic effect. Although the biology clearly supports a role for HDAC in mediating the pathogenesis of HPV, it remains an open question as to whether and how HDAC inhibitors will be used for the treatment of HPV infections and HPV-induced cancers. It may be worthwhile to start addressing this question in animal models of HPV oncogenesis.

Cdk2 inhibitors

Cdk2, in association with cyclin A or E, is an essential kinase for cellular proliferation, in particular for promoting the G1/S phase transition of the cell cycle. Cdk2 has therefore been considered an interesting target for the development of anti-proliferative drugs particularly in the area of oncology. The proliferation of HPV-immortalized cells, like that of most cancer cells, relies on Cdk2 activity. Two viral proteins, E7 and E1, have been shown to target Cdk2 to promote viral replication in infected cells. E7 increases Cdk2 activity by several mechanisms. It binds directly to cyclin E/A–Cdk2 to stimulate its activity [158]. It also upregulates Cdk2 indirectly by promoting the degradation of Rb and related family members, by inactivating the CDKIs p21 and p27 through direct protein–protein interactions and by increasing the expression of cyclin E and A through E2F transcription factor modulation (reviewed in [24]). These concerted actions on Cdk2 activity promote cellular proliferation and probably also underlie the ability of E7 to induce genomic instability by affecting centrosome copy numbers [159]. Indeed, centrosome abnormalities can be rapidly induced by E7 in transfected cells through a mechanism dependent on Cdk2 activity [160,161] and have also been observed in organotypic raft cultures of HPV-immortalized cells [161,162].

Cdk2 is also essential for the viral E1 helicase to support viral DNA replication [163,164]. E1 binds directly to cyclin A/E–Cdk2 though a cyclin-binding motif located in its N-terminal domain [164,165]. Phosphorylation of E1 by Cdk2 is essential for viral DNA replication, in part for E1 to accumulate in the nucleus. Indeed, recent studies have demonstrated that E1 shuttles

in and out of the nucleus and that its phosphorylation at specific Cdk2 sites abrogates its nuclear export, thereby promoting its nuclear accumulation [166,167].

The findings presented above provide a good rationale for using small molecule Cdk2 inhibitors for the treatment of HPV infections and associated cancers [168,169]. In fact, roscovine, a Cdk2 inhibitor, has already been shown to delay proliferation of cervical carcinoma cells [170] and to inhibit the ability of E7 to cause centrosome abnormalities (see below). To date, two low-molecular-weight compounds belonging to the purine-derived pharmacological Cdk inhibitors family (P-PCI), indirubin-3'-oxime (IO) and roscovitine (Table 1), have demonstrated high potency against Cdk2. These small molecules inhibit the kinase activity of the enzyme by binding directly at its ATP-binding site [169]. IO has been shown to be a potent antagonist of several Cdks but especially of cyclin A–Cdk2 and cyclin E–Cdk2, which it can inhibit with an IC_{50} as low as 0.25 μ M and 0.44 μ M, respectively [169,171]. Moreover, IO has been reported to selectively inhibit HPV16 E7-induced centrosome abnormalities in human U2OS osteosarcoma and hTERT-immortalized human oral keratinocyte cell lines at a concentration of 0.1 μ M [172]. Roscovitine, a less potent inhibitor of cyclin A/E–Cdk2 (IC_{50} of 0.7 μ M), has also been found to block the proliferation of HPV16 E7-expressing cells and restore a normal number of centrosomes [169]. Interestingly, this inhibitor was also shown to be active in human cervical cancer tissues from different donors *in vitro*, where it leads to an average 61% reduction of DNA synthesis at a concentration of 100 μ M [170]. The activity of more potent Cdk2 inhibitors such as flavopiridol has not yet been determined against HPV-infected cells [168]. Unfortunately, current Cdk2 inhibitors lack specificity and inhibit other cellular kinases including extracellular signal-regulated kinase (erk), protein kinase A (PKA) and casein kinase II (CKII), albeit at lower potencies (>5 μ M) [169,173]. Further development of Cdk2 inhibitors will therefore need to address their relatively broad spectrum of activity against other kinases, either through the synthesis of more specific inhibitors or by demonstrating that this lack of specificity has no detrimental clinical consequences. In any case, because HPV-associated lesions appear to be particularly reliant on Cdk2 activity for proliferation and malignant progression, they should be prime candidates for treatment with effective and safe Cdk2 inhibitors.

Artemisinin

Dihydroartemisinin (DHA), the major metabolite of the antimalarial drug artemisin, was reported to be preferentially cytotoxic to HPV-containing cervical carcinoma cells, such as those from the HeLa cell line

(IC₅₀ of 7.5 μM), as well as to ectocervical cells transduced with both E6 and E7 [174,175]. Artemisinin, a natural product from the Chinese herb *Artemisia annua*, reacts with ferrous ions to generate reactive oxygen species capable of inducing apoptotic cell death [176,177]. Accordingly, iron was shown to be required for the cytotoxicity of DHA towards HPV-containing cells [175]. Moreover, cervical carcinoma cell lines and E6/E7-transduced ectocervical cells were found to express approximately twofold higher levels of the transferrin receptor, which for HeLa cells was associated with an increase in intracellular iron content [175]. Additional mechanistic studies indicated that DHA triggers apoptosis of carcinoma cells via the mitochondrial pathway in a p53- and E6/E7-independent manner. Remarkably, when tested topically in the canine papillomavirus infection model, DHA prevented papilloma formation in two out of three infected dogs and accelerated tumour regression in the third animal [175]. Furthermore, all three animals developed antibodies against L1, suggesting that DHA did not prevent infection or viral replication but rather inhibited tumour growth. These promising findings warrant the clinical evaluation of artemisinin and its derivatives for the treatment of HPV-induced lesions.

Sp1 inhibitors

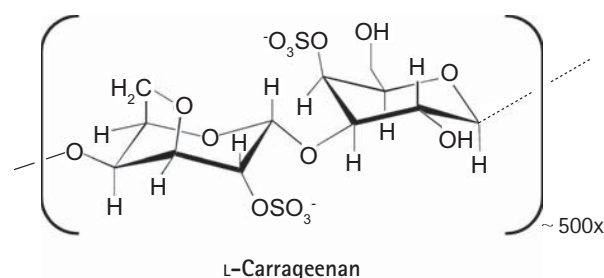
Transcription of the HPV genome is regulated by several cellular transcription factors, including Sp1, NFI-C, junB, transcription elongation factor 1 and AP1, which bind to specific sites in the viral LCR [178,179]. Among these, Sp1 is one of the best characterized [179,180]. Besides being involved in transcription of many cellular genes [181], Sp1 activates transcription of the viral E6 and E7 oncogenes by binding upstream of the early promoter p97 [182–184]. The presence of an Sp1 binding site in the viral LCR is a highly conserved feature of low- and high-risk HPV types [185]. These findings provided the rationale for inhibition of Sp1 as a potential therapy for the treatment of HPV-associated cancers. The natural product nordihydroguaiaretic acid (NDGA), isolated from the creosote bush *Larrea tridentata*, and its derivatives have been found to inhibit Sp1-mediated transcription by preventing binding of Sp1 to DNA [182]. In luciferase reporter gene assays, the two potent NDGA derivatives, tetra-O-methyl NDGA (M₄N) and tetraacetyl NDGA (Table 1), have been shown to reduce Sp1-activated transcription from the HPV16 p97 at IC₅₀s of 28 and 11 μM, respectively [182]. M₄N was also shown to inhibit the growth of the C33A (HPV-negative) and C3 (HPV-16/Ras-transformed) cervical carcinoma cell lines, albeit after 3 days of incubation with 50 μM of inhibitor [186]. In animal studies, daily intratumoral injection of 20 mg of M₄N

led to reduction in the size of C3-induced tumours in mice after 2 weeks of treatment [186]. In addition to their direct effect on the HPV promoter, Sp1 inhibitors also promote apoptosis by downregulating expression of the Cdc2 kinase and survivin genes [187] at concentrations that apparently do not affect Sp1-modulated housekeeping genes [188]. Despite these interesting observations, the fact that Sp1 is involved in the transcription of many cellular genes raises important questions about the safety of these inhibitors. The demonstration that this class of inhibitors can provide therapeutic benefit at doses that do not compromise their safety profile has yet to be achieved.

Carrageenan: an attachment inhibitor and potential microbicide

All of the inhibitors described above are aimed at treating HPV-induced lesions by targeting viral and cellular proteins required for pathogenesis after infection. A complementary approach is to prevent HPV infections through the use of microbicides. The recent development of methods to produce pseudoviruses (PSVs) has greatly facilitated the study of how papillomaviruses attach to and enter keratinocytes, and has opened the door for the identification of inhibitors of these processes as candidate microbiocidal compounds. Using a high-throughput screening assay based on the PSV-induced delivery of a fluorescent protein into HeLa cells, Buck *et al.* (2006) recently identified carrageenan as a potent HPV cellular attachment inhibitor [189]. Carrageenan is a sulphated polysaccharide (Figure 8) extracted from seaweed (red algae) that is closely related to heparin, a known inhibitor of HPV cell entry [190,191]. Although structurally related, carrageenan is 1,000-fold more potent than heparin and both are believed to exert their inhibitory effect by mimicking heparin sulphate, an attachment factor for HPV virions on the cell surface [191]. Like heparin, carrageenan was

Figure 8. Structure of carrageenan



Carrageenan is a polymer of the indicated structure. The average number of repeated units is ~ 500 [189, 192].

shown to bind specifically to the L1 capsid protein. Accordingly, order-of-addition studies showed that carrageenan acts primarily by inhibiting attachment of PSV to the cell surface although it did also show a post-attachment, heparin-sulphate-independent inhibitory activity at higher doses [189]. To date, carrageenan has showed high activity against PSV from anogenital HPV types 16, 18, 31, 45 and 6, a 100-fold lower potency against those from BPV and CRPV, and, somewhat surprisingly, no activity against HPV5 [189]. In *in vitro*-focal transformation-based assays, carrageenan inhibited native BPV1 virions at an IC_{50} varying between 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$, consistent with its activity against BPV1 PSV [189]. Importantly, these inhibitors remained highly active at the lower pH of 4.5, characteristic of the human vaginal region [189]. What makes carrageenan an especially attractive potential microbicide is the fact that it has already proven to be safe. In fact, it is currently widely used as a thickener in the food and cosmetic industries as well as in some sexual lubricants. Therefore clinical trials could, in principle, be initiated relatively soon to evaluate the efficacy of carrageenan as a topical microbicide for the prevention of anogenital HPV infections.

Conclusions

There are currently no antiviral agents to treat HPV-associated diseases despite the fact that infections by these viruses are extremely common, are the cause of a significant proportion of dermatological and oncological disorders, and are directly responsible for more than 200,000 deaths annually due to cervical cancer [15]. HPV has been considered a difficult virus to tackle by antiviral therapy, in part because the pharmaceutical industry has historically preferred enzymes as antiviral drug targets and HPV encodes only a single enzyme, the E1 helicase. Fortunately, this situation has begun to change in recent years as our greater understanding of the molecular biology of these viruses has permitted the discovery of new potential antiviral targets and approaches. Among the HPV early proteins, E1, E2, E6 and E7 have now been validated through mutations as being essential for pathogenesis and hence are considered the most attractive targets against which to develop drugs. It is exciting that small molecules that can inhibit specific functions of these early proteins are now emerging. Maintenance of the viral episome in infected cells can now be antagonized with indandione, polyamides and biphenylsulphonacetic inhibitors that respectively inhibit the E1–E2 protein interaction, the binding of E1 and E2 to origin DNA and the ATPase and helicase activities of E1. In addition to being the foundations for drug discovery programmes, these inhibitors

have proven that hindering viral DNA replication by pharmacological means is feasible. Because these compounds and their targets are relevant to infections in which the viral genome is maintained in episomal form, rather than integrated, they represent attractive entry points for the development of drugs to treat anogenital and cutaneous warts, and perhaps even low-grade squamous intraepithelial lesions in which the viral DNA is most often found not integrated. Clearly, once integration has occurred, E6 and E7 are the prime targets for therapeutic intervention. Our enhanced understanding of how E6 from high-risk HPV types targets p53 for degradation has permitted the design of E6–E6AP interaction inhibitors and established that restoration of p53 levels in HPV-infected cells can be achieved with small molecules. Although the discoveries of these E1, E2 and E6 inhibitors are exciting, they need to be viewed with caution as none of these compounds have yet all of the attributes of a real drug. In fact, for most of these inhibitors, potency and drug-like properties still need to be improved to reach nanomolar levels of activity in cellular assays prior to further development.

An important issue is whether development of a pan-HPV antiviral is possible. As can be appreciated from this review, compounds that are active against one HPV type are often less active or inactive against others, sometimes because of a single amino acid difference in the target protein. Although HPV proteins are highly conserved structurally between types, they are not as similar at the primary amino acid sequence level, a fact that may well prevent the development of pan-HPV antivirals. Thus, treatment of HPV-associated diseases might require the development of several classes of drugs that would each target a subset of types associated with a given medical indication. One potential way circumvent this type-specificity issue would be to develop inhibitors of cellular proteins that mediate the pathogenesis of most, if not all, HPV types. Examples of this approach are the HDAC and Cdk inhibitors, which were found to be effective at inhibiting the ability of E7 to promote cellular immortalization and induce centrosomal abnormalities, respectively. Obviously a major hurdle in using these inhibitors is that they will also affect normal cell functions, and thus might be more likely to exhibit mechanism-based toxicity. If so, topical application rather than systemic administration of these drugs might partly alleviate these undesirable effects.

However, it is important to realize that none of the liabilities associated with current inhibitors of the HPV early proteins or of cellular factors mediating their pathogenic effects are insurmountable and, in fact, they are typical concerns for most drug discovery programmes. Thus we can be cautiously optimistic that

some of these compounds will be further developed and that we may witness in the relatively near future the first clinical trials with candidate antiviral drugs to treat papillomavirus infections and associated cancers. As resistance to such drugs is not expected to be an issue given that the HPV genome is replicated by cellular DNA polymerases with high fidelity, these novel HPV antiviral agents could rapidly become the gold-standard first-line therapy to treat HPV infections in diseased patients.

Acknowledgements

We thank Dr Simon Joubert and Dr Keith Schappert for helpful comments on this manuscript. Work in the authors' laboratory is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and The Cancer Research Society Inc. JA is a senior scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244–265.
- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004; 101:270–280.
- Frisch M, Fenger C, van den Brule AJ, et al. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res* 1999; 59:753–757.
- Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1:S59–S66.
- Akgul B, Cooke JC, Storey A. HPV-associated skin disease. *J Pathol* 2006; 208:165–175.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17–27.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78:11451–11460.
- Clad A, Gissmann L, Meier B, Freese UK, Schwarz E. Molecular cloning and partial nucleotide sequence of human papillomavirus type 1a DNA. *Virology* 1982; 118:254–259.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995; 69:3074–3083.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:11–22.
- Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80:560–563.
- Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102:3–8.
- American Cancer Society [homepage on the internet]. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 2006. Cancer Facts and Figures 2006. Available from http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PW_Secured.pdf
- Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 2004; 36:11–19.
- Batson A, Meheus F, Brooke S. Chapter 26: Innovative financing mechanisms to accelerate the introduction of HPV vaccines in developing countries. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3:S219–S225.
- Scheinfeld N, Lehman DS. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol Online J* 2006; 12:5.
- Gross G. Therapy of human papillomavirus infection and associated epithelial tumors. *Intervirology* 1997; 40:368–377.
- US Food and Drugs Administration. VEREGENTTM (Kunecatechins) Ointment, 15%. Bradley Pharmaceuticals, Inc. under license from MediGene AG. Application No 021902. Rockville: US Food and Drug Administration; 2006. Available from <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2006/021902lbl.pdf>
- US Food and Drug Administration [homepage on the internet]. Rockville: US Food and Drug Administration; 2006 [updated 2006 June 8, cited 8th June 2006]. GARDASIL[®]. Product Approval Information – Licensing Action. Merck & Co., Inc. Available from <http://www.fda.gov/cber/products/hpvmer060806.htm>
- Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:46–54.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006; 95:1459–1466.
- GlaxoSmithKline. Mississauga: GlaxoSmithKline, 2006 [updated 2006 June 5, cited 5th June 2006]. New data show cervarixTM, GSK's HPV 16/18 cervical cancer candidate vaccine is highly immunogenic and well-tolerated in women over 25 years of age. Available from http://www.gsk.ca/en/media_room/news/20060605.pdf
- Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 2005; 37:S3–S9.
- Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006; 16:83–97.
- Sverdrup F, Myers G. The E1 proteins. In *Human papillomavirus* 1997; pp. 37–53. Edited by G Myers, C Baker, K Münger, F Sverdrup, A McBride & HU Bernard. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory.
- Frattini MG, Laimins LA. 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* 1994; 91:12398–12402.
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990; 250:1694–1699.
- Lusky M, Hurwitz J, Seo YS. 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* 1994; 91:8895–8899.
- Sanders CM, Stenlund A. 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* 2001; 276:23689–23699.
- Schuck S, Stenlund A. Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell* 2005; 20:377–389.
- Schuck S, Stenlund A. Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* 2005; 79:8661–8664.

32. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J Biol Chem* 1999; 274:2696–2705.
33. Clower RV, Fisk JC, Melendy T. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* 2006; 80:1584–1587.
34. Han Y, Loo YM, Militello KT, Melendy T. 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* 1999; 73:4899–4907.
35. Loo YM, Melendy T. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 2004; 78:1605–1615.
36. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. *J Virol* 1998; 72:7407–7419.
37. Park P, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR, Mohr IJ. The cellular DNA polymerase α -primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8700–8704.
38. Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002; 31:343–360.
39. Ilves I, Kivi S, Ustav M. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* 1999; 73:4404–4412.
40. Frattini MG, Laimins LA. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 1994; 204:799–804.
41. Wu X, Xiao W, Brandsma JL. Papilloma formation by cottontail rabbit papillomavirus requires E1 and E2 regulatory genes in addition to E6 and E7 transforming genes. *J Virol* 1994; 68:6097–6102.
42. Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle *in vivo*. *J Virol* 2004; 78:2142–2151.
43. Brandsma JL, Yang ZH, DiMaio D, Barthold SW, Johnson E, Xiao W. The putative E5 open reading frame of cottontail rabbit papillomavirus is dispensable for papilloma formation in domestic rabbits. *J Virol* 1992; 66:6204–6207.
44. Ruesch MN, Stubenrauch F, Laimins LA. Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J Virol* 1998; 72:5016–5024.
45. McBride AA, McPhillips MG & Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol* 2004; 12:527–529.
46. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In *Fields Virology*, vol. 2, 4th edn 2001; pp. 2197–2229. Edited by BN Fields, DM Knipe & PM Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
47. Kovelman R, Bilter GK, Glezer E, Tsou AY, Barbosa MS. Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. *J Virol* 1996; 70:7549–7560.
48. Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* 1997; 71:9343–9349.
49. Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987; 6:3391–3397.
50. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63:4317–4324.
51. Soeda E, Ferran MC, Baker CC, McBride AA. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology* 2006; 351:29–41.
52. Lehman CW, Botchan MR. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4338–4343.
53. Skiadopoulos MH, McBride AA. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* 1998; 72:2079–2088.
54. Bastien N, McBride AA. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 2000; 270:124–134.
55. Dao LD, Duffy A, Van Tine BA, *et al*. Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin-binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* 2006; 80:4792–4800.
56. Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, *et al*. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4030–4035.
57. Schweiger MR, You J, Howley PM. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 2006; 80:4276–4285.
58. Senechal H, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, Archambault J. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* 2007; 358:10–17.
59. Abbate EA, Voitenleitner C, Botchan MR. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 2006; 24:877–889.
60. Wu SY, Lee AY, Hou SY, *et al*. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* 2006; 20:2383–2396.
61. You J, Schweiger MR, Howley PM. Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 2005; 79:14956–14961.
62. Ilves I, Maemets K, Silla T, Janikson K, Ustav M. Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle. *J Virol* 2006; 80:3660–3665.
63. Brannon AR, Maresca JA, Boeke JD, Basrai MA, McBride AA. Reconstitution of papillomavirus E2-mediated plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* by the Brd4 bromodomain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2998–3003.
64. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117:349–360.
65. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* 2006; 80:9530–9543.
66. McPhillips MG, Ozato K, McBride AA. Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol* 2005; 79:8920–8932.
67. Baxter MK, McPhillips MG, Ozato K, McBride AA. The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* 2005; 79:4806–4818.
68. Stubenrauch F, Colbert AM, Laimins LA. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J Virol* 1998; 72:8115–8123.

69. Jeckel S, Huber E, Stubenrauch F, Iftner T. A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus E2 is essential for tumor induction in rabbits. *J Virol* 2002; 76:11209–11215.
70. DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol* 2003; 77:1551–1563.
71. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8:3905–3910.
72. Gonzalez SL, Stremmler M, He X, Basile JR, Munger K. 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* 2001; 75:7583–7591.
73. Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:59–67.
74. Moon MS, Lee CJ, Um SJ, Park JS, Yang JM, Hwang ES. Effect of BPV1 E2-mediated inhibition of E6/E7 expression in HPV16-positive cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2001; 80:168–175.
75. Nishimura A, Nakahara T, Ueno T, et al. Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells. *Microbes Infect* 2006; 8:984–993.
76. Yamato K, Fen J, Kobuchi H, et al. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther* 2006; 13:234–241.
77. Longworth MS, Laimins LA. 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* 2004; 78:3533–3541.
78. Collins AS, Nakahara T, Do A, Lambert PF. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol* 2005; 79:14769–14780.
79. Defeo-Jones D, Vuocolo GA, Haskell KM, et al. Papillomavirus E7 protein binding to the retinoblastoma protein is not required for viral induction of warts. *J Virol* 1993; 67:716–725.
80. Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:8449–8454.
81. Massimi P, Gammoh N, Thomas M, Banks L. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 2004; 23:8033–8039.
82. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 2000; 19:5270–5280.
83. Thomas M, Laura R, Hepner K, et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 2002; 21:5088–5096.
84. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20:7874–7887.
85. Woods DF, Hough C, Peel D, Callaini G, Bryant PJ. Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol* 1996; 134:1469–1482.
86. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 2000; 289:113–116.
87. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 2000; 403:676–680.
88. Fanning AS, Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 1999; 103:767–772.
89. Borg JP. hScrib: un nouveau suppresseur de tumeur à l'horizon [hScrib: a potential novel tumor suppressor]. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52:328–331. French.
90. Lee C, Laimins LA. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2004; 78:12366–12377.
91. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. 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* 2003; 77:6957–6964.
92. Nguyen MM, Nguyen ML, Caruana G, Bernstein A, Lambert PF, Griep AE. Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium. *Mol Cell Biol* 2003; 23:8970–8981.
93. Berg M, Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* 1997; 71:3853–3863.
94. Sanders CM, Stenlund A. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J* 1998; 17:7044–7055.
95. Blitz IL, Laimins LA. The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator *in vitro*. *J Virol* 1991; 65:649–656.
96. Bonne-Andrea C, Tillier F, McShan GD, Wilson VG, Clertant P. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts *in vitro* as a specificity factor. *J Virol* 1997; 71:6805–6815.
97. Seo YS, Muller F, Lusky M, et al. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:2865–2869.
98. Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR. Activation of BPV-1 replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Nature* 1991; 353:628–632.
99. Yoakim C, Ogilvie WW, Goudreau N, et al. 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* 2003; 13:2539–2541.
100. White PW, Titolo S, Brault K, et al. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists of the E1-E2 protein interaction. *J Biol Chem* 2003; 278:26765–26772.
101. Wang Y, Coulombe R, Cameron DR, et al. Crystal structure of the E2 transactivation domain of human papillomavirus type 11 bound to a protein interaction inhibitor. *J Biol Chem* 2004; 279:6976–6985.
102. Davidson W, McGibbon GA, White PW, et al. Characterization of the binding site for inhibitors of the HPV11 E1-E2 protein interaction on the E2 transactivation domain by photoaffinity labeling and mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76:2095–2102.
103. Abbate EA, Berger JM, Botchan MR. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* 2004; 18:1981–1996.
104. Sedman T, Sedman J, Stenlund A. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* 1997; 71:2887–2896.
105. Chen G, Stenlund A. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol* 1998; 72:2567–2576.
106. Sun YN, Lu JZ, McCance DJ. Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* 1996; 216:219–222.
107. Holt SE, Wilson VG. 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* 1995; 69:6525–6532.

108. Titolo S, Brault K, Majewski J, White PW, Archambault J. 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* 2003; 77:5178–5191.
109. Schaal TD, Mallet WG, McMinn DL, *et al.* Inhibition of human papilloma virus E2 DNA binding protein by covalently linked polyamides. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:1282–1291.
110. Bashkin J, Fisher C. Potential new treatment for human papillomavirus: Scientists from UM-St. Louis, NanoVir make discovery. *19th International Conference for Antiviral Research*. 7–11 May 2006, San Juan, Puerto Rico. Abstract 35. Available from <http://m114.phrm.cf.ac.uk/ISAR2/2006.sanjuan.icar.progra.m.pdf>
111. Dervan PB, Burli RW. Sequence-specific DNA recognition by polyamides. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3:688–693.
112. Zimmerman JM, Maher LJ III. Solution measurement of DNA curvature in papillomavirus E2 binding sites. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:5134–5139.
113. Bedrosian CL, Bastia D. The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* 1990; 174:557–575.
114. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 2002; 24:275–290.
115. Stenlund A. Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:777–785.
116. Rocque WJ, Porter DJ, Barnes JA, *et al.* Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif* 2000; 18:148–159.
117. Titolo S, Pelletier A, Sauve F, *et al.* Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* 1999; 73:5282–5293.
118. Titolo S, Pelletier A, Pulichino AM, *et al.* Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* 2000; 74:7349–7361.
119. White PW, Pelletier A, Brault K, *et al.* 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* 2001; 276:22426–22438.
120. Sedman J, Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* 1998; 72:6893–6897.
121. Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:5817–5823.
122. Jenkins O, Earnshaw D, Sarginson G, *et al.* Characterization of the helicase and ATPase activity of human papillomavirus type 6b E1 protein. *J Gen Virol* 1996; 77:1805–1809.
123. Santucci S, Bonne-Andrea C, Clertant P. Bovine papillomavirus type 1 E1 ATPase activity does not depend on binding to DNA nor to viral E2 protein. *J Gen Virol* 1995; 76:1129–1140.
124. Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication *in vitro*. *Virology* 2000; 272:137–150.
125. Jeffery JA, Sharom JR, Fazekas M, *et al.* An ATPase assay using scintillation proximity beads for high-throughput screening or kinetic analysis. *Anal Biochem* 2002; 304:55–62.
126. Faucher AM, White PW, Brochu C, Grand-Maitre C, Rancourt J, Fazal G. Discovery of small-molecule inhibitors of the ATPase activity of human papillomavirus E1 helicase. *J Med Chem* 2004; 47:18–21.
127. White PW, Faucher AM, Massariol MJ, *et al.* Biphenylsulfonacetic acid inhibitors of the human papillomavirus type 6 E1 helicase inhibit ATP hydrolysis by an allosteric mechanism involving tyrosine 486. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4834–4842.
128. Hurst DN, Jones PS, Parkes KEB, Parratt MJ, Wilson FX, inventors; Hoffmann-La Roche Inc., assignee. Inhibitors of HPV E1 helicase enzyme. United State patent US 6703387. 2004 March 9.
129. Be X, Hong Y, Wei J, Androphy EJ, Chen JJ, Baleja JD. Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry* 2001; 40:1293–1299.
130. Baleja JD, Cherry JJ, Liu Z, *et al.* Identification of inhibitors to papillomavirus type 16 E6 protein based on three-dimensional structures of interacting proteins. *Antivir Res* 2006; 72:49–59.
131. Sterlinko GH, Weber M, Elston R, *et al.* Inhibition of E6-induced degradation of its cellular substrates by novel blocking peptides. *J Mol Biol* 2004; 335:971–985.
132. Liu Y, Liu Z, Androphy E, Chen J, Baleja JD. Design and characterization of helical peptides that inhibit the E6 protein of papillomavirus. *Biochemistry* 2004; 43:7421–7431.
133. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46:3–26.
134. Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, *et al.* Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 2006; 21:665–678.
135. Zhang B, Chen W, Roman A. 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* 2006; 103:437–442.
136. Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 2005; 24:1821–1830.
137. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, *et al.* The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 1999; 18:2449–2458.
138. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. 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* 2000; 275:6764–6769.
139. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:194–202.
140. Finzer P, Ventz R, Kuntzen C, Seibert N, Soto U, Rosl F. Growth arrest of HPV-positive cells after histone deacetylase inhibition is independent of E6/E7 oncogene expression. *Virology* 2002; 304:265–273.
141. Finzer P, Kuntzen C, Soto U, zur Hausen H, Rosl F. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene* 2001; 20:4768–4776.
142. Finzer P, Krueger A, Stohr M, *et al.* HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway. *Oncogene* 2004; 23:4807–4817.
143. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005; 4:38.
144. Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2005; 40:1–13.
145. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:495–528.

146. Lu Q, Yang YT, Chen CS, *et al.* Zn²⁺-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2004; 47:467–474.
147. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Cell cycle regulatory proteins are targets for induced differentiation of transformed cells: Molecular and clinical studies employing hybrid polar compounds. *Int J Hematol* 1996; 63:1–17.
148. Suzuki T, Matsuura A, Kouketsu A, Nakagawa H, Miyata N. Identification of a potent non-hydroxamate histone deacetylase inhibitor by mechanism-based drug design. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15:331–335.
149. Suzuki T, Nagano Y, Kouketsu A, *et al.* Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates. *J Med Chem* 2005; 48:1019–1032.
150. Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, *et al.* Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J Med Chem* 1999; 42:3001–3003.
151. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res* 1998; 241:126–133.
152. Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 2006; 26:397–413.
153. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370:737–749.
154. Hildmann C, Wegener D, Riestler D, *et al.* Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases. *J Biotechnol* 2006; 124:258–270.
155. Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, *et al.* Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2006; 6:2.
156. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:495–528.
157. Chavez-Blanco A, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, *et al.* Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A Phase I study. *Mol Cancer* 2005; 4:22.
158. He W, Staples D, Smith C, Fisher C. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J Virol* 2003; 77:10566–10574.
159. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5:383–391.
160. Duensing S, Munger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 2002; 21:6241–6248.
161. Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 2001; 75:7712–7716.
162. Duensing S, Lee LY, Duensing A, *et al.* The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:10002–10007.
163. Lin BY, Ma T, Liu JS, *et al.* HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 2000; 275:6167–6174.
164. Ma T, Zou N, Lin BY, Chow LT, Harper JW. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:382–387.
165. Cueille N, Nougarede R, Mechali F, Philippe M, Bonne-Andrea C. Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* 1998; 72:7255–7262.
166. Hsu CY, Mechali F, Bonne-Andrea C. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* 2007; 81:384–394.
167. Deng W, Lin BY, Jin G, *et al.* Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 2004; 78:13954–13965.
168. Schang LM. Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697:197–209.
169. Schang LM. Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50:779–792.
170. Vitali L, Yakisich JS, Vita MF, *et al.* Roscovitine inhibits ongoing DNA synthesis in human cervical cancer. *Cancer Lett* 2002; 180:7–12.
171. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, *et al.* Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1999; 1:60–67.
172. Duensing S, Duensing A, Lee DC, *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene* 2004; 23:8206–8215.
173. Meijer L, Borgne A, Mulner O, *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 243:527–536.
174. Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006; 36:1427–1441.
175. Disbrow GL, Baege AC, Kierpiec KA, *et al.* Dihydroartemisinin is cytotoxic to papillomavirus-expressing epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2005; 65:10854–10861.
176. Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* 2002; 32:1655–1660.
177. O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 2004; 47:2945–2964.
178. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 2002; 7:219–237.
179. Demeret C, Le Moal M, Yaniv M, Thierry F. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4777–4784.
180. Gloss B, Bernard HU. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol* 1990; 64:5577–5584.
181. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188:143–160.
182. Craigo J, Callahan M, Huang RC, DeLucia AL. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antivir Res* 2000; 47:19–28.
183. Gloss B, Bernard HU. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol* 1990; 64:5577–5584.
184. Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993; 67:6476–6486.
185. O'Connor M, Chan SY, Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In *Human Papillomaviruses 1995 Compendium*, part III-A

- 1995, pp. 21–40. Edited by G Myers, HU Bernard, H Delius, C Baker, J Icenogle, A Halpern & C Wheeler. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.
186. Heller JD, Kuo J, Wu TC, Kast WM, Huang RC. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces G2 arrest in mammalian cells and exhibits tumoricidal activity *in vivo*. *Cancer Res* 2001; **61**:5499–5504.
187. Chang CC, Heller JD, Kuo J, Huang RC. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:13239–13244.
188. Huang RC, Li Y, Giza PE, *et al*. Novel antiviral agent tetraglycylated nordihydroguaiaretic acid hydrochloride as a host-dependent viral inhibitor. *Antivir Res* 2003; **58**:57–64.
189. Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, Muller M, Lowy DR, Schiller JT. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog* 2006; **2**:e69.
190. Giroglou T, Sapp M, Lane C, *et al*. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 2001; **19**:1783–1793.
191. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, *et al*. 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* 1999; **274**:5810–5822.
192. Tobacman JK. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environ Health Perspect* 2001; **109**:983–994.

Accepted for publication 15 March 2007
