

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et la Terre

MEMOIRE

Présenté par
BIOLLAY Coline

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

TITRE :

**CARACTERISATION DE L'ENVIRONNEMENT NUCLEAIRE NECESSAIRE
A LA REPLICATION DU VIRUS ADENO-ASSOCIE DANS LES CELLULES
INFECTEES PAR LE VIRUS HERPES SIMPLEX DE TYPE 1**

Soutenance le mardi 26 Juin 2012 devant le jury suivant :

Thierry DUPRESSOIR,	Président
Anna GRECO,	Tuteur scientifique
Jean-Marie EXBRAYAT,	Tuteur pédagogique
Evelyne MANET,	Rapporteur
Karine MONIER,	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Anna GRECO, tuteur scientifique

Laboratoire de : CGPhiMC – CNRS - UMR5534 – UCBL1

Equipe « Génétique moléculaire du virus Herpes simplex de type 1 »

16 rue R. Dubois 69622 Villeurbanne cedex 02

Directeur : Guy MOUCHIROUD

et de

Jean-Marie EXBRAYAT, tuteur pédagogique

Laboratoire de : *Reproduction et Développement Comparé*

25 rue du Plat

69288 Lyon Cedex 02.

Directeur : Jean-Marie EXBRAYAT

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et la Terre

Titre :

CARACTERISATION DE L'ENVIRONNEMENT NUCLEAIRE NECESSAIRE A LA
REPLICATION DU VIRUS ADENO-ASSOCIE DANS LES CELLULES INFECTEES PAR
LE VIRUS HERPES SIMPLEX DE TYPE 1

Biollay Coline

Soutenu le mardi 26 Juin 2012

RESUME

*Le virus adéno-associé (AAV) est un parvovirus humain qui se réplique seulement dans les cellules co-infectées par un virus auxiliaire, tel que l'adénovirus ou le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). Nous avons entrepris une analyse protéomique de facteurs cellulaires et HSV-1 associés à la protéine Rep d'AAV et donc potentiellement recrutés dans les compartiments de réplication AAV (RC). Pour cela, nous avons développé une approche protéomique TAP/MS performante permettant de purifier spécifiquement les partenaires de la protéine Rep d'AAV induite après infection par HSV-1. L'approche protéomique est la méthode TAP (« Tandem Affinity Purification ») et est basée sur une double purification en utilisant les deux protéines Rep78 et Rep68 de l'AAV fusionnées à deux peptides de liaison à des résines d'affinités différentes. Des mises au point techniques ont été nécessaires et ont permis d'établir les conditions d'infection des cellules pour lesquelles la réplication de l'AAV est optimum, de proposer un protocole modifié de double purification par la méthode TAP de façon à limiter au maximum la fixation non spécifique des protéines sur les deux résines. Nous avons alors purifié les complexes protéiques contenant Rep, puis identifié les partenaires de Rep par une analyse en spectrométrie de masse. Cette étude a abouti à l'identification d'environ 60 protéines cellulaires, parmi lesquelles des facteurs impliqués dans le métabolisme de l'ADN et l'ARN représentaient les plus grandes catégories fonctionnelles. Les analyses de validation ont confirmé la présence de facteurs déjà connus pour participer à la réplication d'AAV *in vitro*, tels que les facteurs RPA, PCNA, RFC et des protéines du complexe MCM. Mais la plupart n'étaient pas connus comme partenaires de Rep tels que le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1), le complexe Ku70 et -86, et les protéines de réparation des mésappariements MSH2, MSH3 et MSH6. De plus, une dizaine de protéines virales ont été identifiées comme partenaires de Rep dont l'exonucléase virale UL12 jamais décrite jusqu'à ce jour comme participant à la réplication de l'ADN d'AAV. Au total, ces analyses fournissent la base pour comprendre comment AAV adapte sa stratégie de réplication dans un environnement nucléaire induit par le virus helper HSV-1.*

Mots clé : AAV, HSV-1, Rep, centre de réplication, purification complexes protéiques, UL12.

ABREVIATIONS

AAV: Adéno-Associated Virus

AAVr: AAV recombinant

AAVS1 : Site principal d'intégration spécifique de l'AAV

Ad: Adénovirus

AgNO₃: nitrate d'argent

ATM: Ataxia Telangectasia Mutated protein

ATR: ATM and Rad3-related protein

BSA: Bovin Serum Albumin

CBB: Calmoduline Binding Buffer

CBP: Calmoduline Binding Peptide

CMV: Human Cytomegalovirus

Co-IP: co-immunoprécipitation

db: double brin

DBP: DNA-Binding Protein

DDR : DNA Damage Response

DMEM: Dulbecco's minimum essential medium

DNA-PK_(CS) : DNA-dependent Protein Kinase (catalytic subunit)

DTE: dithiothreitol

E: Early protein (Ad. ou HSV)

-E1B55k : E1B protein, M(r) = 55 kDa

-E4orf6 : E4, open reading frame 6

E2F : cellular factor regulated by Ad E1A identified in F9 cells

ECL : Enhanced ChemiLuminescence

EMEM: Eagle's minimum essential medium

HCl : acide chlorhydrique

HeLa-AAVtCRep : Clone de cellules

HeLa portant un génome AAVtCRep intégré

HIV : Human Immunodeficiency Virus

hnRNP: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

hpi: heure(s) post-infection

HSV-1: herpes simplex virus de type 1

HTLV : Human T-Lymphotropic Virus

kb : kilobase

kDa : kilodalton

ICP : Infected Cell Protein

IE : phase très précoce (Immediate Early)

IFI : immunofluorescence indirecte

Ig: Immunoglobuline

ITR : répétition terminale inversée (Inverted Terminal Repeat)

Ku : complexe Ku70/86, auto-antigène identifié chez le patient Ku.

L : Phase tardive (Late)

LB : Lysis Buffer

LC-MS/MS : Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

MCM : Minichromosome Maintenance

MLV : Murine Leukemia Virus

MMR : Mismatch Repair

MOI: multiplicité d'infection (multiplicity of infection)

MRE11 : Meiotic Recombination 11

MRN : complexe formé des protéines MRE11/Rad50/NBS1

MS : spectrométrie de masse

MSH2/3/6 : MutS Homolog 2/3/6

mtSSB : mitochondrial Single Stranded DNA Binding protein (= SSBP1)

NaCl: Chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium ou soude

NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome protein 1

NH₄OH : hydroxyde d'ammonium ou ammoniaque

NHEJ : Non-Homologous End Joining

PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PARP : Poly-ADP Ribose Polymerase

pb : paire de bases

PBS: Phosphate buffered

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PFA: Para-Formaldehyde
pfu: plaque forming unit
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
Rad50 : originalement, nom d'un mutant radiosensitif de la levure
RBS: Rep-binding Site
RC : replication compartment
Rep: protéine de réplication du virus AAV
RFC : Replication Factor C
RPA : Replication Protein A
rpm: rotation(s) par minute
RT: Température Ambiante
RuvBL2 : RuvB-like protein 2
sb : simple brin
SBB: Streptavidine Binding Buffer
SBP: Streptavidine Binding Peptide
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
SEB: Streptavidine Elution Buffer

SIV : Simian Immunodeficiency Virus
SMC1 : Structural Maintenance of Chromosomes 1
SVF: Sérum de Veau Fœtal
TAP: Tandem Affinity Purification
TBST: Tris-Buffered Saline Tween-20
tCRep: Protéine Rep fusionnée à la séquence mCherry et à deux tags
TRS : terminal resolution site
U_L ou U_S : Unique Long or Short region
UV : rayon ultraviolet
VP : Virion protein
VZV : Varicella Zoster Virus
WB: Western Blot
wt: wild type
XRCC4 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 4

251659264

SOMMAIRE

RESUME	2
REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	4
LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES	6
ABREVIATIONS	7
I. INTRODUCTION	9
A. TITRAGE GENRIQUE	10
1. Généralités	11
2. Les vecteurs non-viraux	12
3. Les vecteurs viraux	13
B. AAV	14
1. Présentation	14
2. Cycle viral	17
3. Virus auxiliaires	19
C. LE VIRUS HERPES SIMPLEX DE TYPE 1	20
1. Présentation	20
2. Cycle viral	21
D. AAV: FONCTIONS AUXILIAIRES VIRALES ET CELLULAIRES	26
1. Interaction AAV/H5V	26
2. Interaction AAV/cellule	27
E. STRATEGIE EXPERIMENTALE	29
II. MATERIEL ET METHODE	35
A. MATERIEL BIOLOGIQUE	35
1. Cellules	35
2. Virus	35
B. INFECTIONS	37
C. IMMUNOFLORESCENCE INDIRECTE	37
D. PURIFICATION DES NOYAUX	38
E. DOUBLE PURIFICATION DE COMPLEXES PROTEIQUES PAR LA METHODE TAP (Tandem Affinity Purification)	39
F. ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE DES PROTEINES PAR SDS-PAGE	41

G. ANALYSE DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT	41
1. <i>Transfert sur membrane de nitrocellulose</i>	41
2. <i>Révélation des protéines d'intérêt par un anticorps spécifique</i>	42
H. LOCALISATION DES PROTÉINES PRÉSENTES DANS LE CIL D'ELECTROPHORÈSE	43
1. <i>Méthode de Coomassie</i>	43
2. <i>Nitrate d'argent</i>	43
I. PURIFICATION TAP PRÉPARATIVE POUR L'IDENTIFICATION DES PROTÉINES PAR ANALYSE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE	44
III. RESULTATS	45
A. DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'INFECTION DES CELLULES ET DE PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES NUCLEAIRES	47
1. <i>Mise au point des conditions d'infection pour une production optimale de la protéine C16en</i>	47
2. <i>Préparation des noyaux et préparation des extraits protéiques nucléaires</i>	50
B. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PURIFICATION DES COMPLEXES PROTÉIQUES PAR LE SYSTÈME TAP	52
1. <i>Double purification par la méthode TAP selon le protocole du fournisseur</i>	54
2. <i>Optimisation du protocole de purification par le système TAP</i>	56
C. PURIFICATION PRÉPARATIVE DES COMPLEXES PROTÉIQUES CONTenant HRP	60
D. IDENTIFICATION DES PROTÉINES PURIFIÉES PAR ANALYSE EN MS, CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES PARTENAIRES DE RECT RESEAU D'INTERACTION	63
E. VALIDATIONS BIOCHIMIQUES DE CERTAINES PROTÉINES PARTENAIRES DE HRP	69
IV. DISCUSSION	74
A. MIEUX CELLULAIRE ET LINES A POINTS DE VUE DESQUELS	74
B. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE LA PROTÉINE HRP DANS LES COMPLEXES PURIFIÉS A PARTIR D'EXTRAITS PROTÉIQUES NUCLEAIRES DE CELLULES ULA-AANTÉ HRP INFECTÉES PAR U5V-1	79
1. <i>Protéines du métabolisme de l'ADN</i>	79
2. <i>Protéines du métabolisme de l'ARN</i>	81
3. <i>Protéines mitochondriales et protéines de stress</i>	86
4. <i>Protéines du cytosquelette et protéines ayant d'autres fonctions</i>	87
5. <i>Protéines d'USV-1</i>	87
V. CONCLUSION	90
251653120	
ANNEXES	92
BIBLIOGRAPHIE	96

I. INTRODUCTION

Le virus adéno-associé (AAV) est un petit virus non pathogène pour l'homme dont le génome est une molécule d'ADN linéaire simple brin (sb) (Carter, 2005). Douze sérotypes humains de l'AAV (AAV-1 à AAV-12) et plus de 100 sérotypes de primates non humains sont connus. La possibilité d'utiliser ces nombreux sérotypes, l'absence de pathogénicité du virus et sa capacité à se maintenir dans les cellules font de l'AAV un outil de choix en tant que vecteur de transfert de gène pour les applications en thérapie génique (Daya and Berns, 2008). Lors des récents congrès de l'American Society for Gene Therapy, près de la moitié des présentations concernaient l'utilisation de l'AAV. Cependant, bien que l'AAV soit déjà utilisé avec succès comme vecteur d'expression, il y a un manque d'informations sur sa biologie qui ralentit l'émergence de nouveaux concepts qui permettraient le développement d'outils innovateurs pour la production d'AAV recombinants (AAVr).

*L'AAV est un virus de la famille des parvovirus (*parvoviridae*), du genre *Dependovirus* c'est-à-dire qu'il est incapable de se répliquer dans les cellules qu'il infecte sans l'aide d'un virus auxiliaire. Le virus auxiliaire de l'AAV le plus connu est l'adénovirus (Ad), car c'est en tant que contaminant de préparations de ce virus qu'il a été initialement découvert, d'où son nom (Atchison et al., 1965). Lors de la production de vecteurs AAVr, les fonctions adénovirales auxiliaires sont apportées: *i) par co-infection avec Ad ; ii) ou par co-transfection d'un plasmide portant les gènes auxiliaires adénoviraux et d'un plasmide AAVr dans des cellules permissives ; iii) ou par infection de lignées cellulaires stables qui expriment les fonctions auxiliaires adénovirales avec des AAVr. Ces procédures sont lourdes à mettre en œuvre, relativement inefficaces et souvent les stocks viraux d'AAV produits sont contaminés par du virus auxiliaire. Ceci constitue un obstacle considérable dans le cadre de la thérapie génique pour la production de stock d'AAVr à haut titre et en grande quantité pour des expériences à grande échelle dans des modèles animaux et, à terme, pour des essais cliniques. Cependant, il existe de nombreux autres virus, tous à ADN, capables de fournir à l'AAV une activité auxiliaire c'est le cas du VZV, du cytomégalovirus, du virus d'Epstein Barr et du virus de l'herpès Saimiri (Georg-Fries**

et al., 1984). Les mieux décrits sont les virus herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) (Buller et al., 1981) et pourraient donc remplacer l'adénovirus.

Mis à part cet aspect qui en fait un virus original, AAV se comporte comme tous les virus. Il s'introduit dans l'organisme et atteint un type cellulaire autorisant sa prolifération : i) il pénètre dans la cellule ; ii) il délivre son génome dans un compartiment cellulaire favorable ; iii) il exprime ses gènes ; iv) il reprogramme la machinerie cellulaire à son avantage afin d'autoriser sa réplication ; v) il réplique son génome ; vi) il assemble de nouveaux virions et vii) il assure leur sortie de la cellule. Notre étude porte tout particulièrement sur les mécanismes de réplication des génomes de l'AAV au cours de la phase répllicative de son cycle, c'est-à-dire directement sur les points iv) et v) ci-dessus, qui se déroulent dans les noyaux des cellules infectées.

La situation est plus complexe pour l'AAV par rapport aux autres virus puisque sa réplication requiert l'aide de virus auxiliaire. Plusieurs résultats suggèrent que, comme ses cousins autonomes, l'AAV se réplique principalement grâce à des facteurs de réplication cellulaires : (a) en présence d'adénovirus, l'AAV est répliqué par des facteurs principalement cellulaires et notamment une ADN polymérase cellulaire (Nash et al., 2007; Nash et al., 2008; Nash et al., 2009; Ni et al., 1998; Ni et al., 1994) ; (b) il a été rapporté que l'AAV pourrait se répliquer en absence de virus auxiliaires dans des cellules soumises à différents types de stress (Kang et al., 2009; Yakobson et al., 1989); (c) la diversité évolutive considérable des virus auxiliaires de l'AAV suggère que la fonction de ces virus serait de créer un environnement cellulaire favorisant la réplication de virus à ADN plutôt que de contribuer directement à la réplication de l'AAV.

Cependant, il semblerait que les facteurs de réplication de l'HSV joueraient un rôle plus efficace dans la réplication de l'AAV que ceux de l'adénovirus (Geoffroy et al., 2006; Geoffroy et al., 2004; Heilbronn et al., 2003; Slanina et al., 2006; Stracker et al., 2004; Ward et al., 2001; Weindler and Heilbronn, 1991). De plus, quand bien même les facteurs des virus auxiliaires ne permettraient pas à eux seuls de répliquer directement l'AAV, il est important de comprendre comment les modifications qu'ils induisent dans la cellule hôte permettent la réplication de l'AAV. Ceci permettrait de préciser les mécanismes de cette réplication, et pourrait également aider à la

compréhension de la biologie de l'AAV in vivo, encore insuffisamment connue. Le but de ce projet est d'identifier les facteurs nucléaires cellulaires et viraux (HSV-1) indispensables à la réplication d'AAV. Ce projet a été réalisé sous la direction de Anna Greco en collaboration avec Anna Salvetti (INSERM U758, ENS de Lyon, France), Alberto Epstein (UMR 5534, UCBL1, Villeurbanne, France) et Lauriane Kuhn et Myriam Ferro (INSERM U881, iRTSV, Grenoble, France).

Dans les paragraphes suivants, nous aborderons d'abord rapidement la thérapie génique afin de comprendre en quoi l'AAV est un vecteur de gènes intéressant. Nous présenterons ensuite le virus AAV et son modèle de réplication du génome. Puis nous présenterons quelques généralités du virus auxiliaire HSV-1. Enfin, nous verrons les interactions connues entre l'AAV et les facteurs HSV-1 auxiliaires, et avec les facteurs cellulaires.

A. Thérapie génique

1. Généralités

La connaissance du génome humain ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques parmi lesquelles, de façon non exclusive, la thérapie génique est appelée sans doute à jouer une place notable. Cela implique une étape intermédiaire, souvent encore non-accomplie, d'analyse de la fonction de la protéine, produit du gène d'intérêt. La thérapie génique consiste en l'introduction, à but thérapeutique, d'un gène "médicament" dans des cellules cibles. Il existe deux types de thérapie génique, la thérapie génique ex vivo qui implique un prélèvement des cellules du patient puis leur réinjection après transfert de gène, et la thérapie génique in vivo où du matériel génétique d'intérêt thérapeutique est directement injecté. De plus, la thérapie génique somatique se définit par le traitement de cellules d'un individu sans conséquence sur sa descendance alors que la thérapie génique germinale implique la transmission aux descendants de la modification génétique (Fischer, 2001). Pour des raisons de précaution évidente mais aussi de pertinence, cette dernière forme de thérapie génique n'est pas admise.

La thérapie génique implique un certain nombre d'éléments: 1/ le gène d'intérêt thérapeutique ou transgène dont l'expression devrait améliorer une situation pathologique donnée; 2/ un promoteur nécessaire à l'expression du transgène qui peut être un promoteur du vecteur viral utilisé (par exemple, LTR dans le cas des rétrovirus) ou d'un autre virus comme CMV, et 3/ un système de transfert. Dans la plupart des cas, la pénétration du matériel génétique dans les cellules requiert un vecteur à cause, entre autres, de la charge négative de l'ADN qui est repoussée par les cellules (Fischer, 2001). Le gène d'intérêt peut être ainsi véhiculé par une particule virale ou au moyen de molécules synthétiques (lipides). In vivo, le gène peut aussi être administré par injection intramusculaire ou intradermique sous la forme d'ADN nu.

2. Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux présentent les avantages d'une production non onéreuse, d'une absence d'immunogénicité et d'être non pathogènes.

Cela peut être de l'ADN nu de type plasmide bactérien contenant le transgène sous contrôle d'éléments régulateurs eucaryotes. L'ADN nu est rapidement dégradé mais l'injection d'une grande quantité permet une expression du transgène pendant plusieurs mois. Aucune réaction immunitaire importante n'est à déplorer si ce n'est la libération de cytokines inflammatoires en réponse à la présence de doublets CpG non méthylés lors de la synthèse du plasmide dans les bactéries. D'autres méthodes ont été mises au point pour réduire les quantités injectées telles que le « pistolet à ADN », la « jet injection » ou l'électroporation (Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf, 2003).

La dégradation enzymatique des ADN nus peut être évitée en injectant l'ADN sous forme de complexes avec des lipides ou des polymères cationiques. Ces complexes pénètrent alors dans la cellule par endocytose où l'ADN est libéré et peut passer dans le noyau. Les lipides cationiques sont malheureusement toxiques ce qui limite les essais cliniques. De plus, la formation d'agrégats trop volumineux de polymères cationiques peuvent être emprisonnés dans les endosomes et il faut alors utiliser un agent de rupture des membranes des endosomes (chloroquine) pour obtenir une transfection efficace in vitro (Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf, 2003).

L'inconvénient de ces techniques est que l'introduction d'une grande quantité d'ADN tue la cellule. De plus, chaque type cellulaire nécessite des mises au point spécifiques. Il existe donc d'autres vecteurs moins agressifs qui possèdent les outils nécessaires à l'injection de matériel génétique dans la cellule et ce, de manière naturelle.

3. Les vecteurs viraux

Les virus sont capables d'infecter des cellules, d'y transférer leur matériel génétique et de le répliquer en utilisant les facteurs protéiques cellulaires. Ils peuvent donc être modifiés pour devenir un vecteur d'un gène thérapeutique, à condition d'être débarrassés de leur pouvoir pathogène (Mulligan, 1993). Ils ont donc une forte efficacité de transfert de gène dans la cellule et surtout, dans le noyau.

A ce jour, différents virus sont utilisés comme vecteurs :

*- Les Rétrovirus sont des virus enveloppés contenant deux molécules d'ARN positif sb de 7 à 11 kb. Les Rétrovirus murins de type MLV (virus leucémogènes murins) n'infectent que les cellules en division alors que les Lentivirus tel que le HIV (virus de l'immunodéficience acquise humaine) ou le SIV (virus de l'immunodéficience acquise du singe) sont capables d'infecter les cellules quiescentes. Ils ne sont produits qu'à des titres faibles mais l'intérêt majeur est qu'ils s'intègrent après rétrotranscription dans le génome de la cellule hôte ce qui rend le gène transféré très stable. Cependant, l'expression s'éteint dans les jours ou semaines suivant la transduction. Ils sont inutilisables *in vivo* car rapidement inactivés par le système du complément humain (Fischer, 2001; Mountain, 2000).*

- L'adénovirus est un virus à ADN db linéaire de 36 kb environ. Il est capable d'infecter des cellules quiescentes ou en prolifération. Son tropisme cellulaire est large et il est produit à des titres très élevés. Le génome viral ne s'intègre pas dans l'ADN chromosomique et son expression est donc transitoire. Le gène transféré est maintenu sous forme épisomale et n'est donc pas dupliqué lors de la division cellulaire. L'expression du gène est faible voir non détectable après deux semaines et ne permet pas une correction à long terme. De plus, l'adénovirus déclenche une réaction immunitaire importante qui conduit à la destruction des cellules infectées.

Cinquante sérotypes humains ont été identifiés mais la plupart des vecteurs actuels dérivent des sérotypes 2 et 5 (Fischer, 2001; Mountain, 2000).

- Le virus de l'Herpès simplex est un virus enveloppé à ADN db. Son génome de 153 kb lui confère l'avantage de pouvoir véhiculer de grands gènes. C'est un virus qui est capable de s'établir en latence, c'est-à-dire qu'il est présent mais n'exprime pas tout son patrimoine génétique. Dans cet état, il ne détruit pas les cellules hôtes qu'il infecte. Le tropisme de ce virus est réduit mais sa spécificité pour les cellules du système nerveux est très intéressante dans le cadre de la thérapie génique.

- L'AAV est un virus à ADN sb de 4,7 kb. Parmi les huit sérotypes identifiés chez l'homme et les primates, l'AAV-2 est le mieux caractérisé et le plus utilisé en thérapie génique. Environ 95% de la population est séropositive mais aucune pathologie n'est actuellement associée à l'infection par l'AAV-2¹. Il est, comme l'Ad, capable d'infecter les cellules quiescentes ou en répllication. La réponse immunitaire provoquée par l'AAV est faible et, dans la plupart des cas, ne conduit pas à l'élimination des cellules infectées.

Chacun de ces vecteurs viraux possède donc des avantages et des inconvénients. Leur développement passe donc par une étude approfondie de la biologie de ces virus afin de les transformer pour en faire des vecteurs de thérapie génique sans les inconvénients de leurs homologues sauvages.

Mon projet de recherche concerne les vecteurs AAV et plus particulièrement, leur biologie afin de pouvoir améliorer les techniques de production d'AAVr. Parmi ses virus auxiliaires, HSV-1 permet une production adéquate des vecteurs AAVr (Buller et al., 1981; Conway et al., 1999). Une bonne compréhension des mécanismes par lesquels les AAV se répliquent en présence d'un virus auxiliaire tel que HSV est un élément important pour l'optimisation de l'efficacité et la précision de la production de vecteurs AAV.

¹ *Une étude a cependant révélé qu'AAV pourrait être impliqué dans le cas de problèmes de grossesse, de fausses-couches et de stérilité, en association avec les virus auxiliaires HSV et HPV (Erles et al., 2001).*

B. AAV

1. Présentation

L'AAV a été découvert dans les années 60 comme un contaminant des préparations d'Ad (Atchison et *al.*, 1965) puis classé dans la famille des *Dependovirus*. L'AAV est un petit virus non enveloppé avec une capsidie icosaédrique de 20 à 24 nm de diamètre qui contient un ADN linéaire sb de 4679 bases. Ce génome est constitué de deux cadres de lecture ouverts, *rep* et *cap*, bordés de répétitions terminales inversées (ITRs) de 145 pb repliées en épingle à cheveux. Elles servent notamment d'origine de réplication mais aussi dans la transcription et l'encapsidation du génome, dans l'inhibition de la réplication dans des conditions non permissives et dans l'intégration site-spécifique (Berns, 1990).

Le gène *rep* code pour quatre protéines Rep non structurales de réplication qui sont désignées selon leur poids moléculaire apparent Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Leur expression résulte de l'utilisation de différents promoteurs et d'épissage différentiel. Les protéines Rep78 et Rep68 sont codées par un transcrit commun sous le contrôle du promoteur p5.

De même, les ARNm des protéines Rep52 et Rep40 sont sous la dépendance du promoteur p19. C'est une famille de protéines multifonctionnelles qui régulent la réplication de l'ADN d'AAV. Elles interviennent dans la plupart des étapes du cycle de vie d'AAV dont l'expression des gènes, la réplication de l'ADN, l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et l'empaquetage de son génome dans la capsidie. Toutes les protéines Rep possèdent des activités hélicase et ATPase. Les protéines Rep78/68 sont localisées dans les compartiments de réplication d'AAV en hétérodimères mais aussi en monomères ou homodimères. Elles possèdent aussi des activités endonucléases et de liaison à l'ADN. En effet, elles se lient de manière covalente à l'ADN d'AAV au cours de la réplication sur des sites spécifiques des ITRs appelés RBS pour "Rep-binding Site" qu'elles coupent (Brister and Muzyczka, 1999, 2000; Daya and Berns, 2008; Wistuba et *al.*, 1997).

Le gène *cap*, sous le contrôle du promoteur p40 code trois protéines structurales VP1, VP2 et VP3 qui s'assemblent pour former la capsidie. Après épissage alternatif, VP2 est produite à partir du codon d'initiation de la traduction AUG conventionnel

alors que VP3 est produite à partir du codon non conventionnel ACG (Daya and Berns, 2008).

2. Cycle viral

Lors de l'infection, l'AAV s'adsorbe à la surface des cellules et entre par un mécanisme principalement endocytose-dépendant. Le transport des particules virales dans le cytoplasme est encore mal compris, mais inclut vraisemblablement les vésicules de clathrine. Bien que l'AAV soit théoriquement assez petit pour pénétrer dans le noyau par le complexe du pore nucléaire, l'entrée d'AAV semble s'effectuer par un complexe indépendant pore nucléaire, par l'activation de caspases impliquées dans l'altération de la membrane nucléaire au cours de l'apoptose (Cohen et al., 2011). Les génomes sont alors décapsidés dans le noyau puis peuvent se répliquer si l'environnement nucléaire est favorable ou parfois, s'établir en latence en absence de virus auxiliaires.

a. Latence

En absence de virus auxiliaire, la réplication d'AAV est limitée. L'expression des gènes viraux est réprimée et le génome d'AAV peut entrer en latence par intégration dans une région de 8 kb du bras long du chromosome 19 (q13.4) appelée AAVS1.

Le locus AAVS1 est proche de plusieurs gènes spécifiques du muscle et présente des homologies de séquence avec les ITRs de l'AAV. L'ADN viral s'intégrerait alors par recombinaison homologue. Il y aurait reconnaissance d'un site similaire au RBS par Rep78/68. Des expériences de culture tissulaire suggèrent que ce locus AAVS1 serait un site d'intégration sans conséquence sur l'intégrité du génome cellulaire. Il reste donc à évaluer s'il serait approprié dans l'application en thérapie génique humaine (Daya and Berns, 2008).

b. Réplication

Lorsque l'AAV infecte une cellule en présence d'un virus auxiliaire, il entre dans une phase répllicative caractérisée 1/ par la production des protéines Rep78, 68, 52, 40 et VP1, VP2, VP3, 2/ par la réplication de l'ADN viral initiée au niveau des ITR et

enfin 3/ par l'assemblage de nouvelles particules virales dans le noyau de la cellule. Les principaux acteurs de la réplication sont les ITRs et les protéines Rep, ainsi que les polymérase cellulaires et certaines protéines du virus auxiliaire (voir au paragraphe 3, rôle des virus auxiliaires). La synthèse du génome de l'AAV est initiée par une polymérase cellulaire non encore identifiée qui utilise l'extrémité libre 3'-OH due au repliement en épingle à cheveux de l'ITR comme amorce pour la synthèse du brin complémentaire. La réplication de l'ADN viral est possible grâce à trois propriétés des protéines Rep78 et Rep68 :

- leur capacité à se fixer sur un site précis de l'ITR nommé RBS ;
- leur activité hélicase ATP-dépendante, permettant la séparation des 2 brins d'ADN ;
- leur activité endonucléase qui s'exerce sur un seul brin d'ADN au niveau du site appelé TRS de l'ITR.

Les protéines Rep78/68 sont donc essentielles à la réplication de l'ADN de AAV.

3. Virus auxiliaires

Les protéines Rep sont les seules protéines d'AAV impliquées dans sa réplication. Les autres protéines nécessaires à la réplication sont des protéines cellulaires et des protéines codées par le génome viral auxiliaire, Ad ou HSV, que l'AAV détourne pour sa propre réplication.

a. L'adénovirus

L'activité auxiliaire de l'adénovirus fut découverte en 1965 par Atchison (Atchison et al., 1965) puis l'ensemble des éléments adénoviraux qui permettent la réplication d'AAV, notamment d'AAV-2, a été identifié. Ce sont les protéines E1A, E1B55K, E2A et E4orf6 et les ARNs VA (Alazard-Dany et al., 2009; Matsushita et al., 2004).

La protéine E1A est un facteur de transcription qui stimule la transcription de AAV à partir des promoteurs P5 et P19 du gène rep et active les promoteurs précoces adénoviraux. E1A stabilise aussi la protéine cellulaire p53 conduisant à l'apoptose de la cellule. Afin de contrer cette action, les protéines virales E1B55K et E4orf6 forment un complexe avec p53 et celle-ci est dégradée par protéolyse dans le

protéasome après ubiquitinylation. Plus tardivement au cours de l'infection, l'hétérodimère E1B55K/E4orf6 intervient dans l'exportation préférentielle des ARNm adénoviraux tardifs et d'AAV en dehors du noyau au détriment des ARNm adénoviraux précoces et cellulaires.

La protéine de liaison à l'ADN de 72 kDa codée par le gène E2A d'Ad intervient à la fois dans la régulation des promoteurs d'AAV et sa réplication. Elle joue également un rôle dans la maturation et l'exportation des ARNm viraux (Ad et AAV). Elle permet l'augmentation des niveaux intracellulaires des formes simple et double brin du génome d'AAV, les différentes isoformes des protéines Rep et augmente considérablement la production des protéines de la capsid d'AAV.

Enfin, les ARN VA d'Ad inhibent l'activité de la protéine kinase cellulaire d'eIF-2 induite par les interférons, permettant alors la synthèse des protéines virales et contournant ainsi la réponse anti-virale cellulaire (Matsushita et al., 2004).

b. Le virus Herpes Simplex de type 1 (HSV-1)

L'activité auxiliaire de HSV-1 pour AAV fut découverte en 1981 (Buller et al., 1981). Les protéines HSV-1 identifiées nécessaires à la réplication d'AAV sont les protéines très précoces ICP0, ICP4 et ICP22 qui agissent en synergie sur la transactivation de l'expression du gène rep (Alazard-Dany et al., 2009; Geoffroy et al., 2004; Glauser et al., 2010), la protéine ICP8 ou DBP (protéine de liaison à l'ADN viral), le complexe de l'ADN polymérase (UL30 et UL42) et le complexe hélicase/primase (UL5, UL8, UL52) qui participent à la réplication de l'ADN de l'AAV (Alazard-Dany et al., 2009; Glauser et al., 2010).

C. Le virus herpes simplex de type 1

1. Présentation

L'HSV-1 est un très bon auxiliaire pour la réplication productive complète de AAV (Buller et al., 1981). HSV-1 est un agent pathogène humain très répandu dont le cycle de vie biphasique est caractérisé par une phase lytique dans les cellules épithéliales de la muqueuse et une phase latente dans les neurones sensoriels innervant. C'est un virus à ADN db linéaire de 153 kpb protégé par une capsid qui

est elle-même entourée d'un tégument et recouvert de l'enveloppe virale d'origine cellulaire. Le génome est constitué de deux segments d'ADN dénommés respectivement L (*long*) et S (*short*). Chaque segment est constitué d'une région unique longue (U_L) et unique courte (U_S), encadré de séquences répétées inversées. La séquence U_L est encadrée par la séquence ab et son inversion $b'a'$, d'environ 9 kpb chacune, alors que la séquence U_S est encadrée par la séquence $a'c'$ et son inversion ca , de 6,5 kpb chacune. Ainsi, le génome HSV contient 15 kpb de séquences d'ADN ($b'a'c'$) qui représentent des régions terminales de répétitions inversées insérées entre les domaines U_L et U_S . HSV-1 est connu pour exprimer au moins 84 protéines différentes dont les expressions en cascade sont régulées temporellement (Roizman, 1996). Les gènes viraux (et leurs produits protéiques) sont généralement nommés par leur position relative de gauche à droite dans la région U_L ou U_S . Cependant, de nombreuses protéines virales possèdent aussi d'autres noms (Taylor et al., 2002). Elles sont également décrites selon leurs fonctions : *Infected Cell Protein* (ICP), *Virion Protein* (VP) ou leur poids moléculaire (par exemple, ICP0 est aussi nommée IE110 ou Vmw110 ou alpha 0 protein). Certaines protéines virales sont essentielles au déroulement du cycle lytique, alors que d'autres ne le sont pas.

2. Cycle viral

Tous les virus herpes sont capables de persister sous forme latente dans certains types ou contextes cellulaires et de produire une infection productive dans d'autres.

a. Latence

L'infection latente peut durer toute la vie de l'hôte. Après la primo-infection, généralement à la surface de la muqueuse buccale ou génitale, le virus se déplace le long de l'axone neuronal vers le corps cellulaire des neurones innervant les ganglions de Gasser pour HSV-1 ou les ganglions sacrés pour HSV-2. Une fois à l'intérieur du neurone, le virus entre dans un état de repos : l'ADN est sous forme épisomale au cours duquel les gènes lytiques ne sont pas exprimés.

Le virus à l'état latent peut être réactivé par des stimuli extérieurs. Il rentre alors en phase lytique et voyage par l'axone jusqu'au site de l'infection primaire pour ré-

initier un cycle de réplication lytique produisant de nouvelles particules virales. Les signaux et les mécanismes impliqués dans ce processus sont mal connus mais il semble que certains stimuli, comme la maladie, le stress ou l'exposition à la lumière ultraviolette augmentent le risque de réactivation (Taylor et al., 2002).

b. Réplication

Le cycle viral lytique débute par la fixation du virus sur la membrane de la cellule hôte suivie de la pénétration dans la cellule, puis du transport de la capsid jusqu'au noyau. L'ADN viral est alors injecté à travers les pores nucléaires dans le nucléoplasme. L'ADN se circularise et la réplication s'effectue par l'expression en cascade des gènes viraux de manière hautement régulée (Roizman, 1996).

Les gènes d'HSV-1 sont classés en trois groupes, α , β et γ , en fonction de leur cinétique d'expression au cours de l'infection virale. Ainsi, les gènes de type α , également nommés gènes très précoces ou IE (Immédiate Early) sont les premiers à être transcrits ; suivront ensuite les gènes β , précoces ou E (Early) ; et, enfin, les gènes tardifs, γ ou L (Late). La phase très précoce est caractérisée par l'expression des gènes IE codant pour des protéines transactivatrices qui initient la transcription. Pendant la phase précoce, ce sont les gènes E codant pour des facteurs de réplication impliqués dans la synthèse de l'ADN viral qui sont exprimés. Enfin, la phase tardive est marquée par l'expression des protéines structurales du virion (Taylor et al., 2002). La réplication de l'ADN viral débute à partir de 3 heures post-infection (hpi) jusqu'à 12 hpi. La synthèse protéique est maximale tardivement au cours de l'infection (Boehmer and Lehman, 1997; Roizman, 1996; Taylor et al., 2002).

- *Phase très précoce*

L'expression des gènes IE est maximale entre 3 et 4 hpi. Ce sont les protéines ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47. La transcription de ces gènes est initiée par la protéine VP16 présente dans le tégument des virions et qui est relâchée dans la cellule lors de l'infection. ICP4, protéine de liaison à l'ADN, est l'activateur indispensable à la transcription des gènes α . Il est activé par ICP0, activateur non essentiel, et il réprime sa propre synthèse. La protéine essentielle ICP27 agit à plusieurs niveaux : régulation post-transcriptionnelle des gènes α , stimulation de la synthèse d'ADN viral et

passage de la phase précoce à la phase tardive. Enfin, les protéines ICP22 et ICP47 sont des protéines non essentielles.

- *Phase précoce*

L'expression des gènes E commence à 3 hpi et est maximale à 6 hpi. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et dans la réplication de l'ADN viral. Nous noterons notamment 7 protéines nécessaires à la synthèse de l'ADN viral. Le gène UL9 code une protéine capable de se lier aux origines de réplication, elle recrute ensuite la protéine DBP (aussi nommée ICP8), codée par le gène UL29. A ce couple, viennent se fixer les protéines UL5, UL8 et UL52. Le complexe ainsi formé possède une activité d'hélicase et de primase qui entraîne donc la séparation des deux brins d'ADN. La synthèse proprement dite peut alors commencer. Elle est réalisée par l'ADN polymérase virale qui est un hétérodimère composé des protéines UL30 et UL42. La sous-unité UL30 possède une activité exonucléase 3' vers 5', permettant une réplication de haute fidélité. La protéine UL42 est une sous-unité transactivatrice pour la protéine UL30.

- *Phase tardive*

Les gènes L codent essentiellement des composants structuraux du virus. Cette phase est divisée en deux stades, stade _1 et stade _2. L'expression des gènes _1 (les glycoprotéines gB et gD par exemple) commence assez tôt dans le cycle alors que celle des gènes _2 (glycoprotéine gC par exemple) débute tardivement après que l'ADN viral se soit répliqué. Ce deuxième stade est dépendant de la protéine DBP (Zhou and Knipe, 2002).

D. AAV: Fonctions auxiliaires virales et cellulaires

1. Interaction AAV/HSV

*Des études ont démontré qu'un ensemble de protéines d'HSV était suffisant pour médier la réplication d'AAV. Ainsi en 1991, Weindler et Heilbronn montrent *in vitro* que la protéine DBP et le complexe hélicase/primase (UL5, UL52 et UL8) sont suffisants pour induire une réplication productive de AAV en absence de réplication*

d'HSV (Weindler and Heilbronn, 1991). Puis Ward et al. montrent en 2001 que la réplication d'AAV est efficace *in vitro* en présence des seules protéines Rep68 d'AAV, de la DBP et du complexe de l'ADN polymérase UL30 et UL42 de HSV-1 (Ward et al., 2001). Cependant, il existe une controverse : selon Ward et al. le complexe hélicase/primase d'HSV ne serait pas indispensable car la protéine Rep68 créerait une amorce terminale aux extrémités de l'ADN db par son activité hélicase et/ou endonucléase ATP-dépendante site-spécifique. Par contre, l'ADN polymérase virale ne serait pas requise. En effet, les résultats de Weindler et Heilbronn en 1991 suggèrent que c'est l'ADN polymérase cellulaire _ et/ou _ qui serait impliquée dans la réplication de l'ADN d'AAV (Weindler and Heilbronn, 1991). Les résultats de Toubanc et al. en 2004 le confirme car ils montrent que l'ADN polymérase d'HSV n'est pas indispensable puisqu'un AAV recombinant peut être produit après co-infection avec un virus HSV muté dans le gène UL30 (HSV Δ Pol) (Toubanc et al., 2004).

De plus, les particules des stocks d'AAVr obtenus ont des propriétés similaires aux particules classiquement produites avec un adénovirus sauvage. Cela suggère donc bien que la polymérase permettant la réplication de l'ADN d'AAV est cellulaire. Enfin, en 2006, Slanina et al. ont confirmé l'importance de la primase UL52 et l'hélicase UL5 d'HSV-1 dans la réplication d'AAV (Slanina et al., 2006). La fonction enzymatique de ce complexe n'est pas requise pour l'activité auxiliaire mais elle est nécessaire pour le recrutement de la protéine DBP dans les compartiments de réplication d'AAV. Cette protéine DBP de liaison à l'ADN viral sb est le marqueur des compartiments de réplication (RC) du virus HSV. De plus, il a été montré qu'elle est aussi recrutée dans les RC d'AAV qui ont une localisation nucléaire distincte des RC d'HSV (Glaser et al., 2007; Heilbronn et al., 2003; Stracker et al., 2004; Ward et al., 2001). Cette protéine formerait un complexe tripartite avec Rep et l'ADN sb d'AAV.

Ces données nous ont permis de sélectionner les outils biologiques qui permettront de nous orienter dans la recherche des partenaires de la protéine Rep. Le virus HSV Δ Pol et la protéine DBP seront donc retenus pour la suite des expériences.

2. Interaction AAV/cellule

Des travaux centrés sur les protéines cellulaires nécessaires à la réplication d'AAV ont été menés en amont et parallèlement aux nôtres. Il a été montré qu'AAV se réplique *in vitro* en présence d'extraits cellulaires de cellules HeLa infectées par l'adénovirus (Ni et al., 1994; Ward and Berns, 1996). De plus, AAV est capable de se répliquer sans l'aide d'un virus auxiliaire à condition que les cellules aient subi un traitement par des agents génotoxiques tels que l'hydroxyurée ou une irradiation aux UV (Yakobson et al., 1989). Cela suggère que certains facteurs cellulaires sont induits suite à l'infection avec le virus auxiliaire ou suite au traitement appliqué. Des expériences de reconstitution de la réplication d'AAV *in vitro* avec des enzymes purifiées suggèrent que la réplication de l'ADN d'AAV nécessite cinq protéines cellulaires : la protéine de réplication A (RPA), du facteur de réplication C (RFC), l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), l'ADN polymérase cellulaire δ et le complexe de maintenance en minichromosome (MCM) (Kang et al., 2009; Nash et al., 2007; Nash et al., 2008; Ni et al., 1998).

La protéine RPA lie l'ADN sb et aurait un rôle dans la réplication de l'ADN d'AAV au même titre que la protéine DBP d'HSV (Nash et al., 2007; Nash et al., 2008; Ni et al., 1998). De même, le complexe MCM est homologue au complexe hélicase/primase d'HSV. Les facteurs RFC et PCNA sont des cofacteurs de la polymérase α , le facteur RFC recrute le facteur PCNA qui lui-même recrute la polymérase α lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN cellulaire. Un grand nombre de complexes protéiques cellulaires ont aussi été mis en évidence pour leur implication dans la réplication du virus AAV tel que la protéine cellulaire nucleophosmine/B23 qui interagit avec des composants nucléolaires des ribosomes nouvellement synthétisés pour promouvoir l'exportation nucléaire des ribosomes (Maggi et al., 2008), le groupe de protéines HMG1 de liaison à l'ADN intervient dans la flexibilité de l'ADN et stimule la formation de complexes nucléoprotéiques au cours de la réplication, de la transcription ou de la recombinaison (Costello et al., 1997). HMG1 stimulerait la coupure du site *trs* du génome d'AAV et la liaison de Rep à l'ADN.

La protéine Rep a été copurifiée avec le complexe Ku70/80, un acteur hétérodimérique majeur du mécanisme de réparation par ligature d'extrémités

d'ADN non homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*) et la réparation de l'ADN lors des cassures double brin (Choi et al.). Il a été montré que l'ITR d'AAV a aussi une interaction directe avec les protéines Ku et la réplication de l'ADN d'AAV est diminuée dans les cellules où le complexe Ku70/80 est délété. Ce complexe est une sous-unité de la protéine kinase DNA-PK qui intervient aussi dans la réparation de l'ADN par le mécanisme NHEJ.

De plus, il y aurait une interaction entre Rep et le facteur de transcription Sp1 (régule la transcription de nombreux gènes à partir des sites riches en GC) qui serait essentielle pour l'activation de la transcription à partir des promoteurs p19 et p40 d'AAV médiée par Rep (Pereira and Muzyczka, 1997). De même, l'interaction de Rep avec la protéine Topors, protéine de liaison à p53 et à l'ADN topoisomérase I, apparaît aussi comme stimulant la transcription d'AAV (Weger et al., 2002). Il a été démontré que la protéine Rep interagit avec beaucoup d'autres facteurs tels que avec le facteur de transcription E2F1 (Batchu et al., 2001), la protéine c-Jun (Prasad et al., 2003), le facteur apoptotique p53 (Weger et al., 2002), le coactivateur PC4 de l'ARN polymérase II (Weger et al., 1999) et le complexe de remodelage de la chromatine TAF1/Set/ANP32A/B (Pegoraro et al., 2006).

Ces recherches se sont appuyées sur des méthodes qui mettent en évidence une interaction directe avec la protéine Rep. Cependant ces techniques ne sont pas susceptibles de révéler tous les facteurs qui participent avec la protéine Rep à l'infection productive.

Afin d'obtenir plus d'informations sur les complexes multiprotéiques contenant la protéine Rep et pouvant être impliqués dans la réplication de l'ADN d'AAV, un groupe américain a purifié les complexes protéiques contenant la protéine Rep par purification par affinité en tandem (TAP) lors d'une infection productive d'AAV dans le contexte d'une co-infection avec l'Ad. L'identification par une analyse en spectrométrie de masse des protéines contenues dans ces complexes purifiés a permis d'identifier près de 188 protéines partenaires. L'analyse des fonctions connues de ces protéines révèle qu'elles sont impliquées dans différents processus biologiques cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la transcription, la traduction, la dégradation des protéines, et l'épissage de l'ARNm (Nash et al., 2009). De plus, cette analyse a permis de valider certaines des protéines partenaires

de Rep citées plus haut: le complexe MCM, les facteurs PCNA, RFC et RPA, le complexe DNA-PK et sa sous-unité Ku70/80, la nucleophosmine et le facteur PC4.

Lorsque cette étude a été publiée, nous étions nous-mêmes en train de mettre au point une variante de cette technique TAP afin d'identifier les facteurs cellulaires et viraux recrutés dans les compartiments de réplication d'AAV formés lors de la co-infection avec le virus auxiliaire HSV-1, alors que les autres groupes utilisaient l'adénovirus (Nicolas et al.). Nous verrons que notre étude a permis non seulement de valider des interactions déjà connues mais a aussi mis en évidence d'autres interactions jamais décrites avant.

E. Stratégie expérimentale

Les données précédentes indiquent qu'il existe un environnement nucléaire minimal autorisant la réplication d'AAV. Le but de ce travail consiste à déterminer les facteurs viraux (HSV-1) et cellulaires optimaux permettant à l'AAV de se répliquer dans un environnement minimal. Ce projet est centré sur une analyse protéomique des RC d'AAV-2 grâce à la technique TAP. Dans cette approche, la protéine Rep d'AAV est utilisée comme "appât" pour co-purifier les protéines qui interagissent avec elle ou qui sont liées à l'ADN d'AAV-2 sur lequel la protéine Rep est fixée. En effet, il est connu que Rep78/68 est liée de façon covalente à l'ADN d'AAV-2 par les sites de liaison appelés RBS. De ce fait, il est vraisemblable qu'au moins une partie des protéines Rep soit stablement liée à l'ADN d'AAV et que Rep fasse partie d'un complexe de réplication et soit donc associée à d'autres protéines virales et cellulaires.

La nouvelle méthode novatrice appelée "Tandem Affinity Purification" ou TAP a été développée pour la purification rapide de complexes protéiques chez la levure (Puig et al., 2001; Rigaut et al., 1999). Elle est basée sur une double purification des complexes. Pour cela, une protéine connue du complexe à purifier est fusionnée par des méthodes génétiques à deux cassettes (ou "tag") d'affinité différente qui permettent la purification en deux étapes consécutives, d'abord grâce à un premier tag correspondant aux séquences de liaison aux IgG de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, puis à un deuxième tag correspondant au peptide de liaison à la calmoduline (CBP). Les deux cassettes sont séparées par un site de clivage

spécifique par la protéase TVE qui permet de récupérer les complexes protéiques après la première purification. Enfin, les conditions douces de lavage et d'élution permettent d'isoler le complexe d'intérêt à partir de cellules où la protéine étiquetée est exprimée. L'entreprise américaine de biotechnologie, Agilent, a apporté des modifications à ce système et a mis au point le kit InterPlay[®] Mammalian TAP System qui permet de purifier les complexes protéiques à partir d'extraits de cellules de mammifères exprimant la protéine étiquetée. Cette méthode est basée sur l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée à deux tags d'affinité en tandem constitué d'un peptide de liaison à la streptavidine (SBP) et d'un peptide de liaison à la calmoduline (CBP). Le tag SBP est une séquence synthétique isolée à partir d'une bibliothèque aléatoire de peptides qui possède une affinité élevée pour la résine de streptavidine. L'élution des complexes protéiques fixés sur cette résine est réalisée efficacement grâce à de la biotine. Le tag CBP est un dérivé d'un fragment C-terminal de la kinase de la chaîne légère de la myosine du muscle. En présence du calcium, il a une affinité élevée pour la résine de calmoduline et l'élution des complexes se réalise par l'addition d'un agent chélateur du calcium (Stratagene).

La stratégie expérimentale pour identifier les partenaires de la protéine Rep d'AAV-2 a consisté d'abord en la création d'un génome AAV modifié contenant les séquences codant pour la protéine Rep fusionnée aux séquences d'un marqueur fluorescent mCherry (fluorescence rouge aux UV) et des deux tags SBP et CBP, puis de son intégration dans le génome des cellules HeLa. Cette étape a été effectuée par l'équipe d'Anna Salvetti. Ce sont les cellules HeLa-AAVtagCRep qui expriment de façon inductible la protéine fusion tag-Cherry-Rep (tCRep) codée par un génome AAV dépourvu des séquences cap. La présence du marqueur mCherry permet de visualiser directement cette protéine tCRep dans les RC d'AAV par observation au microscope à fluorescence en l'excitant par une longueur d'onde maximale de 587 nm. L'équipe d'A. Salvetti a vérifié qu'il y a bien à la fois expression de cette protéine de fusion et répllication de l'ADN modifié d'AAV lorsque les cellules HeLa-AAVtagCRep sont infectées avec un virus HSV-1 sauvage ou muté HSV_Pol. La présence des deux tags, en position N-terminale permet la purification des complexes Rep-ADN-protéines contenant la protéine tCRep sur les résines d'affinités correspondantes du kit Interplay[®] Mammalian TAP system (Stratagene).

Sur la base de ces éléments, le travail de ce stage a consisté :

- 1- à déterminer les paramètres d'infection par HSV-1 qui permettent une réplication optimum d'AAV, une production maximale de protéines tCRep dans les RC d'AAV et la co-localisation de tCRep avec la protéine de réplication DBP d'HSV qui est un marqueur des RC d'HSV-1 et qui est connue comme étant nécessaire à la réplication d'AAV (Glauser et al., 2007; Heilbronn et al., 2003). Pour cela, différents temps d'infection et différentes multiplicité d'infection (MOI) par HSV-1 ont été réalisés avec la souche HSV-1 sauvage et avec la souche HSV-1 défective pour l'ADN polymérase UL30 (HSV Δ Pol). Les conditions optimum ont été déterminées en réalisant des cinétiques d'infection par HSV-1 et en comparant au microscope à fluorescence ou au microscope confocal les localisations des protéines tCRep d'AAV et DBP d'HSV.*
- 2- à optimiser les conditions de purification des complexes contenant la protéine tCRep afin d'identifier les partenaires nucléaires de Rep. La réplication d'AAV étant intranucléaire, nous avons utilisé des extraits protéiques nucléaires que nous avons préparés à partir de noyaux purifiés des cellules afin d'enrichir les extraits protéiques en protéine tCRep et donc en complexes contenant cette protéine.*
- 3- à purifier les complexes protéiques contenant la protéine tCRep à partir d'une grande quantité de cellules et à les séparer par électrophorèse pour leur identification par spectrométrie de masse (collaboration avec l'équipe M. Ferro, CEA de Grenoble).*
- 4- à trier et organiser les résultats et classer les protéines identifiées selon leur fonction connue.*
- 5- à valider certaines des protéines identifiées par des expériences de protéomique de type Western blot (WB), immunofluorescence indirecte (IFI) et co-immunoprécipitation inverse (co-IP).*

Nous avons donc analysé les protéines associées à la protéine Rep dans des cellules infectées avec l'HSV-1 sauvage (HSV wt) ou d'HSV-1 incapable de se répliquer en raison de l'absence de l'ADN polymérase virale (HSV Δ Pol). Cette

étude a abouti à l'identification d'environ 60 protéines cellulaires correspondant majoritairement à des facteurs impliqués dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN. La plupart n'étaient pas connues comme partenaires de Rep. D'autres facteurs étaient déjà connus pour participer à la réplication d'AAV in vitro, tels que les facteurs RPA, PCNA, RFC et des protéines du complexe MCM. De plus, une dizaine de protéines virales ont été identifiées parmi lesquelles l'exonucléase virale UL12 jamais décrite jusqu'à ce jour comme participant à la réplication de l'ADN d'AAV. Nos résultats publiés en 2010 dans Journal of Virology (Nicolas et al., 2010), comparés à ceux de l'équipe américaine, suggèrent que AAV peut adapter sa réplication à l'environnement nucléaire créé par des virus auxiliaires différents.

BIBLIOGRAPHIE

- Alazard-Dany, N., Nicolas, A., Ploquin, A., Strasser, R., Greco, A., Epstein, A.L., Fraefel, C., Salvetti, A., 2009. Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog* 5, e1000340.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.M., 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754-756.
- Batchu, R.B., Shammass, M.A., Wang, J.Y., Munshi, N.C., 2001. Dual level inhibition of E2F-1 activity by adeno-associated virus Rep78. *J Biol Chem* 276, 24315-24322.
- Berns, K.I., 1990. Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54, 316-329.
- Boehmer, P.E., Lehman, I.R., 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 66, 347-384.
- Brister, J.R., Muzyczka, N., 1999. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J Virol* 73, 9325-9336.
- Brister, J.R., Muzyczka, N., 2000. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 74, 7762-7771.
- Bronstein, J.C., Weber, P.C., 1996. Purification and characterization of herpes simplex virus type 1 alkaline exonuclease expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* 70, 2008-2013.
- Brunner, J.E., Nguyen, J.H., Roehl, H.H., Ho, T.V., Swiderek, K.M., Semler, B.L., 2005. Functional interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C with poliovirus RNA synthesis initiation complexes. *J Virol* 79, 3254-3266.
- Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D., Rose, J.A., 1981. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40, 241-247.
- Carter, B.J., 2005. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 16, 541-550.
- Cervelli, T., Palacios, J.A., Zentilin, L., Mano, M., Schwartz, R.A., Weitzman, M.D., Giacca, M., 2008. Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins. *J Cell Sci* 121, 349-357.
- Choi, V.W., McCarty, D.M., Samulski, R.J., 2006. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol* 80, 10346-10356.
- Choi, Y.K., Nash, K., Byrne, B.J., Muzyczka, N., Song, S., 2010. The effect of DNA-dependent protein kinase on adeno-associated virus replication. *PLoS One* 5, e15073.
- Cohen, S., Marr, A.K., Garcin, P., Pante, N., 2011. Nuclear envelope disruption involving host caspases plays a role in the parvovirus replication cycle. *J Virol* 85, 4863-4874.

- Collaco, R.F., Bevington, J.M., Bhargava, V., Kalman-Maltese, V., Trempe, J.P., 2009. Adeno-associated virus and adenovirus coinfection induces a cellular DNA damage and repair response via redundant phosphatidylinositol 3-like kinase pathways. *Virology* 392, 24-33.
- Conway, J.E., Rhys, C.M., Zolotukhin, I., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Hayward, G.S., Byrne, B.J., 1999. High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type 1 vector expressing AAV-2 Rep and Cap. *Gene Ther* 6, 986-993.
- Corcoran, J.A., Saffran, H.A., Duguay, B.A., Smiley, J.R., 2009. Herpes simplex virus UL12.5 targets mitochondria through a mitochondrial localization sequence proximal to the N terminus. *J Virol* 83, 2601-2610.
- Costello, E., Saudan, P., Winocour, E., Pizer, L., Beard, P., 1997. High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *EMBO J* 16, 5943-5954.
- Daya, S., Berns, K.I., 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-593.
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., Engelhardt, J.F., 2005. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12, 873-880.
- Erls, K., Rohde, V., Thaele, M., Roth, S., Edler, L., Schlehofer, J.R., 2001. DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. *Hum Reprod* 16, 2333-2337.
- Fischer, A., 2001. Gene therapy: some results, many problems to solve. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 1269-1275.
- Geoffroy, M.C., Chadeuf, G., Orr, A., Salvetti, A., Everett, R.D., 2006. Impact of the interaction between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 and ubiquitin-specific protease USP7 on activation of adeno-associated virus type 2 rep gene expression. *J Virol* 80, 3650-3654.
- Geoffroy, M.C., Epstein, A.L., Toublanc, E., Moullier, P., Salvetti, A., 2004. Herpes simplex virus type 1 ICP0 protein mediates activation of adeno-associated virus type 2 rep gene expression from a latent integrated form. *J Virol* 78, 10977-10986.
- Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., zur Hausen, H., 1984. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134, 64-71.
- Glauser, D.L., Seyffert, M., Strasser, R., Franchini, M., Laimbacher, A.S., Dresch, C., de Oliveira, A.P., Vogel, R., Buning, H., Salvetti, A., Ackermann, M., Fraefel, C., 2010. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by adeno-associated virus rep proteins depends on their combined DNA-binding and ATPase/helicase activities. *J Virol* 84, 3808-3824.
- Glauser, D.L., Strasser, R., Laimbacher, A.S., Saydam, O., Clement, N., Linden, R.M., Ackermann, M., Fraefel, C., 2007. Live covisualization of competing adeno-

- associated virus and herpes simplex virus type 1 DNA replication: molecular mechanisms of interaction. *J Virol* 81, 4732-4743.
- Heilbronn, R., Engstler, M., Weger, S., Krahn, A., Schetter, C., Boshart, M., 2003. ssDNA-dependent colocalization of adeno-associated virus Rep and herpes simplex virus ICP8 in nuclear replication domains. *Nucleic Acids Res* 31, 6206-6213.
- Hunter, L.A., Samulski, R.J., 1992. Colocalization of adeno-associated virus Rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells. *J Virol* 66, 317-324.
- Jiricny, J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews* 7, 335-346.
- Kang, B.Y., You, H., Bandyopadhyay, S., Agrawal, N., Melchert, R.B., Basnakian, A.G., Liu, Y., Hermonat, P.L., 2009. Cervical cancer isolate PT3, super-permissive for adeno-associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA. *BMC Microbiol* 9, 79.
- Kaufer, S., Coffey, C.M., Parker, J.S., 2012. The cellular chaperone hsc70 is specifically recruited to reovirus viral factories independently of its chaperone function. *J Virol* 86, 1079-1089.
- Kim, C.S., Seol, S.K., Song, O.K., Park, J.H., Jang, S.K., 2007. An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol* 81, 3852-3865.
- Kress, E., Baydoun, H.H., Bex, F., Gazzolo, L., Duc Dodon, M., 2005. Critical role of hnRNP A1 in HTLV-1 replication in human transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 2, 8.
- Li, H.P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L., Lai, M.M., 1997. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9544-9549.
- Maggi, L.B., Jr., Kuchenruether, M., Dadey, D.Y., Schwoppe, R.M., Grisendi, S., Townsend, R.R., Pandolfi, P.P., Weber, J.D., 2008. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol* 28, 7050-7065.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsushita, T., Okada, T., Inaba, T., Mizukami, H., Ozawa, K., Colosi, P., 2004. The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. *J Gen Virol* 85, 2209-2214.
- Mishra, S., Murphy, L.C., Nyomba, B.L., Murphy, L.J., 2005. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 11, 192-197.
- Mou, F., Wills, E.G., Park, R., Baines, J.D., 2008. Effects of lamin A/C, lamin B1, and viral US3 kinase activity on viral infectivity, virion egress, and the targeting of herpes simplex virus U(L)34-encoded protein to the inner nuclear membrane. *J Virol* 82, 8094-8104.

- Mountain, A., 2000. *Gene therapy: the first decade*. *Trends Biotechnol* 18, 119-128.
- Mulligan, R.C., 1993. *The basic science of gene therapy*. *Science* 260, 926-932.
- Murata, T., Goshima, F., Daikoku, T., Inagaki-Ohara, K., Takakuwa, H., Kato, K., Nishiyama, Y., 2000. *Mitochondrial distribution and function in herpes simplex virus-infected cells*. *J Gen Virol* 81, 401-406.
- Nash, K., Chen, W., McDonald, W.F., Zhou, X., Muzyczka, N., 2007. *Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication*. *J Virol* 81, 5777-5787.
- Nash, K., Chen, W., Muzyczka, N., 2008. *Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins*. *J Virol* 82, 1458-1464.
- Nash, K., Chen, W., Salganik, M., Muzyczka, N., 2009. *Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein*. *J Virol* 83, 454-469.
- Nasheuer, H., Pospiech, H., Syv oja, J., Lankenau, D.-H., 2007. *Progress Towards the Anatomy of the Eukaryotic DNA Replication Fork Genome Integrity*. Springer Berlin / Heidelberg, pp. 27-68.
- Navratil, V., de Chassey, B., Meyniel, L., Delmotte, S., Gautier, C., Andre, P., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C., 2009. *VirHostNet: a knowledge base for the management and the analysis of proteome-wide virus-host interaction networks*. *Nucleic Acids Res* 37, D661-668.
- Ni, T.H., McDonald, W.F., Zolotukhin, I., Melendy, T., Waga, S., Stillman, B., Muzyczka, N., 1998. *Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection*. *J Virol* 72, 2777-2787.
- Ni, T.H., Zhou, X., McCarty, D.M., Zolotukhin, I., Muzyczka, N., 1994. *In vitro replication of adeno-associated virus DNA*. *J Virol* 68, 1128-1138.
- Nicolas, A., Alazard-Dany, N., Biollay, C., Arata, L., Jolinon, N., Kuhn, L., Ferro, M., Weller, S.K., Epstein, A.L., Salvetti, A., Greco, A., 2010. *Identification of rep-associated factors in herpes simplex virus type 1-induced adeno-associated virus type 2 replication compartments*. *J Virol* 84, 8871-8887.
- Parkinson, J., Lees-Miller, S.P., Everett, R.D., 1999. *Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase*. *J Virol* 73, 650-657.
- Pastwa, E., Blasiak, J., 2003. *Non-homologous DNA end joining*. *Acta Biochim Pol* 50, 891-908.
- Pegoraro, G., Marcello, A., Myers, M.P., Giacca, M., 2006. *Regulation of adeno-associated virus DNA replication by the cellular TAF-I/set complex*. *J Virol* 80, 6855-6864.
- Pereira, D.J., Muzyczka, N., 1997. *The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter*. *J Virol* 71, 1747-1756.

- Pettit Kneller, E.L., Connor, J.H., Lyles, D.S., 2009. *hnRNPs Relocalize to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus.* *J Virol* 83, 770-780.
- Prasad, C.K., Meyers, C., Zhan, D.J., You, H., Chiriva-Internati, M., Mehta, J.L., Liu, Y., Hermonat, P.L., 2003. *The adeno-associated virus major regulatory protein Rep78-c-Jun-DNA motif complex modulates AP-1 activity.* *Virology* 314, 423-431.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B., 2001. *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification.* *Methods* 24, 218-229.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B., 1999. *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration.* *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., Macneill, J., Ren, J.M., Yuan, J., Bakalarski, C.E., Villen, J., Kornhauser, J.M., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S.P., Gu, T.L., Polakiewicz, R.D., Rush, J., Comb, M.J., 2007. *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer.* *Cell* 131, 1190-1203.
- Rizwani, W., Alexandrow, M., Chellappan, S., 2009. *Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication.* *Cell Cycle* 8, 1621-1629.
- Roizman, B., 1996. *The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11307-11312.
- Russell, D.W., Kay, M.A., 1999. *Adeno-associated virus vectors and hematology.* *Blood* 94, 864-874.
- Sainis, L., Angelidis, C., Pagoulatos, G.N., Lazaridis, L., 2000. *HSC70 interactions with SV40 viral proteins differ between permissive and nonpermissive mammalian cells.* *Cell Stress Chaperones* 5, 132-138.
- Schmidt-Wolf, G.D., Schmidt-Wolf, I.G., 2003. *Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update.* *Trends Mol Med* 9, 67-72.
- Schwartz, R.A., Carson, C.T., Schuberth, C., Weitzman, M.D., 2009. *Adeno-associated virus replication induces a DNA damage response coordinated by DNA-dependent protein kinase.* *J Virol* 83, 6269-6278.
- Schwartz, R.A., Palacios, J.A., Cassell, G.D., Adam, S., Giacca, M., Weitzman, M.D., 2007. *The Mre11/Rad50/Nbs1 complex limits adeno-associated virus transduction and replication.* *J Virol* 81, 12936-12945.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., Wu, C., 2000. *A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing.* *Nature* 406, 541-544.
- Shi, S.T., Yu, G.Y., Lai, M.M., 2003. *Multiple type A/B heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) can replace hnRNP A1 in mouse hepatitis virus RNA synthesis.* *J Virol* 77, 10584-10593.

- Silva, L., Oh, H.S., Chang, L., Yan, Z., Triezenberg, S.J., Knipe, D.M., 2012. Roles of the nuclear lamina in stable nuclear association and assembly of a herpesviral transactivator complex on viral immediate-early genes. *MBio* 3.
- Slanina, H., Weger, S., Stow, N.D., Kuhrs, A., Heilbronn, R., 2006. Role of the herpes simplex virus helicase-primase complex during adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 80, 5241-5250.
- Stracker, T.H., Cassell, G.D., Ward, P., Loo, Y.M., van Breukelen, B., Carrington-Lawrence, S.D., Hamatake, R.K., van der Vliet, P.C., Weller, S.K., Melendy, T., Weitzman, M.D., 2004. The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication. *J Virol* 78, 441-453.
- Stratagene, InterPlay[®] Mammalian TAP System, in: Manual, I. (Ed.).
- Tanaka, E., Fukuda, H., Nakashima, K., Tsuchiya, N., Seimiya, H., Nakagama, H., 2007. HnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 608-614.
- Taylor, T.J., Brockman, M.A., McNamee, E.E., Knipe, D.M., 2002. Herpes simplex virus. *Front Biosci* 7, d752-764.
- Toublanc, E., Benraiss, A., Bonnin, D., Blouin, V., Brument, N., Cartier, N., Epstein, A.L., Moullier, P., Salvetti, A., 2004. Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J Gene Med* 6, 555-564.
- Wang, D., Parrish, C.R., 1999. A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication. *J Virol* 73, 7761-7768.
- Ward, P., Berns, K.I., 1996. In vitro replication of adeno-associated virus DNA: enhancement by extracts from adenovirus-infected HeLa cells. *J Virol* 70, 4495-4501.
- Ward, P., Falkenberg, M., Elias, P., Weitzman, M., Linden, R.M., 2001. Rependent initiation of adeno-associated virus type 2 DNA replication by a herpes simplex virus type 1 replication complex in a reconstituted system. *J Virol* 75, 10250-10258.
- Weger, S., Hammer, E., Heilbronn, R., 2002. Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression. *J Gen Virol* 83, 511-516.
- Weger, S., Wendland, M., Kleinschmidt, J.A., Heilbronn, R., 1999. The adeno-associated virus type 2 regulatory proteins rep78 and rep68 interact with the transcriptional coactivator PC4. *J Virol* 73, 260-269.
- Weindler, F.W., Heilbronn, R., 1991. A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* 65, 2476-2483.
- Wiedmer, A., Wang, P., Zhou, J., Rennekamp, A.J., Tiranti, V., Zeviani, M., Lieberman, P.M., 2008. Epstein-Barr virus immediate-early protein Zta co-opts

- mitochondrial single-stranded DNA binding protein to promote viral and inhibit mitochondrial DNA replication. J Virol 82, 4647-4655.*
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., Kleinschmidt, J.A., 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. J Virol 71, 1341-1352.*
- Yakobson, B., Hrynko, T.A., Peak, M.J., Winocour, E., 1989. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. J Virol 63, 1023-1030.*
- Yazdi, P.T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E.Y., Qin, J., 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. Genes Dev 16, 571-582.*
- Zhang, Y., McKnight, J.L., 1993. Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. J Virol 67, 1482-1492.*
- Zhou, C., Knipe, D.M., 2002. Association of herpes simplex virus type 1 ICP8 and ICP27 proteins with cellular RNA polymerase II holoenzyme. J Virol 76, 5893-5904.*