

Université de Montréal

**Identification et caractérisation d'un domaine de
transactivation dans l'hélicase E1 des papillomavirus
humains**

par

Geneviève Morin

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biochimie

Avril 2010

© Geneviève Morin, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Identification et caractérisation d'un domaine de transactivation dans l'hélicase E1 des
papillomavirus humains

Présenté par :
Geneviève Morin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Normand Brisson, président-rapporteur
Jacques Archambault, directeur de recherche
Pascal Chartrand, membre du jury

Résumé

Les papillomavirus sont des virus à ADN qui infectent la peau et les muqueuses. Ils causent des verrues et peuvent aussi mener au développement de cancers, dont le cancer du col de l'utérus. La réplication de leur génome nécessite deux protéines virales : l'hélicase E1 et le facteur de transcription E2, qui recrute E1 à l'origine de réplication virale. Pour faciliter l'étude de la réplication du génome viral, un essai quantitatif et à haut débit basé sur l'expression de la luciférase a été développé. Parallèlement, un domaine de transactivation a été identifié dans la région régulatrice N-terminale de la protéine E1. La caractérisation de ce domaine a montré que son intégrité est importante pour la réplication de l'ADN. Cette étude suggère que le domaine de transactivation de E1 est une région protéique intrinsèquement désordonnée qui permet la régulation de la réplication du génome viral par son interaction avec diverses protéines.

Mots-clés : papillomavirus, hélicase, E1, réplication de l'ADN, luciférase, SV40, transactivation, désordre protéique.

Abstract

Papillomaviruses are small DNA viruses that infect skin and mucosa. They cause warts and can also lead to the development of cancers, including cervical cancer. Replication of their genome requires two viral proteins: the E1 helicase and the E2 transcription factor, which recruits E1 to the viral origin of replication. To facilitate the study of viral genome replication, a quantitative and high-throughput assay based on luciferase expression has been developed. In parallel, a transactivation domain has been identified in the N-terminal regulatory region of the E1 protein. Characterization of this domain showed that its integrity is important for DNA replication. This study suggests that the E1 transactivation domain is an intrinsically unstructured protein region that allows regulation of viral genome replication by its interaction with diverse proteins.

Keywords : papillomavirus, helicase, E1, DNA replication, luciferase, SV40, transactivation, protein disorder.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1 Introduction.....	1
1.1 Présentation des papillomavirus.....	1
1.1.1 Infections aux papillomavirus humains.....	1
1.1.1.1 Types d'infections et statistiques.....	1
1.1.1.2 Traitements disponibles.....	3
1.1.1.3 Traitements en développement.....	5
1.1.1.4 Vaccins.....	7
1.1.2 Description du virus.....	10
1.1.2.1 Structure du virion et organisation génomique.....	10
1.1.2.2 Protéines virales.....	12
1.1.2.3 Cycle viral.....	17
1.1.2.4 Modèles d'étude.....	20
1.2 Présentation de l'hélicase E1.....	21
1.2.1 Structure en domaines.....	21
1.2.1.1 Région régulatrice N-terminale.....	21
1.2.1.2 Domaine de liaison à l'ADN.....	22
1.2.1.3 Domaine enzymatique (hélicase/ATPase).....	23
1.2.2 Rôle dans la réplication de l'ADN viral.....	23
1.2.2.1 Liaison à l'origine de réplication virale.....	23

1.2.2.2	Activités enzymatiques	24
1.2.2.3	Interactions avec la machinerie de réplication de l'hôte.....	25
1.2.2.4	Essais de réplication de l'ADN viral disponibles	26
1.2.3	Interactions et modifications de l'hélicase E1	27
1.2.3.1	Interactions avec d'autres protéines.....	27
1.2.3.2	Modifications post-traductionnelles.....	29
1.2.3.3	Clivage par les caspases.....	31
1.2.4	Démonstration d'une activité transcriptionnelle de E1	31
1.3	Activateurs de transcription	33
1.3.1	Différents domaines de transactivation.....	33
1.3.2	Domaines de transactivation acides	35
1.3.2.1	Exemple de p53.....	35
1.3.2.2	Exemple de VP16	36
1.3.3	Domaines protéiques intrinsèquement désordonnés.....	37
1.3.4	Cofacteurs impliqués dans la transactivation par p53 et VP16.....	37
1.3.4.1	Rôle de PC4	37
1.3.4.2	Rôle de P300/CBP	38
1.3.4.3	Rôle du complexe SAGA.....	39
1.4	But du projet de recherche	41
2	Article 1 – Développement d'essais de réplication de l'ADN des polyomavirus et des papillomavirus.....	42
2.1	Mise en contexte de l'article	42
2.2	Contribution des co-auteurs	43
2.3	Texte de l'article	44
2.3.1	Abstract	45
2.3.2	Introduction.....	45
2.3.3	Materials and methods	48
2.3.4	Results and discussion	52
2.3.4.1	Development of a novel SV40 DNA replication assay based on a dual-luciferase readout.	52

2.3.4.2	Dependence of the assay on large T antigen expression.....	54
2.3.4.3	Validation of the assay with mutant large T antigens.....	57
2.3.4.4	Development of a luciferase HPV31 DNA replication assay.....	58
2.3.4.5	Validation of the luciferase HPV31 DNA replication assay with E1 and E2 mutant proteins.....	63
2.3.4.6	Luciferase activity increases as a function of ori-plasmid replication.....	69
2.3.4.7	Inhibition of SV40 and HPV DNA replication by the cytidine analogue gemcitabine.....	71
2.3.4.8	Inhibition of SV40 and HPV DNA replication by chemical inhibitors of the cell cycle.....	74
2.3.5	Concluding remarks.....	76
2.3.6	Acknowledgments.....	76
2.3.7	References.....	78
3	Article 2 – Caractérisation d'un domaine de transactivation de E1 du VPH.....	88
3.1	Mise en contexte de l'article.....	88
3.2	Contribution des co-auteurs.....	89
3.3	Texte de l'article.....	90
3.3.1	Abstract.....	91
3.3.2	Introduction.....	92
3.3.3	Materials and Methods.....	94
3.3.4	Results.....	98
3.3.4.1	HPV31 E1 contains a region similar to the p53 transactivation domain that can activate transcription in yeast.....	98
3.3.4.2	The E1 NTR requires the SAGA complex for transactivation in yeast....	104
3.3.4.3	The presence of a TLR in the N-terminal region of E1 is a conserved feature of anogenital HPV types.....	107
3.3.4.4	The E1 TLR is structurally related to the TADs of p53 and HSV VP16..	109
3.3.4.5	Effect of mutations in the E1 TLR on transient HPV DNA replication..	111

3.3.4.6 Amino acid substitutions in the E1 TLR do not affect the binding of E1 to the origin or to p80.....	114
3.3.4.7 Further characterization of the replication defect imposed by the E1 MFI substitution.....	116
3.3.5 Discussion.....	120
3.3.5.1 The HPV E1 helicase contains a TAD-like region (TLR) that can activate transcription in yeast.....	120
3.3.5.2 The E1 TLR is necessary for optimal viral DNA replication.....	121
3.3.5.3 The E1 TLR is likely an intrinsically disordered protein domain.....	122
3.3.5.4 Potential functions of the E1 TLR in papillomavirus DNA replication. ..	124
3.3.6 Acknowledgments.....	125
3.3.7 References.....	128
4 Discussion.....	135
4.1 Retour sur les résultats.....	135
4.1.1 Développement d'un essai de réplication transitoire de l'ADN.....	135
4.1.2 Identification et caractérisation d'une région semblable à un domaine de transactivation chez E1.....	136
4.2 Modèle et hypothèses.....	139
5 Conclusion et travaux futurs.....	142
6 Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1. Représentation du génome de VPH31.....	11
Figure 2. Progression du cycle viral avec la différenciation des kératinocytes.....	17
Figure 3. Représentation schématique de la protéine E1 de VPH31 avec les 3 régions et leurs principales fonctions.....	21
Figure 4. Représentation schématique de la région N-terminale de E1 du type VPH31....	22
Figure 5. Représentation schématique des sites de liaison à E1 et à E2 dans l'origine de réplication du VPH.....	24
Figure 6. Représentation des principales sous-unités du complexe de pré-initiation de la transcription par l'ARN polymérase II lié à l'ADN sur un promoteur.....	34
Figure 7. Représentation des sous-unités du complexe SAGA de la levure.....	40
Figure 8. Représentation du domaine N-terminal de la protéine E1 du type VPH31 et localisation de la région semblable à un TAD (TLR).....	136

Figures – article 1

Fig. 1. Principle of the luciferase SV40 DNA replication assay.....	54
Fig. 2. Dependence of the SV40 DNA replication assay on time and expression of T antigen.....	56
Fig. 3. Validation of the SV40 DNA replication assay using T antigen mutants.....	58
Fig. 4. Principle of the luciferase-based HPV31 DNA replication assay.....	60
Fig. 5. Dependence of the HPV31 DNA replication assay on E1 and E2.....	62
Fig. 6. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E1 mutants.....	64
Fig. 7. Characterization of a dimerization-defective HPV31 E1 mutant.....	66
Fig. 8. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E2 mutants.....	68
Fig. 9. Correlation between ori-plasmid replication and firefly luciferase expression.....	70
Fig. 10. Validation of the SV40 and HPV31 assays using the DNA replication inhibitor gemcitabine.....	73

Supplementary Fig.1. Geldanamycin and lactacystin prevent the formation of S-phase specific PCNA foci.	77
---	----

Figures – article 2

Figure 1. Domain structure of HPV31 E1 and sequence alignment with p53 and VP16.	101
Figure 2. The HPV31 E1 N-terminal region contains a TAD-like region that can activate transcription in yeast.	103
Figure 3. Transactivation activity of the HPV31 E1 N-terminal region is impaired in yeast strains lacking component of the SAGA complex.	106
Figure 4. Transactivation activity of the E1 N-terminal regions from different HPV types in yeast.....	108
Figure 5. The E1 TLR-binding site on Tfb1 is similar to the p53-binding site.	110
Figure 6. DNA replication activities of E1 TLR mutants.	113
Figure 7. Interaction of E1 TLR mutants with DNA and p80.	115
Figure 8. The DNA replication defect of the E1 MFI mutant is not suppressed by overexpression of the protein or by lengthening the time of the assay.....	117
Figure 9. DNA replication activity of the E1 MFI mutant under conditions where the initiation or elongation phases of replication is limiting.	119
Figure 10. Protein disorder and secondary structure predictions obtained for HPV31 E1 N-terminal region.....	124
Supplementary figure 1. Purified proteins used in this study.	126
Supplementary figure 2. Caspase cleavage of E1 TLR mutants after a staurosporine treatment.	126

Liste des tableaux

Tableaux – article 1

Table I. Activity of selected cell-cycle inhibitors on viral DNA replication.	75
--	----

Tableaux – article 2

Supplementary table 1. Raw β -galactosidase activity of p53 and HPV31 E1 LexA fusion proteins in yeast.	127
Supplementary table 2. Raw β -galactosidase activity of p53 and HPV31 E1 LexA fusion proteins in SAGA subunits deletion yeast strains.	127
Supplementary table 3. Raw β -galactosidase activity of p53 and different HPV types E1 LexA fusion proteins in SAGA subunits deletion yeast strains.	128

Liste des sigles et des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADN pol α : ADN polymérase α -primase

ADN pol δ : ADN polymérase δ

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARN pol II: ARN polymérase II

APC : Anaphase-Promoting complex ou complexe promoteur de l'anaphase

BPV : Bovine Papillomavirus (VPB en français)

CBM : Cyclin-binding motif, motif de liaison aux cyclines

CDK : Cyclin-dependant kinase, kinase dépendante des cyclines

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRPV : Cottontail Rabbit Papillomavirus ou papillomavirus du lapin d'Amérique

C-terminal : Carboxy-terminal

DBD : DNA-Binding Domain ou domaine de liaison à l'ADN

E. coli : *Escherichia coli*

EGRF : Epidermal Growth Factor Receptor ou récepteur du facteur de croissance épidermique

EV : Épidermodysplasie verruciforme

FGT : Facteur général de transcription

GST : Glutathion-S-transférase

HDAC : Histone déacétylase

HLA : Human Leukocyte Antigen ou antigène des leucocytes humains

HPV : Human papillomavirus (VPH en français)

HSV : Herpes simplex Virus

ID : Intrinsèquement désordonné (ou non-structuré)

ITC : Isothermal Titration Calorimetry ou calorimétrie de titrage isotherme

LCR : Long Control Region ou région régulatrice

LT : Large T antigen ou antigène Grand T

miARN : microARN

MME : Minichromosome Maintenance Element ou élément de maintien du minichromosome

NES : Nuclear Export Sequence ou séquence d'export nucléaire

NLS : Nuclear Localization Sequence ou séquence de localisation nucléaire

N-terminal : Amino-terminal

OBD : Origin-Binding Domain

ORF : Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert

Ori : Origine de réplication

Pap: test de Papanicolaou

pb : Paires de bases (longueur d'acide nucléique)

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PC4: Positive Cofactor 4 ou cofacteur positif 4

PDZ : PSD95/Dlg/ZO-1

PH : Pleckstrin Homology, domaine d'homologie à la pleckstrine

Plasmide-ori : Plasmide contenant une origine de réplication

POD : Promyelocytic leukemia oncogenic domains ou domaines oncogènes de leucémie promyélocytique

PS : Photosensibilisateur

RFC : Replication Factor C ou facteur de réplication C

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPA : Replication Protein A ou protéine de réplication A

SAGA : Spt/Ada/Gcn5 Acétyltransférase

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SF3 : Superfamily 3

SLIK: SAGA-like

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

SV40: Simian Virus 40 ou virus simian 40

TAD : Transactivation Domain ou domaine de transactivation

TAF : TBP-Associated Factor ou facteur associé à TBP

TBP : TATA-binding Protein ou protéine liant la boîte TATA

TLR : Transactivation domain-Like Region ou région semblable à un domaine de transactivation

TNF1 : Tumor-necrosis Factor 1 ou facteur de nécrose des tumeurs 1

TopoI : Topoisomérase I

TRIP13 : Thyroid hormone receptor interactor 13 ou interacteur du récepteur de l'hormone thyroïdienne 13

URR : Upstream regulatory region ou région régulatrice en amont, synonyme de LCR

VLP : Virus-like particles, particules virales vides formées de L1 ou de L1 et L2

VPB : Virus du papillome bovin

VPH : Virus du papillome humain

VP16 : Viral Protein 16

16E1BP : HPV16 E1-binding protein ou protéine liant E1 de VPH16

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Jacques Archambault, pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir guidée et soutenue tout au long de mes études graduées.

Je tiens à remercier tout spécialement Amélie Fradet-Turcotte, d'abord pour m'avoir légué son projet de recherche et enseigné plusieurs techniques, mais aussi pour son grand soutien, scientifique et moral, au cours de mes études. Un gros merci également à Michaël Lehoux et Hélène Sénéchal, que j'ai aussi côtoyé tout au long de ma maîtrise, pour leurs judicieux conseils, scientifiques ou autres. À vous, mes collègues et ami(e)s, merci d'avoir été là pour me transmettre vos connaissances et votre joie de vivre! Il est très agréable de travailler (et d'aller souper!) avec vous.

Je veux aussi remercier mes collègues présents ou passés Simon Joubert, Claudia D'Abramo et Thibault Mesplede pour leurs suggestions, commentaires et corrections qui m'ont été bien utiles pour mes études.

Je remercie également ma famille et mes « vieux » amis qui m'ont toujours encouragée et supportée dans mon cheminement, dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Merci à Nathalie Grandvaux d'avoir accepté d'être ma marraine de maîtrise et d'avoir pris le temps de me rencontrer au cours de mes études graduées.

Merci à mes collaborateurs, Jim Omichinski et Paola DiLello de l'Université de Montréal ainsi que Peter Bullock de l'Université Tufts de Boston, pour avoir contribué de façon importante aux projets présentés dans ce mémoire. Merci aussi à Joe S. Mymryk pour m'avoir fourni des souches de levure qui ont été utilisées dans le cadre de mon projet de recherche.

Merci au Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM) de l'Université de Montréal pour m'avoir offert une bourse d'études lors de ma première année de maîtrise.

Pour terminer, merci au jury qui lira et évaluera ce mémoire pour le temps et l'attention accordés à mes travaux.

1 Introduction

1.1 Présentation des papillomavirus

Les papillomavirus sont une famille de virus qui infectent les cellules basales de l'épithélium de la peau ou des muqueuses et causent des papillomes, soit des verrues ou des condylomes, chez plusieurs animaux et chez les humains. Ils peuvent aussi induire la transformation des cellules hôtes et causer des lésions malignes pouvant mener à des cancers comme le cancer du col de l'utérus. Les papillomavirus infectant les humains sont communément appelés virus du papillome humain ou VPH. À ce jour, plus de 120 types de VPH ont été identifiés et classés selon la séquence de leur génome (Bernard et al., 2010).

1.1.1 Infections aux papillomavirus humains

Les VPHs peuvent être divisés en trois groupes selon le type d'infection qu'ils causent : les types cutanés, les types muqueux et génitaux et les types EV (pour épidermodysplasie verruciforme). Les types cutanés causent des verrues bénignes qui sont communes chez les individus en santé, comme par exemple les verrues plantaires. Les types muqueux et génitaux peuvent infecter la peau ou les muqueuses de la région génitale ou d'autres régions comme celles de la gorge ou de l'anus. Ces types sont généralement transmis par contact sexuel. Ils sont divisés en 2 catégories : les types à bas risque, qui ne causent que des lésions bénignes et les types à haut risque, qui sont susceptibles de causer des cancers comme le cancer du col de l'utérus. L'épidermodysplasie verruciforme (EV) est une maladie rare qui se caractérise par une forte susceptibilité aux infections et au développement de cancers causés par des types de VPH infectant la peau. Les individus atteints peuvent être infectés par des types cutanés communs, mais aussi par des types spécifiques à cette condition qui forment le troisième groupe de VPH (Lowy, 2001).

1.1.1.1 Types d'infections et statistiques

Les papillomavirus sont la cause la plus commune d'infections transmissibles sexuellement aux États-Unis (Wiley et Masongsong, 2006). Des études effectuées dans ce pays il y a quelques années ont permis d'estimer que 75% de la population âgée de 15 à 49

ans avait déjà été infectée par un ou des papillomavirus de type génital, mais seulement 1% de ces personnes avaient développé des condylomes (Koutsky, 1997). En général, l'infection est asymptomatique et le virus est éliminé par le système immunitaire de l'hôte. Les papillomavirus de types à haut risque sont la cause nécessaire du développement du cancer du col de l'utérus. De l'ADN viral peut être détecté dans 99.7% des cas (Walboomers et al., 1999). Le cancer du col de l'utérus est le deuxième cancer le plus commun chez les femmes dans le monde et cause la mort de plus de 200 000 personnes chaque année (Wheeler, 2002; Parkin et al., 2005). La plupart des cas surviennent dans les pays en voie de développement, où le taux de mortalité est également plus élevé (Parkin et al., 2005). Au Canada, les chances pour les femmes de développer ce type de cancer sont estimées à 1 sur 148, alors que les chances d'en mourir sont de 1 sur 423, ce qui correspond à un taux de mortalité d'environ 30% (Société canadienne du cancer, 2009). L'infection par un papillomavirus d'un type à haut risque est nécessaire, mais pas suffisante pour le développement du cancer du col. Les 2 types à haut risque les plus communs dans le monde sont les types 16 et 18, qui sont la cause d'environ 70% des cancers du col utérin. Le type VPH16 est de loin le plus important, car il est retrouvé dans près de 60% des cas (Munoz et al., 2004). Le cancer se développe généralement dans des cas où l'infection est persistante avec une charge virale constamment élevée (Ylitalo et al., 2000).

Plusieurs facteurs peuvent favoriser la transformation des cellules infectées et le développement du cancer du col de l'utérus. Parmi les facteurs de risques connus, on retrouve notamment l'utilisation de contraceptifs oraux, le nombre de grossesses élevées, la consommation de tabac, la présence d'autres infections transmissibles sexuellement et l'immunosuppression (revu dans (Castellsague et al., 2002)). Le polymorphisme des gènes HLA (antigènes des leucocytes humains), qui codent pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) servant à présenter les antigènes aux lymphocytes, a aussi été relié à la susceptibilité aux cancers causés par le VPH. Certains haplotypes connus de ces gènes permettraient une meilleure reconnaissance des antigènes du VPH, donc une meilleure réponse immunitaire contre le virus et une protection accrue par rapport à d'autres haplotypes. Certains individus seraient donc moins susceptibles de développer des cancers causés par le VPH grâce à leurs gènes HLA. Le génome viral a aussi une influence

sur le développement de la pathologie. Parmi un type spécifique de VPH, on retrouve des variants dont le génome diffère de moins de 2% de celui du prototype. Certains variants représentant un plus grand risque pour le développement de cancers ont été identifiés (revu dans (Hildesheim et Wang, 2002)).

D'un point de vue histologique, le développement de cancers passe par différents stades de dysplasie. Le stade est déterminé par la proportion de cellules des couches supérieures de l'épithélium qui sont remplacées par des cellules morphologiquement semblables aux cellules basales. La plupart de ces lésions sont normalement éliminées par l'organisme, mais une petite proportion peut progresser et former des tumeurs malignes. Les lésions pré-cancéreuses peuvent être détectées par le test de Papanicolaou, mieux connu sous le nom de « test Pap », une analyse cytologique de cellules exfoliées prélevées sur le col de l'utérus. Ce test est considéré positif si des cellules, qui ont été prélevées à la surface de l'épithélium, présentent des caractéristiques morphologiques des cellules basales ou un noyau élargi, typique de ces lésions (Lowy, 2001).

Les VPH anogénitaux sont aussi impliqués dans des cancers du vagin, de la vulve, du pénis, des régions anale et périanale, ainsi que dans des cancers des amygdales, du larynx, du pharynx et de la langue (Wheeler, 2002). Bien que le lien de cause ne soit pas encore démontré, certains types cutanés de VPH sont associés à des cancers de la peau sans mélanome, principalement chez les patients atteints de EV (Dubina et Goldenberg, 2009).

1.1.1.2 Traitements disponibles

Les condylomes génitaux ainsi que les verrues cutanées sont généralement traités par des méthodes d'ablation, de destruction des cellules infectées ou de modulation de la réponse immunitaire. Plusieurs méthodes physiques peuvent être utilisées pour se débarrasser des condylomes. Ils peuvent être enlevés par chirurgie électrique locale, au laser ou tout simplement avec un scalpel. La cryothérapie est aussi fréquemment utilisée pour induire la nécrose des cellules de la lésion. Les verrues, cutanées ou génitales, peuvent également être détruites par une application locale d'acide trichloracétique concentré. Ces

méthodes ont peu d'effets secondaires, mais le taux de récurrence des lésions est très élevé, car le virus n'est pas éliminé de la région affectée et est même parfois disséminé ailleurs dans la région environnante lors de la destruction des cellules hôtes. Parmi les traitements locaux sous forme de solution ou d'onguent, on retrouve la podophyllotoxine, une toxine végétale qui bloque la mitose des cellules en se liant aux microtubules, ainsi que le 5-fluorouracile, qui bloque la synthèse de la thymidine et donc la réplication de l'ADN. Par contre, ces traitements affectent aussi les cellules saines et présentent donc des effets secondaires locaux. De plus, la récurrence des lésions est commune avec ces traitements. Le cidofovir, un analogue de nucléotide approuvé pour le traitement des infections aux cytomégalovirus mais qui est aussi actif contre plusieurs autres virus à ADN, provoque l'apoptose des cellules cancéreuses VPH positives. Il est disponible en gel pour application locale (Tchernev, 2009). Une étude récente suggère qu'il possède aussi des propriétés antimétastatiques, ce qui freinerait la croissance des tumeurs (Amine et al., 2009). Il n'est par contre pas approuvé pour les lésions liées au VPH.

Parmi les immunomodulateurs disponibles, on retrouve l'imiquimod, qui permet l'activation des lymphocytes T, et donc de la réponse immunitaire antivirale et antitumorale, en induisant la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, dont l'interféron- α . Il est disponible sous forme d'onguent. Malheureusement, son application montre une efficacité d'environ 50% seulement contre les condylomes et cause parfois des rougeurs au site d'application au début du traitement. Le traitement à l'interféron peut aussi être utilisé, souvent en combinaison avec la cryothérapie ou la chirurgie. Il active la réponse immunitaire cytotoxique et protège possiblement ainsi les cellules basales de l'épithélium contre l'infection au VPH (Tchernev, 2009). Les interférons de type I (dont α et β) induisent également l'expression de la protéine cellulaire P56, qui est activée de façon générale par les infections virales. Cette protéine lie l'hélicase E1 du VPH et l'exporte au cytoplasme, ce qui empêche la réplication de l'ADN viral. De plus, P56 bloque l'activité hélicase de E1 par sa liaison. Les interférons ont donc un effet inhibiteur direct sur le cycle viral du VPH en bloquant la réplication du génome viral, en plus d'activer la réponse immunitaire antivirale (Terenzi et al., 2008). L'application locale d'interféron est préférée à l'administration systémique car elle est plus efficace et les effets secondaires du traitement

sont mineurs (Yang et al., 2009). Il est donc intéressant de combiner ce traitement à d'autres pour stimuler la réponse immunitaire.

Les lésions précancéreuses du col de l'utérus peuvent être traitées par les mêmes méthodes que les condylomes lorsqu'elles sont à un stade très précoce. Pour les stades plus avancés, on utilise plutôt des méthodes d'excision qui enlèvent la partie affectée du col. Cette intervention est un type de biopsie qui se nomme conisation et qui permet l'étude histologique détaillée des lésions. Dans les cas avancés de cancer, on procède parfois à l'hystérectomie, soit l'ablation de l'utérus. La chimiothérapie et la radiothérapie peuvent aussi être utilisées, surtout dans les cas où la conisation n'est pas suffisante. Une méthode récente utilisée pour traiter les cancers et les lésions précancéreuses est la thérapie photodynamique (revu dans (Bharti et al., 2009)). Elle consiste à injecter ou à appliquer localement au patient un photosensibilisateur (PS), une molécule qui lorsque excitée par de la lumière à une longueur d'onde particulière, peut transférer de l'énergie à l'oxygène et produire des radicaux libres. Ces espèces réactives sont toxiques pour les cellules ciblées et leur destruction provoque également une réaction immunitaire cellulaire (Ortel et al., 2009). La molécule PS s'accumule préférentiellement dans les tumeurs de façon passive, par des mécanismes peu connus qui pourraient être liés à la plus grande capacité de prolifération des cellules tumorales ou à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins dans les tumeurs. La spécificité du traitement est augmentée par le fait que seule la région où se trouve la tumeur est irradiée par la lumière, donc le PS situé à d'autres sites n'est pas activé et est non toxique (Solban et al., 2006). L'efficacité de cette technique pour traiter les cancers liés au VPH est semblable à celle des techniques d'ablation (Bharti et al., 2009).

1.1.1.3 Traitements en développement

Parmi les méthodes décrites ci-haut, aucune n'est vraiment spécifique au VPH et la plupart peuvent également affecter les cellules saines environnantes à la lésion. Plusieurs autres thérapies ciblant directement le cycle viral du VPH sont actuellement à l'étude. Il y a notamment un grand intérêt pour le développement de molécules antivirales qui ciblent les fonctions des différentes protéines du VPH. Ces nouvelles molécules visent généralement à

inhiber la réplication du génome viral ou l'action des oncogènes viraux. La première classe de molécules cible l'activité de l'hélicase virale E1 ou la fonction de la protéine E2, qui doit recruter E1 à l'ADN pour permettre la réplication du génome viral. D'autres antiviraux potentiels visent par exemple à bloquer la fonction de l'oncogène viral E6 en l'empêchant d'induire la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 par son interaction avec une ubiquitine ligase (revu dans (Fradet-Turcotte et Archambault, 2007)). Des protéines à doigt de zinc artificielles liant l'ADN aux sites de liaison de la protéine E2 sur le génome viral ont été développées et peuvent inhiber la réplication du génome viral de VPH18 *in vitro*. Ce traitement est prometteur, mais la toxicité et la biodisponibilité de ces protéines sont pour le moment inconnues (Mino et al., 2008). Des efforts sont également mis sur le développement de thérapies à base d'ARN interférents ou de ribozymes. Les ARN interférents sont des petites molécules d'ARN qui lient de façon spécifique un ARN messager (ARNm) et qui, via le système d'interférence de la cellule, induisent leur dégradation. Ils peuvent être administrés directement aux cellules ou être encodés par un plasmide ou un génome. Les ribozymes, quant à eux, sont des ARN qui possèdent une activité catalytique et peuvent cliver d'autres ARN. La plupart des ARN thérapeutiques dirigés contre le VPH ciblent et dégradent les ARNm des oncogènes viraux E6 et E7, menant à une importante diminution de l'expression de ces gènes et à une réduction de la prolifération des cellules tumorales. Des études dans un modèle de souris ont montré une importante diminution de la croissance de tumeurs causées par le VPH après injection de ces molécules d'ARN (Jonson et al., 2008). Par contre, les ARN sont très instables dans l'organisme et ne sont pas ciblés spécifiquement aux tumeurs lorsqu'ils sont administrés de façon systémique. Une façon de contrer ces problèmes est de produire des pseudovirions contenant un génome codant pour des ARN interférents inséré dans des particules semblables au VPH (VLP, Virus-like particles) ou dans des lentivirus dirigés contre les kératinocytes (Bousarghin et al., 2009). D'autres cibles potentielles pour la thérapie anti-VPH sont les microARN (miARN), de petits ARN codés par le génome de la cellule qui induisent la dégradation d'ARNm spécifiques. Certains miARN sont surexprimés dans des lignées cellulaires provenant de cancer du col de l'utérus. Les miARN dont l'expression est modifiée dans les cellules cancéreuses portent le nom d'oncomirs (Reshmi et Pillai, 2008).

L'action de ces oncomirs peut être bloquée par des antagonistes, des molécules simple brin d'ARN synthétiques qui s'hybrident à un miARN de façon irréversible et empêchent le clivage qui mène normalement à la dégradation de l'ARNm cible (Krutzfeldt et al., 2005). Ce type de molécules est présentement à l'étude *in vitro*, mais les effets cliniques ne sont pas encore connus (Reshmi et Pillai, 2008). Finalement, plusieurs études portent sur le développement de vaccins thérapeutiques, qui ciblent en général les oncogènes E6 et E7. Bien que prometteurs, les études cliniques ont jusqu'à maintenant montré que la réponse immunitaire cytotoxique à ces vaccins est plutôt limitée (Trimble et Frazer, 2009).

En parallèle, des composés naturels extraits de végétaux comme le curcumin, le neem (un arbre retrouvé principalement en Inde) ou le thé vert sont à l'étude pour leurs propriétés ciblant les mécanismes menant à la prolifération cellulaire (Bharti et al., 2009). Des composés polyanioniques, comme par exemple des dérivés de polysaccharides de surface de la bactérie *E. coli*, peuvent être utilisés pour bloquer l'interaction du VPH avec les cellules hôtes. Ces molécules lient les protéoglycans d'héparan sulfate qui servent de molécule d'attachement pour les papillomavirus et empêchent donc la liaison du virus aux cellules (Rusnati et al., 2009). Par contre, ces traitements ne sont pas spécifiques au VPH et peuvent affecter d'autres processus cellulaires.

Finalement, bien que plusieurs méthodes de traitement soient à l'étude, aucun traitement efficace spécifique au VPH n'est actuellement disponible sur le marché. Il est donc important de continuer à étudier les mécanismes qui régissent le cycle viral pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques ou mieux caractériser les cibles actuelles pour faciliter le développement de molécules antivirales.

1.1.1.4 Vaccins

Des efforts sont mis depuis plusieurs années pour développer des vaccins prophylactiques dirigés contre les papillomavirus. Les premiers essais ont été faits avec des préparations de papillomavirus bovins (VPB) injectés de façon intramusculaire à des animaux. Ils ont induit la production d'anticorps neutralisants, principalement dirigés

contre L1, la protéine majeure de la capside. La réponse immunitaire induite était spécifique au type de virus contenu dans le vaccin, donc il ne protégeait pas contre d'autres types de papillomavirus. D'autres vaccins ont alors été produits à partir de la protéine L1 recombinante. Par contre, la protéine était produite par des bactéries et les vaccins étaient peu efficaces, possiblement à cause d'un problème de structure tridimensionnelle des protéines. Pour contrer ce problème, des protéines de fusion de L1 à la GST (glutathion-S-transférase) ont été utilisées. Ces protéines forment des pentamères, ce qui rend les épitopes de la protéine L1 plus accessibles pour la reconnaissance par le système immunitaire (revu dans (Campo et Roden, 2010)).

Ensuite, des vaccins ont été préparés avec des particules semblables au virus (VLP, Virus-Like Particles), des capsides vides formées de L1 seule ou de L1 et de la protéine mineure de la capside, L2. Lorsque produites en cellules eucaryotes, généralement en levure ou en cellules d'insectes, les protéines L1 ont la propriété de s'auto-assembler en capsides virales vides. Lorsque L2 est présente, elle est incorporée en petites quantités dans les capsides, de façon similaire à ce qui est observé dans les virions (Kirnbauer et al., 1992; Kirnbauer et al., 1993). Les vaccins qui sont maintenant distribués sont constitués de VLP. Deux versions sont disponibles dans plusieurs pays : un vaccin quadrivalent et un vaccin bivalent. Le premier, Gardasil®, est produit par la compagnie Merck Sharp and Dohme Corp. et protège contre les types à haut risque VPH16 et 18 ainsi que les types à bas risque VPH6 et 11 (Inglis et al., 2006). Il protège donc contre les types qui causent 70% des cas de cancer du col de l'utérus et ceux entraînant 90% des cas de condylomes (Wiley et Masongsong, 2006). Le deuxième est produit par la compagnie GlaxoSmithKline Inc. et protège contre les types 16 et 18. Il est commercialisé sous le nom de Cervarix® (Inglis et al., 2006). Les deux vaccins induisent une protection très efficace contre les types de VPH visés avec très peu d'effets secondaires. Par contre, ils protègent seulement contre les types de VPH inclus dans le vaccin et parfois partiellement contre des types très apparentés à ceux-ci. Par exemple, les vaccins contenant des VLP des types VPH16 et 18 protègent aussi partiellement contre les types 45 et 31 (Schiller et al., 2008). Ces vaccins visent principalement les jeunes filles avant qu'elles aient une vie sexuelle active, donc avant qu'elles soient exposées au virus, car ils n'ont pas d'effet bénéfique chez les personnes déjà

infectées. Des débats sont en cours pour déterminer si les jeunes hommes, chez qui les cancers dus au VPH sont beaucoup moins fréquents que chez les femmes, devraient aussi être vaccinés. Cette situation préviendrait non seulement les cas de cancers liés au VPH et les condylomes chez les hommes, mais permettrait aussi de réduire le nombre de cas d'infections chez les femmes en augmentant l'immunité collective (Castle et Scarinci, 2009). Malheureusement, la production de VLP en cellules eucaryotes est coûteuse, donc les vaccins ne peuvent pas être facilement distribués à grande échelle, surtout dans les pays en voie de développement.

Contrairement à la protéine L1, L2 induit une réponse immunitaire qui n'est pas restreinte à un type de virus. Des études avec des papillomavirus bovins (VPB) ont montré que la protéine L2 d'un type de papillomavirus induit la production d'anticorps neutralisants se liant à une séquence de 30 acides aminés dans la partie N-terminale de la protéine. Cet épitope est exposé à la surface du virion lorsque celui-ci se lie à son récepteur sur la cellule hôte. La partie N-terminale de L2, incluant l'épitope, doit être clivée par la furine pour permettre au virus de pénétrer dans la cellule. Les anticorps neutralisants empêchent ce clivage et bloquent donc l'entrée du virus et non son interaction avec le récepteur cellulaire. Comme cette séquence est fortement conservée parmi les types de papillomavirus, l'immunisation d'animaux avec L2 d'un type bovin permet la production d'anticorps capables de reconnaître la protéine L2 de types humains. Des vaccins peuvent être générés avec du L2 produit en bactéries et les animaux produisent une réponse immunitaire efficace et à large spectre. Lors d'une infection naturelle ou d'une injection de VLPs formées de L1 et L2, à cause de sa conformation peu accessible dans la capsid virale, le taux d'anticorps neutralisants contre L2 est faible. L'immunisation avec la protéine L2 recombinante seule permet une meilleure réponse sérologique (revu dans (Campo et Roden, 2010)). Des études ont également été effectuées avec un vaccin basé sur une protéine de fusion L2-E6-E7 de VPH16. Le but de ce vaccin est d'obtenir un effet à la fois prophylactique par la réponse contre L2 et thérapeutique par la réponse contre les oncogènes E6 et E7. Des études chez un modèle de souris ont montré que ce vaccin, administré avec un adjuvant, avait une efficacité prophylactique semblable à celle obtenue

avec Gardasil® pour les types VPH16 et 18, mais qu'il protégeait en plus contre plusieurs autres types. L'efficacité thérapeutique de ce vaccin reste à démontrer et le degré de spécificité de la réponse immunitaire cellulaire reste inconnu. Ce vaccin est très prometteur, d'abord pour sa protection contre plusieurs types de VPH, mais aussi pour son potentiel thérapeutique et son faible coût de production dû à la production de protéines recombinantes en bactéries (Karanam et al., 2009).

1.1.2 Description du virus

1.1.2.1 Structure du virion et organisation génomique

Les papillomavirus sont de petits virus à ADN double brin non enveloppés. Leur capsid, de forme icosaédrique, est formée par 2 protéines : L1, la protéine majeure de la capsid qui représente aussi 80% des protéines totales du virion, et L2, la protéine mineure. Leur génome est sous forme d'ADN circulaire double brin d'une taille d'environ 8000 paires de base (pb) et code pour 9 protéines.

Le génome est divisé en trois grandes régions : les gènes précoces, qui comprennent les cadres de lecture ouverts (ORFs, open reading frames) E1 à E8, les gènes tardifs L1 et L2 et la région régulatrice LCR (Long Control Region). Les ORFs précoces codent pour les protéines E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8. À l'origine, une autre région codante nommée E3 a été identifiée, mais la protéine n'a jamais été détectée. En général, seules 6 protéines virales précoces peuvent être détectées. Dans le cas de E8, l'ORF permet la synthèse d'une protéine de fusion de E8 avec la partie C-terminale de E2, nommée E8^{E2C}, mais cette protéine n'a été identifiée que dans certains types (VPB1, VPH16, 31, 33 et 11) (Stubenrauch et al., 2001). Les protéines tardives L1 et L2 sont les protéines qui forment la capsid et ne sont exprimées qu'aux dernières étapes du cycle viral, avant l'assemblage des virions (Zheng et Baker, 2006). Tous les ORFs sont compris sur le même brin d'ADN et donc un seul des deux brins sert de matrice pour la transcription. Deux promoteurs viraux sont principalement utilisés (voir Figure 1 page 11). Le premier est le promoteur précoce, nommé P₉₇ pour les types VPH16 et 31, selon sa position en nucléotides dans le génome. Il sert à l'expression des protéines précoces et est le promoteur le plus actif dans les cellules

non différenciées. Le deuxième promoteur, P₆₇₀ pour VPH16 ou P₇₄₂ pour VPH31, est activé avec la différenciation des cellules et induit l'expression des protéines virales tardives. Il est situé dans la séquence codante du gène E7 et permet l'expression des protéines L1 et L2, mais aussi E4 et E1 (Howley, 2001; Zheng et Baker, 2006). Les histones cellulaires s'associent au génome viral pour former une structure semblable à la chromatine et sont encapsidées avec celui-ci lors de l'assemblage des virions (Favre et al., 1977). La présence de ces histones sous forme de nucléosomes liés à l'ADN viral permet la régulation de l'expression des protéines au cours du cycle viral alors que l'état d'activation de la chromatine varie (Stunkel et Bernard, 1999; Wooldridge et Laimins, 2008).

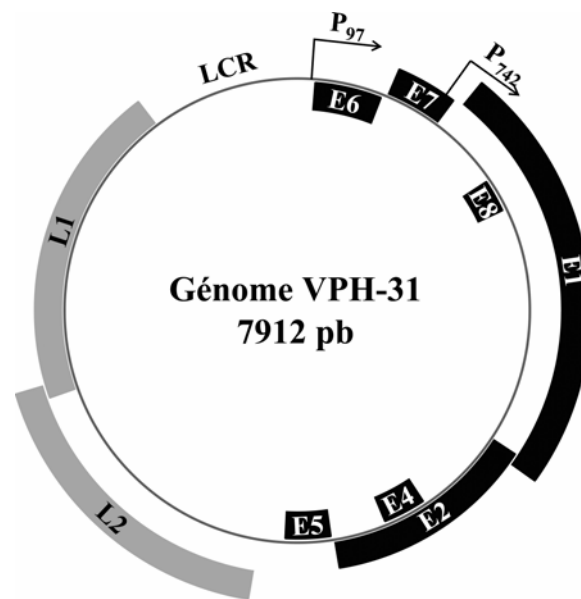


Figure 1. Représentation du génome de VPH31.

Les gènes précoces sont représentés par des boîtes noires et les gènes tardifs par des boîtes grises. La position des promoteurs P₉₇ et P₇₄₂ sont indiqués par des flèches. LCR : Long Control Region, pb : paires de bases.

Le LCR, ou longue région de contrôle, contient l'origine de réplication virale et une séquence auxiliaire comprenant des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription. Cette portion du génome est aussi appelée URR (upstream regulatory region) ou région régulatrice en amont. Elle se situe en amont du promoteur précoce (P₉₇ pour VPH16 et 31) et en aval de la séquence codante de L1. L'origine de réplication du VPH comprend une région de liaison à E1, composée de paires de séquences répétées inversées pour permettre la formation d'un double hexamère de E1 sur l'ADN, et trois sites de liaison pour E2. Elle est située tout près du promoteur précoce (Frattini et Laimins, 1994b; Chen et Stenlund, 2001). Le LCR contient un quatrième site de liaison à E2, situé à l'autre extrémité de la région, en aval de L1. Entre l'origine et ce 4^e site de liaison à E2 se trouve une séquence amplificatrice qui permet la liaison de plusieurs facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs cellulaires Sp1, AP-1, Oct1, NF-1 et YY1 (del Mar Pena et Laimins, 2002).

1.1.2.2 Protéines virales

E1 est la seule protéine virale qui possède une activité enzymatique. Elle se lie à l'origine de réplication virale avec l'aide de la protéine E2 et utilise son activité hélicase/ATPase pour dérouler l'ADN et permettre à la machinerie de réplication de l'hôte de répliquer l'ADN viral. Cette protéine est le sujet principal de ce mémoire et sera décrite plus en détail dans la section 1.2 (voir page 21).

La protéine E2, en plus d'être essentielle à la réplication du génome viral *in vivo*, est un régulateur de transcription et permet la ségrégation de l'épisome lors de la division cellulaire. Elle est composée d'un domaine de transactivation et d'un domaine de liaison à l'ADN qui sont séparés par une région charnière qui varie entre les types de papillomavirus. Elle reconnaît des séquences dans l'origine de réplication et en interagissant avec E1, lui permet de se lier de façon spécifique à ses séquences cibles dans l'origine. Le LCR des VPH contient 4 sites auxquels E2 se lie sous forme de dimère. Ce régulateur de transcription peut être un activateur ou un répresseur, selon le site auquel il se lie dans le LCR, ses interactions avec d'autres régulateurs de transcription et sa concentration dans la cellule. E2 possède des affinités différentes pour ses sites de liaison,

c'est pourquoi sa concentration dans la cellule est importante pour ses activités. Ainsi, à faible concentration, E2 se lie à un site et active la transcription du promoteur précoce, alors qu'à forte concentration, sa liaison à d'autres sites pour lesquels il a moins d'affinité réprime la transcription (Howley, 2001; Hegde, 2002). Une autre fonction de E2 est d'assurer le maintien du génome viral dans les cellules en induisant la ségrégation des copies de l'épisome lors de la mitose. Chez le VPB, E2 se lie à un élément de maintien (MME, Minichromosome maintenance element) dans le LCR du génome viral qui est composé de plusieurs sites de liaison à E2 (Piiirsoo et al., 1996). Le génome viral est ensuite lié aux chromosomes mitotiques par l'interaction de E2 avec Brd4, une protéine cellulaire qui se lie aux histones acétylées. D'autres facteurs jouent un rôle dans l'attachement du génome viral au chromosome, mais leur rôle est encore peu connu (revu dans (You, 2009)).

La protéine E4 est exprimée en fusion avec les premiers acides aminés de E1. Cette protéine est donc nommée E1^{E4}. Elle est la protéine virale qui est le plus abondamment exprimée dans un épithélium infecté. Elle est principalement exprimée par le promoteur tardif avec la différenciation des cellules lors de la phase d'amplification du génome, mais elle est exprimée avant les protéines de la capsid L1 et L2 (Howley, 2001). Son rôle dans le cycle viral n'est pas encore clairement défini. Elle serait importante pour l'amplification du génome viral et pour l'expression des gènes tardifs chez les types CRPV, VPH18 et 31. Par contre, chez le type VPH11, E1^{E4} n'aurait aucun effet significatif sur l'amplification du génome (Wilson et al., 2007). Chez VPH16, E1^{E4} est importante pour l'amplification de l'épisome, mais aurait aussi d'autres rôles comme l'altération de la différenciation des cellules, l'arrêt du cycle cellulaire avant la mitose (en phase G₂/M) et l'induction de l'apoptose (Nakahara et al., 2005). E1^{E4} peut aussi s'associer au réseau de kératine de la cellule et le fragiliser. Cette dernière propriété, combinée à l'activation de l'apoptose via l'altération du potentiel de membrane des mitochondries, pourrait permettre la relâche des virions nouvellement assemblés des cellules cornées des couches supérieures de l'épithélium (Raj et al., 2004). Il a été suggéré que l'arrêt en phase G₂, combiné à l'activation par E7 de certains gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN, mène à l'arrêt de la réplication de l'ADN de la cellule tout en permettant celle du génome viral (Davy et

al., 2002; Nakahara et al., 2002). Les fonctions de E1^{E4} semblent varier entre les différents types de VPH, tout comme sa séquence qui est peu conservée.

Le mécanisme d'action de la protéine E5 est encore peu connu, malgré les nombreuses publications à ce sujet dans les dernières années. Elle est considérée comme une oncoprotéine. Son rôle dans la transformation des cellules infectées a été proposé il y a plus de 20 ans pour le VPB (Schiller et al., 1986). E5 est le gène transformant majeur chez le VPB, mais il joue un rôle plus mineur chez le VPH, où le principal gène transformant est E7 (Howley, 2001). Dans plusieurs cas de cancers liés au VPH, E5 n'est plus exprimée car sa séquence codante est interrompue lors de l'intégration du génome viral. Son activité transformante doit donc avoir lieu aux stades précoces du développement du cancer. E5 est une protéine hydrophobe qui s'insère dans les membranes de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et dans les membranes nucléaire et cytoplasmique. Plusieurs rôles lui ont été attribués. D'abord, la protéine E5 du VPH active les voies de signalisation par le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR, epidermal growth factor receptor), ce qui mène à une augmentation de la prolifération cellulaire. Elle semble aussi stimuler indirectement les oncogènes c-jun, junB et c-fos via l'activation de facteurs de transcription communs comme AP-1 et NF-1. Étant donné que la région LCR du VPH contient des sites de liaison pour ces activateurs, E5 peut aussi activer indirectement la transcription des gènes viraux dont les oncogènes E6 et E7. Elle semble également inactiver le suppresseur de tumeurs p21, ce qui mène à une augmentation de la prolifération cellulaire (Tsai et Chen, 2003). Lorsque localisée à la membrane plasmique, E5 peut causer la fusion de deux cellules pour créer une cellule binucléée (Hu et Ceresa, 2009). Elle contribue aussi, avec E6, à la formation de koilocytes, c'est-à-dire de cellules dont le noyau est élargi et entouré de grandes vacuoles. Les koilocytes sont des cellules caractéristiques des lésions précancéreuses qui sont détectées par le test Pap (Krawczyk et al., 2008). Une étude du profil d'expression génique dans des cellules exprimant E5 de VPH16 a montré une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la présentation des antigènes, la différenciation et l'adhésion des cellules et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la motilité et la prolifération cellulaire (Kivi et al., 2007). Finalement, E5 a aussi été associée à la diminution de l'expression des gènes HLA de type I (donc des

molécules de CMH-I), à l'altération du processus d'acidification des endosomes et à l'inhibition de l'apoptose médiée par TRAIL et FasL (Kabsch et al., 2004; Disbrow et al., 2005; Ashrafi et al., 2006). La protéine E5 semble donc jouer plusieurs rôles dans les cellules infectées qui peuvent faciliter le développement de tumeurs.

La protéine E6 est une oncoprotéine importante pour la transformation des cellules infectées par le VPH. Sa fonction principale chez les virus à haut risque est d'induire la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 par le protéasome et ainsi d'inhiber l'apoptose de la cellule. E6 lie p53 et recrute une ubiquitine ligase nommée E6AP, qui polyubiquitinye p53 pour induire sa dégradation par le protéasome 26S. Lorsque p53 est inactivée, le processus de réparation des dommages à l'ADN est affecté, ce qui cause une instabilité génomique et peut mener au développement de tumeurs. L'oncogène E6 a aussi des propriétés anti-apoptotiques indépendantes de p53, notamment via l'inhibition de Bax et du récepteur du facteur de nécrose des tumeurs TNF1 (Tumor necrosis factor 1). E6 des virus à bas risque peut aussi lier p53, mais avec une faible affinité et n'induit pas sa dégradation car elle ne lie pas E6AP (Zanier et al., 2005). Elle séquestrerait plutôt p53 au cytoplasme de la cellule et empêcherait ainsi son action (Sun et al., 2008). Chez les types à haut risque, il existe une forme tronquée de E6, nommée E6*, produite par épissage alternatif des ARNm. La forme E6* inhibe les fonctions de la protéine E6 pleine longueur en la liant et en empêchant son interaction avec E6AP. E6 joue aussi un rôle dans l'immortalisation des cellules en activant la transcription du gène de la télomérase hTERT, dont le promoteur est normalement inactif dans les cellules somatiques. L'activation de hTERT empêche le raccourcissement des télomères avec les divisions cellulaires, qui mène habituellement à la sénescence des cellules. Les protéines E6 des types à haut risque contiennent un motif de liaison aux domaines PDZ, un domaine contenu dans plusieurs protéines impliquées notamment dans la polarité des cellules ou l'intégrité des jonctions cellulaires. Ces protéines sont inactivées par E6, ce qui induit l'hyperplasie des cellules. De plus, la production d'interféron et de certaines autres cytokines est inhibée par E6, diminuant ainsi la réponse immunitaire dirigée contre les cellules infectées (revue dans (Ganguly et Parihar, 2009; Lehoux et al., 2009; Yugawa et Kiyono, 2009)).

L'autre oncoprotéine des papillomavirus, E7, a pour principal rôle l'inactivation de la protéine du rétinoblastome (pRb) qui inhibe normalement l'hyperprolifération des cellules. La fonction de pRb est de bloquer l'entrée en phase S du cycle cellulaire en liant et inhibant les facteurs de transcription E2F. Ces facteurs activent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. En liant et provoquant la dégradation de pRb, E7 induit alors une hyperprolifération des cellules. Elle active aussi la transcription dépendante de E2F en inhibant les corépresseurs HDAC (complexes de déacétylation des histones), ce qui permet l'action de E2F. E7 active également les kinases cycline A/CDK2 et cyclineE/CDK2, qui phosphorylent pRb et induisent le relâchement et l'activation de E2F. De plus, elle bloque l'action des protéines inhibitrices de CDK p21 et p27. Tous ces mécanismes ont pour effet de stimuler la prolifération des cellules infectées via les facteurs de transcription E2F. E7 active aussi indirectement la kinase Akt, qui régit des signaux de survie cellulaire. Comme E6, elle inhibe la production d'interférons et la réponse immunitaire antivirale. De plus, elle induit une duplication incontrôlée des centrosomes, ce qui mène à des divisions cellulaires asymétriques et à l'aneuploïdie (Ganguly et Parihar, 2009; Yugawa et Kiyono, 2009). Une étude récente suggère que E7 mène à une diminution de l'expression de miR-203, un miARN qui réprime la prolifération des kératinocytes en différenciation en diminuant l'expression du facteur de transcription p63 (Melar-New et Laimins, 2010). Donc, E7 a plusieurs fonctions qui mènent toutes à une augmentation de la prolifération des cellules infectées.

L'ORF E8 permet l'expression d'une protéine chimérique E8^{E2C}, qui comprend la séquence en acides aminés de E8 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de E2. Cette protéine inhibe la transcription par le promoteur viral précoce ainsi que la réplication de l'ADN viral en se liant aux sites de liaison à E2 chez les types VPB1, VPH16 et 31. Elle est importante pour le maintien de l'épisome à long terme pour le type VPH31, mais pas pour le type VPH16 (Stubenrauch et al., 2000; Lace et al., 2008). Chez VPH31, la portion E8 de E8^{E2C} est constituée d'à peine 12 acides aminés, mais sa séquence semble contribuer à la répression de la transcription (Stubenrauch et al., 2007). Le rôle précis du gène E8 dans le cycle viral reste à déterminer.

Les protéines structurales des papillomavirus sont L1 et L2. Elles forment la capsid virale, dans laquelle L1 est la protéine majeure. L'attachement du virus à la cellule hôte se fait via L1. La liaison de L1 à son récepteur induit un changement de conformation de la capsid qui rend L2 plus accessible. La furine, une proprotéine convertase, clive alors la portion N-terminale de L2. La fonction exacte de ce clivage n'est pas encore connue, mais il facilite l'infection. Il permet éventuellement l'attachement de L2 ou de L1 à un récepteur secondaire en induisant un second changement de conformation de la capsid. L2 joue possiblement un rôle dans le transport du génome viral de l'endosome vers le noyau en régissant la sortie de l'endosome et en liant la dynéine pour transporter le génome au noyau via les microtubules (Pereira et al., 2009). Il a aussi été suggéré que L2 joue un rôle dans l'encapsidation du génome en liant l'ADN (Zhou et al., 1994). De plus, L2 interagit avec E2 et la relocalise dans des sous-domaines nucléaires nommés domaines oncogènes de leucémie promyélocytaire ou PODs, ce qui inhibe l'activité de transactivation de E2, mais pas la réplication de l'ADN viral (Heino et al., 2000).

1.1.2.3 Cycle viral

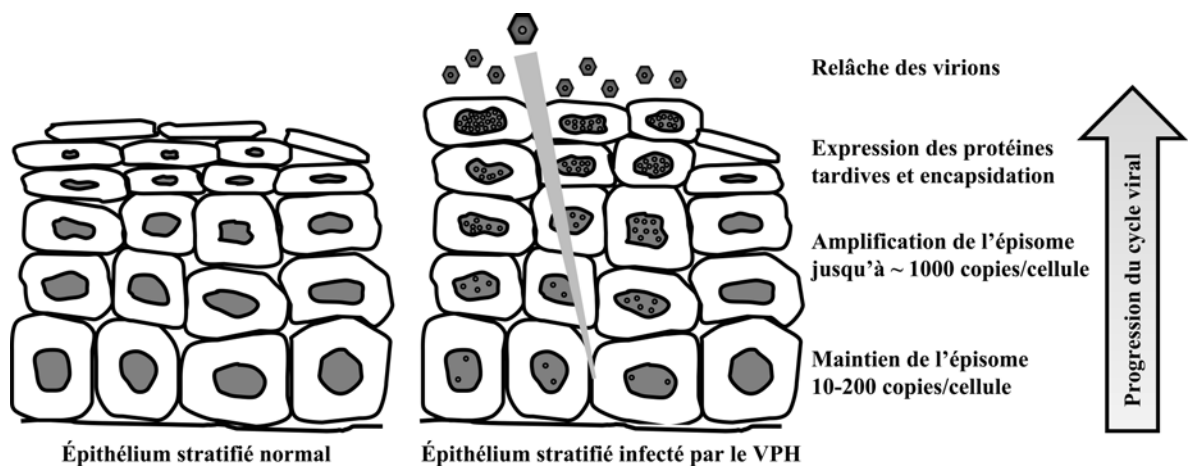


Figure 2. Progression du cycle viral avec la différenciation des kératinocytes.

Représentation schématique d'un épithélium stratifié normal ou infecté par le VPH. Les principales étapes du cycle viral sont indiquées selon le stade de différenciation des cellules.

Le cycle viral des papillomavirus est directement lié à la différenciation de l'épithélium qu'ils infectent. Le virus doit atteindre les cellules basales de l'épithélium stratifié, qui se divisent activement, pour causer une infection productive. L'infection se fait souvent via des microlésions dans la peau ou la muqueuse (Doorbar, 2005). Le col de l'utérus possède une morphologie tissulaire particulière qui le rend fortement susceptible aux infections au VPH. Il existe une région sur le col nommée zone de transformation où deux types d'épithélium se rencontrent : l'épithélium cylindrique du canal utérin et l'épithélium pavimenteux de l'extérieur du col. Comme l'épithélium cylindrique ne comprend qu'une seule couche de cellules, l'accès du virus aux cellules basales de l'épithélium stratifié est facilité à la jonction entre les deux types de tissus. Il semble aussi que la zone de transformation ait un métabolisme de l'œstrogène particulier qui mène à la production de métabolites génotoxiques, ce qui la rend plus susceptible au développement de cancers (Elson et al., 2000). Les mécanismes d'attachement et de décapsidation du virion sont encore peu connus. L'attachement du virus à la cellule hôte se fait par l'interaction de la protéine virale L1 avec des molécules de protéoglycan d'héparan sulfate. Le récepteur cellulaire est encore inconnu, bien qu'il ait été suggéré auparavant que ce soit l'intégrine $\alpha 6$ (Evander et al., 1997; Joyce et al., 1999). L'internalisation du virion se fait ensuite par endocytose via des vésicules de clathrine, de cavéoline ou un autre type de vésicule. Le type d'endocytose utilisé semble varier selon les types de virus. La décapsidation du virion a lieu dans les vésicules, possiblement par un processus d'acidification des endosomes (Sapp et Bienkowska-Haba, 2009). L'ADN viral est ensuite transporté au noyau, possiblement via L2. Il est par la suite maintenu dans le noyau des cellules basales à environ 10 à 200 copies par cellule. Ce processus de maintien nécessite l'expression de E1 et de E2 pour permettre la réplication du génome et sa ségrégation avec les divisions cellulaires. Il est possible que les protéines virales E6 et E7 soient faiblement exprimées à cette étape et induisent la prolifération des cellules infectées. Avec la division des cellules basales, les cellules filles migrent peu à peu vers les couches suprabasales du tissu. Dans un épithélium normal, ces cellules entament un processus de différenciation terminale qui mène à la formation d'enveloppes cornées constituées de kératine à la surface

de l'épiderme. Dans les cellules infectées, les oncoprotéines virales ralentissent ce processus. Le promoteur précoce est activé dans les cellules suprabasales, ce qui permet l'expression de E6 et E7 qui stimulent la prolifération en activant la phase S du cycle cellulaire. Les autres protéines précoces, dont E1 et E2, sont aussi exprimées et permettent le maintien du génome viral. Ensuite, la phase d'amplification du génome a lieu dans les couches supérieures. Le promoteur tardif est activé, ce qui augmente l'expression des protéines E1, E2, E4 et E5 et stimule la réplication de l'ADN viral. Bien que leur rôle ne soit pas clairement défini, les protéines E4 et E5 sont importantes pour l'amplification du génome. Le nombre de copies du génome viral par cellule augmente de façon substantielle, pouvant atteindre des milliers (Klumpp et Laimins, 1999; Doorbar, 2005). Une fois le génome viral amplifié, les protéines tardives L1 et L2 sont produites dans les couches supérieures de l'épithélium et s'assemblent pour former des capsides dans lesquelles une copie du génome est encapsidée. Finalement, les cellules contenant les virions continuent leur différenciation et les virions produits sont relâchés à la surface de l'épithélium par desquamation. Les virions sont alors protégés par une enveloppe cornée et sont résistants à la dessiccation. Ils peuvent ensuite être libérés de leur enveloppe, qui est fragilisée par rapport à celles formées à partir de cellules normales, par des actions mécaniques (Bryan et Brown, 2001; Doorbar, 2005).

Dans plusieurs cas de cancers, le génome viral est retrouvé sous forme intégrée dans les chromosomes des cellules hôtes. Par contre, cette intégration n'est pas une étape normale du cycle viral. Elle nuit plutôt à la progression du cycle car elle a pour conséquence la délétion d'une partie du génome viral. Le mécanisme menant à l'intégration du génome du virus n'est pas connu, mais semble se faire de façon aléatoire à des sites de coupures double brin dans le génome de l'hôte. Dans la plupart des cas, l'intégration mène à la perte de l'expression de la protéine E2. Comme E2 est un répresseur de la transcription des oncogènes, l'intégration permet l'expression constitutive de E6 et E7 dans les cellules basales de l'épithélium. La transformation et l'immortalisation des cellules est alors facilitée par l'intégration du génome viral, plus particulièrement dans les cellules basales de

l'épithélium qui n'expriment habituellement pas ou peu les oncoprotéines E6 et E7 (revu dans (Pett et Coleman, 2007)).

1.1.2.4 Modèles d'étude

L'étude des papillomavirus en laboratoire est compliquée par le fait qu'ils infectent des épithéliums stratifiés en différenciation. Des animaux peuvent être utilisés pour l'étude de leurs papillomavirus respectifs, par exemple le lapin pour le CRPV ou les bovins pour le VPB. Des papillomavirus infectant la souris ou le rat de laboratoire ne sont pas encore caractérisés, ce qui complique aussi l'étude avec des animaux. Pour contrer ce problème, des modèles de souris transgéniques ont été développés pour étudier le VPH. Par exemple, il existe des souris exprimant E6 et/ou E7 ou toute la région des gènes précoces sous un promoteur spécifique aux kératinocytes. Bien que ces modèles soient très utiles pour l'étude des oncogènes du VPH, ils ne sont pas représentatifs de l'infection virale. Des cellules humaines en culture en monocouche peuvent être utilisées pour étudier plusieurs aspects du cycle viral en induisant l'expression de protéines virales dans ces cellules. Par exemple, la réplication du génome viral a lieu sans problème dans des cellules non différenciées en présence du génome d'un VPH dans lesquelles les protéines précoces sont exprimées. Par contre, ce type de culture ne permet pas d'étudier les phases tardives du cycle viral ni de produire des virions. Des modèles utilisant des cellules en culture ont donc été développés pour étudier ces étapes. Le premier utilise des cultures organotypiques générées à partir de kératinocytes primaires transfectés avec le génome d'un VPH. La méthode consiste à faire croître les kératinocytes en présence de cellules nourricières et les placer à une interface air-liquide. Les cellules forment alors un épithélium pavimenteux stratifié dans lequel le cycle viral complet peut avoir lieu, bien qu'une petite proportion de cellules seulement permette la réplication complète. L'autre méthode consiste à induire la différenciation de kératinocytes transfectés avec le génome viral dans un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose. La différenciation des cellules permet l'expression des gènes tardifs et l'amplification du génome viral. Elle permet donc d'étudier des étapes du cycle viral qui ne peuvent pas être reconstituées dans des cellules non différenciées (Lowy, 2001).

1.2 Présentation de l'hélicase E1

La protéine E1 des papillomavirus est une hélicase essentielle à la réplication du génome viral. Sa séquence en acides aminés peut être divisée en trois régions : une région régulatrice amino (N)-terminale, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine enzymatique.

1.2.1 Structure en domaines

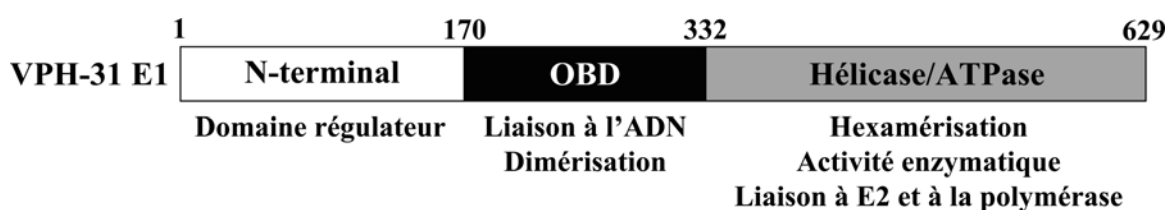


Figure 3. Représentation schématique de la protéine E1 de VPH31 avec les 3 régions et leurs principales fonctions.

Les acides aminés délimitant chaque région sont indiqués. OBD : Origin-binding domain, domaine de liaison à l'origine.

1.2.1.1 Région régulatrice N-terminale

La région N-terminale de la protéine E1 comprend les 170 premiers acides aminés pour le type VPH31. Elle comprend principalement des séquences régulatrices et n'est pas essentielle à la réplication de l'ADN viral *in vitro* (Amin et al., 2000). Elle contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) en deux parties qui permet l'entrée de E1 au noyau via des importines (Lentz et al., 1993; Yu et al., 2007). Bien que la fonction de E1 requière sa localisation au noyau, elle est constamment exportée au cytoplasme via une séquence d'export nucléaire (NES). Ce mécanisme est contrôlé par des kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui phosphorylent E1 en phase S du cycle cellulaire et bloquent son export au cytoplasme. Le transport continu de E1 entre le noyau et le cytoplasme sert alors de mécanisme de régulation de la réplication du génome viral. La portion N-terminale de

E1 contient donc une région de régulation de la localisation intracellulaire qui contient un NLS en deux parties, un NES, un motif de liaison aux cyclines (CBM, cyclin binding motif) et des sites de phosphorylation par les CDK (Deng et al., 2004).

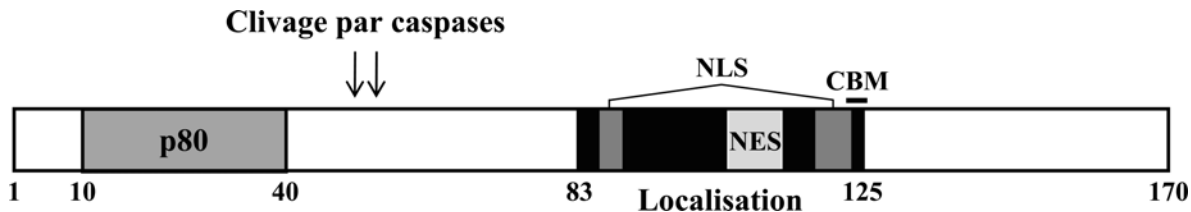


Figure 4. Représentation schématique de la région N-terminale de E1 du type VPH31.

Le domaine de liaison à p80, les sites de clivage par les caspases et le module de localisation sont représentés. Les acides aminés délimitant les différentes régions sont indiqués. Les séquences de localisation nucléaire (NLS) et d'export nucléaire (NES) sont représentées par des boîtes gris foncé et gris pâle, respectivement. Le motif de reconnaissance par les cyclines (CBM) est représenté par un trait noir.

Cette région contient aussi un site de liaison à la protéine cellulaire p80 (ou WDR48) situé entre les acides aminés 10 et 40 chez VPH11 et 31. Le rôle de cette protéine n'est pas bien connu, mais son interaction avec E1 est importante pour le maintien du génome viral dans les kératinocytes (Côté-Martin et al., 2008). De plus, E1 contient un double site de clivage par les caspases 3 et 7 (DxxDxxD), situé aux acides aminés 46 à 52 chez VPH31, qui est conservé chez les types génitaux de VPH. Les caspases, qui sont activées lors de la différenciation des kératinocytes infectés par le VPH31, clivent la portion N-terminale de E1. Ce clivage est important pour l'amplification du génome viral dans les kératinocytes en différenciation (Moody et al., 2007).

1.2.1.2 Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN (OBD pour Origin binding domain ou DBD pour DNA binding domain) de E1 reconnaît les sites de liaison à E1 dans l'origine de réplication

virale. Par elle-même, la protéine E1 lie l'ADN avec une faible affinité et une faible spécificité, c'est pourquoi l'interaction avec E2, qui lie aussi l'origine mais de façon plus spécifique et avec une forte affinité, est importante pour le recrutement de E1 à l'origine. Ce domaine permet aussi la formation de dimères de E1 sur l'ADN par l'interaction des DBD de deux protéines (Titolo et al., 2003).

1.2.1.3 Domaine enzymatique (hélicase/ATPase)

Le domaine C-terminal est le domaine qui confère son activité enzymatique à E1. Il comprend des régions de forte similarité (nommées A, B, C et D) avec l'antigène grand T (Large T Antigen) du virus SV40, avec qui E1 partage plusieurs caractéristiques. De plus, les régions B et C comprennent des motifs d'homologie avec les NTPases SF3 (superfamily 3) nommés a, b et c. Les motifs a et b correspondent aux motifs communs de liaison à l'ATP Walker A et B. La région A est comprise dans la séquence requise pour l'oligomérisation de E1 menant à la formation d'hexamères de E1. Les activités enzymatiques (ATPase et hélicase) nécessitent l'hexamérisation de E1 ainsi que la présence des régions A à D (White et al., 2001). E1 se déplace sur l'ADN dans la direction 3' → 5' pour le dérouler et permettre sa réplication (Seo et al., 1993). Ce domaine comprend aussi une région de liaison au domaine de transactivation de la protéine virale E2, ainsi qu'à l'ADN polymérase α -primase (ADN pol α). La liaison dans cette région de E1 est compétitive pour E2 et l'ADN pol α , donc E2 doit être déplacé de E1 pour permettre la liaison de la polymérase et la réplication de l'ADN (Masterson et al., 1998).

1.2.2 Rôle dans la réplication de l'ADN viral

1.2.2.1 Liaison à l'origine de réplication virale

L'origine de réplication du génome des VPH contient 3 sites de liaison pour E2, une région de liaison à E1 et une région riche en adénine et en thymine (AT) caractéristique de l'origine. Seule, la protéine E1 lie l'origine de réplication avec une faible spécificité et une faible affinité. L'interaction de E1 avec E2 ainsi que la liaison de E2 à un des sites

spécifiques dans l'origine virale augmentent grandement l'affinité et la spécificité de la liaison de E1 à l'ADN (Frattini et Laimins, 1994a; Stenlund, 2003). La région de liaison à E1 comprend 2 paires de séquences de 6 nucléotides qui se chevauchent (voir Figure 5 ci-dessous). Dans chacune des paires, les séquences reconnues par E1 sont séparées par 3 nucléotides, ce qui est optimal pour la dimérisation. Un premier dimère de E1 se lie aux sites 2 et 4 pour lesquels E1 a une forte affinité, puis un autre dimère peut se lier aux sites 1 et 3, avec une plus faible affinité (Chen et Stenlund, 2001). La protéine E2 est détachée du complexe par un processus dépendant de l'ATP et un premier modèle suggère que d'autres molécules de E1 s'ajoutent à celles déjà liées sur l'origine de réplication (Sanders et Stenlund, 1998). Un autre modèle d'assemblage du double hexamère suggère que E1 peut lier l'ADN sous forme de dimère en liant des sites de liaison inversés et sous forme de trimère via son domaine hélicase. Il y aurait alors formation de deux doubles trimères, un sur chaque paire de sites de liaison à E1, qui s'assembleraient ensuite ensemble pour former un double hexamère (Schuck et Stenlund, 2005).

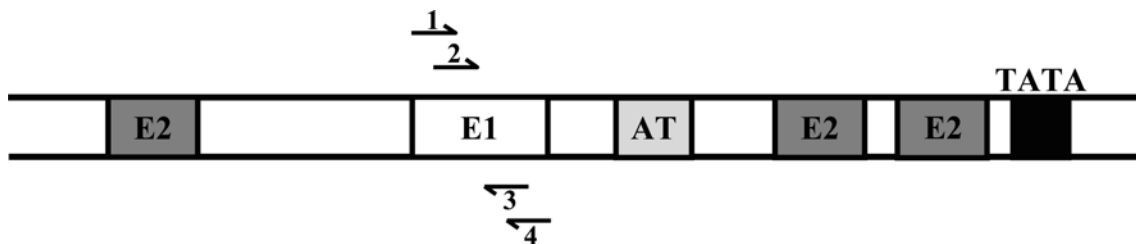


Figure 5. Représentation schématique des sites de liaison à E1 et à E2 dans l'origine de réplication du VPH.

Les sites de liaison à E1 sont représentés par des flèches dans la région de liaison à E1 (E1), les sites de liaison à E2 par des boîtes gris foncé (E2), la région riche en AT par une boîte gris pâle (AT) et la boîte TATA du promoteur précoce par une boîte noire.

1.2.2.2 Activités enzymatiques

Il a récemment été démontré que chacun des deux hexamères se forme autour d'un brin d'ADN opposé à l'autre hexamère. Le génome viral sous forme d'épisome est alors

déroulé de façon bidirectionnelle grâce à l'activité hélicase du double hexamère de E1. Chaque monomère de E1 possède une petite structure en épingle (β -hairpin) dans son domaine ATPase qui est dirigée vers l'ADN simple brin dans l'hexamère et peut lier un nucléotide. La translocation de l'ADN dans l'hexamère de E1 se fait par un mouvement de ces boucles en forme d'épingle qui est coordonné avec l'hydrolyse de l'ATP et fait passer les nucléotides un à un dans la structure hexamérique (Enemark et Joshua-Tor, 2006). Le β -hairpin serait aussi responsable de la dénaturation initiale des deux brins d'ADN (Schuck et Stenlund, 2005). Dès que l'ADN viral est dénaturé, il peut être répliqué par la machinerie de réplication de l'ADN de la cellule hôte.

1.2.2.3 Interactions avec la machinerie de réplication de l'hôte

Comme E1 est la seule protéine du VPH qui possède une activité enzymatique et qu'elle peut seulement reconnaître et dérouler le génome viral, la machinerie de réplication de l'ADN de la cellule hôte est essentielle pour le cycle viral du VPH. E1 interagit avec l'ADN polymérase α -primase et la recrute sur l'ADN simple brin (Park et al., 1994). Cette dernière peut alors initier la réplication du génome viral en synthétisant des amorces d'ARN sur le brin d'ADN retardé (Burgers, 1998). E1 lie et recrute également la protéine de réplication RPA (replication protein A) (Han et al., 1999; Loo et Melendy, 2004) et la topoisomérase I (TopoI) (Clower et al., 2006). RPA est une protéine essentielle à la réplication de l'ADN viral (Melendy et al., 1995). Elle contribue au déroulement de l'ADN double brin, au recrutement de l'ADN pol α et à la stabilisation de l'ADN simple brin à la fourche de réplication (Iftode et al., 1999). La topoisomérase I, également essentielle à la réplication du génome viral, induit des coupures simple brin dans l'ADN pour diminuer la tension causée par la torsion de l'ADN lors de sa dénaturation (Champoux, 2001; Clower et al., 2006). D'autres facteurs cellulaires sont essentiels à la réplication de l'ADN viral, dont l'ADN polymérase δ qui est responsable de la synthèse à partir du brin directeur de l'ADN, ainsi que le facteur de réplication C (RFC) et la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui jouent un rôle dans le recrutement et la réplication par l'ADN pol δ (Melendy et al., 1995).

1.2.2.4 Essais de réplication de l'ADN viral disponibles

La réplication transitoire de l'ADN des papillomavirus peut être mesurée *in vitro* dans un système reconstitué ou dans des cellules en culture. La réplication d'un plasmide comprenant la séquence de l'origine de réplication ou de la région LCR complète (plasmide-ori) du type de virus à étudier est mesurée en présence des protéines virales E1 et E2 correspondantes. L'utilisation d'un tel plasmide en remplacement du génome viral complet permet de mesurer seulement la réplication de l'ADN, indépendamment de sa ségrégation avec les divisions cellulaires, ainsi que d'éliminer l'effet des autres protéines virales précoces qui pourraient être exprimées à partir du génome.

La réplication d'un plasmide sous le contrôle de l'origine virale peut être mesurée *in vitro* dans un système en absence de cellules (Kuo et al., 1994). Le plasmide est alors incubé en présence des protéines E1 et E2 purifiées et d'extraits cellulaires qui fournissent les facteurs de l'hôte nécessaires à la réplication de l'ADN viral. Un nucléotide marqué radioactivement ajouté à la réaction permet ensuite la détection de l'ADN répliqué après une migration sur gel d'agarose. Cette méthode est fastidieuse car elle nécessite la purification de protéines et nécessite de la radioactivité pour la détection.

La réplication transitoire de l'ADN viral peut aussi être mesurée dans des cellules en culture en monocouche. Bien que les méthodes varient légèrement d'un laboratoire à l'autre, le principe de base reste le même (Lusky et Botchan, 1986; Taylor et Morgan, 2003). Un plasmide-ori ainsi que des vecteurs d'expression pour les protéines virales E1 et E2 sont transfectés dans les cellules. Après une incubation de quelques jours, l'ADN est extrait, parfois par une extraction qui favorise l'enrichissement en molécules d'ADN de faible poids moléculaire comme les plasmides, pour détecter l'ADN répliqué. L'ADN extrait est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI afin d'éliminer les plasmides transfectés. Cette enzyme ne peut digérer que l'ADN méthylé Dam⁺, une modification retrouvée spécifiquement sur l'ADN produit en bactéries, comme l'ADN de départ présent dans l'essai. L'ADN répliqué est alors détecté par hybridation de type Southern (Lusky et Botchan, 1986; Chiang et al., 1992; Del Vecchio et al., 1992) ou par PCR quantitatif (Taylor et Morgan, 2003). Ces méthodes sont laborieuses car elles comprennent plusieurs

étapes et nécessitent de grandes quantités de cellules. Elles sont donc des techniques à faible débit. De plus, elles nécessitent en général des réactifs toxiques comme du phénol/chloroforme et des molécules marquées radioactivement. Il a donc été entrepris, pour la première partie de ce projet de recherche, de développer un essai à haut débit de réplication transitoire de l'ADN. Cet essai, qui est présenté dans l'article 1 de ce mémoire, simplifie grandement l'étude de la réplication de l'ADN du VPH et permet de tester plusieurs conditions expérimentales différentes dans une seule expérience.

1.2.3 Interactions et modifications de l'hélicase E1

1.2.3.1 Interactions avec d'autres protéines

L'hélicase E1 des papillomavirus interagit avec plusieurs protéines en plus de E2, l'ADN pol α , RPA et TopoI, décrites dans les sections précédentes (voir sections 1.2.1.3 page 23 et 1.2.2.3 page 25). D'autres interactions avec des protéines comme l'histone H1, le complexe de remodelage des histones SWI/SNF et les chaperones Hsp40 et 70 facilitent l'activité de E1. Le génome des papillomavirus est associé aux histones de la cellule hôte, dont l'histone H1, pour former une structure chromatinienne. La présence de nucléosomes inhibe la réplication de l'ADN viral et ils doivent donc être déplacés pour l'initiation de la réplication (Li et Botchan, 1994). La portion N-terminale de E1 (acides aminés 1-185 chez VPH11) lie l'histone H1 et peut la déplacer de l'origine virale (Swindle et Engler, 1998). Le complexe SWI/SNF altère la chromatine pour faciliter entre autres l'accès de la machinerie de transcription à l'ADN. La sous-unité Ini1/hSNF5 interagit avec E1 et cette interaction est importante pour la réplication de l'ADN viral. La région de E1 ayant été identifiée pour l'interaction avec hSNF5 comprend le DBD ainsi que des portions de la région N-terminale et du domaine enzymatique (entre les acides aminés 147 et 444). Il semble que cette interaction facilite l'initiation de la réplication du génome viral en rendant l'ADN accessible à la machinerie (Lee et al., 1999). Les chaperones Hsp40 et Hsp70 interagissent aussi avec E1. Elles favorisent sa liaison à l'ADN viral et la formation d'un double hexamère (Liu et al., 1998). Il a été suggéré que Hsp70 facilite la liaison de E1 à

l'origine en dissociant les complexes de E1 préformés, ce qui libère des monomères qui peuvent ensuite s'assembler un à un sur l'ADN. Hsp40 pourrait ensuite favoriser la formation d'un double hexamère. Les chaperones peuvent aussi permettre de détacher E2 du complexe de réplication pour relâcher son inhibition sur l'activité enzymatique de E1 (Lin et al., 2002). Récemment, l'induction de l'expression de Hsp70 dans des kératinocytes en différenciation a montré une augmentation de la réplication du génome viral, suggérant un rôle de cette chaperone dans les phases tardives du cycle viral (Song et al., 2010).

La portion N-terminale (acides aminés 10-40 chez VPH11 et 31) des types anogénitaux de VPH interagit avec la protéine cellulaire p80. La fonction de cette protéine est peu connue, mais son interaction avec E1 est importante pour le maintien du génome viral à long terme dans des cellules infectées. Des mutants de E1 qui ne lient plus p80 montrent une diminution de 50% de leur activité dans un essai de réplication transitoire. Lorsque ces mutations sont introduites dans le génome viral, celui-ci ne peut plus être maintenu à long terme dans des kératinocytes. L'interaction de E1 avec p80 est donc importante pour la progression du cycle viral. La protéine p80, aussi nommée WDR48 et récemment UAF1, comprend 7 ou 8 domaines WD dans sa portion N-terminale qui forment une structure en « β -propeller ». Ce type de structure permet généralement l'interaction avec diverses protéines (Côté-Martin et al., 2008). Elle a récemment été identifiée comme une sous-unité activatrice de complexes de déubiquitinylation contenant USP1, 12 ou 46 (Cohn et al., 2009). La fonction de p80 dans le cycle viral du VPH est présentement à l'étude.

L'interféron est connu pour bloquer le cycle viral du VPH et peut même être utilisé comme traitement contre les lésions causées par le virus. Cette action inhibitrice peut en partie être expliquée par l'action de la protéine P56, dont l'expression est activée par l'interféron. Cette protéine se lie à E1 et bloque son action par deux mécanismes : elle induit la relocalisation de E1 au cytoplasme et bloque directement son activité hélicase. Elle se lie dans le domaine C-terminal de E1. Des études *in vitro* ont montré que P56 inhibe l'activité hélicase, mais pas l'activité ATPase de E1, ce qui suggère que son action est spécifique et n'altère pas grossièrement la structure de E1. Elle inhibe aussi de façon dose-

dépendante la réplication de l'ADN viral. L'expression de P56 dans des cellules en culture inhibe aussi la réplication, mais de façon moins prononcée qu'un traitement à l'interféron. L'activité de cette protéine explique donc en partie seulement l'effet de l'interféron sur la réplication de l'ADN viral (Terenzi et al., 2008).

Il a également été démontré que la protéine 16E1BP (pour HPV16 E1-binding protein), qui contient un motif de liaison à l'ATP, interagit avec E1 du type VPH16. Sa fonction reste inconnue, mais elle semble jouer un rôle dans la réplication du génome viral. Des mutations situées dans le domaine C-terminal de E1 qui abolissent l'interaction avec 16E1BP affectent aussi la réplication de l'ADN du VPH, sans nécessairement affecter l'oligomérisation de E1 ou sa liaison à E2 (Yasugi et al., 1997b). La protéine 16E1BP est aussi nommée TRIP13 (pour Thyroid hormone receptor interactor 13) car elle a été identifiée comme un partenaire d'interaction du récepteur de l'hormone thyroïdienne. Elle est fréquemment surexprimée dans les cas de cancer du col de l'utérus, à des taux environ 5 fois plus élevés que dans des cellules normales. Cette surexpression est due à une amplification génomique du bras court du chromosome 5 qui est retrouvée dans environ 63% des cas de cancer invasif du col de l'utérus (Scotto et al., 2008). Si 16E1BP est réellement importante pour la réplication du génome viral par E1, alors sa surexpression dans les cas de cancer peut contribuer à l'amplification de l'épisome et à la progression du cycle viral.

1.2.3.2 Modifications post-traductionnelles

La régulation de la localisation intracellulaire de E1 et donc de la réplication virale se fait entre autres via la phosphorylation de E1. La région de localisation dans la portion N-terminale de E1 du VPH contient un NES, un motif de liaison aux cyclines, trois sites de phosphorylation par les CDK et un NLS en deux parties. La séquence NES domine sur le NLS, mais peut être inactivée par la phosphorylation par les CDK, plus particulièrement les complexes cycline A ou E/CDK2 (Deng et al., 2004). Pour sa part, le NLS est activé par la phosphorylation par les MAP kinases ERK et JNK (Yu et al., 2007). En résumé, la

localisation intracellulaire de E1 est régie par différentes phosphorylations qui sont fortement régulées avec le cycle cellulaire et le cycle viral.

Les protéines E1 des types VPB1, VPH11 et 16 interagissent avec Ubc9, une enzyme de conjugaison à SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à lier de façon covalente un groupement SUMO à une protéine, sur un résidu lysine (K). Le mécanisme de la sumoylation est très similaire à celui de l'ubiquitinylation. Il nécessite 3 enzymes différentes, soit une enzyme activatrice de SUMO (E1), une enzyme de conjugaison (E2), dont la seule connue est Ubc9, et une SUMO-ligase (E3). La sumoylation joue divers rôles régulateurs, par exemple dans la localisation intracellulaire, la réplication de l'ADN, la transcription ou la progression du cycle cellulaire. La sumoylation de E1 a été démontrée pour VPB, HPV1 et 18 *in vitro* et pour VPB *in vivo*. Le domaine de E1 qui interagit avec Ubc9 est le même qui est essentiel à l'oligomérisation de E1. Le rôle de cette interaction est encore peu connu (Fradet-Turcotte et al., 2009). Bien qu'il ait été suggéré que la sumoylation de E1 soit nécessaire pour son accumulation nucléaire (Rangasamy et Wilson, 2000; Rangasamy et al., 2000), cette possibilité a été démentie récemment (Rosas-Acosta et Wilson, 2008; Fradet-Turcotte et al., 2009). Une étude récente suggère, étant donné que l'interaction de E1 avec Ubc9 nécessite son oligomérisation ainsi que sa liaison à l'ADN et à l'ATP, que Ubc9 joue un rôle dans la réplication virale après la formation du double hexamère (Fradet-Turcotte et al., 2009).

Chez le papillomavirus bovin VPB1, E1 est dégradée par le protéasome après avoir été polyubiquitinylée, mais elle est stabilisée par son interaction avec la cycline E/Cdk2. Sa dégradation aurait lieu après la complétion de la réplication, alors que E1 est détachée de la cycline E/Cdk2 (Malcles et al., 2002). Le complexe promoteur de l'anaphase APC (Anaphase-promoting complex) est responsable de la polyubiquitinylation de E1 qui permet sa reconnaissance par le protéasome. VPB1 E1 contient un motif de destruction (D-box), reconnu par l'APC, situé dans le domaine C-terminal, dans la même région qui permet l'interaction de E1 avec Ubc9. La mutation de ce motif stabilise E1, mais empêche aussi

son interaction avec Ubc9, ce qui suggère un lien entre la stabilité de E1 et sa sumoylation (Mechali et al., 2004).

1.2.3.3 Clivage par les caspases

Dans les kératinocytes infectés, les caspases-3, -7 et -9 sont activées par les oncogènes E6 et E7 de VPH31 avec la différenciation des cellules (Moody et al., 2007). Cette activation se fait via la voie de réparation des dommages à l'ADN par la kinase ATM. La kinase Chk2, située en aval de ATM dans la voie de signalisation, est essentielle pour l'activation des caspases par le VPH (Moody et Laimins, 2009). Cette activation n'induit pas de façon substantielle l'apoptose des cellules, mais induit un clivage par les caspases-3 et -7 dans la portion N-terminale de E1. Les caspases reconnaissent un site de clivage DxxD, retrouvé aux acides aminés 46 à 49 de VPH31 E1 (séquence DMVD) (Moody et al., 2007). En réalité, deux sites de reconnaissance par les caspases se chevauchent (DxxDxxD) et incluent donc les acides aminés 46 à 52. Ce clivage est important pour l'amplification du génome viral, et donc pour la progression du cycle viral. Sa fonction exacte n'est pas connue, mais il est possible qu'il lève l'inhibition de la réplication par la protéine p80, qui se lie en N-terminal du site de clivage (Moody et al., 2007).

1.2.4 Démonstration d'une activité transcriptionnelle de E1

Pour certains types de VPH, E1 peut agir comme un activateur chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lorsque fusionné à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue. Cette propriété a été observée lors d'études de double hybride effectuées pour caractériser l'interaction entre E1 et E2. La technique de double hybride est basée sur deux protéines de fusion : l'appât, une protéine d'intérêt fusionnée au domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et la proie, un partenaire d'interaction potentiel qui est fusionné au domaine d'activation d'un activateur de transcription. S'il y a interaction entre l'appât et la proie, le domaine d'activation de la proie, lié indirectement à l'ADN par l'appât, active la transcription d'un gène rapporteur. Dans les cas où E1 est utilisé comme appât, une activation du gène rapporteur est observée en absence de proie, ce qui suggère que E1

possède une activité de transactivation intrinsèque. Ce phénomène a été observé d'abord avec E1 de VPH16, pour lequel la portion comprenant les acides aminés 1-190 donnait un fort signal d'activation (Yasugi et al., 1997a). Une situation semblable a été observée chez le type VPH11 pour lequel un appât comprenant la protéine E1 pleine longueur donnait un signal d'activation élevé alors qu'une troncation ne contenant pas les 71 premiers acides aminés n'activait pas la transcription du gène rapporteur (Titolo et al., 1999). L'activité transcriptionnelle de E1 chez la levure est donc conférée par sa partie N-terminale.

L'activité de transactivation de E1 a aussi été étudiée en cellules humaines en utilisant l'origine de réplication de VPH18 en amont d'un gène rapporteur sous le promoteur de la thymidine kinase. Cette étude a démontré que E1 possède une activité de transactivation intrinsèque en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de E2. Elle suggère aussi que la liaison de E1 à E2 sur l'origine virale augmente la transactivation par E2 (Demeret et al., 1998). Par contre, dans cette étude, le plasmide rapporteur contient l'origine de réplication du VPH et peut donc être répliqué par E1 et E2. Le signal obtenu avec E1 et E2 est tout de même partiellement indépendant de la réplication de l'ADN et ne nécessite pas les séquences spécifiques de liaison de E1 dans l'origine virale. Il est donc possible que E1 possède une activité de transactivation dans les cellules humaines lorsqu'il est en complexe avec E2. De plus, une étude dans des cellules humaines de lignée HeLa montre que E1 du VPB peut activer l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle de promoteurs contrôlés par un, deux sites de liaison à E2 ou par l'origine de réplication de VPH18. Par contre, cette activité est indépendante de la présence de E2. Elle décrit aussi l'activation du gène rapporteur sous des promoteurs viraux comme celui de SV40 et celui de la thymidine kinase de HSV, ce qui suggère que l'activité transcriptionnelle n'est pas spécifique à l'origine virale du VPB (Monini et al., 1993).

Donc, la protéine E1 peut activer la transcription lorsqu'elle est fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue qui la recrute à un promoteur, chez la levure et dans une lignée de cellules humaines. Toutefois, il n'est pas clair si elle peut activer la transcription dans le contexte du cycle viral, lorsqu'elle est recrutée sur l'ADN viral par son interaction avec E2. Le niveau de conservation de cette propriété entre les différents types

de papillomavirus est aussi inconnu. Comme la fonction de E1 est d'initier la réplication de l'ADN viral, l'activité transcriptionnelle conférée par son domaine N-terminal joue possiblement un rôle régulateur dans ce processus.

Le but de ce projet de recherche est d'identifier les séquences nécessaires à la transactivation dans la portion N-terminale de la protéine E1 des papillomavirus humains et de caractériser le rôle de ce domaine dans la réplication du génome viral.

1.3 Activateurs de transcription

Pour identifier la portion de E1 responsable pour l'activation de la transcription et déterminer son rôle dans la réplication de l'ADN, il était important de bien comprendre les mécanismes de transactivation pour ensuite comparer E1 à des activateurs connus.

1.3.1 Différents domaines de transactivation

Les activateurs de transcription comprennent deux principaux domaines : le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation. Souvent, ces deux domaines sont assez distincts pour être séparés et différentes combinaisons peuvent être utilisées pour des études de biologie moléculaire. Généralement, les domaines de transactivation peuvent être classés en différents groupes selon leur séquence primaire, par exemple en domaines acides, riches en proline ou en glutamine (Mitchell et Tjian, 1989). Par contre, la classification selon le principal type d'acide aminé retrouvé dans la séquence n'est pas idéale, car parfois la disposition et les propriétés des autres résidus sont autant ou même plus importantes (Triezenberg, 1995). Ce sont habituellement de courtes séquences d'environ 30 à 100 acides aminés qui servent à recruter d'autres protéines comme les facteurs généraux de transcription. Plusieurs activateurs possèdent plus d'un domaine de transactivation (Mitchell et Tjian, 1989). Les activateurs recrutent la machinerie de transcription composée de l'ARN polymérase II (ARN pol II) et des facteurs généraux de transcription (FGTs) (voir Figure 6 ci-dessous) via leur interaction avec l'un de ces

facteurs. Plusieurs activateurs lient la sous-unité TBP (TATA-binding protein) du facteur TFIID, qui reconnaît et lie la boîte TATA sur le promoteur. Certains domaines acides ou riches en proline lient le facteur TFIIB. D'autres, comme les domaines acides retrouvés dans les protéines p53 et VP16, lient aussi le facteur TFIIH qui possède des activités de kinase et d'hélicase. Enfin, les domaines de transactivation peuvent aussi lier TFIIA, des cofacteurs qui font le lien entre l'activateur et les FGTs, des complexes acétyltransférases ou de remodelage des histones (Triezenberg, 1995). Plusieurs domaines d'activation sont des régions protéiques normalement non repliées, qui ne forment pas de structure tridimensionnelle ordonnée en solution. Ces régions sont dites intrinsèquement désordonnées ou non structurées et adoptent généralement une structure secondaire ordonnée lorsqu'elles se lient à leur ligand respectif (Garza et al., 2009). Cette propriété sera décrite plus en détail à la section 1.3.3 à la page 37.

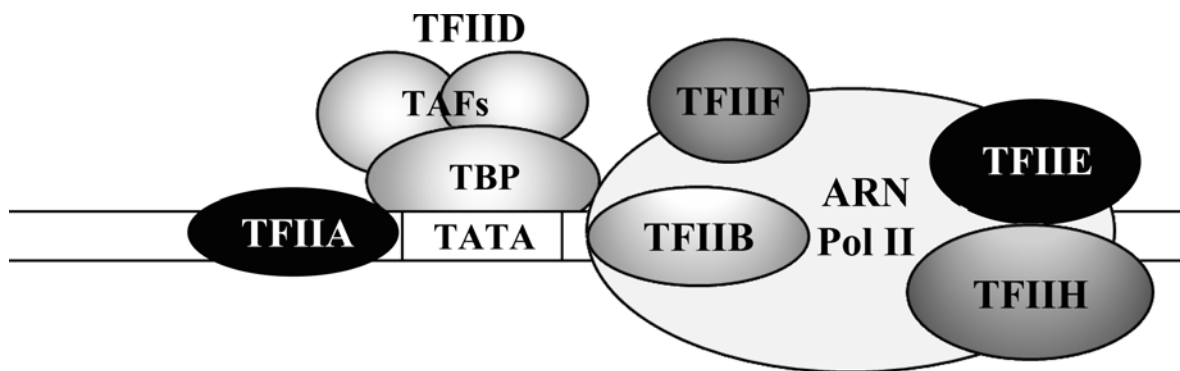


Figure 6. Représentation des principales sous-unités du complexe de pré-initiation de la transcription par l'ARN polymérase II lié à l'ADN sur un promoteur.

Leur position approximative par rapport à la boîte TATA du promoteur est représentée. TBP et les TAFs sont des sous-unités du facteur TFIID.

1.3.2 Domaines de transactivation acides

1.3.2.1 Exemple de p53

La protéine p53 est un important suppresseur de tumeurs dont le gène contient fréquemment des mutations dans les cas de cancer. Elle est divisée en trois grands domaines : un domaine de transactivation dans sa partie N-terminale, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'oligomérisation en C-terminal. Ce dernier domaine lui permet de former des tétramères (Stenger et al., 1992; Stürzbecher et al., 1992). Son domaine d'activation est divisé en deux courts sous-domaines de transactivation, nommés ici TAD1 et TAD2. Les deux sont des domaines de transactivation acides, mais ils contiennent aussi des acides aminés hydrophobes qui sont importants pour l'activité du domaine. Les deux sous-domaines, délimités par les acides aminés 1 à 40 et 40 à 73, possèdent une activité de transactivation de façon indépendante et leur activité est synergique. Aucun des deux ne semble activer de gène spécifique (Candau et al., 1997; Smith et al., 2007). L'activité de p53 est régulée par la protéine Mdm2, une ubiquitine ligase qui se lie au domaine N-terminal et ubiquitinye p53 pour induire sa dégradation par le protéasome (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997). Les deux TADs diffèrent par certains partenaires d'interaction. Par exemple, Mdm2 et TBP lient le TAD1 (Chang et al., 1995; Kussie et al., 1996), alors que RPA et la sous-unité p62 de TFIIH lient le TAD2 (Abramova et al., 1997; Di Lello et al., 2006). Ils interagissent tous deux avec les coactivateurs P300 et CBP (Jenkins et al., 2009). Le domaine N-terminal, comprenant les deux sous-domaines d'activation et une portion riche en proline, est une région intrinsèquement non-structurée de p53 (Wells et al., 2008). L'interaction du TAD2 avec la sous-unité p62 (Tfb1 chez la levure *S. cerevisiae*) est importante pour l'activité de transactivation de ce sous-domaine. Le TAD2 forme une hélice alpha lorsqu'il se lie à p62. Trois acides aminés hydrophobes compris dans le TAD2 sont essentiels à cette interaction et à la fonction d'activateur de p53. L'affinité de l'interaction entre p53 et p62 est augmentée par la phosphorylation de p53 à deux sites différents, soit la sérine 46 (S46) et la thréonine 55 (T55) (Di Lello et al., 2006). La phosphorylation de S46 par la MAPK p38 ou par HIPK-2 est connue pour activer

l'expression de certains gènes pro-apoptotiques (Bulavin et al., 1999; Oda et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). L'effet de la phosphorylation de T55 est plus complexe. Sa phosphorylation par ERK-2 active p53 en augmentant son affinité pour l'ADN (Yeh et al., 2001; Yeh et al., 2004). Par contre, une publication indique que sa phosphorylation par TAF1, une sous-unité du facteur général de transcription TFIID, mène à sa dégradation via Mdm2 (Li et al., 2004). Comme p53 joue un rôle important dans la cellule et doit être hautement régulé, il est possible que la phosphorylation de T55 par différentes kinases ait lieu dans des contextes distincts et mène à des effets différents.

1.3.2.2 Exemple de VP16

Le virus Herpes Simplex est souvent retrouvé sous forme latente dans les cellules infectées. Pour que le cycle lytique soit réactivé, les gènes précoces doivent être exprimés. La protéine VP16 est importante pour l'activation de ces gènes. Elle possède un domaine de transactivation acide situé dans la portion C-terminale de la protéine. En fusion avec un domaine de liaison à l'ADN approprié, elle forme un puissant activateur de transcription (Cress et Triezenberg, 1991). VP16 a une très faible affinité pour l'ADN par elle-même. Elle forme donc un complexe avec les facteurs de transcription cellulaires HCF-1 et Oct-1. Cette association permet d'augmenter son affinité pour l'ADN et mène à l'activation des gènes viraux précoces (Babb et al., 2001; Wysocka et Herr, 2003). Le domaine de transactivation de VP16 partage plusieurs similitudes avec celui de p53. Par exemple, il peut lier le facteur TFIID et la sous-unité TBP de TFIID, est formé de deux sous-domaines d'activation et est non structuré en solution (Xiao et al., 1994; Jonker et al., 2004). VP16 interagit aussi avec les coactivateurs P300, CBP et PC4, comme p53 (Ge et Roeder, 1994; Kundu et al., 2000; Ikeda et al., 2002). Le sous-domaine situé en C-terminal du domaine de transactivation de VP16 (VP16C) possède une séquence similaire au TAD2 de p53. Les deux se lient à la sous-unité p62 de TFIID et adoptent une conformation d'hélice alpha avec leur liaison à p62. Par contre, la phosphorylation ne semble pas jouer de rôle dans la liaison de VP16 à p62 (Langlois et al., 2008). De plus, le TAD de VP16 interagit avec d'autres facteurs généraux de transcription, dont TFIIA (Kobayashi et al., 1995), TFIIB (Lin et al., 1991) et TFIIF (Zhu et al., 1994).

1.3.3 Domaines protéiques intrinsèquement désordonnés

La structure tridimensionnelle de plusieurs protéines ou régions de protéines est trop instable pour être déterminée clairement par les techniques actuelles. On qualifie ces protéines ou domaines protéiques d'intrinsèquement désordonnés ou non structurés. Leur structure est flexible dans leur forme libre, mais se définit avec la liaison à leur ligand ou par des modifications post-traductionnelles. Ces régions sont souvent caractérisées par une faible hydrophobicité et sont fortement chargées à pH neutre. Elles sont très communes chez les facteurs de transcription et les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Il est estimé que le tiers des protéines des eucaryotes comprennent des régions intrinsèquement désordonnées de 30 acides aminés ou plus. Ces régions, par leur grande flexibilité, semblent permettre à une protéine d'interagir avec plusieurs partenaires différents et possiblement d'avoir des actions différentes en adoptant diverses structures selon les stimuli. Elles semblent aussi procurer aux protéines une grande instabilité, caractéristique des protéines régulatrices qui sont rapidement dégradées puis remplacées. Finalement, les régions non structurées permettent des interactions de forte spécificité, mais de faible affinité, ce qui permet des liaisons réversibles importantes pour la régulation de différents processus biologiques. (Revue : (Garza et al., 2009))

1.3.4 Cofacteurs impliqués dans la transactivation par p53 et VP16

Parmi les cofacteurs nécessaires à l'activation de la transcription par p53 et VP16, on retrouve notamment la protéine PC4 ainsi que les acétyltransférases P300/CBP chez l'humain et SAGA chez la levure.

1.3.4.1 Rôle de PC4

Le cofacteur PC4 (Positive Cofactor 4) est un coactivateur de transcription qui interagit avec plusieurs activateurs et avec la machinerie de transcription (Ge et Roeder, 1994). Il peut lier l'ADN simple ou double brin avec une forte affinité (Werten et al., 1998a). Il interagit avec le TAD de p53 et stimule la liaison de la protéine à l'ADN, stimulant ainsi son activité (Banerjee et al., 2004). Il active aussi la transactivation par

VP16 en interagissant avec son TAD (Ge et Roeder, 1994). Il soutient également la formation du complexe de pré-initiation de la transcription par l'ARN pol II aux promoteurs (Malik et al., 1998). PC4 serait aussi impliqué dans la répression de la transcription dans certains cas particuliers, mais cette activité est encore peu connue (Malik et al., 1998; Werten et al., 1998b).

1.3.4.2 Rôle de P300/CBP

Les protéines P300 et CBP, retrouvées chez l'humain, sont des enzymes très semblables qui sont souvent regroupées sous une famille désignée p300/CBP. Elles possèdent une activité acétyltransférase d'histones et peuvent donc acétyler des histones, mais aussi des facteurs de transcription et des composantes de la machinerie de transcription. Ce sont des coactivateurs impliqués dans plusieurs processus cellulaires importants comme la prolifération et la différenciation (Chan et La Thangue, 2001). Ils interagissent avec plusieurs activateurs, dont les protéines virales E1A des adénovirus (Eckner et al., 1994; Arany et al., 1995), l'antigène grand T de SV40 (Eckner et al., 1996), VP16 de Herpès simplex (Kundu et al., 2000) et E2 du VPH (Lee et al., 2000; Peng et al., 2000), ainsi qu'avec le suppresseur de tumeurs humain p53 (Lill et al., 1997). P300 et CBP peuvent exercer leur fonction selon trois différents mécanismes : en servant de pont entre le facteur de transcription et l'ARN polymérase, en servant de chaperone pour la formation de complexes de transcription ou par leur activité acétyltransférase. Finalement, P300/CBP peuvent utiliser leur activité enzymatique pour acétyler les facteurs de transcription, la machinerie de transcription et les histones. L'acétylation des activateurs est commune et augmente généralement leur affinité pour l'ADN ou pour d'autres partenaires d'interaction. Par exemple, p53 peut être acétylée par P300, ce qui stimule sa liaison à des séquences spécifiques dans l'ADN (Gu et Roeder, 1997). Des effets semblables sont observés avec l'acétylation de certains des facteurs généraux de transcription. L'acétylation des histones est bien connue pour faciliter l'accès à l'ADN en stimulant le remodelage de la chromatine. Certains activateurs, comme VP16, recrutent P300 ou CBP sur la chromatine pour qu'ils acétylent les histones (Kundu et al., 2000; Ikeda et al., 2002). De plus, des mutations dans les gènes codant pour ces protéines sont fréquemment observées dans des cas de cancers, ce

qui suggère qu'elles possèdent des activités de suppression de tumeurs (Chan et La Thangue, 2001). Finalement, les protéines p300 et CBP sont d'importants coactivateurs de transcription qui sont impliqués dans plusieurs processus, dont la transactivation par p53 et VP16.

1.3.4.3 Rôle du complexe SAGA

Le complexe SAGA, nommé ainsi basé sur les noms de ses principales sous-unités, soit Spt-Ada-Gcn5-Acétyltransférase, est un complexe coactivateur retrouvé chez la levure *S. cerevisiae*. Il est nécessaire à la transactivation par p53 et stimule l'activité du TAD de VP16 lorsque ces protéines sont exprimées en levure (Candau et al., 1997; Utley et al., 1998). Il possède des activités d'acétylation et de déubiquitination des histones, deux processus qui mènent à l'activation de la transcription. Il est formé de plusieurs sous-unités, dont les protéines Ada1 à 5, les protéines Spt et les TAFs (voir Figure 7 page 40). Les sous-unités TAFs (pour TBP-associated factors) sont des facteurs associés à la sous-unité TBP de TFIID dont certaines font aussi partie du complexe SAGA. La sous-unité Gcn5 (aussi nommée Ada4) lui confère son activité acétyltransférase. La sous-unité Ubp8 possède aussi une activité enzymatique qui permet au complexe de déubiquitinyler l'histone H2B. Cette déubiquitinylation contribue à l'activation de la transcription. La sous-unité Tra1 est aussi très importante, car elle permet l'interaction avec plusieurs activateurs via leurs domaines de transactivation acides (Baker et Grant, 2007). Il existe un homologue chez l'humain, nommé hSAGA ou TFIIIC/STAGA/PCAF, mais sa composition exacte n'est pas claire. Plusieurs homologues des sous-unités de SAGA ont été identifiés chez l'humain dans les dernières années et le complexe hSAGA semble finalement très semblable à celui de la levure. Chez *S. cerevisiae*, certaines des protéines qui forment SAGA peuvent s'associer à de nouvelles sous-unités pour former différents complexes, par exemple SLIK (pour SAGA-like) ou SALSA. Le même phénomène est possiblement retrouvé chez l'humain, ce qui pourrait expliquer les différences de composition de hSAGA selon les études (Nagy et al., 2009). Le complexe SAGA joue différents rôles importants pour la transcription dont certains sont semblables à ceux de P300/CBP. Il facilite l'initiation de la transcription en

induisant le remodelage de la chromatine et en liant à la fois un activateur et la machinerie enzymatique. Ensuite, il reste lié à la queue C-terminale de l'ARN polymérase II et induit le remodelage de la chromatine avec l'élongation de la transcription. SAGA interagit aussi avec des composantes du complexe de pore nucléaire, ce qui permet un couplage de la synthèse et de l'export des ARNm vers le cytoplasme (Baker et Grant, 2007). L'activité acétyltransférase de SAGA n'est pas toujours importante pour l'activation de la transcription. Par exemple, l'activation par Gal4 nécessite l'interaction avec SAGA, mais pas l'activité conférée par la sous-unité Gcn5. SAGA sert alors à l'assemblage d'un complexe de pré-initiation de la transcription et non au remodelage de la chromatine (Bhaumik et Green, 2001). Il est aussi important pour la transactivation par la portion N-terminale/CR1 de E1A, pour chacun des TAD de p53 et pour VP16 exprimés en levure. Par contre, dans ces cas, la sous-unité Gcn5 est importante (Candau et al., 1997; Stafford et Morse, 2001; Kulesza et al., 2002). Différents modes de régulation sont donc utilisés selon les activateurs. Le complexe SAGA est important pour la transcription d'environ 10% des gènes chez la levure. La majorité de ces gènes sont impliqués dans la réponse à différents stress environnementaux et sont donc hautement régulés. Le rôle de ce complexe chez l'humain reste à déterminer, tout comme sa composition exacte (Baker et Grant, 2007).

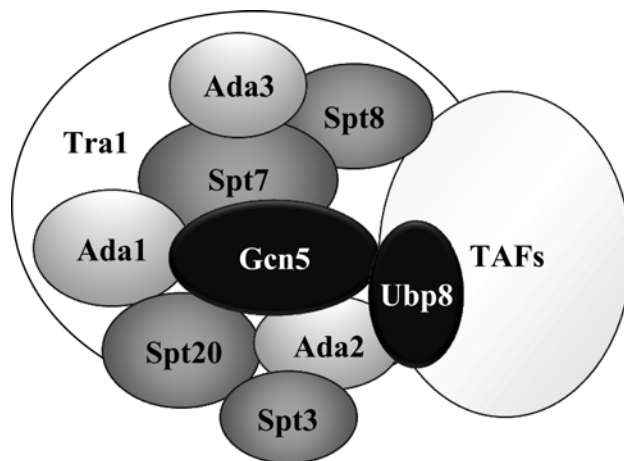


Figure 7. Représentation des sous-unités du complexe SAGA de la levure.

Les sous-unités possédant une activité enzymatique sont représentées en noir, les sous-unités Spt en gris foncé, les Ada en gris plus pâle et les autres en blanc ou gris très pâle.

1.4 But du projet de recherche

Le but de ce projet de recherche est de caractériser l'activité de transactivation intrinsèque de la protéine virale E1 et son rôle dans la réplication du génome viral. Pour ce faire, un nouvel essai de réplication de l'ADN viral à haut débit, décrit dans l'article 1 de ce mémoire, a été développé. Dans un deuxième temps, la portion de la région N-terminale de E1 et les acides aminés spécifiques qui lui confèrent son activité transcriptionnelle ont été identifiés, par comparaison avec des domaines de transactivation d'activateurs connus. Les études, présentés dans l'article 2, sont d'abord faites chez la levure *S. cerevisiae*, chez laquelle l'activité de transactivation a d'abord été observée, puis se continuent dans des cellules humaines en culture pour étudier la réplication du génome viral. Ce projet vise à mieux comprendre l'implication d'un domaine de transactivation dans la fonction première de la protéine, c'est-à-dire la réplication du génome viral. La fonction de ce domaine est possiblement importante pour la progression du cycle viral, ce qui serait intéressant d'un point de vue clinique. Bien que des vaccins prophylactiques soient maintenant disponibles pour les types viraux les plus communs, les infections au VPH et les cancers qu'elles causent représentent encore un important problème de santé publique. De plus, les traitements actuellement disponibles sont souvent peu spécifiques et peu efficaces. Cette étude s'inscrit dans l'optique d'une meilleure compréhension du rôle de chacune des protéines virales lors de l'infection qui pourra éventuellement mener au développement de molécules antivirales pouvant traiter les symptômes et dans certains cas prévenir le développement de cancers.

2 Article 1 – Développement d’essais de réplication de l’ADN des polyomavirus et des papillomavirus

2.1 Mise en contexte de l’article

Pour étudier la réplication de l’ADN chez les papillomavirus, nous devons utiliser un essai de réplication transitoire dans des cellules en culture. Les essais généralement utilisés consistent à mesurer la réplication d’un plasmide contenant l’origine de réplication virale par les techniques d’hybridation de Southern ou par PCR quantitatif. Comme décrit à la section 1.2.2.4 (page 26), ces méthodes sont fastidieuses et permettent difficilement l’étude de plusieurs conditions à la fois. De plus, elles nécessitent en général l’utilisation de produits toxiques comme le phénol/chloroforme ou la radioactivité. Pour éviter ces inconvénients, nous avons développé un essai de réplication basé sur l’expression de la luciférase à partir d’un plasmide qui est répliqué par les protéines virales via l’origine de réplication du virus. Cet essai est quantitatif, rapide et peut être facilement utilisé pour effectuer du criblage à haut débit. Il a été développé d’abord pour étudier la réplication de l’ADN du virus SV40, dont la réplication ne nécessite qu’une seule protéine virale, puis a été adapté pour étudier le type VPH31. Il a servi entre autres, dans le cadre de cet article, à mesurer le taux de réplication de l’ADN avec des mutants des protéines virales et en présence de différents inhibiteurs. C’est d’ailleurs cet essai qui a été utilisé pour les résultats présentés dans l’article 2 de ce mémoire.

2.2 Contribution des co-auteurs

Amélie Fradet-Turcotte et moi avons contribué de façon égale aux expériences du développement de l'essai, c'est pourquoi nous sommes co-premières auteures sur l'article.

Michaël Lehoux a contribué à la caractérisation d'un mutant de la protéine E1 (résultats présentés à la figure 7 A) à D)).

Peter A. Bullock nous a conseillé pour la partie sur le virus SV40 et nous a fourni plusieurs plasmides utilisées pour ces études.

Jacques Archambault a dirigé le projet et écrit l'article avec **Amélie Fradet-Turcotte**.

2.3 Texte de l'article

DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE AND HIGH-THROUGHPUT ASSAYS OF POLYOMAVIRUS AND PAPILLOMAVIRUS DNA REPLICATION

Amélie Fradet-Turcotte^{1,£}, Geneviève Morin^{1,£}, Michaël Lehoux¹, Peter A. Bullock² and
Jacques Archambault^{1,*}


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

²Department of Biochemistry, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts

Running Title: SV40 and HPV DNA replication assays

[£] Both authors contributed equally to this work

* To whom correspondence should be addressed: Institut de Recherches Cliniques de
Montréal (IRCM), 110 Pine Avenue West, Montreal (Quebec), Canada, H2W 1R7.

Tel: (514) 987-5739; Fax: (514) 987-5741; E-mail: 

2.3.1 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.

2.3.2 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, You, and Arai, 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, Lowy, and Schiller, 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, Hurwitz, and Seo, 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, Batiza, and Lambert, 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, Strauss, and Gluzman, 1989; Simmons, Loeber, and Tegtmeyer, 1990; Titolo et al., 2003a; Titolo et al., 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; Titolo et al., 2003b). Crystal structures of the bovine papillomavirus (BPV) and human papillomavirus (HPV) 18 E1 OBDs have revealed the nature of the dimerization interface and mutations that disrupt this interface have been shown to impair viral DNA replication (Auster and Joshua-Tor, 2004; Enemark, Stenlund, and Joshua-Tor, 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; Kalderon et al., 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, Stillman, and Gluzman, 1987; Scheidtmann et al., 1984; Schneider and Fanning, 1988; Virshup, Kauffman, and Kelly, 1989; Virshup, Russo, and Kelly, 1992; Weisshart et al., 1999). As for the N-terminal domain of E1, it contains a bipartite 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, Anderson, and Tegtmeyer, 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, Gandhi, and Botchan, 1995; Sun, Lu, and McCance, 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, Lowy, and Schiller, 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.

2.3.3 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) (Buchman, 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'-CGCATCACGTAGTGCCTCCCCAGCAGGC-3' and 5'-CGCATCACTACGTGCCACTCCTTTCAAGACC-3'. The plasmids to express 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'-CGCATGCCGGCAAAC TGCTTTTAGGCACATATTTTG-3' and 5'-CGCATGCCGGCGTAGGTTTGCACAAAAT ACTATGTG-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'-CCACCGTCGACGCCACCATGACCAGCAAGGTGTAC G-3' and 5'-CCCGCGGCCGCTTATCTAGATCCGGTGGATCC-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 µg/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 0.5ng 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 μ l 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 hrs in a final volume of 30 μ l. The digested DNA samples were then incubated for 30 minutes 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 minutes. 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 sec 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. 8×10^5 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 100M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, CAN) and analyzed using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss, Toronto, Canada).

2.3.4 Results and discussion

2.3.4.1 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 the SV40 origin of replication (nucleotides 5094-161) (Buchman, 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.

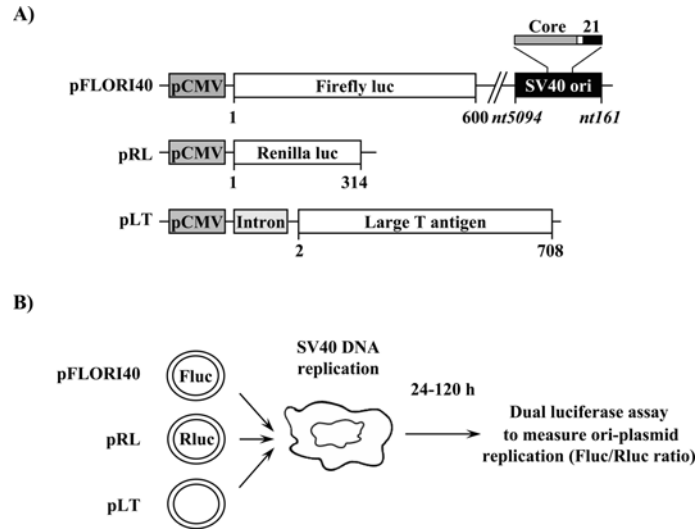


Fig. 1. Principle of the luciferase SV40 DNA replication assay.

(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.

2.3.4.2 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.

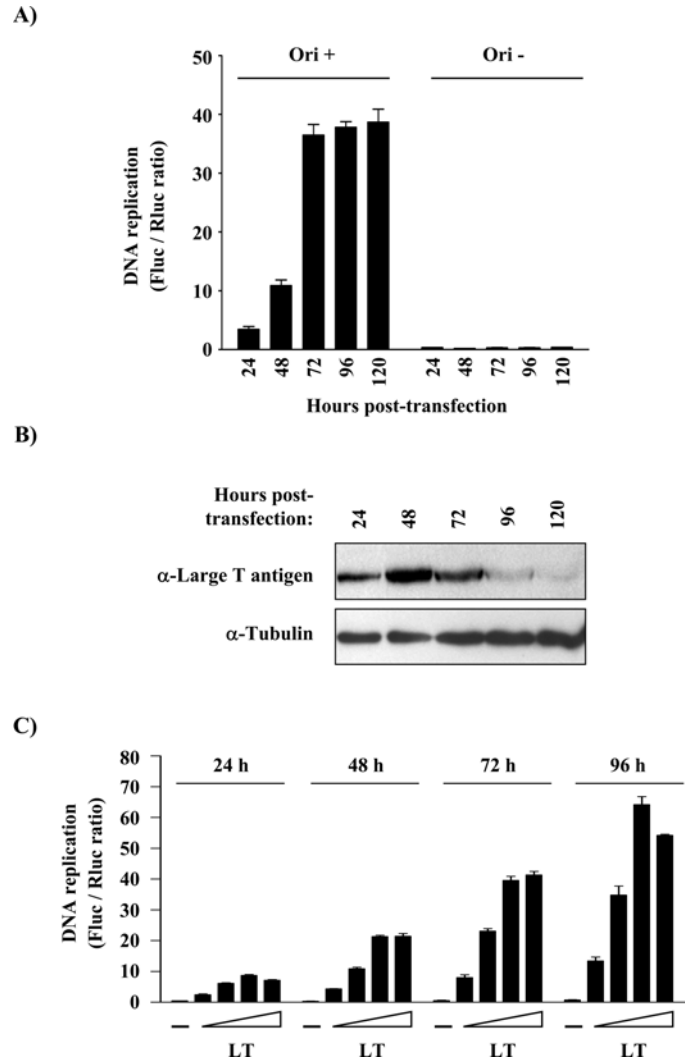


Fig. 2. Dependence of the SV40 DNA replication assay on time and expression of T antigen.

(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.

2.3.4.3 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., 1989; McVey et al., 1993; McVey, Woelker, and Tegtmeyer, 1996; Moarefi et al., 1993; Schneider and Fanning, 1988; Weisshart et al., 1999) or DNA binding (N153S) (Simmons et al., 1993; Simmons, Wun-Kim, and Young, 1990) 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.

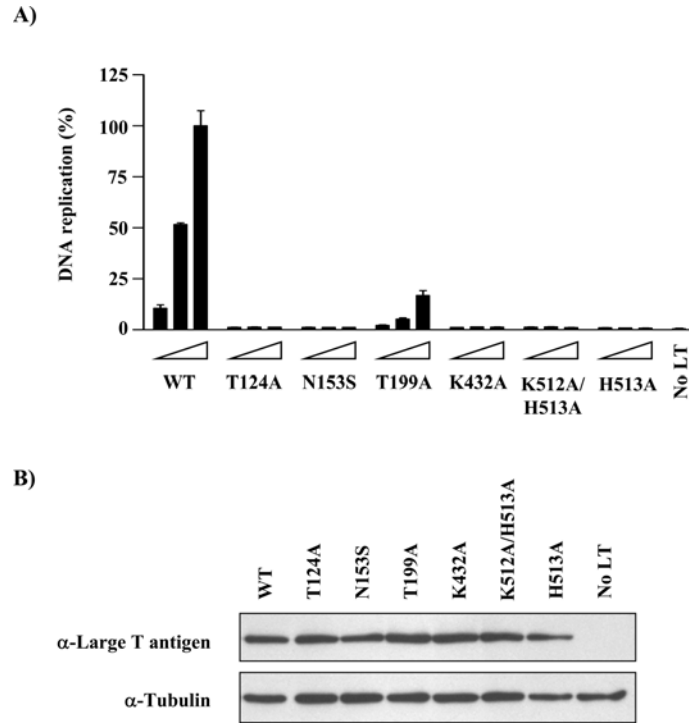


Fig. 3. Validation of the SV40 DNA replication assay using T antigen mutants.

(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.

2.3.4.4 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).

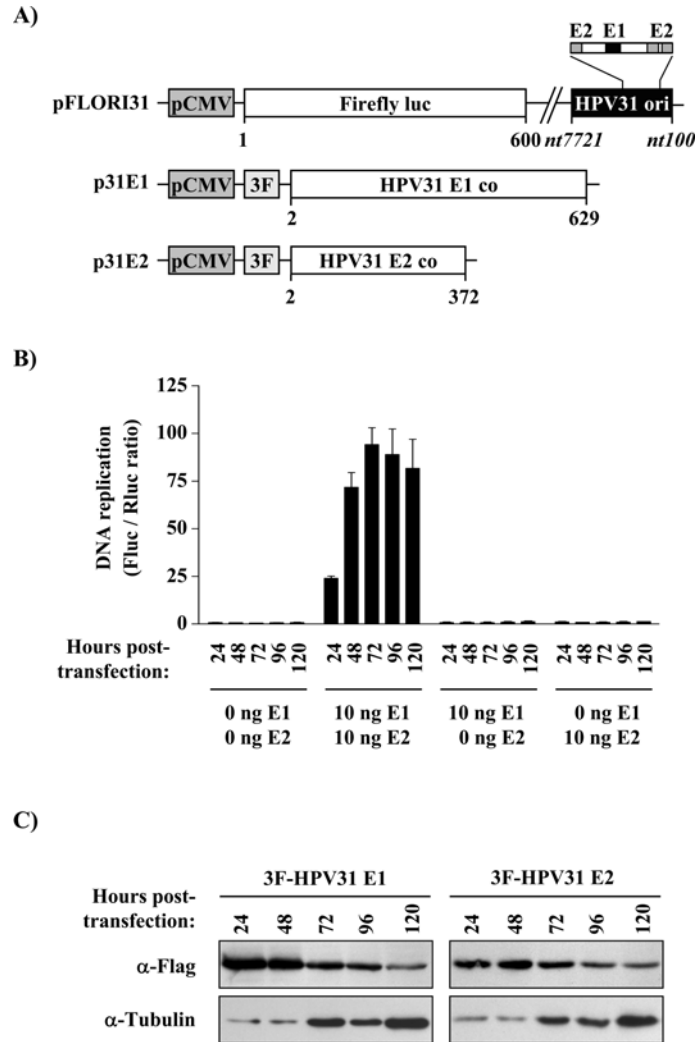


Fig. 4. Principle of the luciferase-based HPV31 DNA replication assay.

(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 posttransfection, 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.

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 octaplicates, 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 (Fig. 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 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.

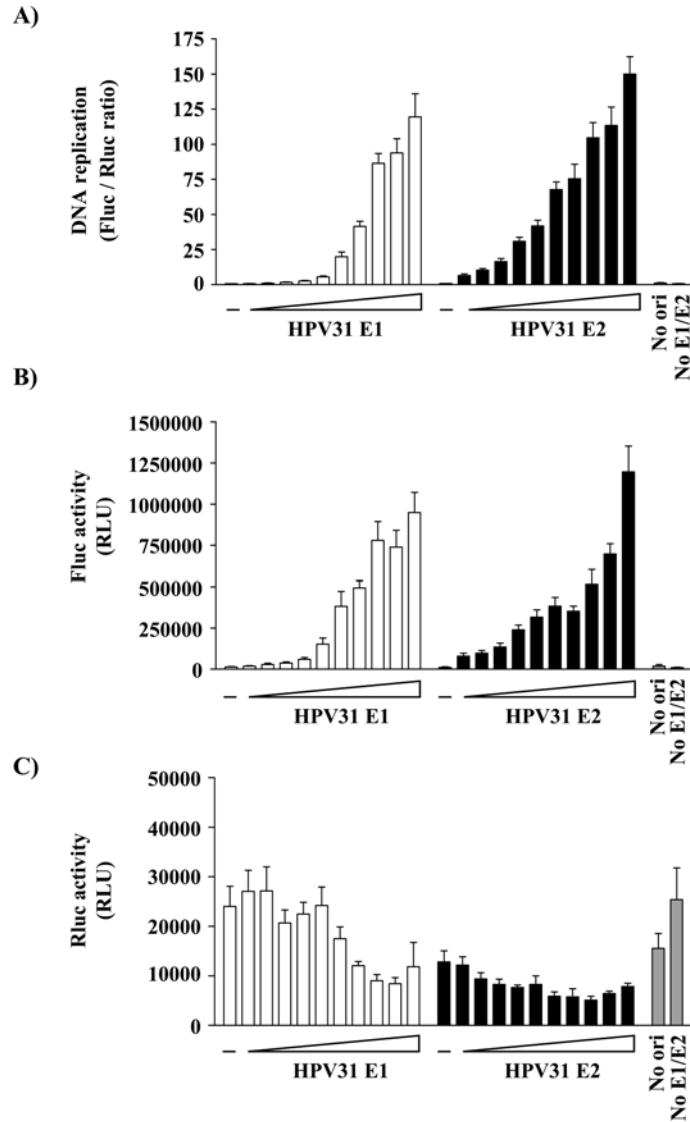


Fig. 5. Dependence of the HPV31 DNA replication assay on E1 and E2.

(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).

2.3.4.5 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 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; Titolo et al., 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).

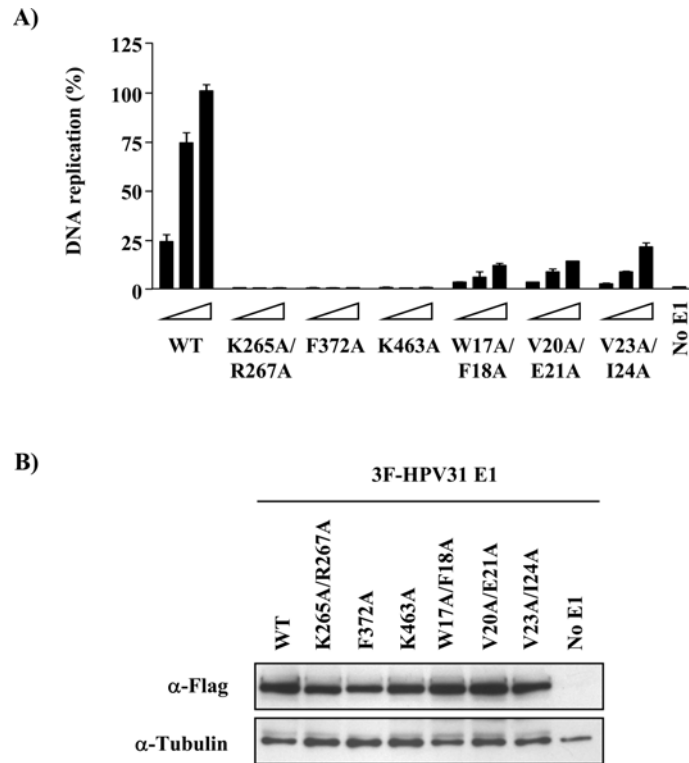


Fig. 6. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E1 mutants.

(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 blots 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, Stenlund, and Joshua-Tor, 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-type and mutant OBDs was sequence specific 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.

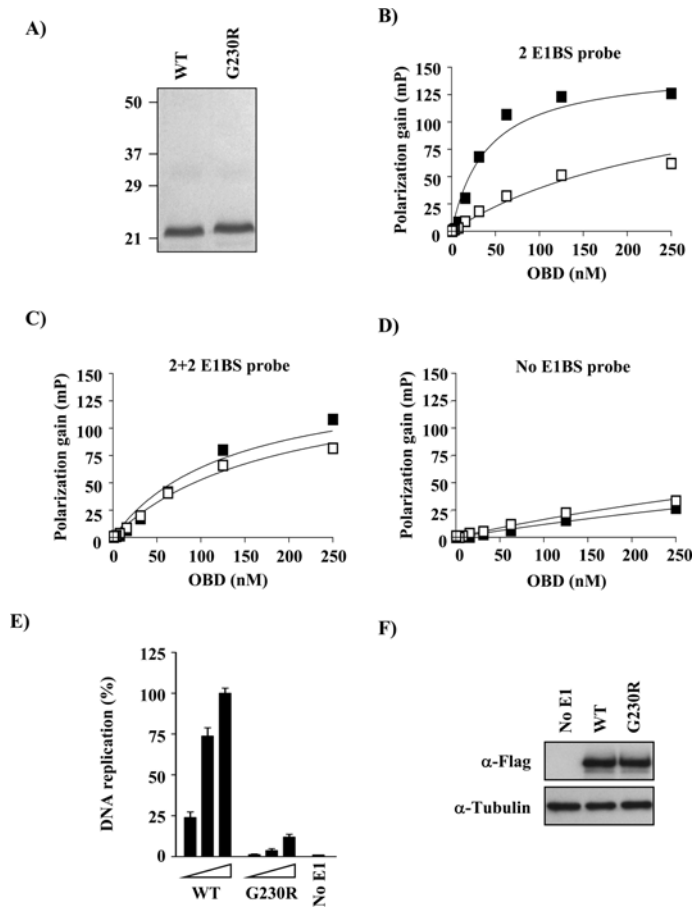


Fig. 7. Characterization of a dimerization-defective HPV31 E1 mutant.

(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 blots showing the expression of E1 proteins. Tubulin was used as a loading control.

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, Blanco, and McBride, 1996; Cooper, Upmeyer, and Winokur, 1998; Ferguson and Botchan, 1996; Sakai et al., 1996; Stubenrauch, Colbert, and Laimins, 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, Colbert, and Laimins, 1998). In contrast, the E39A and E39Q substitutions that affect E1-binding significantly reduced replication (Abbate, Berger, and Botchan, 2004; Ferguson and Botchan, 1996; Harris and Botchan, 1999; Sakai et al., 1996; Stubenrauch, Colbert, and Laimins, 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, Jansen, and McClements, 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.

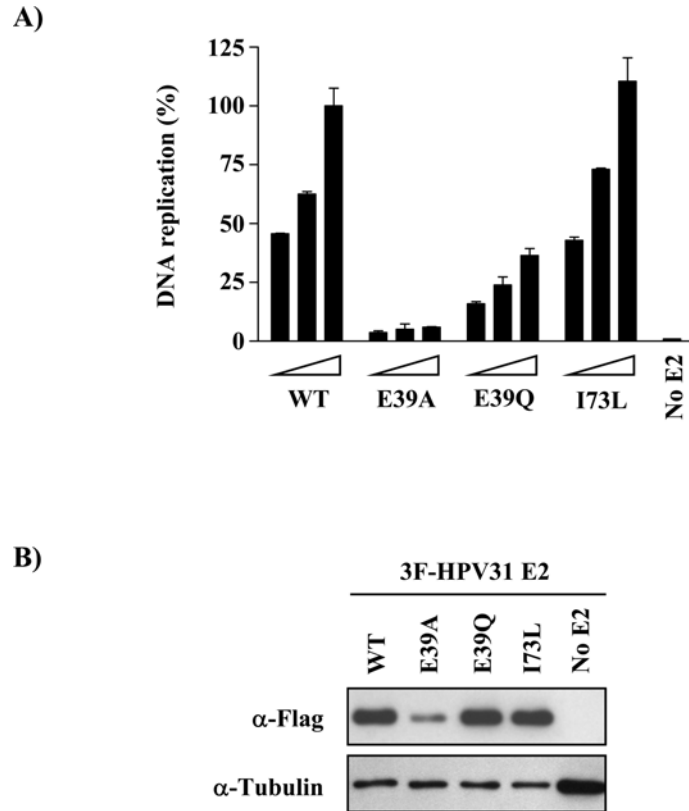


Fig. 8. Validation of the HPV31 DNA replication assay using E2 mutants.

(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 blots showing the expression of E2 mutant proteins. Tubulin was used as a loading control.

Altogether, the results obtained with E1 and E2 mutants described above provide additional evidence that the Fluc/Rluc ratio reflects 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.

2.3.4.6 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). Figure 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 function of ori-plasmid replication, in both the SV40 and HPV31 assays.

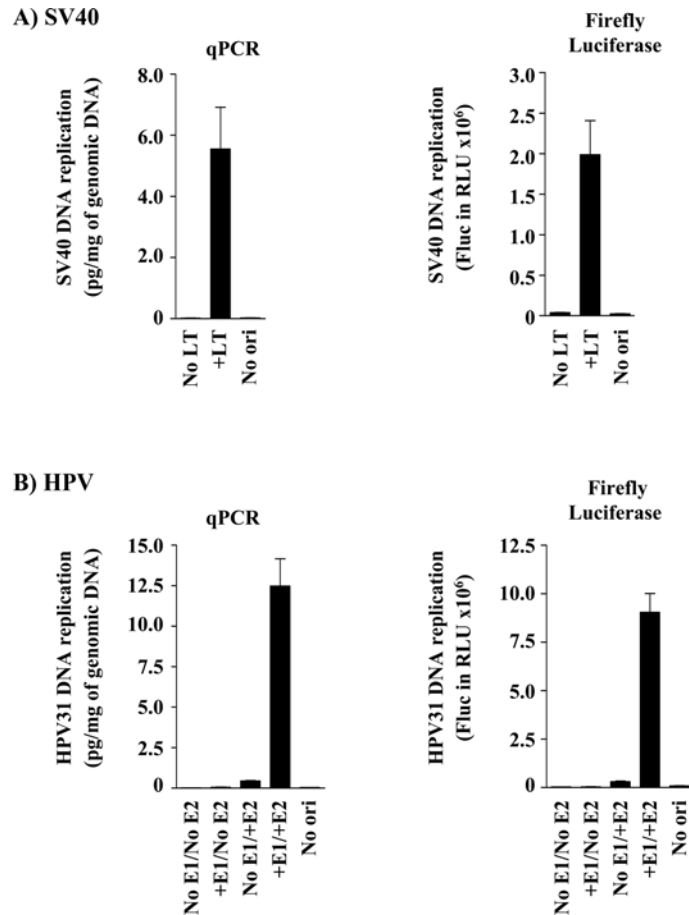


Fig. 9. Correlation between ori-plasmid replication and firefly luciferase expression.

(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.

2.3.4.7 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 IC_{50} 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 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).

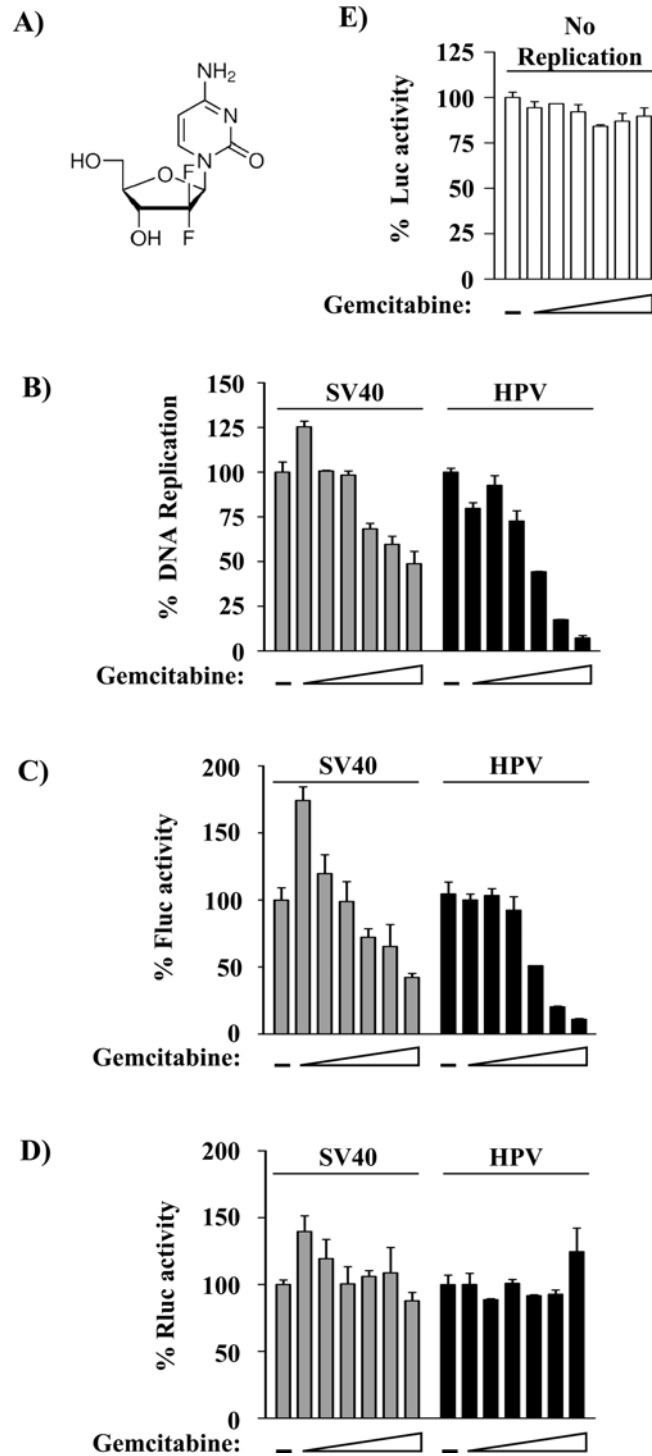


Fig. 10. Validation of the SV40 and HPV31 assays using the DNA replication inhibitor gemcitabine.

(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).

2.3.4.8 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 I). As a control, they were also tested for their effect on CMV-Fluc expression in the absence of viral replication proteins (Table I, 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, Miskimins, and Miskimins, 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 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 (Fig. S1) (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.

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

Table I. Activity of selected cell-cycle inhibitors on viral DNA replication.

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.

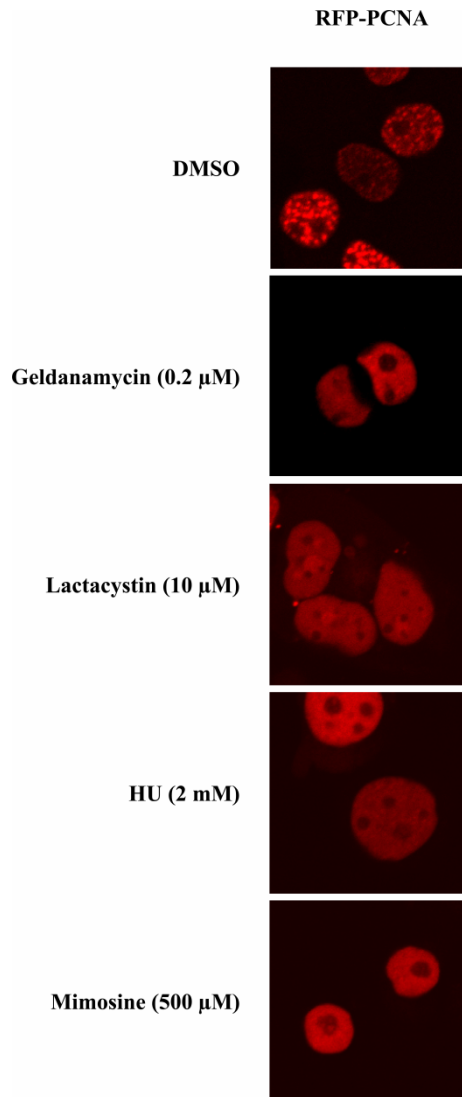
2.3.5 Concluding remarks.

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 IC₅₀ 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.

2.3.6 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.



Supplementary Fig.1. Geldanamycin and lactacystin prevent the formation of S-phase specific PCNA foci.

Confocal fluorescence microscopy images of C33A cells transfected with an expression vector for RFP-PCNA and treated for 24 h with either 0.2 μM geldanamycin, 10 μM lactacystin or with DMSO as a control. Hydroxyurea (HU, 2 mM), which blocks S-phase, and mimosine (500 μM), which prevents entry into S-phase, were used as positive controls.

2.3.7 References

- 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**(16), 1981-1996.
- 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**(6099), 70-3.
- 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**(5), 3733-3742.
- Baxter, M. K., McPhillips, M. G., Ozato, K., and 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), 4806-18.
- Bedin, M., Gaben, A. M., Saucier, C., and Mester, J. (2004). Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int J Cancer* **109**(5), 643-52.
- Bergsma, D. J., Olive, D. M., Hartzell, S. W., and 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), 381-5.
- Blitz, I. L., and 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., and Hurwitz, J. (1990). Binding and unwinding--how T antigen engages the SV40 origin of DNA replication. *Cell* **60**(2), 181-4.
- Brokaw, J. L., Blanco, M., and McBride, A. A. (1996). Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J Virol* **70**(1), 23-9.

- Buchman, A. R., Burnett, L. and Berg, P. (1981). Appendix A: The SV40 nucleotide sequence. In "DNA TUMOR VIRUSES - SECOND EDITION REVISED" (J. Tooze, Ed.), pp. 799-841, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Bullock, P. A. (1997). The initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**(6), 503-68.
- Bullock, P. A., Joo, W. S., Sreekumar, K. R., and 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), 460-73.
- 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**(9), 1098-110.
- Cegielska, A., Moarefi, I., Fanning, E., and Virshup, D. M. (1994). T-antigen kinase inhibits simian virus 40 DNA replication by phosphorylation of intact T antigen on serines 120 and 123. *J Virol* **68**(1), 269-75.
- Chen, G., and 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., and Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* **311**(5983), 276-9.
- 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**(2), 312-22.
- 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**(3), 1271-83.
- de Chasseval, R., and 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), 245-50.

- Deb, S., Tsui, S., Koff, A., DeLucia, A. L., Parsons, R., and Tegtmeyer, P. (1987). The T-antigen-binding domain of the simian virus 40 core origin of replication. *J Virol* **61**(7), 2143-9.
- Del Vecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M., and Baker, C. C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* **66**(10), 5949-58.
- DeLucia, A. L., Lewton, B. A., Tjian, R., and 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), 143-50.
- 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**(24), 13954-65.
- 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**(6), 1487-96.
- Ferguson, M. K., and 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), 4193-9.
- 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**(17), 9162-74.
- Frattini, M. G., and 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., and Burhans, W. C. (1995). Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J Biol Chem* **270**(16), 9597-606.
- Gorisch, S. M., Sporbert, A., Stear, J. H., Grunewald, I., Nowak, D., Warbrick, E., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. (2008). Uncoupling the replication machinery: replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis. *Cell Cycle* **7**(13), 1983-90.

- Harris, S. F., and Botchan, M. R. (1999). Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. *Science* **284**(5420), 1673-7.
- Hebner, C. M., and Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* **16**(2), 83-97.
- Hickman, A. B., and Dyda, F. (2005). Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol* **15**(1), 77-85.
- 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**(10), 6525-32.
- Hughes, T. A., and Cook, P. R. (1996). Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp Cell Res* **222**(2), 275-80.
- Jiang, H. Y., Hickey, R. J., Abdel-Aziz, W., and 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), 320-8.
- Johnson, A., and 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., and Smith, A. E. (1984a). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**(5981), 33-8.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and 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., and Omura, S. (1995). The neuritogenesis inducer lactacystin arrests cell cycle at both G0/G1 and G2 phases in neuro 2a cells. *J Antibiot (Tokyo)* **48**(4), 344-6.
- Keezer, S. M., and 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., and DeCaprio, J. A. (1995). Cell synchronization. *Methods Enzymol* **254**, 114-24.

- Krude, T. (1999). Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* **247**(1), 148-59.
- 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**(9), 4808-18.
- Lee-Chen, G. J., and Woodworth-Gutai, M. (1986). Simian virus 40 DNA replication: functional organization of regulatory elements. *Mol Cell Biol* **6**(9), 3086-93.
- 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**(1), 97-108.
- Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J. A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., and Chen, X. S. (2003). Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**(6939), 512-8.
- 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**(19), 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 USA* **96**(2), 382-7.
- 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**(10), 7600-8.
- Masai, H., You, Z., and Arai, K. (2005). Control of DNA replication: regulation and activation of eukaryotic replicative helicase, MCM. *IUBMB Life* **57**(4-5), 323-35.
- McVey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D. R., Gluzman, Y., and Beach, D. (1989). Phosphorylation of large tumour antigen by cdc2 stimulates SV40 DNA replication. *Nature* **341**(6242), 503-7.

- McVey, D., Ray, S., Gluzman, Y., Berger, L., Wildeman, A. G., Marshak, D. R., and Tegtmeyer, P. (1993). cdc2 phosphorylation of threonine 124 activates the origin-unwinding functions of simian virus 40 T antigen. *J Virol* **67**(9), 5206-15.
- McVey, D., Strauss, M., and Gluzman, Y. (1989). Properties of the DNA-binding domain of the simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* **9**(12), 5525-36.
- McVey, D., Woelker, B., and Tegtmeyer, P. (1996). Mechanisms of simian virus 40 T-antigen activation by phosphorylation of threonine 124. *J Virol* **70**(6), 3887-93.
- 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**(6), 3789-98.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., and Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* **17 Suppl 5**, v7-12.
- Moarefi, I. F., Small, D., Gilbert, I., Hopfner, M., Randall, S. K., Schneider, C., Russo, A. A., Ramsperger, U., Arthur, A. K., Stahl, H., and 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., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., and 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.
- Mohr, I. J., Stillman, B., and Gluzman, Y. (1987). Regulation of SV40 DNA replication by phosphorylation of T antigen. *Embo J* **6**(1), 153-60.
- 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**(49), 19541-6.
- Munster, P. N., Srethapakdi, M., Moasser, M. M., and 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), 2945-52.
- Nishitani, H., and Lygerou, Z. (2002). Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* **7**(6), 523-34.

- Parsons, R., Anderson, M. E., and 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), 509-18.
- Rihs, H. P., Jans, D. A., Fan, H., and 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), 633-9.
- 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**(3), 1602-11.
- Scheidtmann, K. H., Hardung, M., Echle, B., and 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., and 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), 4301-12.
- Schneider, J., and 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), 1598-605.
- Schuck, S., and Stenlund, A. (2005). Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* **79**(13), 8661-4.
- Simmons, D. T., Loeber, G., and Tegtmeyer, P. (1990). Four major sequence elements of simian virus 40 large T antigen coordinate its specific and nonspecific DNA binding. *J Virol* **64**(5), 1973-83.
- Simmons, D. T., Upson, R., Wun-Kim, K., and Young, W. (1993). Biochemical analysis of mutants with changes in the origin-binding domain of simian virus 40 tumor antigen. *J Virol* **67**(7), 4227-36.

- Simmons, D. T., Wun-Kim, K., and Young, W. (1990). Identification of simian virus 40 T-antigen residues important for specific and nonspecific binding to DNA and for helicase activity. *J Virol* **64**(10), 4858-65.
- Sporbert, A., Domaing, P., Leonhardt, H., and Cardoso, M. C. (2005). PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting Okazaki fragment maturation proteins. *Nucleic Acids Res* **33**(11), 3521-8.
- Srethapakdi, M., Liu, F., Tavorath, R., and Rosen, N. (2000). Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest. *Cancer Res* **60**(14), 3940-6.
- Stubenrauch, F., Colbert, A. M., and 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), 8115-23.
- 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**(2), 179-202.
- 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**(1), 219-22.
- Taylor, E. R., and Morgan, I. M. (2003). A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV-16 E1- and E2-mediated DNA replication. *Virology* **315**(1), 103-9.
- Tegtmeyer, P., Lewton, B. A., DeLucia, A. L., Wilson, V. G., and 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), 151-61.
- 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**(9), 5178-91.

- 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**(16), 7349-7361.
- 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**(9), 5512-5518.
- 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**(13), 4321-9.
- Virshup, D. M., Kauffman, M. G., and 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., and Kelly, T. J. (1992). Mechanism of activation of simian virus 40 DNA replication by protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **12**(11), 4883-95.
- Wang, G., Miskimins, R., and 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., and 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., and Lalande, M. (1991). Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border. *Cytometry* **12**(3), 242-6.
- Weisshart, K., Taneja, P., Jenne, A., Herbig, U., Simmons, D. T., and Fanning, E. (1999). Two regions of simian virus 40 T antigen determine cooperativity of double-hexamers assembly on the viral origin of DNA replication and promote hexamer interactions during bidirectional origin DNA unwinding. *J Virol* **73**(3), 2201-11.
- Welsh, J. D., Swimmer, C., Cocke, T., and 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), 2207-12.

- 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**(25), 22426-22438.
- Wun-Kim, K., Upson, R., Young, W., Melendy, T., Stillman, B., and Simmons, D. T. (1993). The DNA-binding domain of simian virus 40 tumor antigen has multiple functions. *J Virol* **67**(12), 7608-11.

3 Article 2 – Caractérisation d’un domaine de transactivation de E1 du VPH

3.1 Mise en contexte de l’article

Le domaine N-terminal de la protéine E1 du VPH est essentiel pour la réplication de l’ADN viral *in vivo*, mais pas *in vitro*. Le rôle de la portion située entre le site de liaison à p80 et le module de localisation cellulaire dans la réplication de l’ADN viral est encore inconnu. La portion comprise entre les acides aminés 1-72 chez VPH11 agit comme un activateur de transcription chez la levure *S. cerevisiae* lorsque fusionnée à un domaine de liaison à l’ADN hétérologue. Le même phénomène a été observé avec la protéine pleine longueur fusionnée au domaine de liaison à l’ADN de E2 dans des cellules humaines. À partir de ces observations, nous avons identifié dans la région N-terminale de E1 un motif similaire à ceux des sous-domaines de transactivation TAD2 de p53 et VP16C de VP16. Ce motif est fortement conservé chez les types anogénitaux du VPH et possède une activité de transactivation chez la levure. Le but principal de cet article est de caractériser la région semblable à un domaine de transactivation identifiée chez E1 et de déterminer si elle joue un rôle dans la régulation de la réplication de l’ADN viral.

3.2 Contribution des co-auteurs

J'ai personnellement effectué la caractérisation du domaine de transactivation de E1, incluant les essais de transactivation en levure, les essais de réplication, de liaison à l'ADN et de clivage par la caspase-3 avec les mutants de transactivation. J'ai aussi utilisé des programmes de prédiction de structure des protéines, compilé les résultats et écrit en partie l'article.

Amélie Fradet-Turcotte a construit les mutants du domaine de transactivation de VPH31 E1 utilisés en levure et en cellules humaines. Elle a aussi effectué les expériences de microscopie confocale à fluorescence et de GST-pulldown.

Paola Di Lello a fait les expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de calorimétrie et a préparé les figures 1C) et 5.

James G. Omichinski a dirigé les expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de calorimétrie et a écrit la section de l'article décrivant ces résultats.

Jacques Archambault a guidé et supervisé la recherche et a écrit l'article.

3.3 Texte de l'article


The papillomavirus E1 helicase contains a region similar to the p53 transactivation domain that is required for efficient viral DNA replication

Geneviève Morin^{1,2}, Amélie Fradet-Turcotte^{1,2}, Paola Di Lello², James G. Omichinski²,
Jacques Archambault^{1,2}

¹Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM)

²Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running Title: Transactivation domain of papillomavirus E1

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

3.3.1 Abstract

The E1 helicase is essential for replication of the papillomavirus genome. E1 binds to the viral origin where it assembles into hexamers that unwind DNA and interacts with host factors at the replication fork. The origin-binding domain of E1, located in the middle of the protein, and its C-terminal helicase domain are necessary and sufficient to support DNA replication *in vitro*. In contrast, the N-terminal region (NTR) of E1 is only required *in vivo*, suggesting that it has a regulatory function. The first 40 amino acids of the NTR interact with the cellular protein p80 to promote replication and maintenance of the viral genome in keratinocytes. In this study, we show that a region located immediately C-terminal of the p80-binding site has sequence similarity to a region of the p53 transactivation domain (p53 TAD2). Accordingly, the E1 NTR from several HPV types could activate transcription in yeast when fused to the LexA DNA-binding domain. In all cases, E1 transactivation activity could be abrogated by mutation of three conserved hydrophobic amino acids that correspond to those important for the interaction of p53 TAD2 with the Tfb1/p62 (yeast/human) subunit of the general transcription factor TFIIF. As previously reported for p53, transactivation by E1 in yeast was found to require the SAGA histone acetyltransferase complex. By NMR and ITC, we showed that the E1 TAD-like region can also bind Tfb1/p62, on the same surface as p53 TAD2, and with a comparable affinity. Finally, we determined that mutation of the three residues in E1 that abrogate its transactivation activity also reduce by 50% its ability to support transient DNA replication in C33A cells. These results demonstrate the existence of a conserved TAD-like region in the E1 NTR that is required for efficient viral DNA replication.

3.3.2 Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are small DNA tumor viruses that infect stratified epithelium from skin or mucosa. Amongst the 120 or more HPV types identified so far, there are at least 40 that infect the anogenital tract. Those types are classified either as low-risk if they only cause benign lesions such as warts or as high-risk if they can lead to the development of cancer. Infection by a high-risk HPV type is a necessary cause of cervical cancer, the second most common malignancy amongst women in the world (Parkin et al., 2005). HPVs establish their double-stranded DNA genomes as episomes in the nucleus of undifferentiated keratinocytes from the basal layer of the epithelium and rely on the differentiation program that these cells undergo to complete their viral life cycle (reviewed in (Doorbar, 2005)). Replication of the viral genome is accomplished by the E1 and E2 proteins in conjunction with the host cell DNA replication machinery. E1 is a helicase that is recruited, by E2, to the viral origin of replication (ori). E1 assembles on the ori as a double hexamer that unwinds DNA at the bi-directional replication fork and also recruits DNA polymerase/ α -primase (DNA Pol α), RPA and other host replication factors to promote viral DNA replication (reviewed in (Stenlund, 2003)).

The E1 protein can be divided into three functional segments (Fig. 1A): the N-terminal regulatory region (NTR), the central origin-binding domain (OBD) and the C-terminal helicase domain. The helicase domain contains sequences important for oligomerization of the protein, for interaction with E2 and DNA Pol α and, as its name indicates, has helicase/ATPase activities (Masterson et al., 1998; Titolo et al., 2000; White et al., 2001). The OBD and C-terminal helicase domain are both necessary and sufficient to catalyze viral DNA replication *in vitro*, in a cell-free system (Amin et al., 2000). Although the NTR of E1 is dispensable for DNA replication *in vitro*, it is essential *in vivo* suggesting that it has a regulatory function (Amin et al., 2000; Sun, Han, and McCance, 1998). The NTR was previously shown to contain a bi-partite nuclear localization sequence (NLS), a nuclear export sequence (NES), a cyclin-binding motif (CBM) and phosphorylation sites important for the accumulation of E1 in the nucleus, where viral DNA replication takes place. All of these motifs allow the highly-regulated nucleo-cytoplasmic shuttling of E1

(Deng et al., 2004; Lentz et al., 1993; Yu et al., 2007). These motifs are all contained within a short region, located between residues 83 and 125 of E1 (for HPV31; Fig. 1A), which we refer to as the “shuttling module”. We previously reported that the NTR also contains a binding site for the cellular protein p80 within its first 40 amino acids (Fig. 1A). Mutations in this site that abrogate p80-binding severely reduce the ability of E1 to support transient DNA replication and abolish its ability to maintain the viral genome in immortalized keratinocytes (Cote-Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte et al., 2010). Finally, the E1 NTR also contains two consecutive caspase cleavage sites (DxxDxxD), located between the p80 binding region and the shuttling module (Fig. 1A), whose cleavage by caspases-3 and -7 is required for viral genome amplification in differentiated keratinocytes (Moody et al., 2007; Moody and Laimins, 2009).

A previous study by Demeret et al. (Demeret et al., 1998) suggested that HPV18 E1 can function as a transcriptional transactivator when interacting with E2 or when fused directly to the DNA-binding domain of E2. Similarly, we and others observed in the course of yeast two-hybrid studies that E1 can activate transcription when fused to the heterologous DNA-binding domain of Gal4 or LexA. This ability of E1 to activate transcription in yeast could be mapped to the NTR, more precisely to sequences located between amino acids 1-190 of HPV16 E1 and 1-72 of HPV11 E1 (Titolo et al., 1999; Yasugi et al., 1997). Here we report that the NTR from HPV31 E1 also activates transcription in yeast when fused to the DNA-binding domain of LexA. Inspection of the amino acid sequence of the NTR revealed that it contains a short region with similarity to the transactivation domains (TADs) of the tumor suppressor p53 and that of Herpes Simplex Viral Protein 16 (VP16). These TADs are characterized by their acidic nature and the presence of three hydrophobic residues that make direct contact with their target proteins, including the general transcription factor TFIID. These hydrophobic residues are conserved in E1 and their mutation to alanine severely reduces transactivation in yeast, indicating that the TAD-like region of E1 (referred herein as TLR) is functionally related to those of p53 and VP16. We also show that the transactivation activity of the NTR is conserved amongst E1 from several HPV types and, similarly to that of the p53 TAD,

requires the SAGA histone acetyltransferase complex. To gather further evidence that the E1 TLR is similar to the p53 TAD, we studied its interaction in vitro with the Tfb1 subunit of TFIID, a well-established target of the p53 and VP16 TADs (Di Lello et al., 2006; Langlois et al., 2008; Xiao et al., 1994). We provide evidence from NMR and isothermal titration calorimetry (ITC) studies that the E1 TLR binds to Tfb1 with a comparable affinity and through the same binding surface as that of p53. Finally, we determined that mutations in E1 that abolish its transactivation activity in yeast reduce by half its ability to support transient DNA replication in C33A cervical carcinoma cells. These studies demonstrate that the E1 NTR contains a conserved TAD-like region that is required for efficient viral DNA replication.

3.3.3 Materials and Methods

Plasmid constructions and mutagenesis. Plasmid pSH18-34 (Invitrogen) expressing LacZ under the control of eight LexA operators was used as reporter for the β -galactosidase assays in yeast. LexA-DNA binding domain (DBD) fusion proteins were expressed from pEG202-NLS-MCS, a modified version of pEG202 (Origene) in which a sequence encoding the SV40 NLS and restriction sites for NcoI, NotI, SacII and BamHI has been inserted between the EcoRI and XhoI sites. The sequence encoding amino acids 1-83 of HPV31 E1 was inserted between the NcoI and BamHI restriction sites of pEG202-NLS-MCS. Analogous constructs were also produced for HPV6 E1(1-80), HPV11 E1(1-80), HPV16 E1(1-84) and HPV18 E1(1-83). The plasmid used to express EYFP-HPV31 E1 was described previously (Cote-Martin et al., 2008). For purification of HPV31 E1 (2-332) in bacteria, GST fusion proteins were expressed from plasmid pGEX-4T-1 in which the E1 coding sequence was inserted between the EcoRI and Sall restriction sites. Site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Further details on their constructions will be provided upon request.

Transactivation assays in yeast. Yeast strain EGY48 (MATa; leu2-3, 112; his3-11,15; trp1-1; ura3-1; 6xLexAop-LEU2) or BY4741 (MATa; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0) and its derivatives carrying a deletion of ADA1, GCN5 or SPT7, were transformed with the LexA operator–lacZ fusion plasmid pSH18–34 and the indicated LexA DBD-fusion proteins. For each transformation, β -galactosidase activity was determined from three independent samples and average values are reported with standard deviations. To measure β -galactosidase activity, the transformed cells were pre-grown overnight in synthetic defined (SD) liquid medium lacking uracil and histidine and then used to inoculate new cultures in fresh medium. These cultures were grown at 30°C until they reached an optical density at 600 nm (OD_{600}) of approximately 0.6. The cells were then harvested, washed, and permeabilized by three cycles of freezing and thawing. β -galactosidase activity was measured spectrophotometrically (at 578 nm) with the substrate chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG, Roche) as described in the Clontech Yeast Protocols Handbook. Enzymatic activity was calculated by the following equation: Miller units = $(1,000 \times OD_{578}) / (\text{elapsed minutes} \times V \times OD_{600})$ where $V = 0.1 \times$ concentration factor of the culture. One Miller unit is defined as the amount of β -galactosidase that hydrolyzes 1 μmol of CPRG to chlorophenol red and D-galactose per minute per cell.

Cell culture and transfections. C33A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.5 IU/ml of penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ 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. This assay was performed essentially as described previously, but using EYFP-tagged E1 instead of Flag-tagged E1 (Fradet-Turcotte et al., 2010). Briefly, C33A cells were plated 20 hrs before transfection in white flat-bottom 96-well plates at a density of 25000 cells/well. When different amounts of EYFP-E1 expression plasmid (pEYFP-HPV31 E1) were used, the quantity of plasmid

DNA was adjusted to 50 ng with the empty vector (pEYFP-C1, Clontech). For all experiments, 10 ng of a plasmid expressing Flag-tagged E2 (p31E2) and 40 ng of the empty plasmid (pCMV-3Tag-1a; Stratagene), in addition to 2.5 ng of the origin-containing plasmid pFLORI31 (Fluc) and 0.5 ng of the Renilla luciferase internal control (pRL) were transfected. The culture medium was changed 4 hrs post-transfection. Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Glo Luciferase assay system (Promega) 72 hrs post-transfection. Plasmids p31E2, pFLORI31 and pRL were previously described (Fradet-Turcotte et al., 2010). For inhibitors testing, 10 ng of pEYFP-HPV31 E1 were transfected. Inhibitors were added 4 hrs post-transfection and luciferase activities were measured 24 hrs later. Hydroxyurea and aphidicolin were purchased from Sigma-Aldrich and Calbiochem, respectively.

Western blotting and antibodies. Proteins fused to EYFP or to the LexA DBD were detected using, respectively, a mixture of two mouse monoclonal antibodies purchased from Roche (Cat: 11814460001) and a mouse monoclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology (Cat: sc-7544). Human β -tubulin, yeast β -actin and human caspase-3 were detected using a mouse monoclonal antibody from Sigma-Aldrich (Cat: T0426), a mouse monoclonal antibody from Abcam (Cat: ab8224) and a rabbit polyclonal antibody from Cell Signalling Technology (Cat: 9662), respectively. For Western blot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes and detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from GE Healthcare, either sheep anti-mouse IgG (Cat: NA931) or donkey anti-rabbit IgG (Cat: NA934V) and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Confocal fluorescence microscopy. 8×10^5 C33A cells were transfected with 1 μ g of EYFP-HPV31 E1 expression plasmid and grown on coverslips. Cells were fixed 24 hrs later with 4% formaldehyde, DNA was stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes) and coverslips 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, Canada) and analyzed using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss, Toronto, Canada).

Purification of E1 fragments from bacteria. E1 fragments were produced as GST-fusion proteins in *E. Coli* BL21 (DE3) (Novagen) as previously described (Senechal et al., 2007). GST-E1 fusion proteins were purified and cleaved with thrombin to remove the GST-moiety and further purified as described previously (Fradet-Turcotte et al., 2007). All protein concentrations were determined by Bradford analysis. The PH domain of Tfb1 (Tfb1₁₋₁₁₅) was expressed and purified as previously described (Di Lello et al., 2005).

Fluorescence polarization DNA binding assay. Binding assays were performed as previously described (Fradet-Turcotte et al., 2007) using 10 nM fluorescein-labeled probe and the indicated concentrations of protein in the following buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.01% NP-40, and 1 mM DTT. Fluorescence readings were taken after a 30 min incubation at 4°C using a Wallac 1420 Multilabel HTS Counter (Victor³V) equipped with a 485 nm / 535 nm filter set. Background fluorescence from buffer was subtracted and polarization values defined as follows: $P = (I_{\parallel} - I_{[\text{perp}]}) / (I_{\parallel} + I_{[\text{perp}]})$, where I_{\parallel} and $I_{[\text{perp}]}$ are the fluorescence intensities recorded in the parallel and perpendicular orientations respective to the excitation polarizer. Fluorescein-labeled oligonucleotides were purchased from Invitrogen, with the fluorophore attached at the 5'-end by a six-carbon linker. Duplex DNA probes were prepared by annealing each fluorescein-labeled oligonucleotide to a complementary oligonucleotide in a ratio of 1:1.5 as previously described (Fradet-Turcotte et al., 2007).

Caspase cleavage assay. Approximately 8×10^5 C33A cells were transfected in 6-well plates with 1.2 µg of EYFP-HPV31 E1 expressing vectors. Cells were treated 24 hrs post-transfection with 2 µM staurosporine (Sigma-Aldrich) or 0.2% DMSO alone as the vehicle for 4 hrs. Cells were then lysed and extracts analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-GFP and anti-caspase-3 antibodies.

Peptide Synthesis. A synthetic peptide containing amino acids 44-63 of HPV11 E1 (HPV11 E1(44-63)) was purchased from the Sheldon Biotechnology Centre (McGill University, Montreal, Canada) and purified by reversed phase HPLC using a C4-column (Vydac). The amino acid sequence of the peptide is EEEVEDSGYDMVDFIDDRG.

Isothermal titration calorimetry studies. The ITC titration experiments were performed as previously described (Houtman et al., 2004) in 20 mM Tris at pH 7.5. All titrations fit the single-binding site mechanism with 1:1 stoichiometry.

Sample for NMR studies. For the NMR chemical shift mapping studies, a sample containing 0.4 mM ^{15}N -Tfb1(1–115) in 20 mM sodium phosphate (pH=6.5) and 1 mM EDTA (90% H_2O / 10% D_2O) was used. The unlabeled HPV11 E1(44-63) peptide was added to a final ratio of 1:1.

NMR spectroscopy studies. NMR spectra were collected at 300 K on a Varian Unity Inova 600 MHz NMR spectrometer equipped with a z pulsed-field gradient unit and triple resonance probes. For the chemical shift mapping, the changes were determined in both ^1H and ^{15}N chemical shifts $\{\Delta\delta > 0.1 \text{ ppm}; \Delta\delta = [(0.17\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2]^{1/2}\}$ as observed in the 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -labeled Tfb1(1-115) upon binding to a molar equivalent of HPV11 E1(44-63). Figures were generated with PyMol (www.pymol.org).

3.3.4 Results

3.3.4.1 HPV31 E1 contains a region similar to the p53 transactivation domain that can activate transcription in yeast.

HPV11 and HPV16 E1 have been observed to activate the transcription of reporter genes in yeast when fused to the heterologous DNA-binding domain of Gal4 and LexA, respectively (Titolo et al., 1999; Yasugi et al., 1997). Furthermore, for both E1 proteins, transactivation activity could be mapped to the NTR (Titolo et al., 1999; Yasugi et al., 1997). A closer examination of the NTR amino acid sequence revealed that a region located between the p80-binding site and the shuttling module shows similarity to the TADs of p53 and VP16 (Fig. 1A and 1B). p53 contains two well characterized TADs in its N-terminus, one located between residues 1 to 40 (TAD1) and the other between amino acids 40 to 73 (TAD2), to which E1 is similar (Candau et al., 1997; Smith et al., 2007). The VP16 TAD

can also be divided in two autonomous domains, named VP16N and VP16C, the latter being the one similar to p53 TAD2 and E1 (Jonker et al., 2004). The p53 TAD2 and VP16C are largely unstructured in solution but fold into an α -helix upon binding to their target proteins (Fig. 1C) (Bochkareva et al., 2005; Di Lello et al., 2006; Jonker et al., 2004; Uesugi et al., 1997). These TADs contain many acidic residues surrounding three critical hydrophobic residues that make direct contacts with target proteins and which are essential for transactivation activity (Fig. 1C). Interestingly, these three hydrophobic residues (M47, F50 and I51 for HPV31 E1) are highly conserved amongst E1 from different HPV types (Fig. 1B, filled boxes). In addition, the p53 TAD2 contains a phosphorylation site (S46) that enhances its transactivation activity by increasing its binding to target proteins (Bulavin et al., 1999; Di Lello et al., 2006; Oda et al., 2000). A potential CK2 phosphorylation site is present and conserved at a similar position in E1 (T43 for HPV31 E1, Fig. 1B, open box). The TADs of p53 and VP16 can function in yeast when tethered to DNA by fusion with the DNA-binding domain of LexA or Gal4 (Cousens et al., 1989; Fields and Jang, 1990). Using a similar approach, we tested if E1 could also activate transcription in yeast. We found that a fusion protein consisting of the N-terminal 83 amino acids of HPV31 E1 fused to LexA DBD (LexA-E1N) was capable of activating a LacZ reporter gene under the control of 8 LexA operators (Fig. 2A and Sup. Table 1). For comparison, we tested in parallel the activity of the two TADs of p53, either individually or in combination. We observed that expression of the complete p53 TAD fused to LexA (LexA-p53(1-73)) was toxic to yeast cells, as shown by the reduced growth of yeast transformed with this construct on selective media (Fig. 2C). This is in agreement with previous reports that also showed that overexpression of p53 is toxic to *S. cerevisiae* and causes a slow growth phenotype that is correlated to the level of transactivation (Fields and Jang, 1990; Inga and Resnick, 2001; Nigro et al., 1992). As might be expected from its toxicity, we found by Western blotting that LexA-p53(1-73) was expressed at very low levels that could be detected only upon longer exposure of the blot shown in Fig. 2B (data not shown). In contrast to the full-length TAD, the p53 TAD1 and TAD2 were not toxic when expressed separately in yeast and accumulated at levels similar to those of LexA-E1N

(Fig. 2B). In β -galactosidase assays, the transactivation activities of p53 TAD1 and TAD2 were comparable and about 2.5-fold higher than that measured for the N-terminal part of HPV31 E1. Thus, the E1 NTR has a relatively strong transactivation activity in yeast, approaching that of p53 TAD2. Importantly, we found that the combined mutation of the three hydrophobic residues M47, F50 and I51 to alanine (MFI mutant) in E1, severely abrogated its transcriptional activity. We also tested if mutation of the putative CK2 site (T43), to either alanine or glutamate (a phosphomimetic), had any effect on the activity of LexA-E1N. Both mutants were able to transactivate the LacZ reporter gene to a similar extent as the wild-type protein. Collectively, these results indicate that HPV31 E1 possesses an intrinsic transactivation activity in yeast, conferred by a TAD-like region similar in sequence and potency to that of p53 TAD2, but whose activity does not appear to be modulated by phosphorylation of T43.

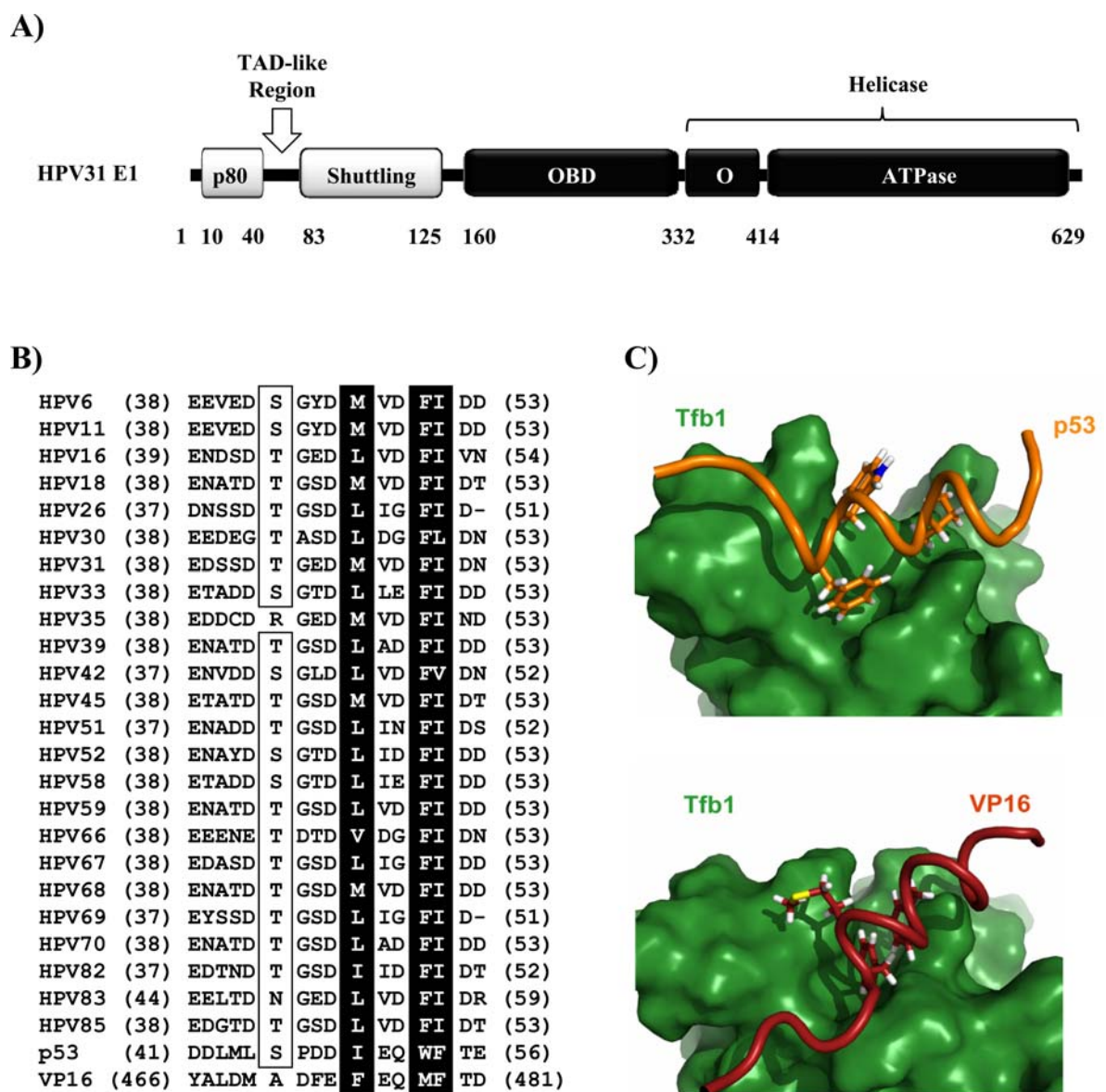


Figure 1. Domain structure of HPV31 E1 and sequence alignment with p53 and VP16.

A) Schematic representation of the full length HPV31 E1 protein. The locations of the p80-binding domain (p80, aa 10-40), nucleo-cytoplasmic shuttling module (shuttling, aa 83 to 125), origin-binding domain (OBD, aa 160-332) and helicase domain encompassing regions required for oligomerization (O, aa 332-414) and ATPase activity (aa 414-629) are indicated. The location of the region showing sequence similarity to p53 TAD (TAD-like

region) is indicated by an open arrow. B) Sequence alignment of part of the E1 N-terminal region from different HPV types together with the transactivation domains of p53 TAD2 and HSV VP16C. The three conserved hydrophobic residues are highlighted in black. Putative CK2 sites in E1 and the S46 phosphorylation site in p53 are boxed. C) Structural details of the Tfb1/p53 and Tfb1/VP16 interactions. The surface of Tfb1 is shown in green with the backbone trace of either the p53 TAD2 helix (in orange, top panel) or the VP16C helix (in red, bottom panel). The side chain of the three hydrophobic residues of p53 and VP16 important for the interaction with Tfb1 are shown.

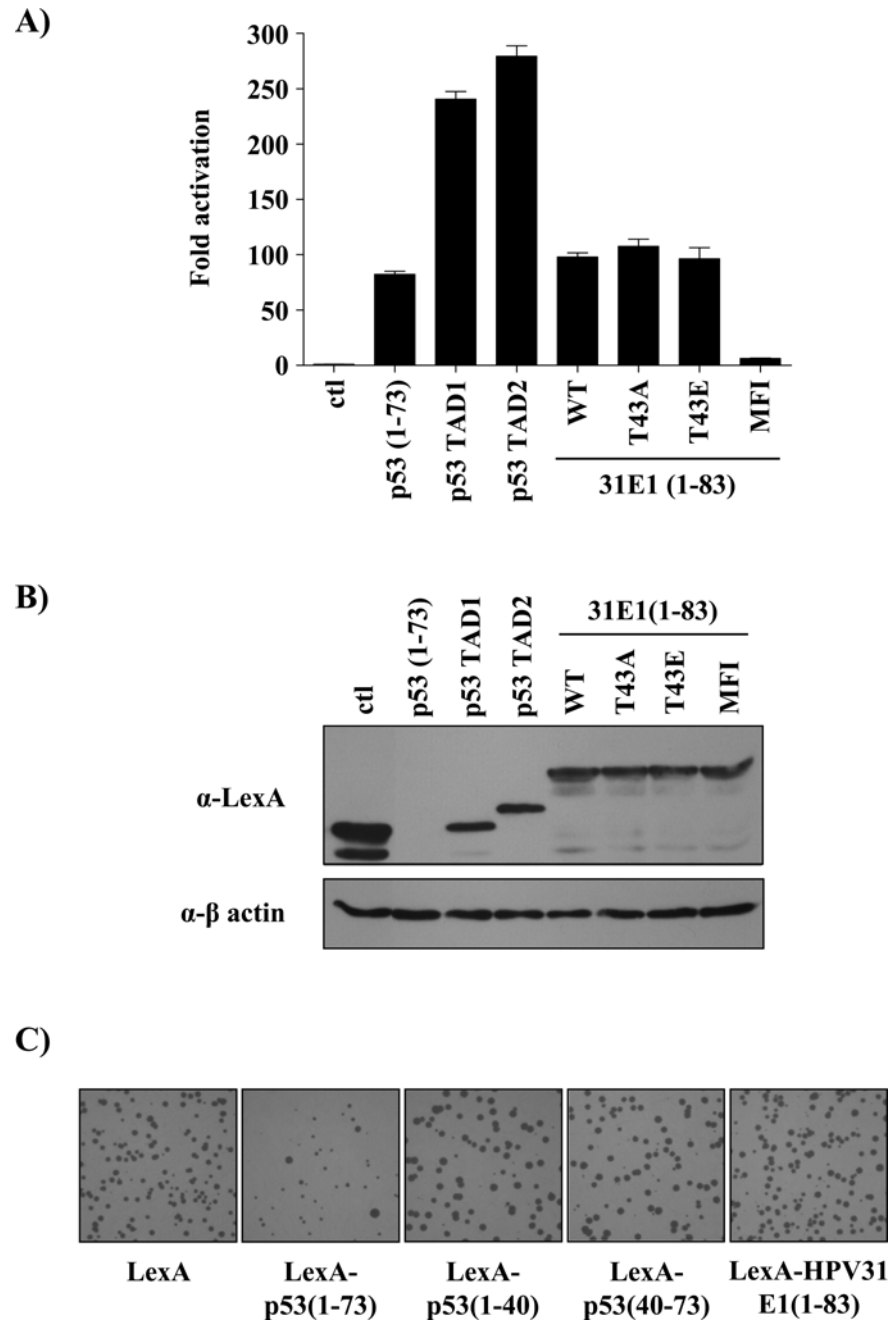


Figure 2. The HPV31 E1 N-terminal region contains a TAD-like region that can activate transcription in yeast.

A) Transactivation activity of LexA-E1N fusion proteins in yeast. β -galactosidase activities measured in cells expressing the indicated LexA fusion proteins are reported in “fold-

activation” of the reporter gene calculated relative to that of the LexA DNA-binding domain alone. B) Anti-LexA Western blot showing the expression of the different LexA-fusion proteins. β -actin was used as a loading control. C) Pictures of yeast colonies grown on selective media plates 4 days after their transformation with LexA-DBD fusion proteins. All constructs were transformed at the same time, starting from the same EGY48 yeast culture.

3.3.4.2 The E1 NTR requires the SAGA complex for transactivation in yeast.

We next wanted to determine if the transactivation activity of E1N in yeast was dependent on the same factors as those required for p53 TAD2. The ability of the full p53 TAD or each of its subdomains to function in yeast was previously shown to require the SAGA chromatin-modifying complex (Candau et al., 1997; Yousef et al., 2008). SAGA is a co-activator complex required for the transcription of about 10% of yeast genes. It is involved in different steps of the transcription process, from the initiation to the nuclear export of the mRNA. First, it can contribute to the assembly of the pre-initiation complex by interacting with the transcription machinery and with activators. Then, it induces chromatin remodeling by acetylating histones at promoters and during the elongation of transcription. It also allows the coupling of mRNA synthesis and nuclear export by binding to nuclear pores (reviewed in (Baker and Grant, 2007)). Some of the components of the SAGA complex are not coded by essential genes in yeast and deletion strains are thus viable (Giaever et al., 2002). We therefore tested if the SAGA complex was needed for activation by the E1 NTR, by performing transactivation assays in three different yeast strains lacking one of the following components of the complex: Gcn5, Ada1, and Spt7. Gcn5 is the subunit that has acetyltransferase activity and its deletion markedly reduced transactivation by p53 TADs (Fig. 3A and Sup. Table 2) and by LexA-E1N and its mutant derivatives (Fig. 3B and Sup. Table 2). Ada1 and Spt7 are required for the structural integrity of the complex and, accordingly, deletion of either of these proteins severely reduced transactivation by LexA-E1N. However, as detected by Western blotting, proteins were expressed at lower levels in these strains (Fig. 3C). In order to factor in the variations

in protein levels, we analyzed the data in terms of “fold-activation” of the reporter gene (Fig. 3A and B), obtained by dividing the β -galactosidase values measured with each LexA-fusion protein by that measured with LexA alone, as was done previously to examine the effect of Gcn5, Ada1, and Spt7 deletions on transactivation by other LexA-fusion proteins (Yousef, Brandl, and Mymryk, 2009). Even when analyzed in this manner, the data revealed a significant effect of the Ada1, Gcn5 and Spt7 deletions on the transactivation activity of LexA-E1N. For E1 and for the p53 TADs, the effect was particularly marked in the Ada1 and Spt7 deletion strains, showing that the integrity of the SAGA complex is necessary for both E1N and p53. The effect of deleting Gcn5 was more moderate, perhaps because the acetyltransferase activity of SAGA is important but not absolutely necessary for activation by E1 and p53 TADs. Importantly, these data indicate that the transactivation by E1N is affected to a similar extent as that of p53 TAD2 by deletion of Gcn5, Ada1, and Spt7, thus providing further evidence that the E1 TLR is functionally similar to p53 TAD2.

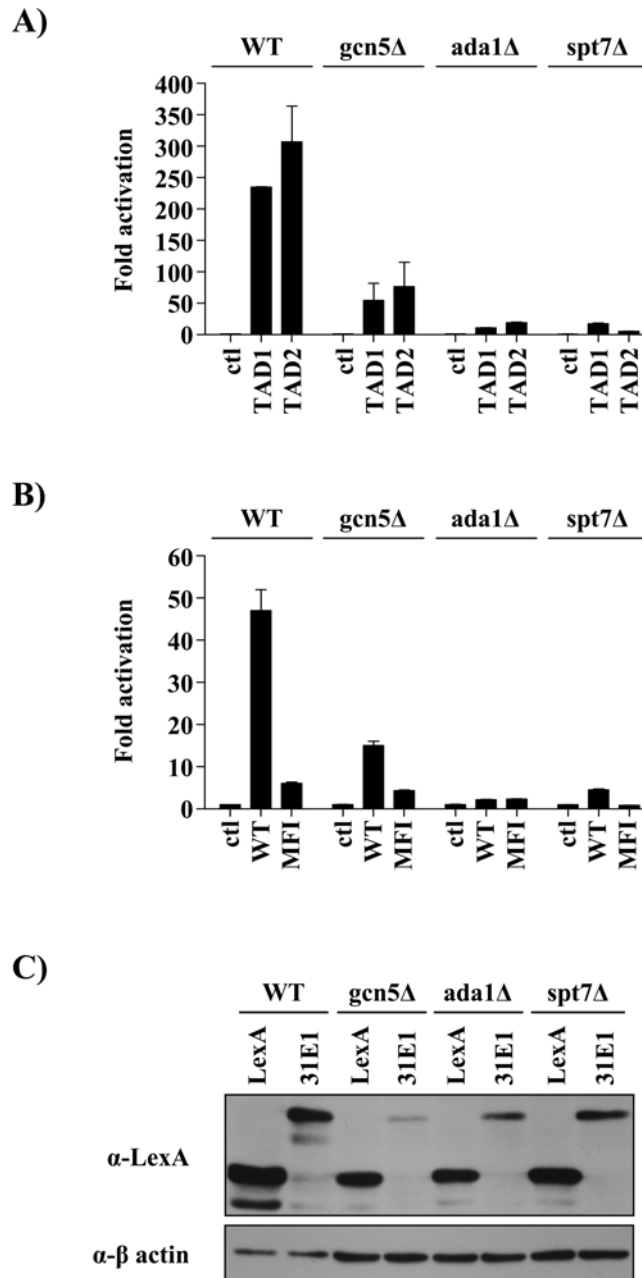


Figure 3. Transactivation activity of the HPV31 E1 N-terminal region is impaired in yeast strains lacking component of the SAGA complex.

Transactivation activity of the indicated LexA-p53 (A) or WT or mutant LexA-E1N (B) fusion proteins was determined in WT yeast strain (BY4741) or isogenic derivatives in which the ADA1, GCN5 or SPT7 gene was deleted. β -galactosidase activities are reported as “fold-activation” of the reporter gene. C) Anti-LexA Western blot showing the

expression of the indicated LexA-DBD fusion proteins in the different yeast strains. β -actin was used as a loading control.

3.3.4.3 The presence of a TLR in the N-terminal region of E1 is a conserved feature of anogenital HPV types.

Next, we tested if the E1 proteins from other anogenital HPV types could also activate transcription in yeast when fused to LexA. We found that the E1 N-terminal regions from the two low-risk types HPV6 and 11 as well as those from the oncogenic types 16 and 18, were all able to activate transcription (Fig. 4A and Sup. Table 3) and were expressed to comparable levels in yeast (Fig. 4B). Thus, the E1 proteins from both high- and low-risk HPV types can activate transcription in yeast. The E1 N-terminal regions from HPV6 and HPV18 displayed the most robust activity, being able to transactivate the reporter gene by 186- and 195-fold, respectively, similar to the levels obtained with p53 TAD2. Importantly, the transcriptional activities of HPV6, 11, 16 and 18 LexA-E1N were abolished by mutations of the three conserved hydrophobic residues to alanine (Fig. 4A), similarly to what was observed for HPV31 E1. From these results, we conclude that the presence of a TLR within the N-terminal region of E1 is a conserved feature of this viral helicase from both low and high-risk HPV types.

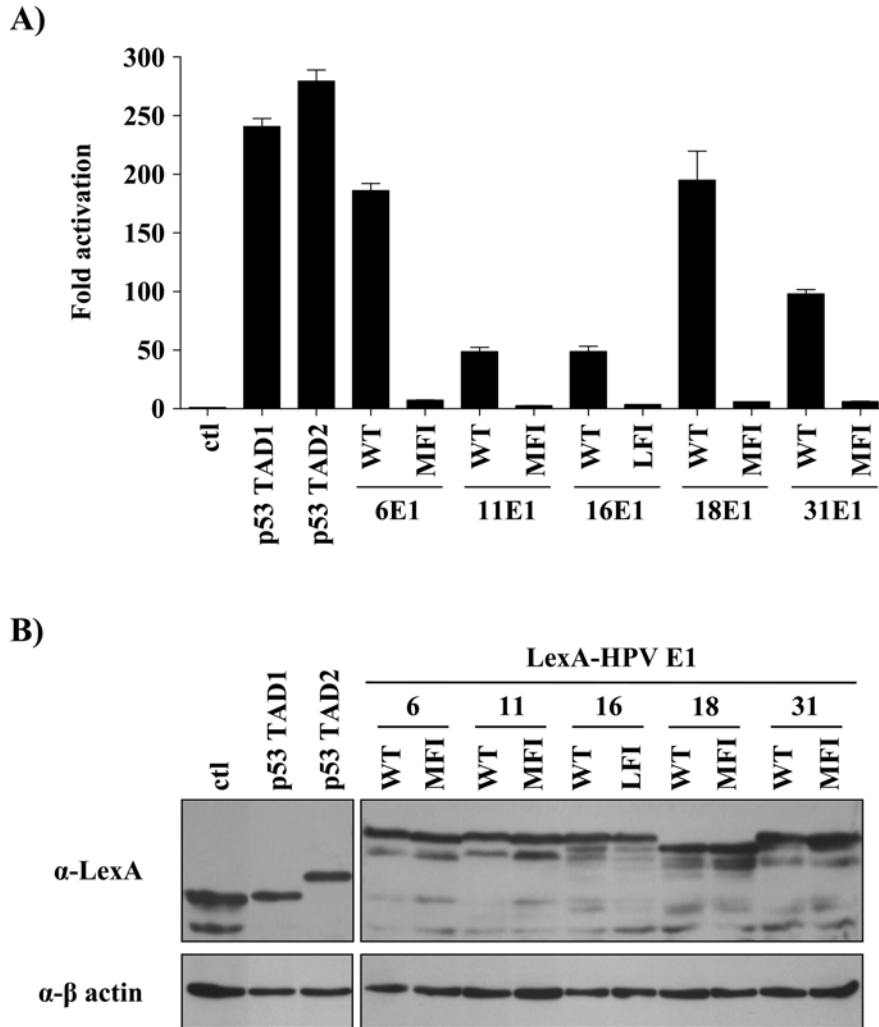


Figure 4. Transactivation activity of the E1 N-terminal regions from different HPV types in yeast.

A) β -galactosidase activities measured in cells expressing the indicated LexA-fusion protein, either WT or mutant, are reported in “fold-activation”. Mutant proteins were created by mutating the three conserved hydrophobic residues to three alanines. B) Anti-LexA Western blot showing the expression of the different LexA-DBD fusion proteins. β -actin was used as a loading control.

3.3.4.4 The E1 TLR is structurally related to the TADs of p53 and HSV VP16.

The TADs of p53 and HSV VP16 have been shown to make direct contacts with several components of the RNA polymerase II transcription machinery. We have previously reported that the p53 and VP16 TADs bind with high affinity to the Tfb1/p62 subunit of the yeast/human general transcription factor IIH (TFIIH), a common target of many acidic TADs. In addition, we have determined that both p53 TAD2 and VP16C form 9-residue α -helices upon binding to the PH (pleckstrin homology) domain of Tfb1 (amino acids 1-115) (Di Lello et al., 2006; Langlois et al., 2008). Based on the structures of these two complexes, it is possible to align the sequence of acidic TADs from other proteins based on a simple recognition code for the Tfb1/p62 subunit of TFIIH. Given that we were able to identify a region from the amino-terminal domain of E1 that resembled p53 and VP16 based on this recognition code for Tfb1/p62 (Fig. 1B), we were interested to determine if a peptide corresponding to this region of HPV11 E1(44-63) was in fact capable of interacting with the PH domain of Tfb1(1-115).

To determine if HPV11 E1(44-63) could interact with Tfb1 like p53 TAD2 and VP16C, we performed NMR chemical shift mapping studies. Additions of HPV11 E1(44-63) to ^{15}N -labeled Tfb1(1-115) resulted in changes in ^1H and ^{15}N chemical shifts for several signals of Tfb1(1-115) in the ^1H - ^{15}N HSQC spectra (Fig. 5A). When mapped onto the NMR solution structures of free Tfb1, the residues displaying significant chemical shift changes (Fig. 5B) cluster on strands β 5, β 6 and β 7 (Fig. 5C). Based on these changes in chemical shifts, the HPV11 E1(44-63) binding site on Tfb1 is similar to that of p53 TAD2 (Fig. 5D). It is also comparable to that of VP16C, because the latter uses the same binding surface as p53 (Langlois et al., 2008). In addition, ITC analysis demonstrated that HPV11 E1(44-63) bound to Tfb1 ($K_d = 380$ nM) with virtually the same affinity as p53 TAD2 ($K_d = 390$ nM) and VP16C ($K_d = 360$ nM).

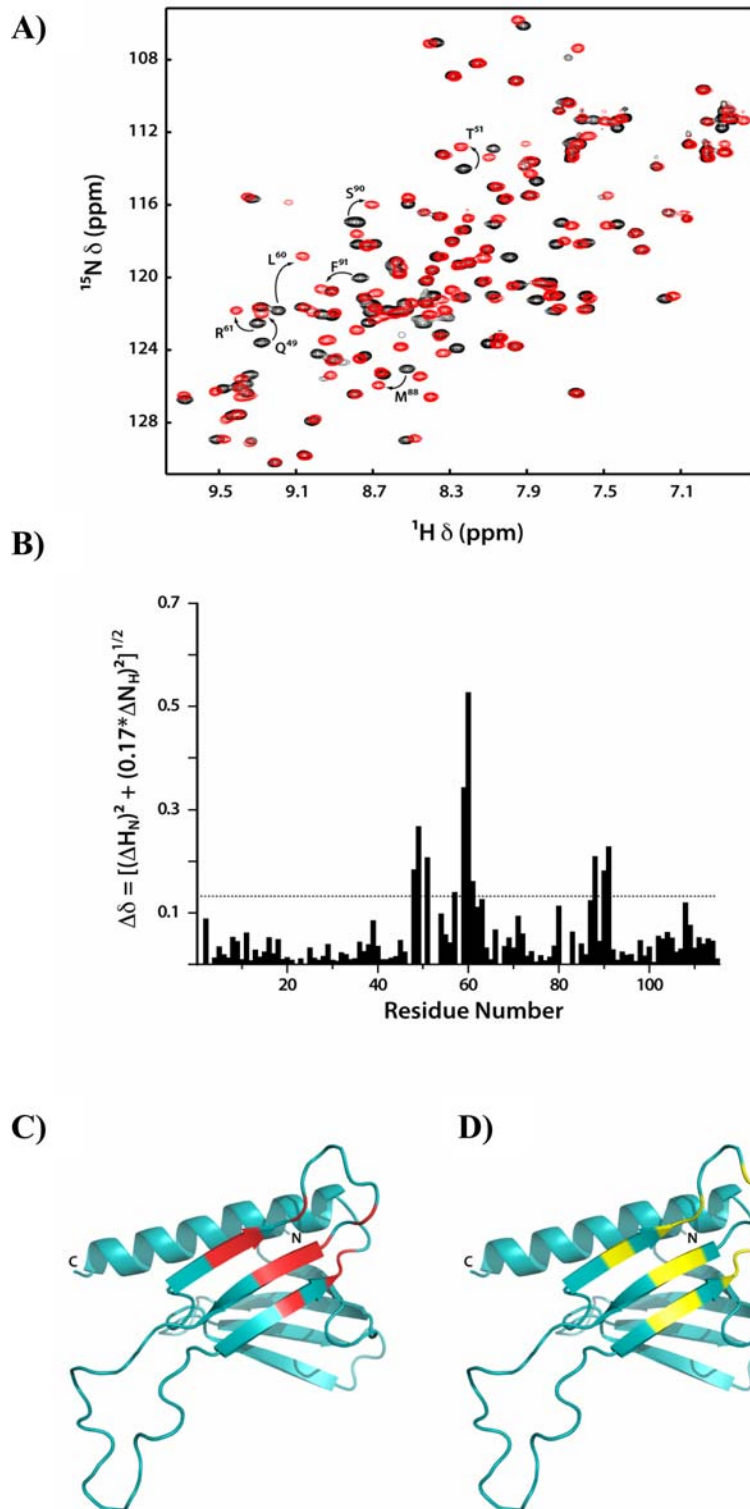


Figure 5. The E1 TLR-binding site on Tfb1 is similar to the p53-binding site.

A) Overlay of the 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -labeled Tfb1(1-115) in the free form (black) and in presence of 1 equivalent of E1(44-63) (red). The residues showing significant chemical shifts changes upon formation of the Tfb1(1-115)/E1(44-63) complex are highlighted by arrows. B) Histogram of the variation in chemical shifts $\{\Delta\delta_{(\text{ppm})} = [(0.17*\Delta N_{\text{H}})^2 + (\Delta H_{\text{N}})^2]^{1/2}\}$ observed in the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of Tfb1(1-115) in the free form and in presence of E1(44-63). C) The amino acids that undergo a significant chemical shift change $[\Delta\delta_{(\text{ppm})} > 0.14]$ upon formation of the Tfb1(1-115)/E1(44-63) complex, and defining the binding site of E1 on Tfb1 were mapped (in red) onto a ribbon model of the free Tfb1(1-115) structure. D) Ribbon model of the free Tfb1(1-115). The binding site for the p53 TAD2, as determined by NMR mapping studies (Di Lello et al., 2006), is highlighted in yellow.

3.3.4.5 Effect of mutations in the E1 TLR on transient HPV DNA replication.

As the primary function of E1 is to replicate the viral genome, we next investigated if the E1 TLR was required for transient HPV DNA replication. Specifically, we tested the effect of the MFI mutation in HPV31 E1 on its ability to support DNA replication using our recently described luciferase assay (Fradet-Turcotte et al., 2010). We also investigated in this experiment the effect of mutations of the potential CK2 phosphorylation site (T43) on DNA replication. This assay is based on an ori-containing plasmid that also carries a luciferase reporter gene in cis of the ori. We previously validated that replication of this plasmid by E1 and E2 results in increased expression of luciferase (Fradet-Turcotte et al., 2010). Furthermore, we show here that EYFP-HPV31 E1 can also be used in this assay and thus is competent for DNA replication similarly to what was reported previously for HPV11 E1 fused to GFP (Deng et al., 2003). Each E1 TLR mutant was tested at three different amounts (1.25, 2.5 and 5 ng of EYFP-E1 expression plasmid), in duplicates, and luciferase activities were determined 72 hrs post-transfection. As can be seen in Fig.6A, the T43A and T43E E1 mutations, which have no effect on transactivation in yeast, did not impair the ability of E1 to support transient DNA replication, indicating that

phosphorylation of this residue is not required for this process. In contrast, the DNA replication activity of the MFI mutant was decreased by approximately 40-50%. All four E1 proteins were expressed to comparable levels, as determined by Western blotting (Fig. 6B). Because the MFI substitution lies in a region of E1 that is close to its nuclear import and export signals, we wanted to rule out that the reduced DNA replication activity of the MFI mutant was due to a defect in nuclear accumulation. To do this, we determined the cellular localization of the EYFP-E1 MFI mutant in absence of E2. In parallel, we also determined the localization of the two T43 mutants. All mutants could accumulate in the nucleus of transfected cells similarly to wild type (WT) E1 (Fig. 6C), indicating that the mutations in the E1 TLR did not affect the activity of the nearby “shuttling module”. Collectively, these results suggest that the TLR of E1 contributes to the overall efficiency of viral DNA replication, although it is not absolutely essential in a transient assay.

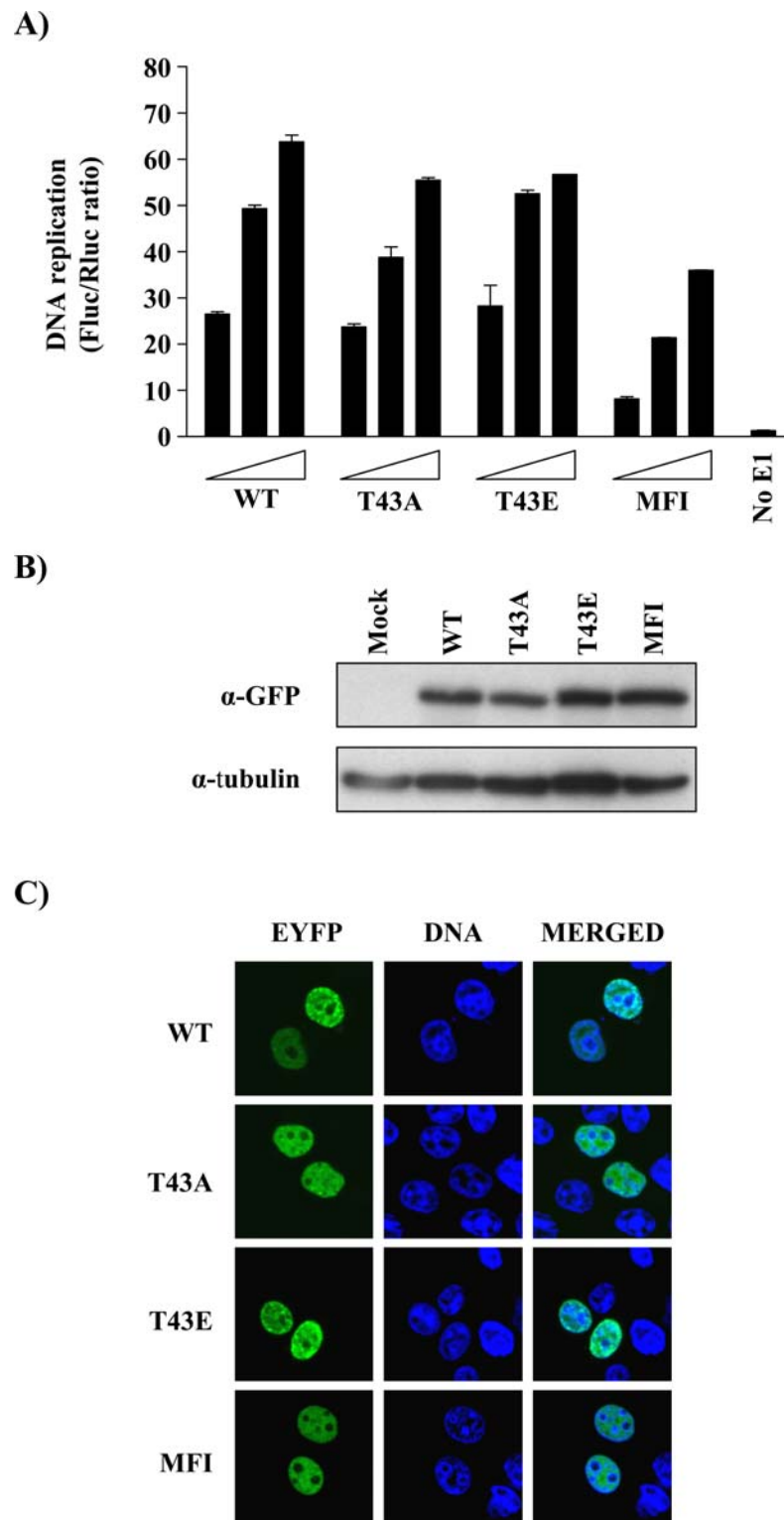


Figure 6. DNA replication activities of E1 TLR mutants.

A) DNA replication activities of the indicated HPV31 E1 mutants were tested using three different amounts of expression vector, as described in the text. B) Anti-GFP Western blot showing the expression of the different EYFP-tagged E1 mutants. Tubulin was used as a loading control. C) Fluorescence confocal microscopy images showing the intracellular localization of the E1 mutant proteins fused to EYFP in C33A cells. Nuclei (DNA) were stained with TOPRO-3.

3.3.4.6 Amino acid substitutions in the E1 TLR do not affect the binding of E1 to the origin or to p80.

To determine if the reduced replication activity of the E1 MFI mutant could be explained by a defect in DNA binding, we tested its DNA-binding affinity directly, using our previously described fluorescence polarization assay (Fradet-Turcotte et al., 2007; Titolo et al., 2003). First, we produced and purified from bacteria a polypeptide spanning amino acids 2-332 of HPV31 E1. This E1 fragment encompasses the complete amino-terminal region and the origin-binding domain (OBD). We similarly produced mutant fragments carrying the MFI and T43A/E substitutions. These E1 fragments were expressed as fusions with GST and the GST moiety was removed by thrombin cleavage after purification. The affinity of these E1 fragments for a DNA probe containing two E1-binding sites (E1BS; 5'-ATACTT-3') in an inverted orientation and separated by 3 bp was then measured. We previously determined that the E1 OBD can bind and dimerize efficiently on this combination of E1BS (Titolo et al., 2003). The affinity of the E1 fragments for a probe in which the two E1BS were mutated (Mut) was used as control. As can be seen in Figure 7A, all four E1 fragments were able to bind to the 2E1BS probe with comparable affinities. Thus, the replication defect brought about by the MFI substitution is not due to a defect in DNA binding. Next, given the proximity of the p80-binding site to the TLR and the importance of the E1-p80 interaction for transient DNA replication (Cote-Martin et al., 2008; Fradet-Turcotte et al., 2010), we considered the possibility that the MFI substitution could be lowering viral DNA replication by affecting the interaction of E1 with the cellular factor p80. However, results from GST-pulldown experiments using purified

GST-E1N and endogenous p80 from a cell extract, indicated that all three mutant proteins were as competent as WT E1 in binding p80 (Fig. 7B). Collectively, the results presented above indicate that the E1 TLR plays an important role in viral DNA replication that is unrelated to ori-binding or interaction with p80.

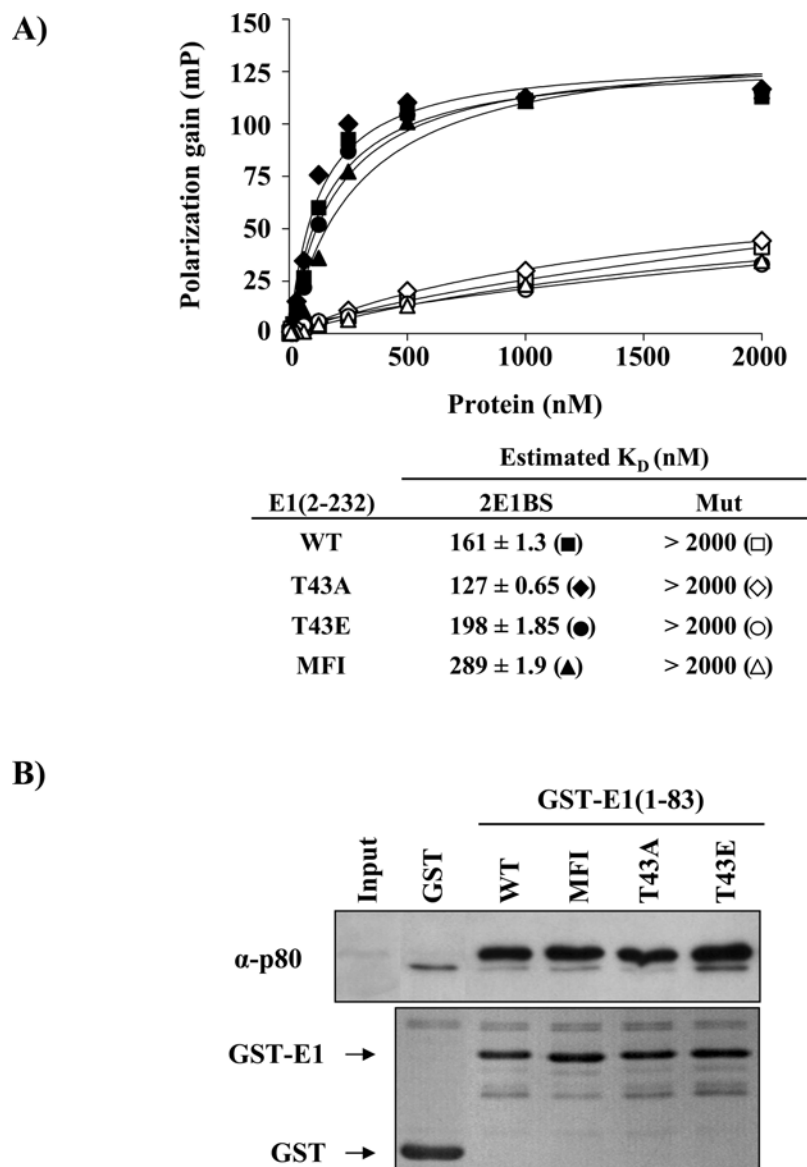


Figure 7. Interaction of E1 TLR mutants with DNA and p80.

A) DNA-binding activity of recombinant HPV31 E1(2-332). Fluorescence polarization binding isotherms were performed with 10 nM of the indicated probe and increasing

concentrations of the indicated WT or mutant E1 fragments. Each isotherm was performed in triplicate; errors bars are barely visible on the graph as they are smaller than the size of the symbols. Polarization values were determined as described in Materials and Methods. Apparent dissociation constants determined from these binding isotherms are indicated below the graph. B) GST-pulldown assays showing the binding of p80 from C33A whole cell extracts to purified GST-HPV31E1(1-83) WT and TLR mutants. Coomassie-stained gel of purified proteins is shown in the lower panel.

3.3.4.7 Further characterization of the replication defect imposed by the E1 MFI substitution.

The findings that the MFI mutation does not affect the origin-binding activity of E1 or its interaction with p80 prompted us to characterize in greater detail the replication defect imposed by these substitutions. First, we tested if the DNA replication defect of the MFI E1 mutant could be rescued by overexpression of the protein, as might be anticipated if the protein is slightly unstable or has a reduced affinity for E2, for example. To do so, we performed transient DNA replication assays using a wide range of the MFI E1-expression vector and of the WT E1 vector as a control. As can be seen in Fig. 8A, the DNA replication signal obtained with WT E1 reached a plateau at 5 ng of expression plasmid. In contrast, the plateau obtained with the MFI E1 mutant was reached with 10 ng of expression vector and, importantly, was lower than that obtained with WT E1 by approximately 50%. These results indicate that the DNA replication defect of the E1 MFI mutant cannot be corrected by overexpression levels of the protein.

Next, we investigated if the replication defect of the MFI mutant was due to a delay in the DNA replication process. To assess this possibility, we measured DNA replication by E1 WT and MFI over time for five days. Maximal signals were obtained after about 72 hrs for both proteins and the MFI mutant could never reach replication levels comparable to those of the WT (Fig. 8B). For each time point, the signals obtained with E1 MFI were about 50-60% of those obtained with E1 WT. In parallel, we verified by Western blotting

that both proteins were expressed to comparable levels during the entire time-course (Fig. 8B). Thus, the replication defect of the E1 MFI mutant is not due to a delay in DNA replication.

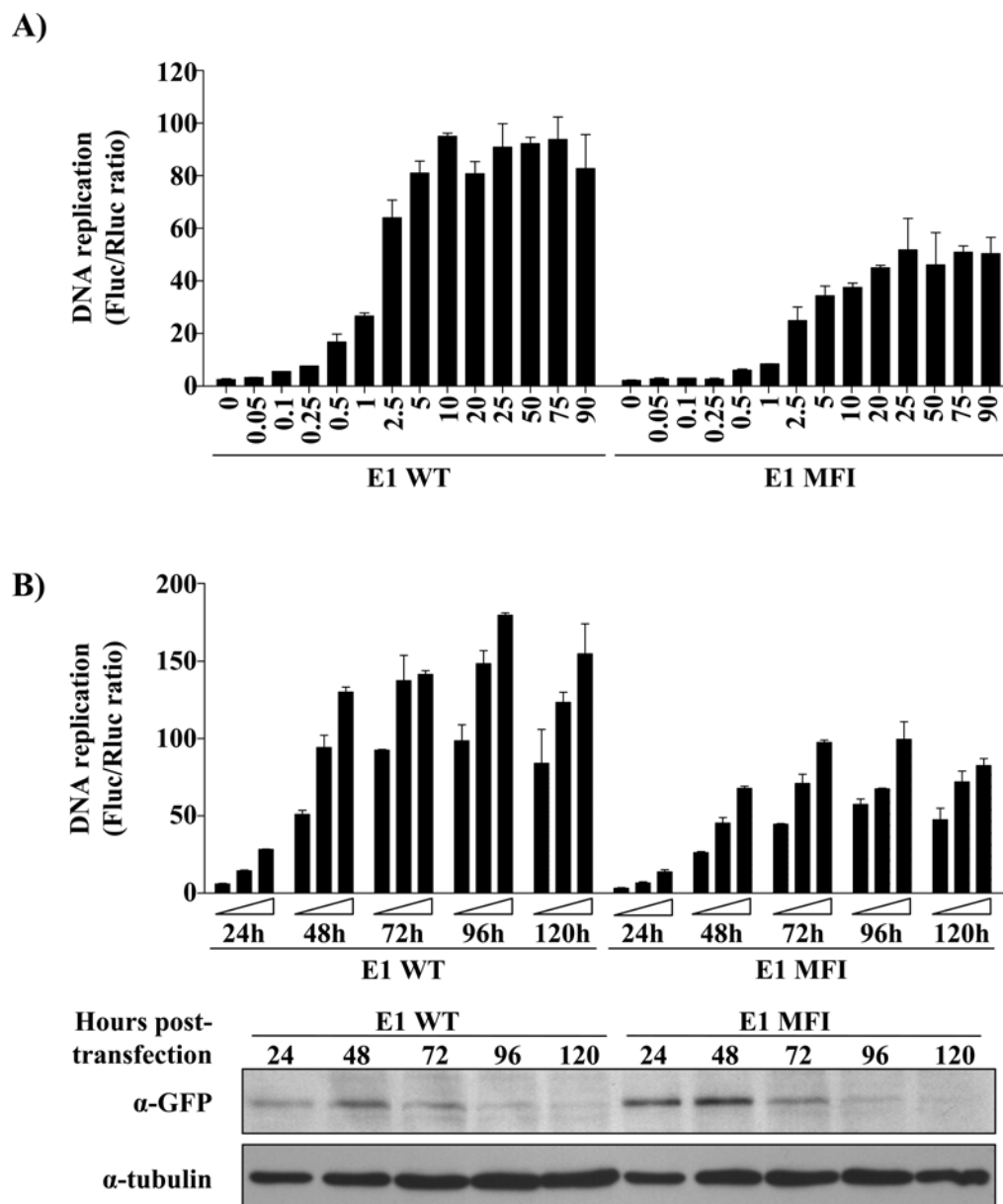


Figure 8. The DNA replication defect of the E1 MFI mutant is not suppressed by overexpression of the protein or by lengthening the time of the assay.

A) Gradients of E1 WT and MFI expressing plasmids (amounts are indicated in ng) were transfected for the replication assay and incubated for 72 hrs. Results are presented as Fluc/Rluc ratio. B) Fluc/Rluc ratio (replication signals) obtained by using 1.25, 2.5 and 5 ng of pEY31E1 WT or MFI at 24, 48, 72, 96 and 120 hrs post-transfection.

Finally, we also tested if the defect of the MFI mutant would be exacerbated under conditions where either the initiation or the elongation phase of viral DNA replication is limiting. To limit initiation, we tested the activity of the MFI mutant in the presence of an E2 mutant (E39Q) that has a weaker affinity for E1 and supports only low levels of transient DNA replication (Fradet-Turcotte et al., 2010). In unpublished studies, we have observed that the replication defect of certain E1 mutants is exacerbated when combined with E39Q E2, or stated otherwise, that these E1 mutations confer a synthetic defective phenotype together with E39Q E2. Figure 9A confirms that the replication activity of E39Q E2 (right panel) is lower than that of WT E2 (left panel), by approximately four-fold, when tested in presence of WT E1. We then determined the effect of the E1 MFI mutation in combination with E39Q E2. Under these conditions, the E1 MFI mutant still showed a reduced replication activity relative to that of WT E1, as anticipated. However, the luciferase levels achieved with the MFI mutant remained 50-60% of those achieved with WT E1. Thus, the DNA replication activity of the MFI mutant is not significantly worsened, relative to that of WT E1, when its recruitment to the ori is made limiting by the use of E2 E39Q. We next tested if the defect of the MFI mutant is enhanced when the elongation phase of DNA replication is partially inhibited by the use of two different inhibitors, hydroxyurea and aphidicolin. Hydroxyurea inhibits ribonucleotide reductase leading to a decrease in the pool of deoxyribonucleotides needed for DNA synthesis (Krakoff, Brown, and Reichard, 1968). Aphidicolin blocks DNA chain elongation by inhibiting DNA polymerases α and δ (Goscin and Byrnes, 1982; Ikegami et al., 1978). When these inhibitors were added in the assay, replication by the E1 MFI mutant was reduced in a dose-dependant manner, but not to a higher extent than those of WT E1. Thus,

the defect of the MFI mutant is not overtly aggravated when the elongation phase of DNA replication is made limiting.

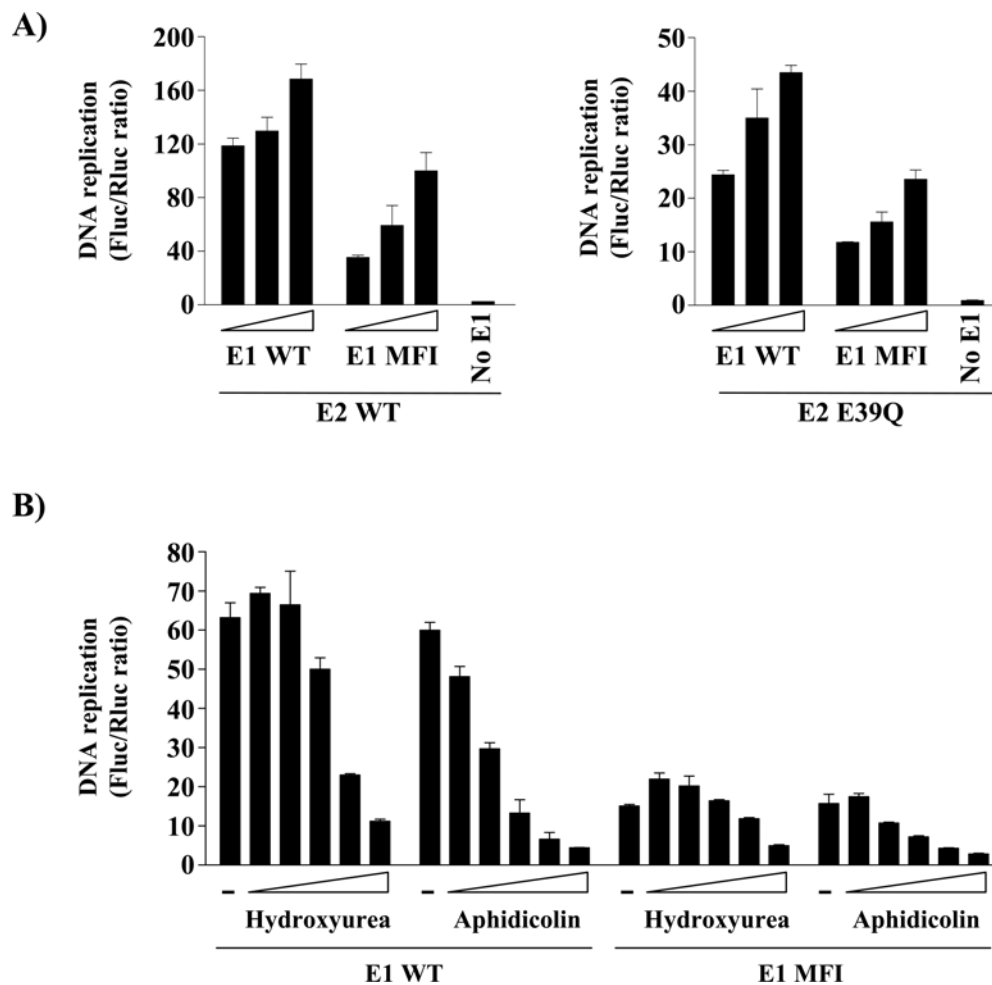


Figure 9. DNA replication activity of the E1 MFI mutant under conditions where the initiation or elongation phases of replication is limiting.

A) Replication signals (Fluc/Rluc ratio) obtained by using 1.25, 2.5 and 5 ng of pEYFP-HPV31 E1 WT or MFI with WT E2 (left panel) or the E2 E39Q mutant that has reduced E1-binding (right panel). B) Replication signals (Fluc/Rluc ratio) obtained with EYFP-HPV31 E1 WT or MFI mutant in cells treated with increasing concentrations of either hydroxyurea (2-fold increments ranging from 125 μ M to 2 mM) or aphidicolin (2-fold

increments ranging from 625 nM to 10 μ M). Negative controls (-) were obtained with either untreated cells or cells treated with DMSO as a vehicle control, respectively.

Collectively, the results presented above indicate that the replication defect of the E1 MFI mutant cannot be rescued by overproducing the protein or by lengthening the time of the assay and is not exacerbated by limiting either the initiation or elongation phase of DNA replication. These results point to the MFI substitution affecting a function of E1 unrelated to its interaction with E2, affinity for substrate nucleotides or its coupling to DNA polymerase α and δ (see Discussion).

3.3.5 Discussion

3.3.5.1 The HPV E1 helicase contains a TAD-like region (TLR) that can activate transcription in yeast.

In this manuscript, we presented evidence that E1 contains a conserved region with sequence and functional similarity to an acidic transactivation domain like those of p53 and VP16. First, we found that the E1 N-terminal regions from five different HPV types (6, 11, 16, 18, 31) can activate transcription in yeast when fused to the LexA DNA-binding domain, indicating that this property is a conserved feature of E1. Second, we noticed that the E1 NTR contains a conserved region with sequence similarity to p53 TAD2 and VP16C. This region is characterized by a propensity of acidic amino acids and the presence of three hydrophobic residues analogous to those in p53 TAD2 and VP16C that make direct contact with their target proteins such as Tfb1. Importantly, we determined that mutation of these three hydrophobic residues in E1 greatly reduced its transactivation activity in yeast, for all five viral types tested, indicating that they are indeed essential for this activity. Third, we determined that E1 requires the SAGA histone acetyltransferase complex to transactivate in yeast, similarly to what was shown previously for p53 TAD2. Fourth, we showed by NMR and ITC that E1 interacts with the Pleckstrin homology (PH) domain of

yeast Tfb1 (p62 in humans), a subunit of the TFIID general transcription factor, with a similar affinity and specificity as p53 TAD2 and VP16C. Collectively, these findings provide convincing evidence that E1 contains a conserved TAD-like region.

3.3.5.2 The E1 TLR is necessary for optimal viral DNA replication.

Because the primary function of E1 is to promote viral DNA replication, we investigated the requirement for the TLR in this process. Specifically, we tested the effect of mutations of the three hydrophobic residues in the TLR (MFI) on the ability of E1 to support transient DNA replication. These studies showed that the MFI mutation reduced the activity of E1 by approximately 50%, thus highlighting the importance of the TLR for viral DNA replication. We then addressed the mechanism by which the MFI mutation impairs DNA replication. We determined that this mutation has little to no effect on the ability of E1 to accumulate in the nucleus *in vivo*. We also showed *in vitro* that the MFI mutation neither affects the binding of E1 to DNA nor its interaction with p80. We then determined that the transient DNA replication defect of the E1 MFI mutant cannot be suppressed by over-expression of the protein or by lengthening the time of the assay. Under all conditions tested, the MFI mutant always showed replication levels around 50 to 60% of those of the WT protein. This pattern was also observed when using an E2 mutant with reduced binding to E1 or chemical inhibitors of the elongation phase of DNA replication. Collectively, this data argues that the MFI mutation impairs an activity of E1 required for optimal DNA replication that is distinct from its ability to interact with E2, incorporate nucleotides or functionally interact with DNA polymerases. Given that the MFI mutation does not affect any of the previously known functions of the E1 NTR (nuclear accumulation and p80-binding) or the activity of the adjacent DNA-binding domain, we propose that the E1 TLR is implicated in a novel activity of the E1 NTR required for viral DNA replication.

As part of this study, we also investigated the function of a highly conserved CK2 phosphorylation motif located within the TLR. Mutation of the putative phosphorylation

site, T43, to alanine, to prevent its phosphorylation, or to glutamate as a phosphomimetic, had little to no effect on the transactivation activity of HPV31 E1 in yeast or its ability to support transient DNA replication in C33A cells. Thus, the reason underlying the evolutionarily conservation of this putative CK2 site remains unknown. It is also noteworthy that the sequence of the E1 TLR overlaps the conserved caspase cleavage sites in E1, which were previously shown to be required for amplification of the viral genome in differentiated keratinocytes (Moody et al., 2007). This prompted us to investigate if any of the two T43 mutations, or the MFI mutation which changes residues within the caspases sites (DxxDxxD, DMVDFID), had an effect on the susceptibility of E1 to caspase-3 and -7. Cleavage of E1 was tested in C33A cells treated with staurosporine to induce caspases, as previously described (Moody et al., 2007). Under these conditions, none of the mutations had an effect on the cleavage of E1 by caspases (Suppl. Fig. 2). The fact that the MFI mutation has no effect on caspase cleavage but impairs DNA replication indicates that these two processes are distinct events. This result also serves to emphasize that the DNA replication defect of the E1 MFI mutant is unlikely related to a defect in caspase cleavage, especially given the very low levels of activated caspases present in the C33A cell line used for the transient DNA replication assay (Suppl. Fig. 2; cells not treated with staurosporine).

3.3.5.3 The E1 TLR is likely an intrinsically disordered protein domain.

Our NMR chemical shift mapping studies revealed that the E1 TLR binds the PH domain of Tfb1 in a similar manner as p53 TAD2 and VP16C, suggesting that it may have a similar structure. The p53 and VP16 TADs have both been shown to be intrinsically disordered domains (IDDs) (Jonker et al., 2004; Wells et al., 2008) that fold into alpha-helices upon binding to their target proteins. IDDs are protein domains that have no intrinsic secondary structure in their free form and adopt a specific conformation when they bind to their target. This flexibility can allow interactions with different binding partners. IDDs are very common amongst eukaryotic proteins involved in regulatory and signaling processes, especially among transcription factors (reviewed in (Garza, Ahmad, and Kumar, 2009)). As a first step towards determining if the E1 TLR could be an unstructured region,

we used three different protein disorder prediction programs available on the web, MetaPrDos (<http://prdos.hgc.jp/meta/>) (Ishida and Kinoshita, 2008), Genesilico metadisorder binCons and floatCons (<http://iimcb.genesilico.pl/metadisorder/>) (Kurowski and Bujnicki, 2003). Those three programs are meta-predictors, meaning that they use many individual analyses based on the protein primary sequence to make a consensus prediction. They give a score of disorder probability between 0 and 1 for every amino acid of the protein; a region is predicted as disordered if the scores are higher than 0.5. Predictions obtained for the first 83 amino acids of HPV31 E1 are shown in Fig. 10A. All three programs suggest an unstructured region immediately before the MFI motif (⁴⁷MVDFI⁵¹), including residues between amino acids 27 and 48. The MFI motif has a lower disorder probability (around 0.35), but some secondary structure predictors suggest a short helix for this motif. Secondary structure predictions for HPV31 E1(1-83) obtained with the Porter program (<http://distill.ucd.ie/porter/>) (Pollastri and McLysaght, 2005) are shown in Fig. 10B. This program predicts an alpha-helix for the MFI motif of E1. It also indicates helices for the analogous regions of p53 TAD2 and VP16C (data not shown). As mentioned above, both p53 TAD2 and VP16C have been shown to form 9-residue alpha-helices upon binding to Tfb1/p62 (Di Lello et al., 2006; Langlois et al., 2008). It is thus plausible that the E1 TLR is an intrinsically disordered domain that forms a short helix in the MFI region upon binding to target proteins such as to Tfb1/p62. On the basis of these observations, we propose that the E1 TLR is an IDD that mediates interaction with one or more factors to allow optimal viral DNA replication.

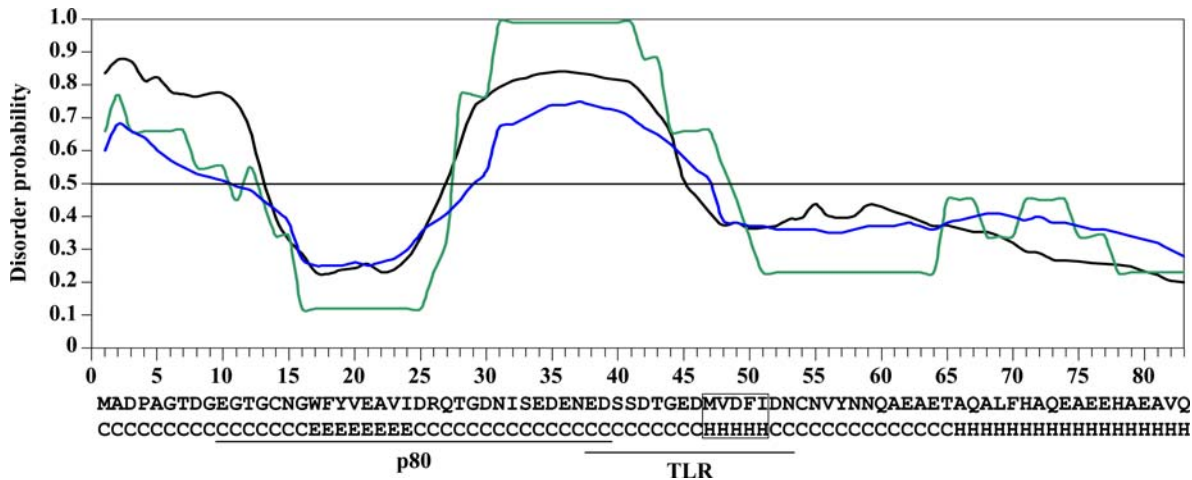


Figure 10. Protein disorder and secondary structure predictions obtained for HPV31 E1 N-terminal region.

Disorder probability score for every residue of HPV31 E1 (1-83) obtained with three different predictors: MetaPrDos (black line), Genesilico metadisorder binCons (green line) and Genesilico metadisorder floatCons (blue line). Secondary structure predictions for each amino acid of HPV31 E1 (1-83) obtained with the Porter predictor is indicated below the amino acids sequence. H: helix, E: strand, C: other (coil). The p80-binding (p80) and TAD-like (TLR) regions are also indicated. The MFI motif is boxed.

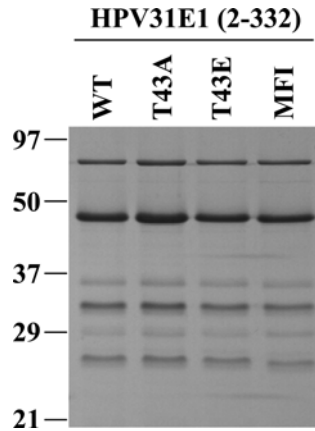
3.3.5.4 Potential functions of the E1 TLR in papillomavirus DNA replication.

We can think of several cellular factors that the E1 TLR could interact with to promote viral DNA replication. Given that the papillomavirus genome is packaged into nucleosomes (Favre et al., 1977; Stunkel and Bernard, 1999), E1 could interact with chromatin remodeling complexes to facilitate progression of the replication fork. During the initiation phase of viral DNA replication, the transcription factor E2 relieves the inhibition exerted by nucleosomes at the origin. Interestingly, this antirepression mechanism can also be achieved by other transcription factors, including p53 and VP16, when tethered near the ori (Li and Botchan, 1994). The E1 TLR could assume this chromatin remodeling function together with E2 or by itself once E2 has been released

from the initiation complex. The E1 TLR could also promote genome replication by interacting with the single-stranded DNA binding protein RPA, a well established target of the p53 TAD2 (Dutta et al, 1993; Abramova et al, 1997). E1 was previously shown to interact with RPA, but the exact region of E1 responsible for this interaction has not yet been reported (Han et al., 1999; Loo and Melendy, 2004). Given that the E1 TLR requires the SAGA acetyltransferase complex for transactivation activity in yeast, like p53 TAD2, one may also speculate that E1 interacts with related acetyltransferases in mammalian cells. Interestingly the related Large T Antigen helicase of polyomavirus has been shown to interact with the PCAF and GCN5 acetyltransferases and to be acetylated by these enzymes to promote viral DNA replication (Xie, Bermudez, and Folk, 2002). Finally, the interaction of E1 with the PH domain of Tfb1/p62 reported herein, suggest that E1 may also interact with TFIID. As TFIID is involved both in transcription and DNA nucleotide excision repair, it may play similar roles in the context of the viral episome. As an intrinsically disordered domain, the E1 TLR is likely to interact with several cellular factors, the ones mentioned above representing a few possibilities. It is noteworthy that small DNA tumor viruses often encode proteins with IDD, as exemplified by the E1A protein of adenovirus (Pelka et al., 2008). The use of IDD may represent an evolutionarily solution for the need of these viruses to interact with a plethora of host factors to complete their life cycle despite the limited coding capacity of their genomes.

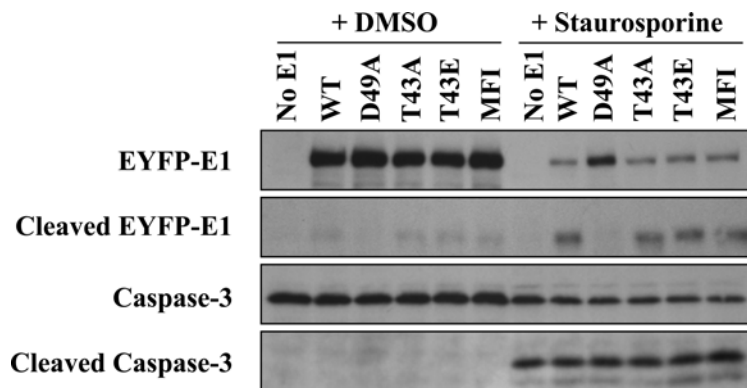
3.3.6 Acknowledgments

We thank Joe Mymryk (University of Western Ontario) for the gift of the SAGA deletion yeast strains. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.F.-T. holds a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).



Supplementary figure 1. Purified proteins used in this study.

Coomassie blue stained polyacrylamide gel showing purified proteins used for fluorescence polarization assays in this study. 3 μ g of each protein were loaded on the gel.



Supplementary figure 2. Caspase cleavage of E1 TLR mutants after a staurosporine treatment.

Western blots showing caspase cleavage of EYFP-HPV31 E1 in C33A cells induced by a 4 hrs staurosporine treatment. The caspase recognition motif E1 mutant (D49A) was used as a negative control. Detection of caspase-3 cleavage upon activation was used as a control for the staurosporine treatment.

Protein	Beta-galactosidase activity (Miller units)
LexA	0.5 ± 0.1
LexA-p53(1-73)	42.1 ± 2.6
LexA-p53 TAD1	123.4 ± 6.1
LexA-p53 TAD2	143.2 ± 8.4
LexA-HPV31E1(1-83) WT	50.2 ± 3.2
LexA-HPV31E1(1-83) T43A	55.2 ± 5.6
LexA-HPV31E1(1-83) T43E	49.4 ± 8.8
LexA-HPV31E1(1-83) MFI	3.2 ± 0.3

Supplementary table 1. Raw β -galactosidase activity of p53 and HPV31 E1 LexA fusion proteins in yeast.

β -galactosidase activity in Miller units obtained with LexA-fusion proteins in the yeast transactivation assay. Results from a representative experiment are shown. These values were used to calculate the fold-activation shown in Fig. 2A.

Protein	Beta-galactosidase activity (Miller units)			
	WT strain	gcn5 Δ strain	ada1 Δ strain	spt7 Δ strain
LexA	19 ± 1	1.4 ± 0.1	10.7 ± 1.6	1.5 ± 0.1
LexA-p53 TAD1	4441 ± 24	116.9 ± 12.4	117.0 ± 3.4	26.6 ± 2.8
LexA-p53 TAD2	5799 ± 1865	163.6 ± 17.3	201.7 ± 18.1	7.9 ± 1.2
LexA-HPV31E1(1-83) WT	889 ± 161	21.5 ± 2.4	23.3 ± 1.9	7.0 ± 0.5
LexA-HPV31E1(1-83) T43A	897 ± 255	15.7 ± 0.8	24.3 ± 1.2	13.2 ± 0.7
LexA-HPV31E1(1-83) T43E	1154 ± 140	14.1 ± 0.2	42.2 ± 0.8	5.8 ± 0.2
LexA-HPV31E1(1-83) MFI	115 ± 10	6.2 ± 0.2	24.7 ± 1.6	1.3 ± 0.1

Supplementary table 2. Raw β -galactosidase activity of p53 and HPV31 E1 LexA fusion proteins in SAGA subunits deletion yeast strains.

β -galactosidase activity in Miller units obtained with LexA-fusion proteins in the yeast transactivation assay. Results from a representative experiment are shown. These values were used to calculate the fold-activation shown in Fig. 3A and B.

Protein	Beta-galactosidase activity (Miller units)	
	WT	M/LFI mutant
LexA	0.5 ± 0.1	
LexA-p53 TAD1	123.4 ± 6.1	
LexA-p53 TAD2	143.2 ± 8.4	
LexA-HPV6E1(1-80)	5.3 ± 5.4	3.8 ± 0.2
LexA-HPV11E1(1-80)	5.0 ± 3.2	1.4 ± 0.1
LexA-HPV16E1(1-84)	5.0 ± 3.9	1.8 ± 0.1
LexA-HPV18E1(1-83)	100.0 ± 21.8	3.0 ± 0.1
LexA-HPV31E1(1-83)	50.2 ± 3.2	3.2 ± 0.3

Supplementary table 3. Raw β -galactosidase activity of p53 and different HPV types E1 LexA fusion proteins in SAGA subunits deletion yeast strains.

β -galactosidase activity in Miller units obtained with LexA-fusion proteins in the yeast transactivation assay. Results from a representative experiment are shown. These values were used to calculate the fold-activation shown in Figure 4A.

3.3.7 References

- 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**(1), 137-50.
- Baker, S. P., and Grant, P. A. (2007). The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* **26**(37), 5329-40.
- Bochkareva, E., Kaustov, L., Ayed, A., Yi, G., Lu, Y., Pineda-Lucena, A., Liao, J., Okorokov, A., Milner, J., and Arrowsmith, C. (2005). Single-stranded DNA mimicry in the p53 transactivation domain interaction with replication protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(43), 15412.
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., and Fornace, A. J. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates

- N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* **18**(23), 6845-6854.
- Candau, R., Scolnick, D. M., Darpino, P., Ying, C. Y., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1997). Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* **15**(7), 807-16.
- 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**(3), 1271-83.
- Cousens, D., Greaves, R., Goding, C., and O'Hare, P. (1989). The C-terminal 79 amino acids of the herpes simplex virus regulatory protein, Vmw65, efficiently activate transcription in yeast and mammalian cells in chimeric DNA-binding proteins. *EMBO J.* **8**(8), 2337.
- 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**(2), 378-86.
- 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**(19), 10213-26.
- Di Lello, P., Jenkins, L. M., Jones, T. N., Nguyen, B. D., Hara, T., Yamaguchi, H., Dikeakos, J. D., Appella, E., Legault, P., and Omichinski, J. G. (2006). Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIF and the activation domain of p53. *Mol. Cell* **22**(6), 731-40.
- Di Lello, P., Nguyen, B. D., Jones, T. N., Potempa, K., Kobor, M. S., Legault, P., and Omichinski, J. G. (2005). NMR structure of the amino-terminal domain from the Tfb1 subunit of TFIIF and characterization of its phosphoinositide and VP16 binding sites. *Biochemistry* **44**(21), 7678-86.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J.Clin.Virol.* **32 Suppl 1**, S7-15.

- Favre, M., Breitbart, F., Croissant, O., and Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* **21**(3), 1205-9.
- Fields, S., and Jang, S. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**(4972), 1046-1049.
- Fradet-Turcotte, A., Morin, G., Lehoux, M., Bullock, P. A., and Archambault, J. (2010). Development of quantitative and high-throughput assays of polyomavirus and papillomavirus DNA replication. *Virology* **399**(1), 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**(17), 9162-74.
- Garza, A. S., Ahmad, N., and Kumar, R. (2009). Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation. *Life Sci.* **84**(7-8), 189-93.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.-D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.-y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**(6896), 387-391.
- Goscin, L. P., and Byrnes, J. J. (1982). DNA polymerase delta : one polypeptide, two activities. *Biochemistry* **21**(10), 2513-2518.

- 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**(6), 4899-4907.
- Houtman, J. C., Higashimoto, Y., Dimasi, N., Cho, S., Yamaguchi, H., Bowden, B., Regan, C., Malchiodi, E. L., Mariuzza, R., Schuck, P., Appella, E., and Samelson, L. E. (2004). Binding specificity of multiprotein signaling complexes is determined by both cooperative interactions and affinity preferences. *Biochemistry* **43**(14), 4170-8.
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., and Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* **275**(5679), 458-60.
- Inga, A., and Resnick, M. A. (2001). Novel human p53 mutations that are toxic to yeast can enhance transactivation of specific promoters and reactivate tumor p53 mutants. *Oncogene* **20**(26), 3409-19.
- Ishida, T., and Kinoshita, K. (2008). Prediction of disordered regions in proteins based on the meta approach. *Bioinformatics* **24**(11), 1344-1348.
- Jonker, H. R. A., Wechselberger, R. W., Boelens, R., Folkers, G. E., and Kaptein, R. (2004). Structural Properties of the Promiscuous VP16 Activation Domain. *Biochemistry* **44**(3), 827-839.
- Krakoff, I., Brown, N., and Reichard, P. (1968). Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* **28**(8), 1559.
- Kurowski, M. A., and Bujnicki, J. M. (2003). GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucl. Acids Res.* **31**(13), 3305-3307.
- Langlois, C., Mas, C., Di Lello, P., Jenkins, L. M. M., Legault, P., and Omichinski, J. G. (2008). NMR Structure of the Complex between the Tfb1 Subunit of TFIIH and the Activation Domain of VP16: Structural Similarities between VP16 and p53. *J. Am. Chem. Soc.* **130**(32), 10596-10604.

- 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. USA* **91**(15), 7051-5.
- 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**(4), 1605-1615.
- 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. USA* **104**(49), 19541-6.
- Nigro, J. M., Sikorski, R., Reed, S. I., and Vogelstein, B. (1992). Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**(3), 1357-65.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**(6), 849-62.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**(2), 74-108.
- Pelka, P., Ablack, J. N., Fonseca, G. J., Yousef, A. F., and Mymryk, J. S. (2008). Intrinsic structural disorder in adenovirus E1A: a viral molecular hub linking multiple diverse processes. *J. Virol.* **82**(15), 7252-63.
- Pollastri, G., and McLysaght, A. (2005). Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* **21**(8), 1719-20.
- 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**(1), 10-7.
- Smith, J. M., Stubbert, L. J., Hamill, J. D., and McKay, B. C. (2007). The contribution of transactivation subdomains 1 and 2 to p53-induced gene expression is heterogeneous but not subdomain-specific. *Neoplasia* **9**(12), 1057-65.

- Stenlund, A. (2003). Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(10), 777-85.
- 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**(3), 1918-30.
- Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P. W., and Archambault, J. (2003). Characterization of the Minimal DNA Binding Domain of the Human Papillomavirus E1 Helicase: Fluorescence Anisotropy Studies and Characterization of a Dimerization-Defective Mutant Protein. *J. Virol.* **77**(9), 5178-5191.
- Titolo, S., Pelletier, A., 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**(7), 5282-5293.
- Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A. J., and Verdine, G. L. (1997). Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to a human TAF. *Science* **277**(5330), 1310-3.
- Wells, M., Tidow, H., Rutherford, T. J., Markwick, P., Jensen, M. R., Mylonas, E., Svergun, D. I., Blackledge, M., and Fersht, A. R. (2008). Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(15), 5762-7.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and et al. (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* **14**(10), 7013-24.
- Xie, A. Y., Bermudez, V. P., and Folk, W. R. (2002). Stimulation of DNA replication from the polyomavirus origin by PCAF and GCN5 acetyltransferases: acetylation of large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **22**(22), 7907-18.

- Yasugi, T., Benson, J. D., Sakai, H., Vidal, M., and Howley, P. M. (1997). Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins. *J. Virol.* **71**(2), 891-9.
- Yousef, A. F., Brandl, C. J., and Mymryk, J. S. (2009). Requirements for E1A dependent transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol. Biol.* **10**, 32.
- Yousef, A. F., Xu, G. W., Mendez, M., Brandl, C. J., and Mymryk, J. S. (2008). Coactivator requirements for p53-dependent transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Cancer* **122**(4), 942-946.

4 Discussion

4.1 Retour sur les résultats

4.1.1 Développement d'un essai de réplication transitoire de l'ADN

Comme décrit dans l'introduction, les méthodes traditionnelles pour mesurer la réplication transitoire de l'ADN des papillomavirus sont fastidieuses et ne permettent pas de tester facilement un grand nombre d'échantillons à la fois. Les essais de réplication de l'ADN utilisés pour les polyomavirus, incluant le virus SV40, sont semblables à ceux des papillomavirus. Ces deux familles de virus utilisent des mécanismes de réplication très similaires. Un essai simple et à haut débit basé sur l'expression de la luciférase a alors été développé pour les virus SV40 et VPH31, dans le but de remplacer les essais traditionnels. L'essai a d'abord été développé pour SV40, qui ne nécessite qu'une seule protéine virale, l'antigène Grand T (LT) pour répliquer son génome. Il a ensuite été adapté au type VPH31 en modifiant le plasmide-ori et en exprimant les protéines virales E1 et E2. Ces essais ont démontré que l'augmentation du signal de la luciférase qui est codée par le plasmide-ori est proportionnelle à la réplication de ce plasmide par la ou les protéines virales. De plus, l'utilisation d'un contrôle interne permet de normaliser le signal, ce qui atténue grandement les variations dues à l'efficacité de transfection et à la mortalité cellulaire. La technique utilisée est beaucoup plus simple et rapide que les essais précédents, car les extractions d'ADN et la détection sont remplacées par deux lectures consécutives de luminescence. De plus, comme l'essai est effectué en plaques à 96 puits, plusieurs conditions peuvent être testées dans une seule plaque, ce qui en fait un essai à haut débit. Tel que démontré dans l'article 1, ces essais peuvent être utilisés pour déterminer l'effet de mutations dans les protéines virales ou de la présence d'inhibiteurs sur la réplication. D'autres applications ont aussi été testées dans le laboratoire, comme l'effet d'ARN interférents ou de l'expression de protéines additionnelles dans ces essais (données non publiées), ce qui montre que ces essais sont flexibles et peuvent être adaptés pour différentes études.

4.1.2 Identification et caractérisation d'une région semblable à un domaine de transactivation chez E1

La région N-terminale de la protéine E1 (acides aminés 1-170 pour VPH31) est essentielle à la réplication de l'ADN viral *in vivo*, au cours de laquelle elle joue un rôle de régulateur. Il est connu que le module de régulation de la localisation intracellulaire (83-125) est nécessaire pour que le transport de E1 entre le cytoplasme et le noyau au cours du cycle cellulaire s'effectue correctement. Par contre, le rôle des 83 premiers acides aminés est encore peu connu. Il a été démontré que la liaison de p80 à E1 est importante pour la réplication de l'ADN et pour le maintien du génome viral dans les kératinocytes. De plus, les caspases-3 et -7, qui sont activées lors de la différenciation des kératinocytes infectés par un VPH de type à haut risque, peuvent cliver E1 juste avant les acides aminés 50 ou 53 (voir Figure 8 ci-dessous). Ce clivage est important pour l'amplification du génome dans les couches suprabasales de l'épithélium.

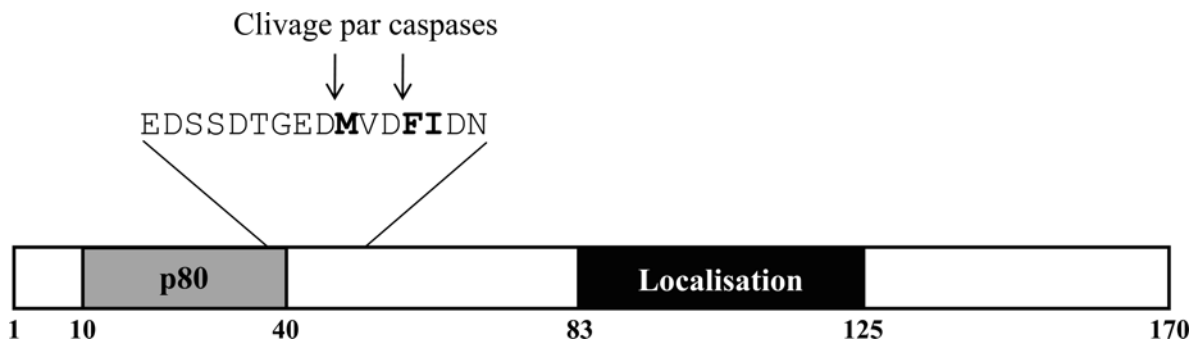


Figure 8. Représentation du domaine N-terminal de la protéine E1 du type VPH31 et localisation de la région semblable à un TAD (TLR).

Les sous-domaines d'interaction avec p80 (acides aminés 10-40) et de régulation de la localisation intracellulaire (acides aminés 83-125) sont indiqués. La séquence d'homologie avec les domaines de transactivation TAD2 de p53 et VP16C (TLR) est inscrite au-dessus et les acides aminés importants pour la transactivation par E1 sont en caractères gras.

Dans cette étude, une région semblable à un domaine de transactivation (TLR) semblable au TAD2 de p53 et au sous-domaine VP16C de VP16 a été identifiée dans la

région de E1 située entre le domaine de liaison à p80 et le module de localisation. Cette région est riche en acides aminés acides (glutamate et aspartate) et comprend trois acides aminés hydrophobes (M, F et I) qui sont conservés entre les types anogénitaux de VPH. Ces résidus hydrophobes sont aussi retrouvés à des positions équivalentes dans le TAD2 de p53 ainsi que dans VP16C et sont importants pour leur activité. Les portions N-terminales de E1 des types 6, 11, 16, 18 et 31 ont été testées en levure et possèdent toutes la capacité d'activer la transcription. Chez tous ces types, les trois acides aminés hydrophobes du TLR sont essentiels à cette activité. Les niveaux de transactivation obtenus avec E1 varient selon les types de VPH, de façon indépendante de leur classification en tant que type à haut ou à bas risque. Les niveaux les plus élevés ont été obtenus avec E1 provenant des types 6 et 18, des types à bas et à haut risque, respectivement. Leurs niveaux d'activation étaient comparables à ceux obtenus avec chacun des TAD de p53 testés séparément (TAD1 et TAD2). Suivaient ensuite les protéines E1 des types à haut risque 31 et 16 et du type à bas risque 11, avec des niveaux de 2 à 4 fois moins élevés que les types 6 et 18. Le degré d'activation par E1 ne semble donc pas être lié à la capacité de transformation cellulaire du virus.

Dans le cas de p53, la transactivation par le TAD2 est augmentée par la phosphorylation de la sérine 46 et de la thréonine 55. Selon l'alignement de séquence avec E1, l'acide aminé S46 de p53 correspond à une sérine chez les types VPH6 et 11 et à une thréonine chez les types 16, 18 et 31. Ce résidu (T43 chez VPH31) est un site potentiel de phosphorylation par la caséine kinase 2 (CK2) chez tous les types énumérés, selon la séquence consensus de reconnaissance par CK2 S/T-x-x-D/E (Pinna, 1990). Lorsque l'acide aminé T43 est muté en alanine (T43A) ou en glutamate (T43E), E1 du VPH31 donne un signal comparable à celui obtenu avec la protéine de type sauvage. Donc, contrairement à p53, la phosphorylation de ce résidu ne semble pas jouer de rôle dans la transactivation.

Le TLR de E1 est semblable au TAD2 de p53 sur plusieurs points. Tout d'abord, leur séquence en acides aminés est similaire. Ce sont tous deux des domaines de

transactivation acides comprenant trois acides aminés hydrophobes qui sont importants pour leur fonction. Ils présentent également des niveaux de transactivation comparables en levure lorsque fusionnés à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue. Chacun des TAD de p53 nécessite entre autres facteurs le complexe d'acétylation des histones SAGA pour activer la transcription chez la levure. Comme les gènes codant pour la plupart des sous-unités du complexe ne sont pas essentiels à la survie de la levure, des souches mutantes de délétion sont viables et disponibles (Giaever et al., 2002). Pour vérifier si p53 et E1 nécessitent les mêmes facteurs pour la transactivation, des souches de levures dans lesquelles un gène codant pour une sous-unité de SAGA a été délété ont été utilisées pour effectuer des essais de transactivation. Des essais dans des levures *gcn5Δ*, *ada1Δ* et *spt7Δ* ont démontré que comme pour chacun des deux TAD de p53, l'intégrité du complexe SAGA est essentielle et son activité acétyltransférase est importante pour la transactivation par E1. Ensuite, des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de calorimétrie à titrage isotherme (ITC) ont montré que le TLR de E1 lie le domaine PH (Pleckstrin homology) de la sous-unité Tfb1 du facteur général de transcription TFIIH de levure sur la même surface et avec la même affinité que le TAD2 de p53. Le TAD VP16C ainsi que le facteur général de transcription TFIIIE, qui recrute TFIIH au complexe de pré-initiation de la transcription, interagissent aussi avec cette même surface de Tfb1 (Di Lello et al., 2008; Langlois et al., 2008).

Afin de mieux comprendre le rôle possible du TLR sur la fonction de E1, les mutants du TLR ont été testés dans l'essai de répliation transitoire de l'ADN présenté dans l'article 1. La mutation du site potentiel de phosphorylation par CKII n'a pas d'effet significatif sur la répliation, ce qui suggère soit que ce site n'est pas phosphorylé dans nos conditions ou que sa phosphorylation n'est importante ni pour la transactivation, ni pour la répliation de l'ADN par E1. Par contre, le mutant de transactivation de E1 (MFI) montre une diminution d'environ 50% du taux de répliation par rapport à la protéine de type sauvage. Ce défaut est observé même lorsque E1 est surexprimé ou que la durée de l'essai est prolongée. L'utilisation d'un mutant de E2 qui lie moins bien E1 n'empire pas le défaut de répliation du mutant par rapport à la protéine de type sauvage, ce qui suggère que la mutation MFI affecte la répliation à une étape subséquente au recrutement de E1 par E2.

De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la réductase de ribonucléotides ou des ADN polymérase n'amplifie pas le défaut du mutant MFI, ce qui suggère que ce défaut n'est pas lié à l'incorporation des nucléotides ou à l'activité des polymérase. Donc, l'intégrité du TLR de E1 est essentielle pour obtenir des niveaux optimaux de réplication de l'ADN viral.

4.2 Modèle et hypothèses

Comme présenté dans l'article 2, la région comprenant le TLR de E1 est prédite par des programmes d'analyse de structure de protéines comme étant une région intrinsèquement désordonnée (ID), comme p53 TAD2 et VP16C. Cette propriété pourrait lui permettre d'interagir avec différentes protéines. Par exemple, le TAD2 de p53 n'interagit pas seulement avec Tfb1/p62, mais aussi avec RPA et PC4 (Abramova et al., 1997; Rajagopalan et al., 2009). De plus, une courte hélice alpha comprenant les acides aminés importants pour la transactivation (motif **MVDFI**) est anticipée par des programmes informatiques conçus pour prévoir la structure secondaire des protéines. Le modèle présenté ici suggère donc que comme les TAD de p53 et VP16 auxquels il est apparenté, le TLR de E1 est un domaine intrinsèquement non structuré qui adopte une conformation d'hélice alpha lorsqu'il se lie à ses protéines cibles, dont la sous-unité Tfb1/p62 de TFIIF.

Étant donné que l'intégrité du TLR de E1 est essentielle pour obtenir une réplication optimale de l'ADN viral, il interagit possiblement avec un ou des facteurs qui stimulent l'activité de E1. Il existe plusieurs partenaires potentiels du TLR qui pourraient jouer ce rôle, dont des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, dans la réplication de l'ADN comme telle ou dans certaines modifications post-traductionnelles.

Le remodelage de la chromatine associée au génome viral, pour permettre sa réplication, peut être effectué par différents mécanismes potentiels. Par le passé, il a été démontré chez la levure que des activateurs de transcription peuvent activer la réplication de l'ADN lorsque des sites de liaison à ces activateurs sont insérés à proximité d'une origine de réplication (Gaudreau et al., 1997; Bodmer-Glavas et al., 2001). Cette

stimulation implique possiblement le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine tel que le complexe SWI/SNF (Bodmer-Glavas et al., 2001). E1 pourrait donc, par l'interaction de son TLR, se lier directement à un complexe de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF. Il a déjà été démontré que E1 interagit avec la sous-unité hSNF5 du complexe SWI/SNF via son domaine enzymatique (Lee et al., 1999). Il est donc possible que le TLR de E1 lie une autre sous-unité du complexe, par exemple pour faciliter son recrutement à l'origine. De plus, certains facteurs de transcription lient des chaperones d'histones, facilitant ainsi le désassemblage puis le réassemblage des nucléosomes sur l'ADN (Peng et al., 2010). La liaison du TLR de E1 à ces chaperones pourrait faciliter la progression des fourches de réplication sur le génome viral. Alternativement, le TLR de E1 pourrait interagir avec l'histone H1. Il a été démontré précédemment que la région N-terminale de E1 du type VPH11 (entre les acides aminés 1-185) lie l'histone H1 et permet son déplacement de l'origine virale (Swindle et Engler, 1998). Il est donc possible que ce soit précisément le TLR qui médie cette interaction. E1 pourrait également se lier à une ou certaines histones acétyltransférases comme P300/CBP, PCAF ou un analogue du complexe SAGA chez l'humain. Les acétyltransférases P300/CBP, PCAF et GCN5 sont d'importants cofacteurs de transcription qui interagissent directement avec plusieurs activateurs. De plus, PCAF et GCN5 peuvent stimuler la réplication de l'ADN du polyomavirus murin. Plus précisément, PCAF et possiblement GCN5 acétylent l'antigène Grand T (Large T Antigen), ce qui active la réplication du génome (Xie et al., 2002). L'antigène Grand T est la protéine initiatrice de la réplication virale qui possède une activité hélicase et est très semblable à E1. Il est donc possible que E1 soit également acétylée lors de la réplication de l'ADN et que cette modification augmente son activité.

Deux partenaires d'interaction importants du TAD2 de p53 sont RPA et PC4 (Positive Cofactor 4), deux protéines liant l'ADN simple brin (Abramova et al., 1997; Rajagopalan et al., 2009). Il est connu que RPA interagit avec E1 (Han et al., 1999; Loo et Melendy, 2004) et est essentielle à la réplication de l'ADN viral (Li et Botchan, 1993). Par analogie avec l'antigène grand T de SV40 (LT, Large T antigen), cette interaction se fait probablement via le domaine de liaison à l'ADN de E1 (Weisshart et al., 1998). Par contre, plusieurs protéines qui lient RPA, dont p53 et LT de SV40, le font par une interaction en

deux points, c'est-à-dire que deux régions distinctes de la protéine peuvent interagir avec deux portions différentes de RPA (Lee et Kim, 1995; Lin et al., 1996; Braun et al., 1997). Il est donc possible que le TLR de E1 interagisse avec une région de RPA différente de celle qui est liée par son domaine de liaison à l'ADN. Par exemple, il est possible que le DBD de E1 interagisse avec un des sous-domaines de liaison à l'ADN simple brin de RPA70 (RPA70A) et que, comme le TAD2 de p53, le TLR de E1 lie la portion N-terminale de RPA70. La protéine PC4, qui interagit aussi avec le TAD2 de p53, est un coactivateur de transcription qui sert de lien entre la machinerie de transcription et plusieurs activateurs. Elle influence également la réplication *in vitro* du génome de SV40 en liant l'ADN simple brin avec RPA et peut supporter le déroulement de l'ADN par LT. Selon le ratio entre RPA et PC4, cette dernière peut soit inhiber ou activer la réplication de l'ADN *in vitro* (Pan et al., 1996). Par contre, son effet exact sur la réplication *in vivo* n'est pas connu.

Finalement, le mécanisme par lequel le TLR de E1 contribue à activer la réplication de l'ADN viral reste à déterminer. Plusieurs hypothèses ont été formulées ici et devront être investiguées dans le futur. Le TLR de E1 semble être une région protéique intrinsèquement non structurée, ce qui peut lui permettre de réguler l'activité de l'hélicase de différentes façons selon les protéines avec lesquelles il interagit.

5 Conclusion et travaux futurs

Le développement d'un nouvel essai de réplication transitoire de l'ADN du VPH a grandement facilité l'étude du rôle du TLR de E1 et permettra d'étudier plus facilement et rapidement l'effet de différentes conditions sur la réplication du génome viral. Cette technique pourra dans le futur être modifiée pour étudier la réplication de l'ADN de d'autres types de VPH ou de polyomavirus, en modifiant simplement l'origine de réplication contenue dans le plasmide-ori et en exprimant les protéines du virus correspondant.

Par analogie avec le TAD2 de p53 et VP16C avec lesquels il partage plusieurs caractéristiques, ainsi que selon des modèles de prédictions bioinformatiques, il est fort probable que le TLR de E1 soit bel et bien un domaine intrinsèquement désordonné (ID). Par contre, le fait que le TLR de E1 soit une région ID n'a pas été démontré expérimentalement. Cette propriété peut être vérifiée entre autres par résonance magnétique nucléaire (RMN) pour voir si le domaine protéique adopte une structure particulière en solution. Il serait intéressant de confirmer si le TLR de E1 est une région ID avant de chercher des partenaires d'interaction pour ce domaine, puisque les interactions protéine-protéine impliquant les domaines ID sont souvent de faible affinité, ce qui peut compliquer leur caractérisation.

Les études donnant suite à ce projet consisteront à explorer le rôle du TLR de E1 dans la réplication du génome viral et à identifier des facteurs importants pour son activité dans des cellules humaines. Étant donné que le complexe SAGA est important pour la transactivation par E1 chez la levure, il sera intéressant de savoir si E1 interagit avec des coactivateurs semblables chez l'humain. À cette fin, des co-immunoprécipitations pourront être faites en transfectant E1 et différents coactivateurs, par exemple P300 ou CBP, PCAF et hGCN5, dans des cellules humaines. Si E1 interagit avec un ou plusieurs des cofacteurs testés, il faudra ensuite déterminer si la mutation MFI a un effet sur cette propriété de E1. L'interaction possible du TLR avec l'histone H1 pourra aussi être vérifiée en utilisant la protéine de type sauvage et le mutant de transactivation MFI dans un essai de co-

immunoprécipitation ou de GST-pulldown. Si le mutant n'interagit plus avec l'histone H1, le résultat indiquera que le déplacement de cette dernière peut se faire via l'interaction avec le TLR de E1.

L'interaction du TLR avec RPA pourra aussi être vérifiée par les méthodes nommées ci-haut. Des troncations de RPA70 pourront être utilisées pour identifier la région impliquée dans l'interaction s'il y a lieu. Les méthodes utilisées dans l'article 2 pour démontrer l'interaction avec TFIID, c'est-à-dire le RMN et l'ITC, pourront également être utilisées pour vérifier si le TLR de E1 et celui de p53 lient RPA de façon semblable. La portion N-terminale de RPA70 (1-120), qui interagit avec le TAD2 de p53, pourra être utilisée pour cette étude avec des peptides du TAD2 de p53 et du TLR de E1. Une expérience semblable a déjà été effectuée pour déterminer la structure de cette portion de RPA en complexe avec le TAD2 de p53 (Bochkareva et al., 2005). Si le TLR de E1 interagit effectivement avec la portion N-terminale de RPA70, il sera alors possible d'identifier les résidus de RPA qui sont liés par E1 en utilisant les résultats de cartographie des variations de déplacements chimiques (chemical shift mapping) obtenus par RMN et de les comparer avec la surface d'interaction de p53. L'affinité de liaison de RPA70 avec les TAD de p53 et E1 pourra aussi être mesurée par ITC pour déterminer si les valeurs sont comparables.

Il sera également possible de déterminer si E1 peut être acétylée et si le TLR joue un rôle dans ce processus. Cela permettrait de vérifier l'hypothèse que le TLR puisse recruter des acétyltransférases qui activeraient la réplication de l'ADN en acétylant E1, comme observé pour la protéine LT du polyomavirus murin. L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à attacher un groupement acétyl sur une lysine. Des anticorps dirigés spécifiquement contre les lysines acétylées sont disponibles commercialement. Ces anticorps pourraient alors être utilisés dans des expériences d'immunoprécipitation pour détecter si E1 de type sauvage et le mutant MFI seraient repêchés parmi les protéines acétylées. Si E1 de type sauvage était acétylée, mais pas le mutant MFI, alors le défaut de réplication du mutant pourrait être expliqué au moins en

partie à un défaut d'acétylation. Il serait alors intéressant d'identifier la ou les acétyltransférases responsables et de déterminer si elles peuvent véritablement activer la réplication de l'ADN viral.

Le rôle du TLR dans le déroulement du cycle viral pourra aussi être investigué dans un système de kératinocytes dont on peut induire la différenciation. Il sera par exemple intéressant de voir si un mutant de transactivation de E1 permet le maintien du génome viral dans des kératinocytes non différenciés ainsi que son amplification lors de la différenciation des cellules. Comme la réplication transitoire de l'ADN est diminuée par la mutation MFI, il est fort probable que le maintien et l'amplification du génome viral soient aussi affectés.

Finalement, cette étude a permis d'identifier un domaine conservé de transactivation dans la région régulatrice N-terminale de l'hélicase E1 des papillomavirus. L'importance pour la transactivation de trois acides aminés qui sont conservés entre les différents types de virus anogénitaux ainsi que chez les TAD de p53 et VP16 a été démontrée chez la levure. Le rôle précis de ce domaine au cours du cycle viral n'est pas connu, mais cette étude démontre que son intégrité est essentielle pour obtenir des niveaux optimaux de réplication de l'ADN viral.

6 Bibliographie

- Abramova, N., J. Russell, M. Botchan et R. Li (1997). "Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(14): 7186.
- Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley et J. Archambault (2000). "Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro." *Virology* 272(1): 137-150.
- Amine, A., S. Rivera, P. Opolon, M. Dekkal, D. S. Biard, H. Bouamar, F. Louache, M. J. McKay, J. Bourhis, E. Deutsch et M. C. Vozenin-Brotans (2009). "Novel anti-metastatic action of cidofovir mediated by inhibition of E6/E7, CXCR4 and Rho/ROCK signaling in HPV tumor cells." *PLoS One* 4(3): e5018.
- Arany, Z., D. Newsome, E. Oldread, D. M. Livingston et R. Eckner (1995). "A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein." *Nature* 374(6517): 81-84.
- Ashrafi, G. H., M. Haghshenas, B. Marchetti et M. S. Campo (2006). "E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain." *Int. J. Cancer* 119(9): 2105-2112.
- Babb, R., C. C. Huang, D. J. Aufiero et W. Herr (2001). "DNA Recognition by the Herpes Simplex Virus Transactivator VP16: a Novel DNA-Binding Structure." *Mol. Cell. Biol.* 21(14): 4700-4712.
- Baker, S. P. et P. A. Grant (2007). "The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex." *Oncogene* 26(37): 5329-5340.
- Banerjee, S., B. R. P. Kumar et T. K. Kundu (2004). "General Transcriptional Coactivator PC4 Activates p53 Function." *Mol. Cell. Biol.* 24(5): 2052-2062.

- Bernard, H.-U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. z. Hausen et E.-M. de Villiers (2010). "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments." *Virology* 401(1): 70-79.
- Bharti, A. C., S. Shukla, S. Mahata, S. Hedau et B. C. Das (2009). "Anti-human papillomavirus therapeutics: facts & future." *Indian J. Med. Res.* 130(3): 296-310.
- Bhaumik, S. R. et M. R. Green (2001). "SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p." *Genes Dev.* 15(15): 1935-1945.
- Bochkareva, E., L. Kaustov, A. Ayed, G. Yi, Y. Lu, A. Pineda-Lucena, J. Liao, A. Okorokov, J. Milner et C. Arrowsmith (2005). "Single-stranded DNA mimicry in the p53 transactivation domain interaction with replication protein A." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(43): 15412.
- Bodmer-Glavas, M., K. Edler et A. Barberis (2001). "RNA polymerase II and III transcription factors can stimulate DNA replication by modifying origin chromatin structures." *Nucl. Acids Res.* 29(22): 4570-4580.
- Bousarghin, L., A. Touze, G. Gaud, S. Iochmann, E. Alvarez, P. Reverdiau, J. Gaitan, M. L. Jourdan, P. Y. Sizaret et P. L. Coursaget (2009). "Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs." *Mol. Cancer Ther.* 8(2): 357-365.
- Braun, K. A., Y. Lao, Z. He, C. J. Ingles et M. S. Wold (1997). "Role of Protein-Protein Interactions in the Function of Replication Protein A (RPA): RPA Modulates the Activity of DNA Polymerase α by Multiple Mechanisms." *Biochemistry* 36(28): 8443-8454.
- Bryan, J. T. et D. R. Brown (2001). "Transmission of Human Papillomavirus Type 11 Infection by Desquamated Cornified Cells." *Virology* 281(1): 35-42.
- Bulavin, D. V., S. Saito, M. C. Hollander, K. Sakaguchi, C. W. Anderson, E. Appella et A. J. Fornace, Jr. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *EMBO J.* 18(23): 6845-6854.
- Burgers, P. M. (1998). "Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair." *Chromosoma* 107(4): 218-227.

- Campo, M. et R. Roden (2010). "Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches." *J. Virol.* 84(3): 1214.
- Candau, R., D. M. Scolnick, P. Darpino, C. Y. Ying, T. D. Halazonetis et S. L. Berger (1997). "Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity." *Oncogene* 15(7): 807-816.
- Castellsague, X., F. X. Bosch et N. Munoz (2002). "Environmental co-factors in HPV carcinogenesis." *Virus Res.* 89(2): 191-199.
- Castle, P. E. et I. Scarinci (2009). "Should HPV vaccine be given to men?" *BMJ* 339: b4127.
- Champoux, J. J. (2001). "DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism." *Ann. Rev. Biochem.* 70(1): 369-413.
- Chan, H. M. et N. B. La Thangue (2001). "p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds." *J. Cell Sci.* 114(Pt 13): 2363-2373.
- Chang, J., D. Kim, S. Lee, K. Choi et Y. Sung (1995). "Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein." *J. Biol. Chem.* 270(42): 25014.
- Chen, G. et A. Stenlund (2001). "The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication." *J. Virol.* 75(1): 292-302.
- Chiang, C. M., M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker et L. T. Chow (1992). "Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(13): 5799-5803.
- Clower, R. V., J. C. Fisk et T. Melendy (2006). "Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I." *J. Virol.* 80(3): 1584-1587.
- Cohn, M. A., Y. Kee, W. Haas, S. P. Gygi et A. D. D'Andrea (2009). "UAF1 Is a Subunit of Multiple Deubiquitinating Enzyme Complexes." *J. Biol. Chem.* 284(8): 5343-5351.
- Côté-Martin, A., C. Moody, A. Fradet-Turcotte, C. M. D'Abramo, M. Lehoux, S. Joubert, G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins et 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(3): 1271-1283.
- Cress, W. D. et S. J. Triezenberg (1991). "Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain." *Science* 251(4989): 87-90.
- D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. i. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella et S. Soddu (2002). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis." *Nat. Cell Biol.* 4(1): 11-19.
- Davy, C. E., D. J. Jackson, Q. Wang, K. Raj, P. J. Masterson, N. F. Fenner, S. Southern, S. Cuthill, J. B. Millar et J. Doorbar (2002). "Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16." *J. Virol.* 76(19): 9806-9818.
- del Mar Pena, L. et L. Laimins (2002). Regulation of human papillomavirus gene expression in the vegetative life cycle. *Human papillomaviruses*. D. J. McCance: 31.
- Del Vecchio, A. M., H. Romanczuk, P. M. Howley et C. C. Baker (1992). "Transient replication of human papillomavirus DNAs." *J. Virol.* 66(10): 5949-5958.
- Demeret, C., S. Goyat, M. Yaniv et F. Thierry (1998). "The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2." *Virology* 242(2): 378-386.
- Deng, W., B. Y. Lin, G. Jin, C. G. Wheeler, T. Ma, J. W. Harper, T. R. Broker et L. T. Chow (2004). "Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase." *J. Virol.* 78(24): 13954-13965.
- Di Lello, P., L. M. Jenkins, T. N. Jones, B. D. Nguyen, T. Hara, H. Yamaguchi, J. D. Dikeakos, E. Appella, P. Legault et J. G. Omichinski (2006). "Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53." *Mol. Cell* 22(6): 731-740.
- Di Lello, P., L. M. Miller Jenkins, C. Mas, C. Langlois, E. Malitskaya, A. Fradet-Turcotte, J. Archambault, P. Legault et J. G. Omichinski (2008). "p53 and TFIIIE α share a

- common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIIH." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(1): 106-111.
- Disbrow, G. L., J. A. Hanover et R. Schlegel (2005). "Endoplasmic Reticulum-Localized Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Alters Endosomal pH but Not trans-Golgi pH." *J. Virol.* 79(9): 5839-5846.
- Doorbar, J. (2005). "The papillomavirus life cycle." *J.Clin.Virol.* 32 Suppl 1: S7-15.
- Dubina, M. et G. Goldenberg (2009). "Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review." *Am. J. Dermatopathol.* 31(6): 561-573.
- Eckner, R., M. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J. DeCaprio, J. Lawrence et D. Livingston (1994). "Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor." *Genes & Dev.* 8(8): 869.
- Eckner, R., J. Ludlow, N. Lill, E. Oldread, Z. Arany, N. Modjtahedi, J. DeCaprio, D. Livingston et J. Morgan (1996). "Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen." *Mol. Cell. Biol.* 16(7): 3454.
- Elson, D. A., R. R. Riley, A. Lacey, G. Thordarson, F. J. Talamantes et J. M. Arbeit (2000). "Sensitivity of the Cervical Transformation Zone to Estrogen-induced Squamous Carcinogenesis." *Cancer Res.* 60(5): 1267-1275.
- Enemark, E. J. et L. Joshua-Tor (2006). "Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase." *Nature* 442(7100): 270-275.
- Evander, M., I. Frazer, E. Payne, Y. Qi, K. Hengst et N. McMillan (1997). "Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses." *J. Virol.* 71(3): 2449-2456.
- Favre, M., F. Breitburd, O. Croissant et G. Orth (1977). "Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses." *J. Virol.* 21(3): 1205-1209.
- Fradet-Turcotte, A. et J. Archambault (2007). "Recent advances in the search for antiviral agents against human papillomaviruses." *Antivir. Ther.* 12(4): 431-451.

- Fradet-Turcotte, A., K. Brault, S. Titolo, P. M. Howley et J. Archambault (2009). "Characterization of papillomavirus E1 helicase mutants defective for interaction with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9." *Virology* 395(2): 190-201.
- Frattini, M. G. et L. A. Laimins (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. USA* 91(26): 12398-12402.
- Frattini, M. G. et L. A. Laimins (1994b). "The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b." *Virology* 204(2): 799-804.
- Ganguly, N. et S. P. Parihar (2009). "Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis." *J. Biosci.* 34(1): 113-123.
- Garza, A. S., N. Ahmad et R. Kumar (2009). "Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation." *Life Sci.* 84(7-8): 189-193.
- Gaudreau, L., A. Schmid, D. Blaschke, M. Ptashne et W. Hörz (1997). "RNA Polymerase II Holoenzyme Recruitment Is Sufficient to Remodel Chromatin at the Yeast PHO5 Promoter." *Cell* 89(1): 55-62.
- Ge, H. et R. G. Roeder (1994). "Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes." *Cell* 78(3): 513-523.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Luca-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.-D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.-y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W.

- Davis et M. Johnston (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Nature* 418(6896): 387-391.
- Gu, W. et R. G. Roeder (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." *Cell* 90(4): 595-606.
- Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello et 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(6): 4899-4907.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz et M. Oren (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* 387(6630): 296-299.
- Hegde, R. S. (2002). "The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 343-360.
- Heino, P., J. Zhou et P. F. Lambert (2000). "Interaction of the Papillomavirus Transcription/Replication Factor, E2, and the Viral Capsid Protein, L2." *Virology* 276(2): 304-314.
- Hildesheim, A. et S. S. Wang (2002). "Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review." *Virus Res.* 89(2): 229-240.
- Hofmann, T. G., A. Moller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Droge, H. Will et M. L. Schmitz (2002). "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2." *Nat. Cell. Biol.* 4(1): 1-10.
- Honda, R., H. Tanaka et H. Yasuda (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." *FEBS Lett.* 420(1): 25-27.
- Howley, P. M., and Lowy, D. R (2001). Papillomaviruses and their replication. In *Fields virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. (eds) Section 2, Chapter 65, pp. 2197-2229, Philadelphia: Lippincott-Raven Publ.
- Hu, L. et B. P. Ceresa (2009). "Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion." *Virology* 393(1): 135-143.
- Iftode, C., Y. Daniely et J. A. Borowiec (1999). "Replication Protein A (RPA): The Eukaryotic SSB." *Crit. Rev. in Biochem. Mol. Biol.* 34(3): 141-180.

- Ikeda, K., T. Stuehler et M. Meisterernst (2002). "The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms." *Genes to Cells* 7(1): 49-58.
- Inglis, S., A. Shaw et S. Koenig (2006). "Chapter 11: HPV vaccines: Commercial Research & Development." *Vaccine* 24(Supplement 3): S99-S105.
- Jenkins, L., H. Yamaguchi, R. Hayashi, S. Cherry, J. Tropea, M. Miller, A. Wlodawer, E. Appella et S. Mazur (2009). "Two Distinct Motifs within the p53 Transactivation Domain Bind to the Taz2 Domain of p300 and Are Differentially Affected by Phosphorylation." *Biochemistry* 48(6): 1244-1255.
- Jonker, H. R. A., R. W. Wechselberger, R. Boelens, G. E. Folkers et R. Kaptein (2004). "Structural Properties of the Promiscuous VP16 Activation Domain." *Biochemistry* 44(3): 827-839.
- Jonson, A. L., L. M. Rogers, S. Ramakrishnan et L. S. Downs, Jr. (2008). "Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer." *Gynecol. Oncol.* 111(2): 356-364.
- Joyce, J. G., J. S. Tung, C. T. Przysiecki, J. C. Cook, E. D. Lehman, J. A. Sands, K. U. Jansen et P. M. Keller (1999). "The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes." *J. Biol. Chem.* 274(9): 5810-5822.
- Kabsch, K., N. Mossadegh, A. Kohl, G. Komposch, J. Schenkel, A. Alonso et P. Tomakidi (2004). "The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures." *Intervirology* 47(1): 48-56.
- Karanam, B., R. Gambhira, S. Peng, S. Jagu, D. J. Kim, G. W. Ketner, P. L. Stern, R. J. Adams et R. B. Roden (2009). "Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity." *Vaccine* 27(7): 1040-1049.
- Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy et J. T. Schiller (1992). "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(24): 12180-12184.

- Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy et J. T. Schiller (1993). "Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles." *J. Virol.* 67(12): 6929-6936.
- Kivi, N., D. Greco, P. Auvinen et E. Auvinen (2007). "Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression." *Oncogene* 27(18): 2532-2541.
- Klumpp, D. J. et L. A. Laimins (1999). "Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1." *Virology* 257(1): 239-246.
- Kobayashi, N., T. Boyer et A. Berk (1995). "A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly." *Mol. Cell. Biol.* 15(11): 6465-6473.
- Koutsky, L. (1997). "Epidemiology of genital human papillomavirus infection." *Am. J. Med.* 102(5A): 3-8.
- Krawczyk, E., F. A. Supryniewicz, X. Liu, Y. Dai, D. P. Hartmann, J. Hanover et R. Schlegel (2008). "Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins." *Am. J. Pathol.* 173(3): 682-688.
- Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan et M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." *Nature* 438(7068): 685-689.
- Kulesza, C. A., H. A. Van Buskirk, M. D. Cole, J. C. Reese, M. M. Smith et D. A. Engel (2002). "Adenovirus E1A requires the yeast SAGA histone acetyltransferase complex and associates with SAGA components Gen5 and Tra1." *Oncogene* 21(9): 1411-1422.
- Kundu, T. K., V. B. Palhan, Z. Wang, W. An, P. A. Cole et R. G. Roeder (2000). "Activator-Dependent Transcription from Chromatin In Vitro Involving Targeted Histone Acetylation by p300." *Mol. Cell* 6(3): 551-561.

- Kuo, S. R., J. S. Liu, T. R. Broker et L. T. Chow (1994). "Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts." *J. Biol. Chem.* 269(39): 24058-24065.
- Kussie, P. H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine et N. P. Pavletich (1996). "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain." *Science* 274(5289): 948-953.
- Lace, M. J., J. R. Anson, G. S. Thomas, L. P. Turek et T. H. Haugen (2008). "The E8{wedge}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(21): 10841-10853.
- Langlois, C., C. Mas, P. Di Lello, L. M. M. Jenkins, P. Legault et J. G. Omichinski (2008). "NMR Structure of the Complex between the Tfb1 Subunit of TFIID and the Activation Domain of VP16: Structural Similarities between VP16 and p53." *J. Am. Chem. Soc.* 130(32): 10596-10604.
- Lee, D., B. Lee, J. Kim, D. W. Kim et J. Choe (2000). "cAMP Response Element-binding Protein-binding Protein Binds to Human Papillomavirus E2 Protein and Activates E2-dependent Transcription." *J. Biol. Chem.* 275(10): 7045-7051.
- Lee, D., H. Sohn, G. V. Kalpana et J. Choe (1999). "Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA." *Nature* 399(6735): 487-491.
- Lee, S. H. et D. K. Kim (1995). "The role of the 34-kDa subunit of human replication protein A in simian virus 40 DNA replication in vitro." *J. Biol. Chem.* 270(21): 12801-12807.
- Lehoux, M., C. D'Abramo et J. Archambault (2009). "Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis." *Public Health Genomics* 12(5-6): 268-280.
- Lentz, M. R., D. Pak, I. Mohr et M. R. Botchan (1993). "The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site." *J. Virol.* 67(3): 1414-1423.
- Li, H. H., A. G. Li, H. M. Sheppard et X. Liu (2004). "Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression." *Mol. Cell* 13(6): 867-878.

- Li, R. et M. R. Botchan (1993). "The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication." *Cell* 73(6): 1207-1221.
- Li, R. et M. R. Botchan (1994). "Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(15): 7051-7055.
- Lill, N. L., S. R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio et D. M. Livingston (1997). "Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators." *Nature* 387(6635): 823-827.
- Lin, B. Y., A. M. Makhov, J. D. Griffith, T. R. Broker et L. T. Chow (2002). "Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein." *Mol. Cell Biol.* 22(18): 6592-6604.
- Lin, Y., C. Chen, K. Keshav, E. Winchester et A. Dutta (1996). "Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A." *J. Biol. Chem.* 271(29): 17190.
- Lin, Y. S., I. Ha, E. Maldonado, D. Reinberg et M. R. Green (1991). "Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region." *Nature* 353(6344): 569-571.
- Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker et L. T. Chow (1998). "Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication." *J. Biol. Chem.* 273(46): 30704-30712.
- Loo, Y. M. et T. Melendy (2004). "Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA." *J. Virol.* 78(4): 1605-1615.
- Lowy, D. R., and Howley, P.M (2001). Papillomaviruses. In *Fields Virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley. (eds) Section 2, Chapter 66, pp. 2231-2264, Philadelphia: Lippincott-Raven Publ.

- Lusky, M. et M. Botchan (1986). "Transient replication of bovine papilloma virus type 1 plasmids: cis and trans requirements." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(11): 3609.
- Malcles, M. H., N. Cueille, F. Mechali, O. Coux et C. Bonne-Andrea (2002). "Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway." *J. Virol.* 76(22): 11350-11358.
- Malik, S., M. Guermah et R. G. Roeder (1998). "A dynamic model for PC4 coactivator function in RNA polymerase II transcription." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(5): 2192-2197.
- Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis et 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(9): 7407-7419.
- Mechali, F., C. Y. Hsu, A. Castro, T. Lorca et C. Bonne-Andrea (2004). "Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC." *J. Virol.* 78(5): 2615-2619.
- Melar-New, M. et L. Laimins (2010). "Human Papillomaviruses Modulate Expression of MIR-203 upon Epithelial Differentiation to Control Levels of p63 Proteins." *J. Virol.*
- Melendy, T., J. Sedman et A. Stenlund (1995). "Cellular factors required for papillomavirus DNA replication." *J. Virol.* 69(12): 7857-7867.
- Mino, T., T. Mori, Y. Aoyama et T. Sera (2008). "Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses." *Arch. Virol.* 153(7): 1291-1298.
- Mitchell, P. J. et R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* 245(4916): 371-378.
- Monini, P., L. de Lellis, P. Borgatti, M. Hassan-Omran et E. Cassai (1993). "Activation of Eukaryotic Transcriptional Promoters by the Bovine Papillomavirus E1-Replication Factor." *Intervirology* 36(4): 245-252.
- Moody, C. A., A. Fradet-Turcotte, J. Archambault et L. A. Laimins (2007). "Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(49): 19541-19546.

- Moody, C. A. et L. A. Laimins (2009). "Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation." *PLoS Pathog.* 5(10): e1000605.
- Munoz, N., F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. de Sanjose, D. Hammouda, K. V. Shah et C. J. Meijer (2004). "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective." *Int. J. Cancer* 111(2): 278-285.
- Nagy, Z., A. Riss, C. Romier, X. le Guezennec, A. R. Dongre, M. Orpinell, J. Han, H. Stunnenberg et L. Tora (2009). "The Human SPT20-Containing SAGA Complex Plays a Direct Role in the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Genes." *Mol. Cell. Biol.* 29(6): 1649-1660.
- Nakahara, T., A. Nishimura, M. Tanaka, T. Ueno, A. Ishimoto et H. Sakai (2002). "Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4." *J. Virol.* 76(21): 10914-10920.
- Nakahara, T., W. L. Peh, J. Doorbar, D. Lee et P. F. Lambert (2005). "Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle." *J. Virol.* 79(20): 13150-13165.
- Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura et Y. Taya (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." *Cell* 102(6): 849-862.
- Ortel, B., C. R. Shea et P. Calzavara-Pinton (2009). "Molecular mechanisms of photodynamic therapy." *Front. Biosci.* 14: 4157-4172.
- Pan, Z. Q., H. Ge, A. A. Amin et J. Hurwitz (1996). "Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA." *J. Biol. Chem.* 271(36): 22111-22116.
- Park, P., W. Copeland, L. Yang, T. Wang, M. R. Botchan et 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. USA* 91(18): 8700-8704.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay et P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J. Clin.* 55(2): 74-108.
- Peng, H., M. L. Nogueira, J. L. Vogel et T. M. Kristie (2010). "Transcriptional coactivator HCF-1 couples the histone chaperone Asf1b to HSV-1 DNA replication components." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(6): 2461-2466.
- Peng, Y.-C., D. E. Breiding, F. Sverdrup, J. Richard et E. J. Androphy (2000). "AMF-1/Gps2 Binds p300 and Enhances Its Interaction with Papillomavirus E2 Proteins." *J. Virol.* 74(13): 5872-5879.
- Pereira, R., Hitzeroth, II et E. P. Rybicki (2009). "Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses." *Arch. Virol.* 154(2): 187-197.
- Pett, M. et N. Coleman (2007). "Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?" *J. Pathol.* 212(4): 356-367.
- Piirsoo, M., E. Ustav, T. Mandel, A. Stenlund et M. Ustav (1996). "Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator." *EMBO J.* 15(1): 1-11.
- Pinna, L. (1990). "Casein kinase 2: an eminence grise in cellular regulation?" *Biochim. Biophys. Acta. Mol. cell res.* 1054(3): 267-284.
- Raj, K., S. Berguerand, S. Southern, J. Doorbar et P. Beard (2004). "E1^{E4} protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria." *J. Virol.* 78(13): 7199-7207.
- Rajagopalan, S., A. Andreeva, D. P. Teufel, S. M. Freund et A. R. Fersht (2009). "Interaction between the transactivation domain of p53 and PC4 exemplifies acidic activation domains as single-stranded DNA mimics." *J. Biol. Chem.* 284(32): 21728-21737.
- Rangasamy, D. et V. G. Wilson (2000). "Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein." *J. Biol. Chem.* 275(39): 30487-30495.

- Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan et V. G. Wilson (2000). "SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation." *J. Biol. Chem.* 275(48): 37999-38004.
- Reshmi, G. et M. R. Pillai (2008). "Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer." *FEBS Lett.* 582(30): 4113-4116.
- Rosas-Acosta, G. et V. G. Wilson (2008). "Identification of a nuclear export signal sequence for bovine papillomavirus E1 protein." *Virology* 373(1): 149-162.
- Rusnati, M., E. Vicenzi, M. Donalisio, P. Oreste, S. Landolfo et D. Lembo (2009). "Sulfated K5 Escherichia coli polysaccharide derivatives: A novel class of candidate antiviral microbicides." *Pharmacol. Ther.* 123(3): 310-322.
- Sanders, C. M. et A. Stenlund (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." *EMBO J.* 17(23): 7044-7055.
- Sapp, M. et M. Bienkowska-Haba (2009). "Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus." *FEBS J.* 276(24): 7206-7216.
- Schiller, J. T., X. Castellsague, L. L. Villa et A. Hildesheim (2008). "An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results." *Vaccine* 26 Suppl 10: K53-61.
- Schiller, J. T., W. C. Vass, K. H. Vousden et D. R. Lowy (1986). "E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene." *J. Virol.* 57(1): 1-6.
- Schuck, S. et A. Stenlund (2005). "Assembly of a double hexameric helicase." *Mol. Cell* 20(3): 377-389.
- Scotto, L., G. Narayan, S. Nandula, S. Subramaniam, A. Kaufmann, J. Wright, B. Pothuri, M. Mansukhani, A. Schneider et H. Arias-Pulido (2008). "Integrative genomics analysis of chromosome 5p gain in cervical cancer reveals target over-expressed genes, including Drosha." *Mol. Cancer* 7(1): 58.

- Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky et J. Hurwitz (1993). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(2): 702-706.
- Smith, J. M., L. J. Stubbert, J. D. Hamill et B. C. McKay (2007). "The contribution of transactivation subdomains 1 and 2 to p53-induced gene expression is heterogeneous but not subdomain-specific." *Neoplasia* 9(12): 1057-1065.
- Société canadienne du cancer, c. d. (2009). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2009*. Toronto, Société Canadienne du cancer.
- Solban, N., I. Rizvi et T. Hasan (2006). "Targeted photodynamic therapy." *Lasers Surg. Med.* 38(5): 522-531.
- Song, H., P. L. Moseley, S. L. Lowe et M. A. Ozbun (2010). "Inducible heat shock protein 70 enhances HPV31 viral genome replication and virion production during the differentiation-dependent life cycle in human keratinocytes." *Virus Res.* 147(1): 113-122.
- Stafford, G. A. et R. H. Morse (2001). "GCN5 Dependence of Chromatin Remodeling and Transcriptional Activation by the GAL4 and VP16 Activation Domains in Budding Yeast." *Mol. Cell. Biol.* 21(14): 4568-4578.
- Stenger, J. E., G. A. Mayr, K. Mann et P. Tegtmeier (1992). "Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers." *Mol. Carcinogen.* 5(2): 102-106.
- Stenlund, A. (2003). "E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding." *EMBO J.* 22(4): 954-963.
- Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner et 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(3): 1178-1186.
- Stubenrauch, F., E. Straub, J. Fertey et T. Iftner (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." *Int. J. Cancer* 121(10): 2284-2292.

- Stubenrauch, F., T. Zobel et T. Iftner (2001). "The E8 Domain Confers a Novel Long-Distance Transcriptional Repression Activity on the E8^{E2C} Protein of High-Risk Human Papillomavirus Type 31." *J. Virol.* 75(9): 4139-4149.
- Stunkel, W. et H. U. Bernard (1999). "The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression." *J. Virol.* 73(3): 1918-1930.
- Stürzbecher, H., R. Brain, C. Addison, K. Rudge, M. Remm, M. Grimaldi, E. Keenan et J. Jenkins (1992). "A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization." *Oncogene* 7(8): 1513.
- Sun, L., G. Zhang, T. Lei, C. Huang, T. Song et L. Si (2008). "Two different HPV-11E6 fusion proteins trap p53 in the cytoplasm and induce apoptosis." *Cancer Biol. Ther.* 7(12): 1909-1915.
- Swindle, C. S. et J. A. Engler (1998). "Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1." *J. Virol.* 72(3): 1994-2001.
- Taylor, E. et I. Morgan (2003). "A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV-16 E1-and E2-mediated DNA replication." *Virology* 315(1): 103-109.
- Tchernev, G. (2009). "Sexually transmitted papillomavirus infections: epidemiology pathogenesis, clinic, morphology, important differential diagnostic aspects, current diagnostic and treatment options." *An. Bras. Dermatol.* 84(4): 377-389.
- Terenzi, F., P. Saikia et G. C. Sen (2008). "Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1." *EMBO J.* 27(24): 3311-3321.
- Titolo, S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, A. Amin, M. G. Cordingley et 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(7): 5282-5293.
- Titolo, S., E. Welchner, P. W. White et 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(9): 5512-5518.

- Triezenberg, S. J. (1995). "Structure and function of transcriptional activation domains." *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(2): 190-196.
- Trimble, C. L. et I. H. Frazer (2009). "Development of therapeutic HPV vaccines." *Lancet Oncol.* 10(10): 975-980.
- Tsai, T. C. et S. L. Chen (2003). "The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein." *Arch. Virol.* 148(8): 1445-1453.
- Utley, R., K. Ikeda, P. Grant, J. Côté, D. Steger, A. Eberharter, S. John et J. Workman (1998). "Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes." *Nature* 394(6692): 498-502.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer et N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J. Pathol.* 189(1): 12-19.
- Weisshart, K., P. Taneja et E. Fanning (1998). "The replication protein A binding site in simian virus 40 (SV40) T antigen and its role in the initial steps of SV40 DNA replication." *J. Virol.* 72(12): 9771.
- Wells, M., H. Tidow, T. J. Rutherford, P. Markwick, M. R. Jensen, E. Mylonas, D. I. Svergun, M. Blackledge et A. R. Fersht (2008). "Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(15): 5762-5767.
- Werten, S., F. W. M. Langen, R. van Schaik, H. T. M. Timmers, M. Meisterernst et P. C. van der Vliet (1998a). "High-affinity DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional coactivator PC4 requires simultaneous interaction with two opposing unpaired strands and results in helix destabilization." *J. Mol. Biol.* 276(2): 367-377.
- Werten, S., G. Stelzer, A. Goppelt, F. M. Langen, P. Gros, H. T. M. Timmers, P. C. Van der Vliet et M. Meisterernst (1998b). "Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription." *EMBO J.* 17(17): 5103-5111.
- Wheeler, C. M. (2002). Clinical aspects and epidemiology of HPV infections. *Human papillomaviruses*. D. J. McCance: 1-29.
- White, P. W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M. Fazekas, M. G. Cordingley et 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(25): 22426-22438.
- Wiley, D. et E. Masongsong (2006). "Human papillomavirus: the burden of infection." *Obstet. Gynecol. Surv.* 61(6 Suppl 1): S3-14.
- Wilson, R., G. B. Ryan, G. L. Knight, L. A. Laimins et S. Roberts (2007). "The full-length E1E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression." *Virology* 362(2): 453-460.
- Wooldridge, T. R. et L. A. Laimins (2008). "Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding." *Virology* 374(2): 371-380.
- Wysocka, J. et W. Herr (2003). "The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch." *Trends Biochem. Sci.* 28(6): 294-304.
- Xiao, H., A. Pearson, B. Coulombe, R. Truant, S. Zhang, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, D. Reinberg, O. Flores, C. J. Ingles et et al. (1994). "Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53." *Mol. Cell. Biol.* 14(10): 7013-7024.
- Xie, A.-Y., V. P. Bermudez et W. R. Folk (2002). "Stimulation of DNA Replication from the Polyomavirus Origin by PCAF and GCN5 Acetyltransferases: Acetylation of Large T Antigen." *Mol. Cell. Biol.* 22(22): 7907-7918.
- Yang, J., Y. G. Pu, Z. M. Zeng, Z. J. Yu, N. Huang et Q. W. Deng (2009). "Interferon for the treatment of genital warts: a systematic review." *BMC Infect. Dis.* 9: 156.
- Yasugi, T., J. Benson, H. Sakai, M. Vidal et P. Howley (1997a). "Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins." *J. Virol.* 71(2): 891-899.
- Yasugi, T., M. Vidal, H. Sakai, P. M. Howley et J. D. Benson (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(8): 5942-5951.

- Yeh, P. Y., S.-E. Chuang, K.-H. Yeh, Y. Chyi Song et A.-L. Cheng (2001). "Nuclear Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Phosphorylates p53 at Thr55 in Response to Doxorubicin." *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 284(4): 880-886.
- Yeh, P. Y., S.-E. Chuang, K.-H. Yeh, Y. C. Song, L. L.-Y. Chang et A.-L. Cheng (2004). "Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death." *Oncogene* 23(20): 3580-3588.
- Ylitalo, N., P. Sorensen, A. M. Josefsson, P. K. Magnusson, P. K. Andersen, J. Ponten, H. O. Adami, U. B. Gyllensten et M. Melbye (2000). "Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study." *Lancet* 355(9222): 2194-2198.
- You, J. (2009). "Papillomavirus interaction with cellular chromatin." *Biochim. Biophys. Acta.* 1799(3-4): 192-199.
- Yu, J.-H., B. Y. Lin, W. Deng, T. R. Broker et 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(10): 5066-5078.
- Yugawa, T. et T. Kiyono (2009). "Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins." *Rev. Med. Virol.* 19(2): 97-113.
- Zanier, K., S. Charbonnier, M. Baltzinger, Y. Nominé, D. Altschuh et G. Travé (2005). "Kinetic Analysis of the Interactions of Human Papillomavirus E6 Oncoproteins with the Ubiquitin Ligase E6AP Using Surface Plasmon Resonance." *J. Mol. Biol.* 349(2): 401-412.
- Zheng, Z. M. et C. C. Baker (2006). "Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation." *Front. Biosci.* 11: 2286-2302.
- Zhou, J., X. Y. Sun, K. Louis et I. H. Frazer (1994). "Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence." *J. Virol.* 68(2): 619-625.
- Zhu, H., V. Joliot et R. Prywes (1994). "Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription." *J. Biol. Chem.* 269(5): 3489-3497.