

ga-20004134

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**THESE**

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

**EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

PAR



**Nathalie DUTHEIL**

**Cibles du parvovirus adéno-associé de type 2**

Présentée le 8 décembre 1997 devant la Commission d'examen

Président: Pr S. **RAMBOUR**

Rapporteurs: Pr J. **ROMMELAERE**

Pr M. **BERGOIN**

Examineurs: Pr J.R. **SCHLEHOFER**

Pr D. **STEHÉLIN**

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier Dominique Stéhelin pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de travailler dans un cadre agréable et efficace, Jörg Schlehofer pour m'avoir accueillie dans son groupe sur les parvovirus et enfin Thierry Dupressoir pour avoir assuré le relais suite au départ de Jörg pour Heidelberg.

Je tiens également à remercier toutes les différentes personnes que j'ai côtoyées au cours de la thèse et tout particulièrement:

tous les membres de l'équipe parvovirus, et surtout Nathalie et Alexias pour leur dynamisme et leur aide technique. Ca y est Alex, tu vas pouvoir passer ta thèse!

le groupe HCV pour leurs nombreuses discussions scientifiques et autres ..., ainsi que pour leur hospitalité dans leur 1/2 dent lors de la rédaction de ce mémoire. J C pour sa générosité sans faille pour le partage (de bonnes grâces) de son ordinateur et enfin Sophana et la mouette rieuse pour leur aide dans la réalisation des figures.

Christian et Claire pour m'avoir initiée aux joies du FISH et les Docteurs Croquette et Delobel pour leurs discussions concernant la cytogénétique et la prise de photos dans leur laboratoire.

enfin, Papy et Agnès pour leurs nombreux conseils pour la culture cellulaire et le clonage moléculaire.

## SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| RESUME   | 7         |
| PRESENTATION DU MEMOIRE  | 9         |
| INTRODUCTION   | 11        |
| <b>I. PROPRIETES GENERALES DES PARVOVIRUS</b>                          | <b>12</b> |
| A. Isolement   | 12        |
| B. Taxonomie   | 12        |
| C. Caractéristiques physico-chimiques                                  | 16        |
| D. Spectre d'hôte  | 17        |
| E. Pathogénicité   | 17        |
| <b>II. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PARVOVIRUS</b>                         | <b>20</b> |
| A. Organisation génomique  | 20        |
| 1. Les extrémités virales  | 20        |
| 2. Organisation des unités de transcription                            | 23        |
| 3. Protéines virales   | 25        |
| B. Le cycle viral  | 28        |
| 1. Infection productive  | 28        |
| 1.1 Réplication de l'ADN   | 28        |
| 1.1.1 Modèle   | 28        |
| 1.1.2 Régulation de la réplication                                     | 30        |
| a Séquence nucléotidique parvovirale requise                           | 24        |
| b Protéines parvovirales et cellulaires requises                       | 24        |
| $\alpha$ Protéines parvovirales  | 32        |
| $\beta$ Protéine(s) cellulaire(s)                                      | 37        |
| c Virus auxiliaires  | 38        |
| d Stress génotoxiques  | 39        |
| 1.2 Régulation de la transcription                                     | 39        |
| 1.2.1 Régulation du promoteur p5                                       | 30        |
| 1.2.2 Régulation du promoteur p19                                      | 42        |
| 1.2.3 Régulation du promoteur p40                                      | 45        |
| 1.3 Assemblage des capsides  | 46        |
| 2. Infection latente   | 47        |
| 2.1 Intégration <i>in vivo</i>   | 47        |
| 2.2 Intégration <i>in vitro</i>  | 49        |
| 2.3 Caractérisation de la séquence AAVSI                               | 51        |
| 2.4 Caractéristiques des jonctions virales et cellulaires              | 53        |
| 2.5 Facteurs déterminant la spécificité d'intégration d'AAV-2          | 55        |
| 2.6 Sites potentiels d'intégration                                     | 43        |
| 2.7 Altération du phénotype cellulaire                                 | 65        |
| 2.8 Régulation de la transcription                                     | 66        |
| 2.9 Modèle d'intégration   | 68        |
| 2.10 Excision du provirus  | 72        |
| <b>III. ACTIVITES ANTITRANSFORMANTES DES PARVOVIRUS ADENO-ASSOCIES</b> | <b>74</b> |
| 1. Sensibilisation des cellules aux stress                             | 75        |
| 2. Perturbation du cycle cellulaire                                    | 76        |

|  |            |
|--|------------|
| 3. Induction de la différenciation                                 | 76         |
| 4. Rôle des gènes rep  | 77         |
| <b>IV. APPLICATIONS POTENTIELLES DES PARVOVIRUS ADENO-ASSOCIES</b> | <b>79</b>  |
| A. Thérapie cellulaire   | 79         |
| B. Thérapie génique  | 80         |
| 1. Les vecteurs rétroviraux  | 80         |
| 2. Les vecteurs adénovirus   | 81         |
| 3. Les vecteurs adéno-associés                                     | 82         |
| 1.1 Production des vecteurs recombinants                           | 82         |
| 1.2 Infections   | 84         |
| 1.3 Intégration  | 84         |
| 1.4 Expression <i>in vivo</i>                                      | 86         |
| 1.5 Problèmes posés par l'utilisation des recombinants AAV         | 87         |
| <b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>                                     | <b>90</b>  |
| <b>ARTICLE I</b>   | <b>91</b>  |
| I. Résumé  | 92         |
| II. Discussion   | 116        |
| <b>ARTICLE II</b>  | <b>118</b> |
| I. Résumé  | 119        |
| II. Discussion   | 134        |
| <b>ARTICLE III</b>   | <b>135</b> |
| I. Résumé  | 136        |
| II. Discussion   | 143        |
| <b>ARTICLE IV</b>  | <b>144</b> |
| I. Résumé  | 145        |
| II. Discussion   | 151        |
| <b>ARTICLE V</b>   | <b>153</b> |
| I. Résumé  | 154        |
| II. Discussion   | 190        |
| <b>CONCLUSION</b>  | <b>196</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>                                 | <b>198</b> |

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

|   |       |
|---|-------|
| <b>Figure 1:</b> Organisation génomique d'AAV-2   | p 21  |
| <b>Figure 2:</b> Séquence des palindromes d'AAV-2, orientations "flip" et "flop"  | p 22  |
| <b>Figure 3:</b> Domaines fonctionnels des protéines Rep78/68   | p 26  |
| <b>Figure 4:</b> Cycle viral d'AAV2   | p 29  |
| <b>Figure 5:</b> Modèle de la réplication d'AAV-2   | p 31  |
| <b>Figure 6:</b> Interaction entre les protéines Rep 78/68 et les extrémités virales d'AAV-2  | p 35  |
| <b>Figure 7-I:</b> Interaction entre les promoteurs parvoviraux et des facteurs de transcription  | p 41  |
| <b>7-II</b> Alignements de séquence entre les motifs RBS de l'extrémité viral et ceux des promoteurs p5, p19 et p40   | p 41  |
| <b>Figure 8:</b> Régulation de la transcription des 3 promoteurs d'AAV-2 en présence de virus auxiliaire  | p 43  |
| <b>Figure 9-A:</b> Caractéristiques du site de préintégration AAVSI   | p 52  |
| <b>9-B:</b> Homologies de séquence entre les motifs RBS, trs et M26 des séquences AAVSI et AAV-2  | p 52  |
| <b>Figure 10:</b> Représentation schématique des jonctions AAV-2/AAVSI dans des cellules infectées de façon latente par AAV-2   | p 54  |
| <b>Figure 11:</b> Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI (cellules infectées de façon latente par AAV-2) | p 56  |
| <b>Figure 12:</b> Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans le vecteur navette  | p 58  |
| <b>Figure 13:</b> Représentation schématique des jonctions AAV-2 et AAVSI, identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans le vecteur navette                      | p 59  |
| <b>Figure 14:</b> Principe schématisé de la formation de complexes entre les protéines Rep68 et les séquences AAV-2 et AAVSI  | p 61  |
| <b>Figure 15:</b> principe de la-détermination de la séquence consensus de fixation des protéines Rep78/68  | p 63  |
| <b>Figure 16-A:</b> Comparaison des sites RBS putatifs et des motifs RBS de l'extrémité virale et de la séquence AAVSI  | p 64  |
| <b>16-B:</b> localisation génomique des sites RBS putatifs  | p 64  |
| <b>Figure 17:</b> Comparaison de la régulation de la transcription des 3 promoteurs d'AAV-2 en absence ou en présence de virus auxiliaire                                     | p 67  |
| <b>Figure 18:</b> Modèle de l'intégration ciblée d'AAV-2 dans la séquence AAVSI   | p 70  |
| <b>Figure 19:</b> Modèle de l'intégration ciblée d'AAV-2 dans la séquence AAVSI   | p 71  |
| <b>Figure 20:</b> Modèle de l'excision du génome viral  | p 74  |
| <b>Figure 21:</b> Stratégie pour la production de vecteurs recombinants AAV   | p 83  |
| <b>Figure 22:</b> Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans les cellules HA16   | p 191 |
| <b>Figure 23:</b> Représentation schématique de toutes les jonctions AAV-2/AAVSI identifiées dans la séquence AAVSI   | p 193 |
| <br>  |       |
| <b>Tableau 1:</b> Classification et origines des membres de la famille des Parvoviridae   | p 13  |
| <b>Tableau 2:</b> Caractéristiques des genres de la famille des Parvoviridae  | p 14  |
| <b>Tableau 3:</b> Pathologies associées aux Parvovirus  | p 18  |
| <b>Tableau 4:</b> Comparaison de l'efficacité de la réplication virale obtenue <i>in vitro</i> par 2 équipes différentes  | p 33  |
| <b>Tableau 5:</b> Détection de séquences d'AAV-2 dans des tissus humains  | p 48  |
| <b>Tableau 6:</b> Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique  | p 81  |
| <b>Tableau 7:</b> Caractéristiques des recombinants AAV-2   | p 85  |

## ABBREVIATIONS

|              |  |
|--------------|--|
| aa:          | acide aminé                                    |
| AAV-2:       | virus adéno-associé de type 2                  |
| AAVSI:       | site d'intégration du parvovirus adéno-associé |
| Ad2:         | adénovirus de type 2                           |
| ADN:         | acide désoxyribonucléique                      |
| ADNc:        | ADN complémentaire                             |
| ARN:         | acide ribonucléique                            |
| ARNm:        | ARN messenger                                  |
| ATCC:        | american type cell culture                     |
| ATP:         | adénosine tri phosphate                        |
| BPV:         | bovine papillomavirus                          |
| CAAP:        | cellular AAV activating protein                |
| CRE:         | cAMP responsive element                        |
| DBP:         | DNA binding protein                            |
| D-BP:        | sequence D binding protein                     |
| DRS:         | short direct repeats                           |
| EGR-1:       | early growth response                          |
| FISH:        | hybridation <i>in situ</i> fluorescente        |
| H-1PV:       | parvovirus H-1                                 |
| HPV:         | human papillomavirus                           |
| ITR:         | inverted terminal repeat                       |
| IVG:         | interruption volontaire de grossesse           |
| kb:          | kilobase                                       |
| kDa:         | kilodalton                                     |
| Line1 ou L1: | long interspaced element 1                     |
| MOI:         | multiplicity of infection                      |
| nm:          | nanomètre                                      |
| nt:          | nucléotide                                     |
| NTP:         | nucléotide tri phosphate                       |
| PCR:         | polymerase chain reaction                      |
| pfu:         | particule forming unit                         |
| p.i.:        | post infection                                 |
| PV:          | parvovirus                                     |
| RBS:         | Rep binding site                               |
| RF:          | forme réplivative                              |
| RT-PCR:      | retro transcription polymerase chain reaction  |
| trs:         | site de résolution terminale                   |
| UBF1:        | upstream binding factor 1                      |
| YY1:         | Ying-Yang                                      |

# RESUME

## RESUME

Parmi les mécanismes évoqués pour expliquer les propriétés oncosuppressives des parvovirus, l'oncolyse semble expliquer en grande partie ces propriétés lorsqu'elles sont attachées aux parvovirus autonomes.

En ce qui concerne les parvovirus AAV, toutefois, d'autres processus doivent être envisagés. Nous nous sommes intéressés ainsi à différentes cibles des parvovirus AAV.

- au niveau de l'entrée du virus dans la cellule hôte, étape pour laquelle nous avons semble-t-il mis en évidence un événement très précoce d'induction de différenciation. La différenciation d'une cellule tumorale peut être considérée comme une voie d'oncosuppression.

- au niveau des tissus infectés de façon latente par les parvovirus AAV chez l'humain, et en particulier au niveau de la sphère génitale, nous avons apporté divers éléments montrant d'une part que la sphère génitale (placenta compris) est bien la cible d'une infection par AAV-2 mais aussi que ce virus peut interférer avec les propriétés transformantes d'un virus oncogène co-infectant (Human Papillomavirus).

- au niveau des sites moléculaires d'intégration du virus, notre apport semble indiquer que l'intégration spécifique et ciblée d'AAV-2, argument majeur pour l'utilisation de ce virus en thérapie génique, doit être re-considérée comme un état dynamique, tout du moins dans les cellules transformées en culture et devant inciter à la circonspection.

# **PRESENTATION DU MEMOIRE**

## PRESENTATION DU MEMOIRE

Le travail que nous avons réalisé avait pour objectif d'identifier des cibles du parvovirus adéno-associé AAV-2.

Une première approche consistait à étudier les mécanismes mis en jeu au cours de la différenciation cellulaire induite par AAV-2. Nous avons ainsi montré que l'induction de la différenciation requiert une interaction entre la particule virale et la membrane cellulaire mais ne nécessite aucune réplication virale ou expression de gènes viraux. Ceci ne peut s'expliquer que si cette interaction active toute une cascade de signaux de transduction conduisant à la différenciation cellulaire.

L'induction, en particulier dans des cellules embryonnaires souches, de marqueurs de différenciation pourrait expliquer, au moins en partie, la perturbation du développement embryonnaire de la souris après une infection par le parvovirus AAV-2 (Botquin *et al.*, 1994). Cette hypothèse ainsi que la détection fréquente du génome d'AAV-2 dans des tissus utérins et dans du matériel provenant d'avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Walz *et al.*, 1997a), nous a conduit à envisager la mise en place d'un système *in vitro* d'infection de cellules placentaires humaines.

Nous avons ainsi choisi d'utiliser 3 lignées placentaires humaines disponibles à l'ATTC. Il s'est avéré que ces 3 lignées cellulaires ainsi que des cellules amniotiques contenaient déjà des séquences d'ADN d'AAV-2 intégrées dans leur génome cellulaire. Ainsi, les tissus placentaires et embryonnaires pourraient constituer une des cibles naturelles de l'infection par AAV-2.

La troisième approche a consisté à déterminer les séquences cibles d'intégration du parvovirus AAV-2. En effet, 70% des clones cellulaires infectés de façon latente par AAV-2 ont montré une intégration du génome viral dans la séquence AAVSI (Kotin *et al.*, 1990), localisée sur le bras long du chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1991). Il apparaît donc que, pour les 30% de clones restants, le génome d'AAV-2 puisse s'intégrer dans une autre (ou plusieurs) séquence cellulaire. Nous avons recherché le(s) site(s) d'intégration de l'ADN d'AAV-2 dans les cellules HA16, cellules HeLa infectées de façon latente par AAV-2. Les premières expériences réalisées par FISH sur ces cellules indiquaient une intégration du génome viral dans une séquence du chromosome 17 (Walz et Schlehofer, 1992). La caractérisation moléculaire des sites d'intégration nous a permis de montrer que l'ADN d'AAV-2 était, en réalité, intégré dans la séquence AAVSI et dans un élément transposable de type L1. En fait, de multiples remaniements chromosomiques impliquant des séquences du chromosome 19 existent dans les cellules HA16 et qui peuvent rendre compte d'une certaine dynamique soit de la zone chromosomique d'intégration, soit de l'intégration d'AAV-2 elle-même.

# **INTRODUCTION**

# I PROPRIETES GENERALES DES PARVOVIRUS

## A Isolement

A la fin des années 50, cherchant à isoler chez le rat un virus responsable du sarcome du foie, Kilham et Olivier observèrent la réplication d'un petit virus. Ce virus, baptisé d'abord RV (pour Rat Virus) puis plus tard Kilham Rat Virus (KRV) possède un fort pouvoir agglutinant (Kilham et Olivier, 1959). Au cours des années suivantes, plusieurs équipes découvrirent des virus apparentés isolés de tumeurs de rats (Lum et Schreiner, 1963; El Dadah *et al.*, 1967) et Helen Toolan dans l'équipe d'Alice Moore mettait en évidence l'existence d'un virus, appelé H-1PV, responsable de diverses malformations (nanisme, microcéphalie) (Toolan, 1960).

A la même époque d'autres virus, isolés en tant que contaminants de stocks d'adénovirus, furent tout d'abord considérés comme précurseurs ou produits de dégradation de ces virus (Mayor *et al.*, 1965), puis identifiés comme des virus distincts nécessitant la coinfection par un adénovirus pour leur réplication, d'où leur dénomination de virus adéno-associés (Hoggan *et al.*, 1966).

Les parvovirus, découverts initialement dans des tissus tumoraux ou des stocks de virus transformants, ont toujours été étroitement associés au cancer. Cependant, ils ne sont pas impliqués dans la dérégulation des cellules tumorales mais trouvent dans ces cellules des facteurs nécessaires au déroulement de leur cycle répliatif.

## B Taxonomie

La famille des *Parvoviridae* fait partie des plus petits virus à ADN connus et regroupe des virus apparentés par leur structure et l'organisation de leur génome. Le virion, d'un diamètre de 18 à 26 nm, contient une molécule d'ADN simple brin linéaire d'environ 5 kb, entourée d'une capsidie icosaédrique (Murphy *et al.*, 1994a).

Initialement, les *Parvoviridae* ont été classés en 3 genres: les Parvovirus Autonomes, les Dépendovirus et les Densovirus (Siegl *et al.*, 1985). Récemment, une nouvelle classification, créant un genre à part entière pour le Parvovirus B19V, a été proposée puis adoptée en 1994 par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) (Murphy *et al.*, 1994a). Cette classification distingue 2 sous-familles, les *Densovirinae* et les *Parvovirinae*, chaque sous-famille étant elle-même divisée en 3 genres (tableau 1). Les propriétés suivantes ont permis l'affectation d'un virus à un genre donné (tableau 2):

- hôte naturel (Vertébré ou Invertébré),
- mode de réplication, nécessitant ou non l'intervention de virus auxiliaires,
- intégration du virus dans l'ADN génomique,

| Acronyme                         | Nom complet   | Source et date du 1er isolement                       |
|----------------------------------|---|---|
| <b>Sous-famille Parvovirinae</b> |   |   |
| <b>Genre Parvovirus</b>          |   |   |
| AMDV                             | Aleutian mink disease virus<br>(Aleutian disease virus) | Tissus de vison (1973)                                |
| BPV                              | Bovine parvovirus                                       | Fèces de veau (1961)                                  |
| CPV                              | Canine parvovirus                                       | Fèces de chien (1979)                                 |
| ChPV                             | Chicken parvovirus                                      |   |
| FPV                              | Feline panleukopenia virus<br>Feline virus              | Rate de léopard (1965)                                |
| GPV                              | Goose parvovirus  | Tissus d'oie (1973)                                   |
| HBPV                             | HB parvovirus   | Tumeur et placenta humains (1964)                     |
| H-1PV                            | H-1 parvovirus  | Tumeur humaine transplantée HEP-1 (1960)              |
| KRV                              | Kilham rat virus<br>(Rat virus, RV)                     | Sarcome de foie de rat (1959)                         |
| LPV                              | Lapine parvovirus                                       | Fèces de lapin (1977)                                 |
| LUIIIIV                          | LUIII virus   | Lignée établie de cellules humaines Lu106 (1971)      |
| MEV                              | Mink enteritis virus                                    | Rate et foie de vison (1952)                          |
| MMV                              | Mice minute virus                                       | Stock d'adénovirus de souris (1966)                   |
| PPV                              | Porcine parvovirus                                      | Stock de virus cholériques de porc (1966)             |
| RPV                              | Raccoon parvovirus                                      |   |
| RTPV                             | RT parvovirus   | Lignées établies de cellules de rat AT (1967)         |
| TVX                              | Tumor virus X   | Lignées établies de cellules tumorales (1971)         |
| <b>Membres possibles</b>         |   |   |
| RAV-1                            | Rheumatoid arthritis virus                              | Synovies humaines (1984)                              |
| <b>Genre Erythrovirus</b>        |   |   |
| B19V                             | B19 virus   | Sérum de donneurs asymptomatiques (1975)              |
| <b>Genre Dependovirus</b>        |   |   |
| AAV-1                            | Adeno-associated virus 1                                | Stock de virus simien 15 (macaque rhésus) (1965)      |
| AAV-2                            | Adeno-associated virus 2                                | Stock d'adénovirus 12 humain (souche HM) (1966)       |
| AAV-3                            | Adeno-associated virus 3                                | Stock d'adénovirus 7 humain (souche HK,T) (1966)      |
| AAV-4                            | Adeno-associated virus 4                                | Stock de virus simien 15 (singe vert africain) (1967) |
| AAV-5                            | Adeno-associated virus 5                                | Lésion condylomateuse péniennne humaine (1984)        |
| AAAV                             | Avian adeno-associated virus                            | Stock de virus bronchique de caille (1967)            |
| BAAV                             | Bovine adeno-associated virus                           | Stock d'adénovirus bovin 1 (1970)                     |
| CAAV                             | Canine adeno-associated virus                           | Stock de virus hépatique canin (1969)                 |
| EAV                              | Equine adeno-associated virus                           |   |
| OAAV                             | Ovine adeno-associated virus                            | Fèces de mouton (1979)                                |
| <b>Sous-famille Densovirinae</b> |   |   |
| <b>Genre Densovirus</b>          |   |   |
| GmDENV                           | Galleria mellonella densovirus                          | Chenille de Galleria mellonella (1964)                |
| JcDENV                           | Junonia coenia densovirus                               | Chenille de Junonia coenia (1972)                     |
| <b>Genre Iteravirus</b>          |   |   |
| BmDV                             | Bombyx mori densovirus                                  |   |
| <b>Genre Contravirus</b>         |   |   |
| AaDENV                           | Aedes aegypti densovirus                                |   |
| AiDENV                           | Aedes albopictus densovirus                             |   |
| <b>Membres possibles</b>         |   |   |
| AdDENV                           | Acheta domestica densovirus                             |   |
| ApDENV                           | Aedes pseudoscutellaris densovirus                      |   |
| AvDENV                           | Agraulis vanillae densovirus                            |   |
| CeDENV                           | Casphalia extranea densovirus                           |   |
| DsDENV                           | Diatraea saccharalis densovirus                         |   |
| EaDENV                           | Euxoa auxiliaris densovirus                             |   |
| LdDENV                           | Leucorrhinia dubia densovirus                           |   |
| LjDENV                           | Lymantria dubia densovirus                              |   |
| PfDENV                           | Periplaneta fuliginosa densovirus                       |   |
| PrDENV                           | Pieris rapae densovirus                                 |   |
| PiDENV                           | Pseudaletia includens densovirus                        |   |
| SfDENV                           | Sibine fusca densovirus                                 |   |
| SvDENV                           | Simulium vittatum densovirus                            |   |

**Tableau 1:** Classification et origines des membres de la famille des Parvoviridae, (Murphy *et al.*, 1994).

| famille                           | Parvoviridae   |                                |                                |                                |                                |                                |
|-----------------------------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| sous-famille                      | Parvovirinae   |                                |                                | Densovirinae                   |                                |                                |
| genre                             | Parvovirus     | Dependovirus                   | Erythrovirus                   | Densovirus                     | Iteravirus                     | Contravirus                    |
| hôte naturel                      | Vertébrés      | Vertébrés                      | Vertébrés                      | Invertébrés                    | Invertébrés                    | Invertébrés                    |
| polarité du brin encapsidé        | négatif (100%) | négatif (50%)<br>positif (50%) | négatif (50%)<br>positif (50%) | négatif (50%)<br>positif (50%) | négatif (50%)<br>positif (50%) | négatif (85%)<br>positif (15%) |
| ITR                               | différents     | identiques                     | identiques                     | identiques                     | identiques                     | différents                     |
| réplication avec virus auxiliaire | non            | oui                            | non                            | non                            | non                            | non                            |

**Tableau 2:** Caractéristiques des genres de la famille des Parvoviridae.  
(d'après Murphy *et al.*, 1994)

- homologie de séquence,
- polarité du brin encapsidé,
- pourcentage d'identité des extrémités virales.

Les *Parvovirinae* infectent uniquement les Vertébrés et ont été fréquemment isolés en association avec d'autres virus. Cette sous-famille comporte 3 genres:

- Les **Dépendovirus**, ou Virus Adéno-Associés (AAV), sont défectifs pour leur propre réplication. Des conditions de stress génotoxiques (Yalkinoglu *et al.*, 1988) ou l'intervention de virus auxiliaires sont un prérequis pour la réalisation de leur cycle réplcatif. Ces virus auxiliaires peuvent être l'adénovirus de type 2 (Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Myers *et al.*, 1980), les herpès virus HSVI, HSVII (Salo et Mayor, 1979; Buller *et al.*, 1981) ou HHV-6 (Thomson *et al.*, 1994), le cytomégalovirus (McPherson *et al.*, 1985), le virus de la vaccine (Schlehofer *et al.*, 1986) ou le papillomavirus humain de type 16 (Walz *et al.*, 1997a).

- Les **Parvovirus**, parfois qualifiés d'autonomes, n'exigent pas la présence de virus auxiliaire pour leur réplication, mais sont très dépendants de l'état de différenciation cellulaire et de certaines phases du cycle cellulaire (Cotmore et Tattersall, 1987).

Le parvovirus GPV a été classé comme un membre du genre Parvovirus car il ne nécessite pas la présence d'un virus auxiliaire pour sa réplication. Cependant, les protéines virales de GPV possèdent la plus forte homologie en acides aminés avec celles du parvovirus AAV-2 (Brown *et al.*, 1995; Zadori *et al.*, 1995).

- Les **Erythrovirus**, ne comprenant actuellement que le parvovirus humain B19V, infectent essentiellement les précurseurs érythrocytaires, d'où leur dénomination (Ozawa *et al.*, 1987). Ils possèdent à la fois des propriétés des genres Dépendovirus et Parvovirus. Récemment, Brown et collaborateurs (Brown *et al.*, 1995) ont isolé un parvovirus simien dont la séquence nucléotidique présente plus de 50% d'homologie avec l'ADN du parvovirus B19V. Le tropisme de ce virus pour les précurseurs érythroïdes et les critères d'homologie de séquence devraient permettre de le classer comme le second membre du genre Erythrovirus.

Les *Densovirinae* infectent uniquement les arthropodes. Ces virus sont autonomes pour leur réplication et encapsident indifféremment des molécules d'ADN de polarité positive ou négative. Ils possèdent une forte affinité pour l'éosine et provoquent une hypertrophie des noyaux des cellules infectées (Kawase *et al.*, 1990). Des virus apparentés ont également été détectés chez certains crustacés, comme le crabe ou la crevette (Murphy *et al.*, 1994a).

## C Caractéristiques physico-chimiques

Tous les membres de la famille des *Parvovirinae* ont en commun les propriétés physico-chimiques suivantes (Murphy *et al.*, 1994a):

- La particule virale renferme une molécule d'ADN monocaténaire linéaire d'environ 5 kb. Cette particule, d'un diamètre de 18 à 26 nm, est composée pour la plupart des parvovirus de 3 protéines de capsid (VP1, VP2, VP3), le parvovirus B19V faisant exception à cette règle avec seulement 2 protéines de capsid (VP1 et VP2) (Murphy *et al.*, 1994a).

- La particule virale possède un poids moléculaire de 5,5 à 6,2  $10^6$  Daltons, composée pour moitié de protéines et d'ADN. La valeur élevée du rapport ADN/protéine a comme conséquence une densité apparente élevée des particules virales en gradient de chlorure de césium. La densité apparente des particules virales varie de 1,39 à 1,42g/cm<sup>3</sup> pour les particules infectieuses, de 1,3 à 1,32 pour les particules ne renfermant aucune séquence génomique et de 1,35 à 1,37 pour les particules comportant des délétions génomiques internes (Mayor et Melnick, 1966; Laughlin *et al.*, 1979).

- La quasi totalité des membres du genre Parvovirus encapsident exclusivement des molécules d'ADN de polarité négative (Astell, 1990) alors que les capsides des membres des genres Dependovirus, Densovirus et Erythrovirus contiennent indifféremment des molécules d'ADN de l'une ou l'autre polarité (Mayor *et al.*, 1969; Cotmore et Tattersall, 1984). Par convention, le brin de polarité négative est représenté avec l'extrémité 3' à gauche.

- Les particules virales sont dépourvues d'ARNs, d'hydrates de carbone, de lipides et de protéines de type Histone (Murphy *et al.*, 1994a).

- L'extrême simplicité des parvovirus semble être responsable de leur résistance vis à vis de nombreux agents. En effet, ils sont stables en présence de solvants lipidiques, à une température de 56°C pendant au moins 30 mn et dans une gamme de pH variant de 3 à 9. Leur inactivation peut être obtenue en présence de formaline, de  $\beta$ propiolactone, d'hydroxylamine ou d'agents oxydants (Murphy *et al.*, 1994a).

## D Spectre d'hôte

Les parvovirus ont été isolés chez un grand nombre d'espèces animales. Bien que les mammifères constituent la majorité des espèces infectées, quelques parvovirus aviaires ont été également caractérisés. Les érythrovirus et la majorité des parvovirus autonomes (B19V, BPV, PPV, LPV) ont un spectre d'hôte assez restreint et n'infectent qu'une seule espèce. Néanmoins, des changements naturels d'hôte ont été décrits. Les virus CPV (canin) et MEV (vison) sont des variants d'un même virus félin FPV, et provoquent des pathologies semblables sur de très jeunes animaux (panleucopénie, entérite). D'autre part, suite à l'injection d'une tumeur d'origine humaine chez des rats de laboratoire, le parvovirus H-1PV avait été décrit initialement comme virus humain (Toolan, 1968). Cependant, 80% des rats sauvages ont développé une séropositivité pour H-1PV (Kilham et Margolis, 1969). Ces observations soulèvent la question de savoir laquelle de ces 2 espèces (l'homme ou le rat) est l'hôte naturel de H-1PV.

*In vitro*, la plupart des parvovirus autonomes ne se répliquent efficacement que dans des cellules provenant de leur hôte d'origine. Cependant, le parvovirus porcin PPV a pu être amplifié sur des cellules humaines. Les dépendovirus, quant à eux, sont capables d'infecter *in vitro* des lignées cellulaires de diverses espèces et ne semblent donc pas avoir de spécificité d'hôte intrinsèque. Leur réplication ne dépend que de la présence du virus auxiliaire possédant ou non une spécificité d'hôte pour cette espèce (Cukor *et al.*, 1983), ce qui rend difficile l'identification d'un hôte précis.

## E Pathogénicité

Les parvovirus ne se répliquent que dans des cellules à haute activité mitotique. Ainsi, la majorité des pathologies, associées à la présence de ces virus, concernent des tissus en cours de prolifération active, avec une prédisposition pour des tissus d'origine embryonnaire ou foetale (tableau 3). La capacité des parvovirus à traverser la barrière placentaire et à infecter l'embryon *in utero* se solde généralement par la mort de l'embryon avec une résorption des tissus foetaux. Les effets les plus dramatiques semblent avoir lieu essentiellement au cours des stades précoces de l'embryogenèse. En effet, l'infection à un stade plus tardif de la gestation peut être compatible avec une survie de l'embryon, mais s'accompagne tout de même de graves lésions cranio-faciales, d'hypoplasie cérébelleuse, d'entérite ou d'hépatite (Toolan, 1960; Siegl, 1984). La plupart des tissus sensibles à l'infection parvovirale durant le stade embryonnaire ou néo-natal deviennent résistants chez l'adulte, à l'exception du tissu épithélial de l'intestin (CPV, FPV et MPV induisent des entérites aiguës) (Pollock et Carmichael, 1990; Porter et Larsen, 1990; Scott, 1990) et des

| Acronyme | Hôte    | Pathologie  |
|----------|---------|---|
| FPV      | Chat    | panleucopénie<br>hypoplasie cérébelleuse<br>entérite  |
| CPV      | Chien   | myocardite<br>panleucopénie<br>entérite<br>résorption foetale   |
| MEV      | Vison   | entérite  |
| AMDV     | Vison   | insuffisance rénale<br>glomérulonéphrite  |
| PPV      | Cochon  | dermatose<br>entérite<br>avortements (occasionnel)<br>mort foetale  |
| GPV      | Oie     | retard de croissance<br>mort foetale<br>myocardite  |
| H-1PV    | Hamster | hypoplasie cérébelleuse<br>faciès "mongoloïd like"<br>lésions craniofaciales<br>périodontales<br>mort foetale<br>résorption foetale           |
| RKV      | Rat     | hypoplasie cérébelleuse<br>mort foetale   |
| MMV      | Souris  | hypoplasie cérébelleuse<br>mort foetale   |
| BPV      | Boeuf   | entérite<br>affections respiratoires  |
| B19V     | Homme   | oedème foetal<br>anémie foetale<br>avortements spontanés<br>exanthème infectieux<br>(ou 5ème maladie de l'enfant)<br>érythroblastopénie aigüe |

**Tableau 3:** Pathologies associées aux Parvovirus

lignées souches hématopoïétiques (B19V) (Tijssen *et al.*, 1990). Néanmoins, une réactivation virale peut être induite dans certains tissus ayant un comportement prolifératif anormal. Par exemple, des rats ayant subi une hépatectomie partielle peuvent déclarer une hépatite suite à une infection par le parvovirus H-1PV. Par ailleurs, l'infection de cellules tumorales, cellules à haute activité mitotique, peut se solder par une régression, voire même une disparition totale, du phénotype tumoral (Rommelaere et Tattersall, 1990).

En règle générale, si la prolifération est un prérequis à l'accomplissement du cycle parvoviral, le niveau de différenciation cellulaire semble également être un facteur déterminant. En effet, la plupart des tissus prolifératifs chez l'adulte sont résistants à l'infection parvovirale, alors que des cellules souches de tératocarcinome, résistantes à une infection par MMV ne deviennent sensibles à l'effet lytique de ce virus qu'après différenciation en cellules fibroblastiques (Cotmore et Tattersall, 1987).

De plus, le parvovirus AAV-2 semble perturber le développement embryonnaire de la souris (Botquin *et al.*, 1994). En effet, la microinjection de l'ADN d'AAV-2 dans des oeufs entraîne un arrêt du développement embryonnaire au stade morula. Par ailleurs, l'infection de souris gestantes par AAV-2 a des conséquences dramatiques sur l'embryogenèse et conduit à la mort du fœtus. Enfin, des séquences virales ont été détectées dans des biopsies humaines de tissus utérins et dans du matériel provenant d'avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994). Le parvovirus AAV-2 pourrait donc être impliqué dans ces pathologies. Cependant, à l'heure actuelle, aucune relation directe n'a été établie entre la présence de séquences d'AAV-2 dans ces tissus et l'induction d'avortements spontanés.

Les parvovirus représentent donc une menace réelle pour l'embryon et le nouveau-né, mais apparaissent le plus souvent inoffensifs pour l'organisme adulte.

## II BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PARVOVIRUS

### A Organisation génomique

Tous les parvovirus présentent la même organisation génomique. Nous nous intéresserons plus particulièrement au parvovirus humain AAV-2, qui a fait l'objet de cette étude.

Le génome d'AAV-2 est une molécule d'ADN simple brin linéaire de 4680 pb (Srivastava *et al.*, 1983) qui contient aux extrémités 5' et 3' des séquences répétées inversées. La moitié gauche du génome (par convention, l'extrémité 3'OH du brin viral) porte les séquences codant les protéines non structurales, alors que la moitié droite (5'P) contient les séquences codant les protéines de capsid (figure 1).

#### 1 Les extrémités virales

Le génome d'AAV-2 présente, au niveau des extrémités virales, des séquences répétées inversées de 145 nucléotides, appelées **ITR** (Inverted Terminal Repeats) (Berns et Kelly, 1974; Lusby *et al.*, 1980) (figure 1). Ces séquences sont strictement identiques en 5' et 3'. On pourra cependant remarquer que, suivant les isolats, les 2 premiers nucléotides sont présents ou absents. En effet, 35% des virions possèdent la séquence terminale 5'TTG, 50% la séquence 5'TG et 15% la séquence 5'G (Fife *et al.*, 1977). La raison de cette hétérogénéité terminale n'a pas encore été élucidée.

Les 125 premiers nucléotides de l'extrémité virale forment une séquence palindromique pouvant établir une structure secondaire en épingle à cheveux (figure 2). Cette séquence peut être caractérisée plus précisément comme 2 petits palindromes internes (séquences BB'-CC' de nt 42 à 84) encadrés par une séquence palindromique plus grande (séquence AA' de nt 1 à 41 et 85 à 125); dans cette configuration, seules 7 paires de bases demeurent non appariées. Les 20 derniers nucléotides de l'extrémité virale forment un domaine, appelé séquence D (nt 126 à 145), et ne sont pas impliqués dans la formation de l'épingle à cheveux.

Les extrémités virales peuvent adopter 2 configurations différentes, dites "**flip**" et "**flop**" (figure 2), isolées avec la même fréquence dans les particules virales, et correspondant à une inversion de la structure primaire des fragments B et C. Par ailleurs, l'orientation d'une extrémité n'influe pas sur celle de l'autre extrémité (Lusby *et al.*, 1981). La présence des configurations "flip" et "flop" peut être expliquée par le mode de réplication du virus, dit de déplacement de brin.

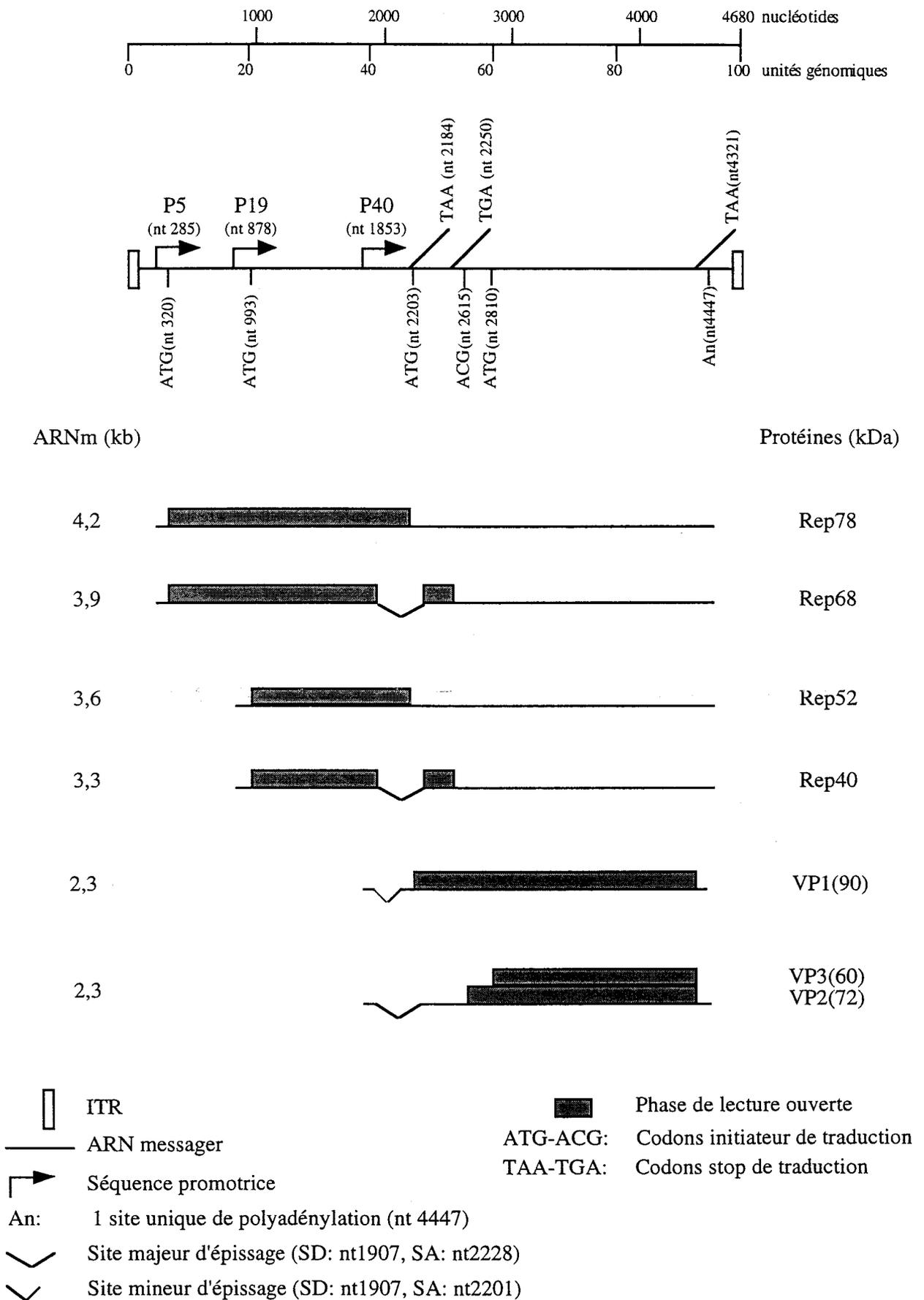


Figure 1: Organisation génomique d'AAV-2



Les extrémités virales jouent un rôle crucial pour l'initiation de la réplication du virus, elles sont également requises pour l'intégration ciblée d'AAV-2 dans l'ADN cellulaire et pour l'excision du provirus (Weitzman *et al.*, 1994). Elles semblent également pouvoir jouer un rôle comme modulateur de la transcription (Flotte *et al.*, 1993a).

## 2 Organisation des unités de transcription

Le génome d'AAV2 contient des unités de transcription chevauchantes conduisant à la synthèse de 3 familles d'ARNm. Trois promoteurs p5, p19 et p40 ont été localisés respectivement aux nucléotides 285, 878 et 1853 (Green et Roeder, 1980b; Lusby et Berns, 1982). Lors du dernier congrès sur les parvovirus, un quatrième promoteur, appelé p81, aurait été identifié (Hermonat *et al.*, 1997c).

L'organisation génomique d'AAV-2 est présentée dans la figure 1.

Les deux promoteurs p5 et p19 dirigent chacun la transcription d'un ARNm ayant comme tailles respectives 4,2 et 3,6 kb. Chaque ARN peut subir un épissage alternatif, conduisant ainsi à la synthèse des ARNm de 3,9 et 3,3 kb (Laughlin *et al.*, 1979; Green et Roeder, 1980a). Le site d'épissage, identique pour ces 2 ARNm, implique un site donneur et un site accepteur localisés respectivement aux nucléotides 1907 et 2228. Un signal de polyadénylation unique, utilisé par tous les ARNm viraux, a été localisé au nucléotide 4447 (Laughlin *et al.*, 1979).

Le promoteur p40 dirige l'expression d'un ARNm précurseur de 2,6 kb pouvant également subir un épissage alternatif différentiel (Green et Roeder, 1980b; Jay *et al.*, 1981; Janik *et al.*, 1984). En présence d'adénovirus, la quasi totalité de l'ARNm précurseur (86%) subit un épissage utilisant le site donneur 1907 et le site accepteur 2228, et conduit ainsi à la synthèse d'un ARNm de 2,3 kb (Trempe et Carter, 1988). Une minorité des ARNm précurseurs subissent un épissage alternatif utilisant le site donneur 1907 en association avec un second site accepteur localisé en position 2201 (Trempe et Carter, 1988), et conduisant également à la synthèse d'un ARNm de 2,3 kb.

Au cours d'une infection productive, seuls les ARNm non épissés (4,2 kb, 3,6 kb et 2,6 kb) et l'ARNm de 2,3 kb ont été isolés dans les noyaux de cellules coinfectées par AAV-2 et Ad2 (Carter, 1990). Cependant, tous les ARNm viraux ont été détectés, par "Northern Blot" et fractionnement cellulaire, dans le cytoplasme de ces cellules.

Les ARNm de 4,2 kb, 3,9 kb, 3,6kb et 3,3 kb sont traduits respectivement en protéines Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 (Mendelson *et al.*, 1986; Trempe *et al.*, 1987) qui possèdent des séquences chevauchantes en position N terminale. En effet, les protéines Rep sont traduites dans la même phase ouverte de lecture. De plus, les protéines Rep78 et Rep52 utilisent le même codon de terminaison de la traduction (localisé en position 2184), alors que les protéines Rep68 et Rep40 sont toutes les 2 terminées au nucléotide 2250. Par ailleurs, les épissages alternatifs, utilisant les mêmes sites donneurs (nt 1907) et accepteurs (nt 2228), n'entraînent aucun changement dans le cadre de lecture ouverte (Green et Roeder, 1980b). La plupart des mutations non-sens trouvées dans cette phase ouverte de lecture inhibent la réplication du virus, ainsi les gènes contenus dans la moitié gauche du génome d'AAV2 ont été baptisés gènes *rep* (Hermonat *et al.*, 1984a; Tratschin *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1992).

La protéine VP1 est produite à partir de l'ARNm minoritaire de 2,3 kb. Cette protéine de 85kDa est initiée à partir du codon AUG-2203, devenu accessible grâce à l'utilisation du second site accepteur d'épissage (Cassinotti *et al.*, 1988). L'ARNm majoritaire de 2,3 kb est traduit en protéines VP2 et VP3, ayant respectivement comme poids moléculaire apparent 70 et 65 kDa (Rose *et al.*, 1971; Buller et Rose, 1978; Janik *et al.*, 1984). La protéine VP3 est synthétisée efficacement à partir du codon initiateur AUG-2810, alors que la protéine VP2 est produite avec une faible efficacité à partir d'un codon ACG, localisé au nucléotide 2615 (Becerra *et al.*, 1988). Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont traduites dans la même phase ouverte de lecture et utilisent le même codon de terminaison de la traduction (nt 4321) (Johnson *et al.*, 1977; Lubeck *et al.*, 1979). Ainsi la séquence de la protéine VP3 est entièrement contenue dans celle de la protéine VP2 qui est elle-même contenue dans celle de la protéine VP1. Le rapport quantitatif entre les protéines VP2 et VP3 est régulé par le codon initiateur de la protéine VP2. En effet, la mutation de ce codon en méthionine (AUG) entraîne une augmentation de la synthèse de la protéine VP2 ainsi que l'abolition de la production de la protéine VP3 (Muralidhar *et al.*, 1994).

L'accumulation relative des différents ARNm ainsi que l'utilisation inhabituelle d'un codon initiateur de la traduction (ACG) conduisent à la synthèse des protéines VP1, VP2 et VP3 en quantité relative 1:1:10, proportion retrouvée dans la particule virale mature.

Toutes les protéines d'AAV-2 ont été localisées dans des noyaux de cellules coinfectées par AAV-2 et Ad2, suggérant ainsi l'existence d'un signal de localisation nucléaire. En effet, un tel signal a été identifié pour toutes les protéines Rep entre les acides aminés 485 et 510 (Hörer *et al.*, 1995). Pour l'instant, aucun signal de localisation nucléaire n'a été identifié dans les protéines de capsid.

La distribution spatiale des protéines parvovirales varie au cours du temps (Wistuba *et al.*, 1997). En effet, au cours des stades précoces d'une infection (10-14 heures p.i.), les 4 protéines

Rep ont été détectées, par double immunofluorescence, dans les noyaux des cellules infectées et forment des foyers répartis de façon homogène. Par immunofluorescence et hybridation *in situ*, il a également été possible de colocaliser les protéines Rep et l'ADN viral dans ces foyers qui représentent probablement des centres de réplication. Quant aux protéines de capsid, leur localisation a été détectée dans le cytoplasme et dans le nucléoplasme.

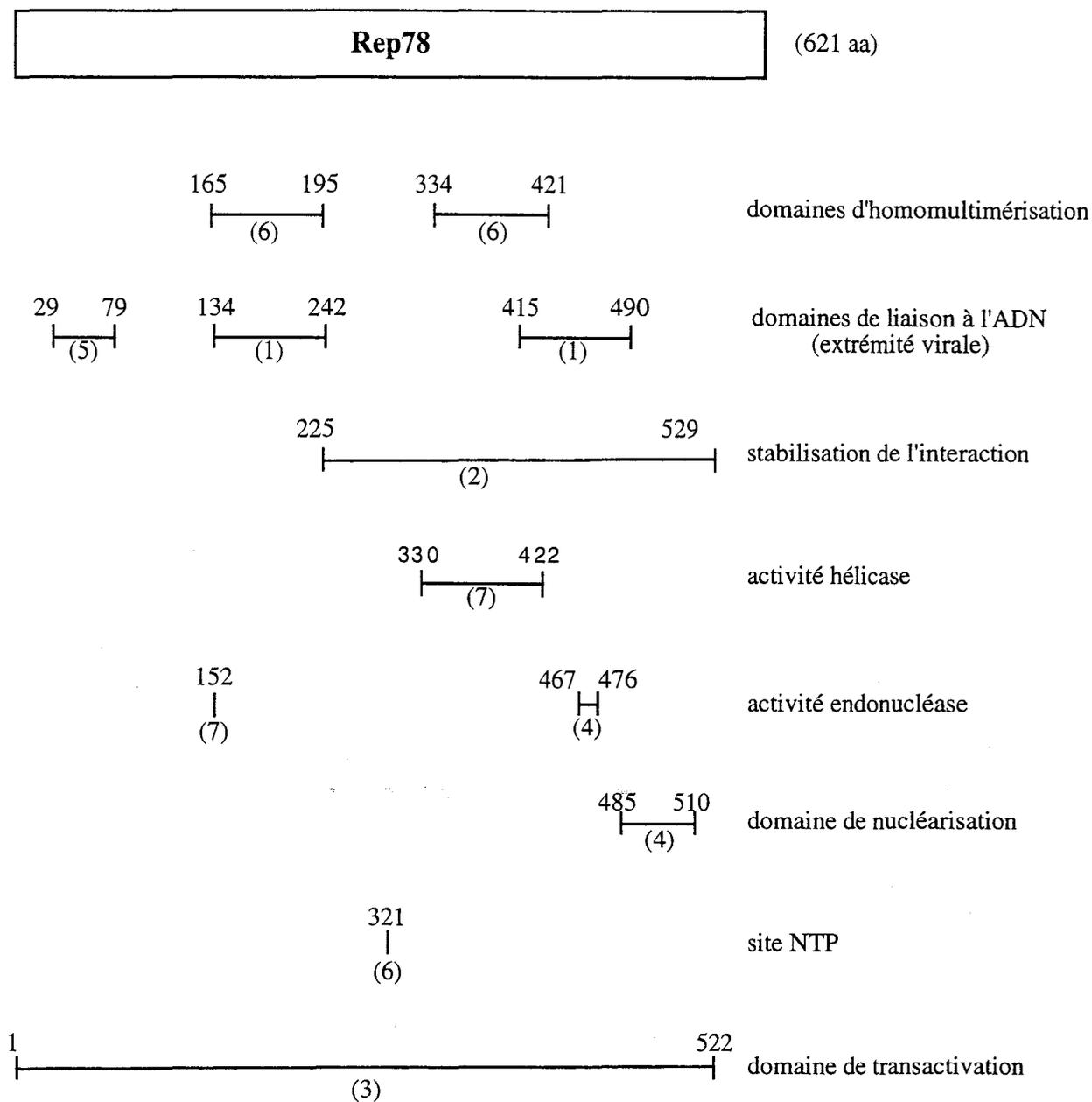
A un stade plus tardif de l'infection (18 heures p.i.), les protéines de capsid migrent alors dans le nucléole, tandis que les protéines Rep demeurent dans le nucléoplasme. Puis quelques heures plus tard (20-24 heures p.i.), les protéines VP migrent dans le nucléoplasme et s'associent alors aux protéines Rep pour former des foyers très denses. Cependant, à ce stade, des protéines de capsid en faible quantité peuvent encore être détectées dans le nucléole, puis ce dernier commence à se désaggréger soit par augmentation de sa taille, soit par fragmentation. A un stade plus tardif (24-30 heures p.i.), les protéines Rep se concentrent alors en foyers localisés essentiellement à la périphérie de la membrane nucléaire tandis que les protéines VP migrent vers le cytoplasme. Il n'existe alors plus aucune colocalisation des protéines Rep et VP.

### 3 Protéines virales

Les **protéines Rep** sont des protéines **multifonctionnelles**, impliquées dans toutes les étapes du cycle viral. Seules des études génétiques et biochimiques ont permis de déterminer la ou les fonction(s) de chacune de ces protéines. Toutes les fonctions de ces protéines seront détaillées ultérieurement.

Il a été clairement établi que les protéines Rep78 et 68 jouent un rôle crucial pour l'initiation de la réplication (Hermonat *et al.*, 1984a; Hermonat, 1989; Hong *et al.*, 1992; Chiorini *et al.*, 1994a; Ni *et al.*, 1994), et sont douées d'activité endonucléasique, hélicase et ATPasique (Im et Muzyczka, 1990). Elles possèdent également une capacité de liaison à l'ADN viral et cellulaire et interagissent spécifiquement avec un motif présent au niveau des extrémités virales (McCarty *et al.*, 1994a; Weitzman *et al.*, 1994), tout comme avec une séquence cellulaire appelée AAVSI (Weitzman *et al.*, 1994; Wonderling et Owens, 1997a). Ces protéines virales sont capables de médier la formation d'un complexe entre la séquence AAVSI et les extrémités virales permettant ainsi l'intégration ciblée du génome viral dans l'ADN cellulaire (Weitzman *et al.*, 1994). L'excision de l'ADN viral semble également faire intervenir ces mêmes protéines Rep. L'ensemble des fonctions des protéines Rep78 est présenté dans la figure 3.

Les protéines Rep78 et 68 interagissent avec les 3 promoteurs viraux (Wonderling et Owens, 1997a) et régulent ainsi leur transcription (Labow *et al.*, 1986; Beaton *et al.*, 1989; Kyöstiö *et al.*, 1994). Elles sont également capables de moduler la transcription à partir de certains promoteurs hétérologues ainsi que la transformation induite par certains virus oncogéniques (Labow *et al.*, 1987; Hermonat, 1989; 1991; 1992; Khleif *et al.*, 1991).



**références**

- |                                   |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| (1): McCarty <i>et al.</i> , 1992 | (4): Hörer <i>et al.</i> , 1995    |
| (2): Owens <i>et al.</i> , 1993   | (5): Weitzman <i>et al.</i> , 1996 |
| (3): Kyöstiö <i>et al.</i> , 1994 | (6): Smith <i>et al.</i> , 1997    |
|                                   | (7): Walker <i>et al.</i> , 1997   |

**Figure 3:** Domaines fonctionnels des protéines Rep78/68

Il a été particulièrement difficile d'attribuer des fonctions spécifiques aux protéines Rep 52 et Rep40 car la totalité de leur séquence en acides aminés est contenue dans les protéines Rep78 et Rep68. Cependant, la mutation du codon initiateur (AUG) des protéines Rep52 et Rep40 en glycine (GGG) a pour conséquence une diminution de l'accumulation de l'ADN simple brin et une réduction de la production de virus infectieux. Ces résultats suggèrent donc que ces protéines sont requises pour l'encapsidation (Chejanovsky et Carter, 1989). Ces 2 propriétés ont pu être partiellement restaurées après complémentation de ce mutant par un plasmide contenant les gènes *rep52* et *rep40* dans leur totalité. L'absence des protéines Rep52/40 mais aussi l'altération des protéines Rep78/68 (substitution de méthionine 225 en glycine) semblent être responsables de l'accumulation non productive de l'ADN simple brin.

Les protéines VP1, VP2 et VP3 entrent dans la constitution de la particule virale.

La structure tridimensionnelle, réalisée par cristallographie aux rayons X, sur les parvovirus canin (CPV) et félin (FPV), a permis de mettre en évidence une capsidie icosaédrique formée de 60 sous-unités protéiques (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995). Chaque sous-unité contient un motif central (formé par 8 feuillets  $\beta$  anti-parallèles), une protrusion, un canyon profond et une dépression (Chapman et Rossmann, 1993). Par analogie avec les rhinovirus, le canyon pourrait constituer le site d'attachement du récepteur viral (Rossmann et Palmenberg, 1988). Des données récentes de cristallographie sur AAV-2 suggèrent que les structures tridimensionnelles des parvovirus AAV-2 et CPV présentent de très grandes similitudes (Xie *et al.*, 1997).

Il a été également difficile d'attribuer une fonction spécifique à une protéine de capsidie donnée, du fait de l'existence de séquences chevauchantes dans la partie C terminale de ces 3 protéines. Cependant, la mutation ponctuelle du codon initiateur de la traduction d'une protéine de capsidie abolit la synthèse de cette protéine mais n'affecte en rien la production des 2 autres. Ainsi, l'absence d'une seule de ces protéines de capsidie empêche toute détection, par immunofluorescence, de particules virales, suggérant donc que les protéines VP1, VP2 et VP3 sont requises pour l'assemblage des virions. Par ailleurs, la mutation d'une seule de ces protéines de capsidie empêche également l'accumulation de l'ADN viral monocaténaire, alors que les formes répliquatives sont efficacement synthétisées (Smuda et Carter, 1991; Muralidhar *et al.*, 1994). Il semble donc que les protéines de capsidie VP1, VP2 et VP3 sont nécessaires pour le recrutement du génome viral dans la particule virale.

## B Le cycle viral

La première étape d'une infection virale passe tout d'abord par l'adsorption du virus à un récepteur membranaire (figure 4). Il a été récemment démontré qu'AAV-2 interagissait spécifiquement avec une protéine N-glycosylée de 150 kD, de nature encore inconnue (Mizukami *et al.*, 1996). Cette glycoprotéine est présente à la surface des lignées cellulaires permissives pour AAV-2 (cellules HeLa ou KB), mais semble absente des cellules mégacaryocytaires UT7/Epo et érythrocytaires, connues pour être réfractaires à toute infection par AAV-2 (Ponnazhagan *et al.*, 1994). La caractéristique d'AAV-2 de pouvoir infecter toute une panoplie de lignées cellulaires de diverses espèces semble être en faveur d'un récepteur ubiquiste. Par ailleurs, une glycoprotéine ubiquiste de 34 kDa de type héparane sulfate (HSP) interagit avec le virus AAV-2, et pourrait donc constituer un second récepteur membranaire pour AAV-2 (Summerford et Samulski, 1997).

Après endocytose, les particules virales sont transportées dans le noyau où l'ADN est alors décapsidé. En l'absence de tout virus auxiliaire, l'expression limitée des protéines régulatrices d'AAV-2 conduit à une intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire et à l'établissement d'un état de latence (Hoggan *et al.*, 1972; Cheung *et al.*, 1980). Ce parvovirus possède la propriété de pouvoir s'intégrer préférentiellement dans une séquence du génome humain localisée sur le bras long du chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1990; 1991; 1992; Samulski *et al.*, 1991; Samulski, 1993). La surinfection par un virus auxiliaire permet alors l'expression limitée des protéines parvovirales et conduit ainsi à l'excision puis à la réplication du génome viral. Finalement, les virions produits sont alors libérés et prêts à infecter de nouvelles cellules.

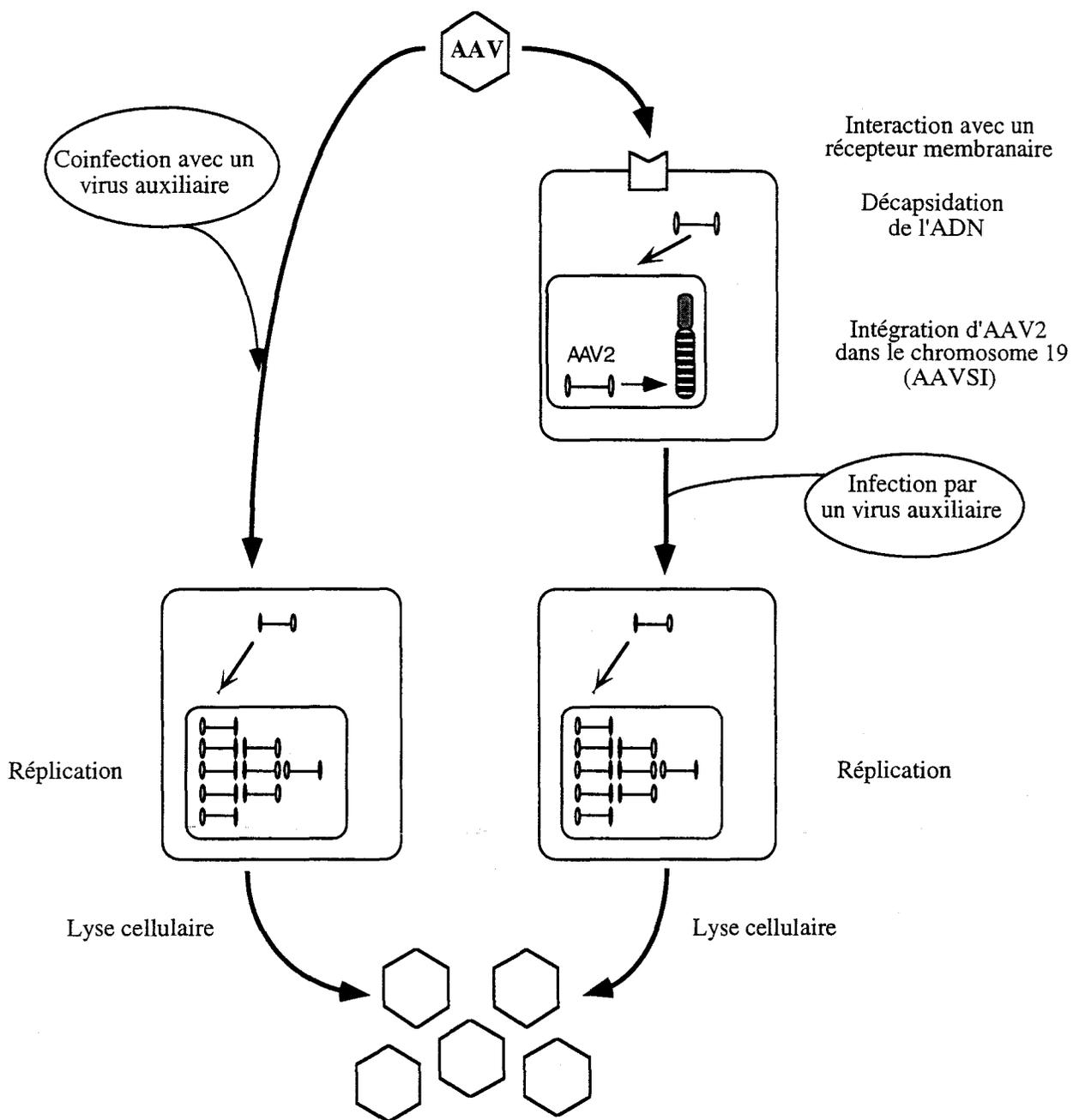
### 1 Infection productive

#### 1.1 Réplication de l'ADN

##### 1.1.1 Modèle

La **réplication** du génome d'AAV-2 fait intervenir un mécanisme dit de **déplacement de brin**. Ce modèle rend compte des différentes structures observées lors de la réplication virale (formes monocaténares, bicaténares et multimériques, orientations "flip" et "flop" des extrémités virales, organisation en tandem, tête-bêche ou queue à queue). Ce modèle peut être divisé en 4 étapes (Berns et Linden, 1995; Berns et Giraud, 1996) (figure 5).

Au cours de la 1<sup>ère</sup> étape, chaque extrémité virale peut adopter une structure secondaire en épingle à cheveux permettant ainsi la création d'une extrémité 3'OH appariée. Un modèle alternatif, proposant l'appariement des 2 extrémités virales par des liaisons hydrogènes (figure 5, en pointillé), permettrait d'expliquer le mécanisme par lequel l'ADN d'AAV-2 est capable de



**Figure 4:** Cycle viral d'AAV2,  
(Berns et Linden 1995)

réparer des mutations ou des délétions importantes de l'une des 2 extrémités pourvu que la seconde extrémité soit intacte (Samulski *et al.*, 1983; Senapathy *et al.*, 1984; Tratschin *et al.*, 1984).

Au cours de la 2<sup>ème</sup> étape, l'extrémité 3'OH sert d'amorce pour l'initiation de la synthèse du brin complémentaire conduisant à la formation de la forme répliquative monocaténaire ("RF"). Il semble que l'ADN polymérase  $\epsilon$  intervienne directement dans la synthèse de nouvelles molécules d'ADN, car l'utilisation d'aphidicoline (inhibiteur spécifique des ADN polymérases  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) ou d'analogues nucléiques (comme le *p-n*-butylphenyl dGTP ou le *p-n*-butylanilino dATP) bloque toute répllication parvovirale (Snyder *et al.*, 1990a; Ward *et al.*, 1994).

L'étape de **résolution terminale** (3<sup>ème</sup> étape) consiste à cliver les 2 extrémités virales au niveau du brin parental entre les nucléotides 124 et 125 (Im et Muzyczka, 1990; Snyder *et al.*, 1990b), ayant comme conséquence une inversion des séquences virales terminales conduisant ainsi à la formation des orientations "flip" et "flop" (Lusby *et al.*, 1980; 1981; Samulski *et al.*, 1982; Snyder *et al.*, 1990b). Ce site de coupure a été appelé **site trs** (terminal resolution site).

L'extrémité 3'OH alors libérée sert à son tour d'amorce et permet ainsi la réparation du brin parental par le déplacement du brin précédemment apparié (4<sup>ème</sup> étape).

La production de formes dimériques puis multimériques peut être obtenue si aucun clivage n'est effectué lors de l'étape de résolution terminale.

### 1.1.2 Régulation de la répllication

Afin de mieux comprendre les mécanismes biochimiques mis en jeu lors de la répllication d'AAV-2, un système de répllication *in vitro* a été développé. Ce système est basé sur l'utilisation de vecteurs infectieux contenant le génome d'AAV2 sous forme d'ADN double brin linéaire (Samulski *et al.*, 1982; Laughlin *et al.*, 1983). Il a alors été clairement établi que la répllication d'AAV-2 nécessite l'implication de 2 séquences parvovirales ainsi que la présence de protéines d'origine cellulaire et virale.

#### a) Séquence nucléotidique parvovirale requise

La séquence nucléotidique virale requise pour la répllication d'AAV-2 est constituée par les **séquences palindromiques** qui servent d'origine de répllication (Samulski *et al.*, 1983; Hong *et al.*, 1992). Les premières études de génétique ont démontré que ces extrémités devaient obligatoirement adopter une structure secondaire en épingle à cheveux afin d'interagir avec

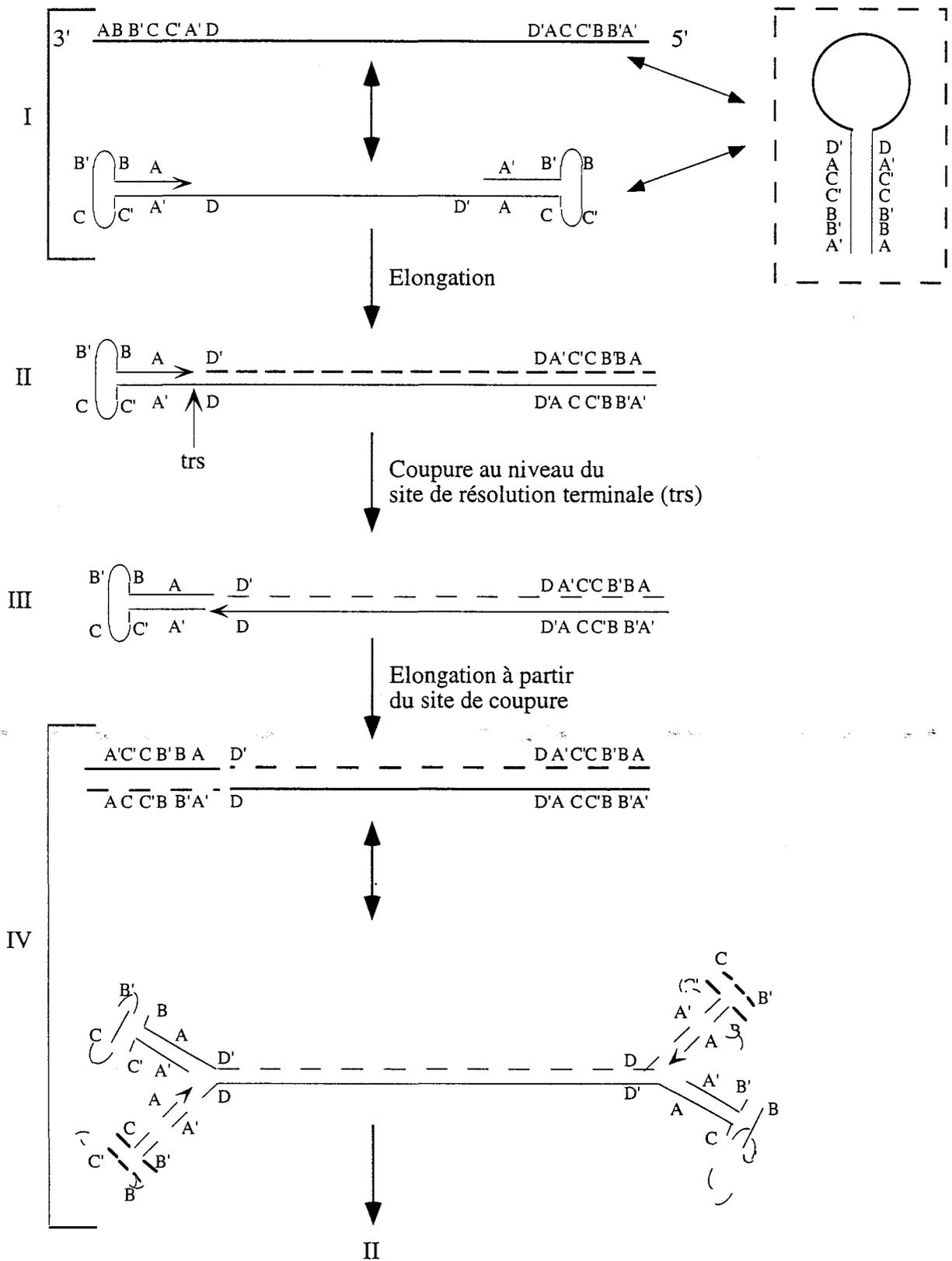


Figure 5: Modèle de la réplication d'AAV-2, (Berns et Linden, 1995)

différentes protéines pour initier toute réplication virale (LeFebvre *et al.*, 1984 Bohenzky *et al.*, 1988).

b) Protéines parvovirales et cellulaires requises

α) Protéines parvovirales

Les **protéines Rep** sont requises pour la réplication d'AAV-2. En effet, seuls des extraits protéiques de cellules HeLa infectées par Ad2 et supplémentées par une protéine recombinante Rep78/68 conduisent à la réplication efficace d'un vecteur infectieux (tableau 4) (Ni *et al.*, 1994; Ward et Berns, 1996). Cependant, d'autres travaux, réalisés par Ward et collaborateurs, ont montré une faible réplication du vecteur infectieux en présence d'extraits de cellules HeLa non infectées et supplémentées par les protéines Rep78/68 (Hong *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1994; Ward et Berns, 1995). Les séquences d'ADN virales amplifiées se sont révélées défectueuses et comportent des délétions génomiques importantes (Ward et Berns, 1996). De plus, dans ces conditions expérimentales, une même matrice d'ADN ne peut être utilisée plus d'une fois pour générer de nouvelles molécules virales (Ni *et al.*, 1994; Ward et Berns, 1996).

Ces résultats suggèrent donc que les protéines Rep sont nécessaires mais insuffisantes pour répliquer efficacement l'ADN viral. Il semblerait que des fonctions répliquatives supplémentaires soient apportées suite à une infection par Ad2. Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de cette différence observée entre des extraits de cellules infectées ou non par Ad2:

- présence d'un nouveau facteur cellulaire dans les extraits de cellules infectées par Ad2.
- présence, dans les cellules HeLa non infectées, d'un facteur inhibant la réplication d'AAV-2. Ce facteur est modifié et la réplication est alors libérée.
- modification post-traductionnelle de protéines cellulaires et/ou virales après infection par Ad2.

Cette dernière hypothèse semble être confirmée par Collaco et collaborateurs qui ont démontré récemment que la coinfection de cellules par AAV-2 et Ad2 entraîne une **phosphorylation des résidus sérine sur les 4 protéines Rep** (Collaco *et al.*, 1997). Or, il s'avère qu'une inhibition de la synthèse virale s'accompagne d'une diminution significative de l'état de phosphorylation des seules protéines Rep78/68. Il apparaît donc tout à fait probable que les protéines Rep78/68 soient phosphorylées suite à une infection par Ad2. Cet état de phosphorylation pourrait induire des changements conformationnels de ces protéines permettant ainsi une réplication efficace d'AAV-2.

Les protéines Rep 78/68 sont composées de multiples domaines fonctionnels impliqués dans différents aspects de la réplication d'AAV-2, ces domaines ont pu être caractérisés par l'analyse de mutations au sein des gènes *rep* (figure 3).

| Conditions expérimentales        | Réplication virale | Séquences virales amplifiées | Références                |
|----------------------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------|
| Ad <sup>-</sup> Rep <sup>-</sup> | —                  |                              | Ni <i>et al.</i> , 1994   |
| Ad <sup>+</sup> Rep <sup>-</sup> | —                  |                              |                           |
| Ad <sup>-</sup> Rep <sup>+</sup> | —                  |                              |                           |
| Ad <sup>+</sup> Rep <sup>+</sup> | + + +              | génomme complet              |                           |
| Ad <sup>-</sup> Rep <sup>-</sup> | —                  |                              | Ward <i>et al.</i> , 1996 |
| Ad <sup>+</sup> Rep <sup>-</sup> | —                  |                              |                           |
| Ad <sup>-</sup> Rep <sup>+</sup> | +                  | fragments génomique          |                           |
| Ad <sup>+</sup> Rep <sup>+</sup> | + + +              | génomme complet              |                           |

**Tableau 4:** Comparaison de l'efficacité de la réplication virale obtenue *in vitro* par 2 équipes différentes

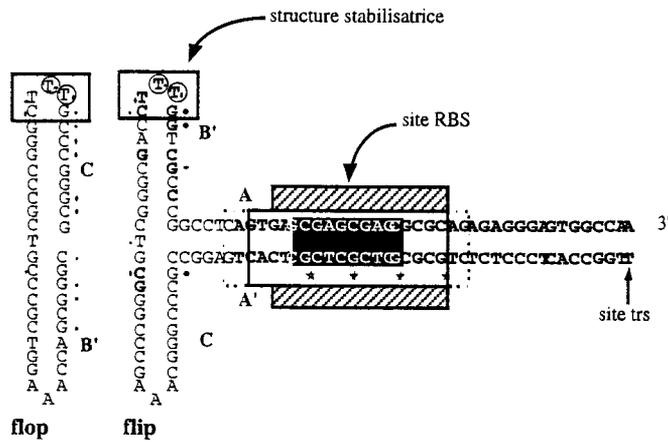
Ces protéines possèdent de nombreuses **activités enzymatiques** associées à la réplication de l'ADN viral.

Tout d'abord, elles ont une **activité endonucléasique**, site et brin spécifique, qui se traduit par le clivage des extrémités de l'ADN viral au niveau du site de résolution terminale (ou **site trs**) entre les nucléotides 124 et 125 (Im et Muzyczka, 1990; Snyder *et al.*, 1990b) (figure 6). L'extrémité 5' de l'ADN clivé est alors liée de façon covalente à la protéine Rep78/68 par un résidu tyrosine phosphorylé (Snyder *et al.*, 1990a). L'activité endonucléasique est entièrement contenue dans le domaine N terminal des protéines Rep78/68 (Weitzman *et al.*, 1996) (figure 3). Récemment, la tyrosine 152 a été impliquée dans ce clivage car la mutation de ce résidu en phénylalanine abroge toute coupure de l'ADN viral (Walker *et al.*, 1997a). Cependant, ce mécanisme reste pour l'instant inconnu. Cette même tyrosine semble également interagir de façon covalente avec l'extrémité virale 5' clivée lors de l'étape de résolution terminale (Walker *et al.*, 1997a).

A cette étape de résolution terminale doit succéder le désappariement des paires de bases de l'extrémité virale. Cette fonction est assurée par les protéines Rep 78/68 qui possèdent une **activité ADN-ADN hélicase NTP** (nucléoside tri phosphate) **dépendante** (Im et Muzyczka, 1990; 1992; Wonderling *et al.*, 1995). Plusieurs motifs hélicases, regroupés sur une centaine d'acides aminés (compris entre les acides aminés 330 et 422), ont été identifiés à la fois au sein des protéines Rep 78/68 et des protéines non-structurales des parvovirus autonomes (Walker *et al.*, 1997b). La plupart des mutations introduites dans ces motifs hélicases réduisent sévèrement ou abolissent complètement l'activité hélicase *in vitro*. Les 3 résidus invariants (2 glycines et 1 lysine) présents dans le motif A interagissent directement avec le groupement phosphate du NTP (Kyöstiö et Owens, 1996; Walker *et al.*, 1997b) et semblent également indispensables pour l'hydrolyse de l'ATP. Le motif C, composé d'acides aminés hydrophobes suivis d'un résidu asparagine, semble être impliqué dans les **fonctions ATPasiques** des protéines Rep78/68. Il est difficile de discerner entre les activités endonucléasiques et hélicases des protéines Rep78/68, car toute mutation affectant l'activité endonucléasique entraîne également une perte de l'activité hélicase.

Outre leurs activités enzymatiques, les **protéines Rep78/68 interagissent spécifiquement avec plusieurs motifs localisés au niveau des extrémités virales** (figure 6).

Un site majeur de fixation des protéines Rep78/68 a été déterminé par empreinte à la DNaseI au niveau de la séquence palindromique A, entre les nucléotides 1 et 41 (Im et Muzyczka, 1989). Des expériences de mutagenèse dirigée et d'interférence de méthylation ont permis de localiser, dans cette séquence A, un motif nucléotidique minimum et suffisant, capable d'interagir



**Interaction entre les protéines Rep78/68 et le palindrome A**

**Interaction entre les protéines Rep78/68 et les palindromes B et C**

- nucléotides ayant une forte affinité pour Rep78/68
- nucléotides ayant la plus forte affinité pour Rep78/68
- mutations affectant fortement l'interaction ADN/protéine
- \* résidus G impliqués directement dans l'interaction ADN/protéine
- Rep Binding Site (RBS)

- nucléotides impliqués dans l'interaction avec Rep78/68
- nucléotides ayant la plus forte affinité
- . nucléotides ayant peu d'effet sur l'interaction séquence/protéine

ACGT nucléotides protégés par empreinte à la DNaseI

**Figure 6:** Interaction entre les protéines Rep 78/68 et les extrémités virales d'AAV-2, (Ryan *et al.*, 1996)

spécifiquement avec les protéines Rep78/68. Ce motif, baptisé **motif RBS (Rep Binding Site)**, est constitué d'une séquence tétramérique (GAGC)<sub>3</sub>/GCGC (Chiorini *et al.*, 1994b; McCarty *et al.*, 1994b), dont les 10 paires de bases centrales et 4 des résidus G apparaissent comme les intervenants directs de cette interaction (Owens *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1996). Cette capacité de liaison du motif RBS est spécifique des protéines Rep78/68. En effet, les protéines Rep52/40 sont incapables de se fixer sur ce motif (Im et Muzyczka, 1992).

Bien que le motif RBS apparaisse comme l'élément majeur requis pour l'interaction de Rep78/68, il ne semble toutefois pas suffisant pour une liaison stable, suggérant fortement l'intervention de séquences adjacentes supplémentaires (Chiorini *et al.*, 1994a; 1994b). Récemment, Ryan et collaborateurs ont identifié un **motif CTTTG** (nt 50-54) pouvant établir des contacts avec les protéines Rep78/68, la plus forte contribution dans cette interaction revenant à 2 résidus T. Ce motif CTTTG, présent dans les palindromes B et C, est retrouvé à la même position quel que soit l'orientation de l'extrémité virale ("flip" ou "flop") (Ryan *et al.*, 1996). Par ailleurs, les palindromes B et C, dans leur configuration en épingle à cheveux, augmentent clairement l'efficacité de liaison des protéines Rep78/68 sur les extrémités virales, suggérant que les structures primaire et secondaire de ces palindromes sont indispensables pour l'interaction des protéines Rep78/68 (McCarty *et al.*, 1994b). La partie N terminale des protéines Rep78/68 contient un domaine pouvant interagir directement avec l'ADN des extrémités virales (McCarty *et al.*, 1992; Weitzman *et al.*, 1996); cette interaction semble être stabilisée par des éléments présents dans la région centrale de la protéine Rep78/68 (Owens *et al.*, 1993) (figure 3). L'ensemble des résultats obtenus en effectuant des délétions impliquent des régions plus ou moins importantes des gènes *rep* et sont à prendre avec beaucoup de précaution. En effet, ces délétions affectent probablement la conformation des protéines tronquées ayant alors pour conséquence une abolition de l'interaction entre ces protéines et les extrémités virales.

Une troisième séquence, située à proximité du **site trs**, et impliquant apparemment un résidu G, interagit spécifiquement avec les protéines Rep78/68, cette interaction a lieu juste avant l'étape de résolution terminale (Ryan *et al.*, 1996).

Il apparaît donc que l'initiation de la réplication d'AAV-2 nécessite l'interaction des protéines Rep78/68 sur au moins 3 motifs présents au niveau des extrémités virales (motifs RBS, CTTTG et trs). L'interaction des protéines Rep avec les motifs RBS et CTTTG aurait comme conséquence d'orienter correctement la protéine sur l'extrémité virale lui permettant ainsi de couper l'ADN bicaténaire au niveau du site trs.

Des données récentes ont montré que les protéines Rep78/68 interagissent avec l'extrémité virale sous forme de complexes multimériques (Smith *et al.*, 1997). En effet, des expériences de double hybride ont tout d'abord révélé l'existence d'interaction entre les protéines Rep (Smith *et*

*al.*, 1997). Puis, ces résultats ont été confirmés, *in vitro*, par des techniques de West-Western et de pontage aux UV démontrant ainsi la formation de complexes multimériques entre les protéines Rep (Hermonat et Batchu, 1997a; Smith *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'addition des extrémités virales sous forme d'ADN double brin (nt 4538 à 4584) favorise la formation de complexes hexamériques entre les protéines Rep, au détriment des complexes multimériques de haut poids moléculaire (Smith *et al.*, 1997).

Des analyses de mutagenèse dirigée ont révélé l'existence de 2 domaines requis pour la multimérisation des protéines Rep78/68:

- un motif de liaison des NTP, compris entre les acides aminés 334 et 421 (Hermonat et Batchu, 1997a; Smith *et al.*, 1997).
- un domaine en  $\alpha$ -hélice de 30 acides aminés, compris entre les acides aminés 165 et 195, appelé crémaillère à leucines. Ce motif, décrit en particulier pour les protéines Fos et Jun, est constitué d'un domaine de dimérisation (LZ ou "leucine zipper"), à savoir une hélice  $\alpha$  comportant 4 à 5 résidus leucines espacés tous les 5 acides aminés, associé à un domaine basique permettant l'interaction avec l'ADN (Landchshultz *et al.*, 1988). L'existence d'un tel domaine dans les protéines Rep78 suggère des interactions entre les protéines Rep78 et des protéines cellulaires ou virales portant un domaine d'interaction hydrophobe (Smith *et al.*, 1997).

### $\beta$ ) Protéine(s) cellulaire(s)

Des protéines d'origine cellulaire, interagissant spécifiquement avec le génome viral, sont également indispensables pour initier la réplication d'AAV-2. Wang et collaborateurs ont montré, par des expériences de retard sur gel, une interaction spécifique entre les 10 paires de bases les plus distales de la séquence D de l'extrémité virale et des protéines présentes dans des extraits nucléaires de cellules HeLa (Wang *et al.*, 1997b). Une protéine de 53 kDa (différente de la p53 suppresseur de tumeur), baptisée **D-BP (D-sequence-binding protein)** interagit spécifiquement avec cette séquence D (Wang *et al.*, 1996). Cette protéine est présente dans des extraits nucléaires de cellules infectées ou non par Ad2 ou par Ad2 et AAV-2. Il semblerait que cette protéine D-BP phosphorylée sur des résidus tyrosine bloque toute réplication virale. La déphosphorylation de cette tyrosine (corrélée avec une coinfection par Ad2) induirait alors un changement conformationnel de la protéine et permettrait ainsi la réplication d'AAV-2 (Qing *et al.*, 1997). Il apparaît donc que les étapes de phosphorylation et de déphosphorylation jouent un rôle central dans la régulation de la réplication d'AAV-2.

### c) Virus auxiliaires

Les parvovirus adéno-associés sont considérés comme des virus défectifs pour leur propre réplication, car ils nécessitent entre autre l'intervention de virus auxiliaires comme l'adénovirus de type 2 ou 5, les herpes virus HSVI, HSVII, HHV-6, le cytomégalovirus ou le papillomavirus de type 16 (se reporter à la page 13 pour les références).

La majorité des études, cherchant à identifier les produits des gènes viraux impliqués dans ces fonctions auxiliaires, ont été réalisées sur des cultures cellulaires coinfectedes par AAV-2 et les adénovirus de type 2 ou 5.

Il apparaît que la plupart des fonctions précoces de l'adénovirus (E1A, E1B, E2A, E4) sont impliquées dans cet effet auxiliaire, contrairement aux gènes tardifs et précoces E2B et E3.

Un résumé succinct des fonctions des protéines précoces de l'adénovirus de type 2 apparaît nécessaire. Les produits de E1, premières protéines virales synthétisées, sont des protéines régulatrices qui agissent sur les promoteurs des autres régions précoces et activent ainsi toute une cascade transcriptionnelle conduisant à la réplication de l'ADN viral. Les protéines E4 semblent jouer un rôle régulateur en association avec les produits des régions E1 et E3. L'association entre les protéines E1 et E4 active la région E2 qui code l'ADN polymérase et la DBP qui se fixe à l'ADN simple brin au cours de la réplication.

Des premières études, réalisées par Richardson et Westphal, ont montré que l'effet auxiliaire de l'adénovirus serait apporté directement par la protéine E4 (Richardson et Westphal, 1981). Cependant, des travaux ultérieurs ont suggéré que cette protéine E4, en association avec la protéine E1B, interviendrait plutôt dans la régulation de l'expression des gènes d'AAV-2, et non dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral (Samulski et Shenk, 1988). La transcription des promoteurs parvoviraux serait également activée par la protéine E2B (Chang et Shenk, 1990; Carter *et al.*, 1992). Enfin, l'ARN VAI de l'adénovirus semble faciliter la synthèse des protéines parvovirales (Schneider *et al.*, 1984).

En résumé, il semble donc que les fonctions auxiliaires apportées par l'adénovirus semblent plutôt contribuer à l'augmentation de l'expression des gènes parvoviraux.

D'autres virus auxiliaires peuvent également pallier la déficience réplivative d'AAV-2. Cependant, peu d'études ont identifié les produits des gènes viraux impliqués dans ces fonctions auxiliaires. On pourra citer pour exemple quelques protéines de virus auxiliaires requises pour la réplication d'AAV-2 comme les protéines ICP4, ICP8, UL5, UL8 et UL52, impliquées dans la réplication d'HSVI (Mishra et Rose, 1990; Weindler et Heilbronn, 1991) ou les protéines E1 et E2 du papillomavirus HPV16 (Ogston *et al.*, 1997).

Quant aux virus HHV-6 et HCMV, les fonctions auxiliaires apportées par ces virus n'ont pas encore été identifiées, probablement à cause de l'extraordinaire complexité de ces virus.

#### d) Stress génotoxiques

La réplication d'AAV-2 a été également détectée en l'absence de virus auxiliaire dans certaines lignées cellulaires rendues permissives pour AAV-2, suite à un traitement par des agents génotoxiques comme l'irradiation aux UV, l'utilisation de cycloheximide, d'hydroxyurée ou de différents agents carcinogènes (Schlehofer *et al.*, 1986; Yakobson *et al.*, 1987; Bantel-Schaal et zur Hausen, 1988; Yalkinoglu *et al.*, 1988; Yakobson *et al.*, 1989). Ces agents génotoxiques induisent non seulement l'amplification sélective de séquences d'ADN cellulaire (Alitalo et Schwab, 1986) ou de virus tumorigènes (comme SV40) (Lavi, 1981) mais également l'amplification de l'ADN d'AAV-2.

Il semble donc que la réplication d'AAV-2 dépende de l'expression de certains gènes cellulaires induits soit après une infection par un virus auxiliaire, soit par des conditions de stress génotoxiques.

#### 1.2 Régulation de la transcription

La régulation de la transcription d'AAV-2 est complexe et dépendante du cycle viral, et donc de la présence ou non de virus auxiliaire. Les 4 protéines Rep jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription d'AAV-2, et sont capables, en fonction du cycle viral, de transactiver ou d'inhiber les 3 promoteurs viraux.

De manière simplifiée, l'initiation de la transcription dépend de l'interaction sur un promoteur donné de l'ARN polymérase II et de facteurs de transcription spécifiques et généraux. Le plus souvent, le facteur de transcription IID (TFIID) du complexe de préinitiation (PIC) reconnaît une boîte TATA présente dans la majorité des séquences promotrices. Ces boîtes TATA sont également présentes dans les 3 promoteurs d'AAV-2.

La transcription du génome d'AAV-2 nécessite impérativement le passage d'une forme monocaténaire du génome viral vers une forme bicaténaire. Deux mécanismes différents sont envisageables:

- après décapsidation des particules virales dans le noyau, les molécules d'ADN de polarité différente s'apparient pour former une molécule d'ADN bicaténaire,
- le génome d'AAV-2 subit un premier cycle réplicatif conduisant à la formation d'une molécule d'ADN double brin.

### 1.2.1 Régulation du promoteur p5

Les protéines Rep ainsi que certains facteurs de transcription interagissent spécifiquement avec le promoteur p5, différents motifs ont été identifiés (figure 7-IA):

- **un site de fixation pour le facteur MLTF** (major late transcription factor) (nt 206-219). Primitivement, ce facteur MLTF a été identifié comme interagissant spécifiquement avec le promoteur tardif de l'adénovirus, d'où son nom. Depuis, d'autres promoteurs cellulaires (Carthew *et al.*, 1987; Chodosh *et al.*, 1987) et viraux (comme le p5 d'AAV-2) ont été identifiés et contiennent également ce motif MLTF (Chang *et al.*, 1989).

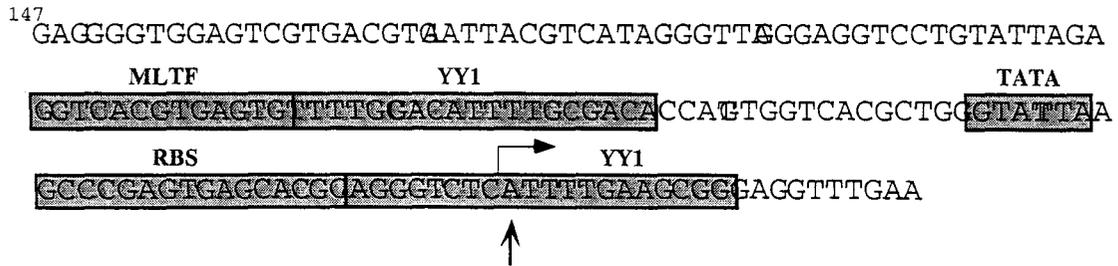
- **2 sites YY1** (nt 218-237; nt 278-299) (Shi *et al.*, 1991), reconnus par la protéine Ying-Yang1 (YY1). Cette protéine, à doigts de Zinc, peut exercer une activité transactivatrice ou inhibitrice sur différents promoteurs.

- **un motif RBS** (nt 267-286), localisé entre la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription. Ce motif RBS, présent au niveau du promoteur p5, a tout d'abord été identifié par analogie de séquence avec le motif RBS des extrémités virales (figure 7-II). L'interaction des protéines Rep78/68 sur ce motif RBS a été démontré par McCarty à la fois par des expériences d'empreinte à la DNaseI et de retard sur gel (McCarty *et al.*, 1992; 1994b).

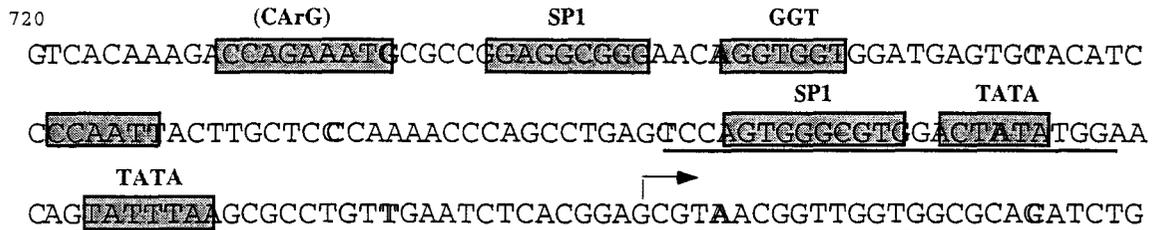
- **un site "trs-like"** (nt 287-288) (Wang et Srivastava, 1997a), localisé en 3' du motif RBS. L'infection par l'adénovirus de type 2 de cellules, transfectées par un plasmide contenant les séquences du parvovirus AAV-2, entraîne un clivage du génome viral puis une réplication des séquences plasmidiques. Ce site de clivage a été localisé précisément, par extension d'amorce, entre les nucléotides 287 et 288 à proximité du promoteur p5 et du motif RBS (Wang et Srivastava, 1997a). Il apparaît donc que ce nouveau site "trs-like" pourrait interagir *in vivo* avec les protéines Rep78/68. Cependant, pour l'instant aucun clivage efficace n'a été observé en présence de protéines Rep68 purifiées. Plusieurs raisons pourraient être invoquées. Tout d'abord, le site trs des extrémités virales est probablement clivé avec une plus forte efficacité que ce nouveau site "trs-like" présent dans le promoteur p5. De plus, les protéines Rep78/68 clivent plus efficacement une matrice d'ADN adoptant une structure secondaire en épingle à cheveux plutôt qu'une séquence nucléotidique sous forme linéaire. Enfin, il ne peut être exclu que d'autres protéines (comme les protéines HMG (Costello *et al.*, 1997)) puissent faciliter le clivage de l'ADN réalisé par les protéines Rep78/68.

En présence de virus auxiliaire, la transcription du promoteur p5 est activée (figure 8). L'activation de la transcription du promoteur p5 fait tout d'abord intervenir la protéine E1A de

I) A) Promoteur p5

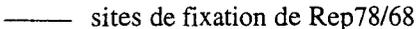


B) Promoteur p19



C) Promoteur p40



 sites de fixation de facteurs de transcription  
 site d'initiation de la transcription  
 sites de fixation de Rep78/68  
 site "trs-like"

II)

| contexte du site | séquence                  | nucléotides AAV | Interaction avec Rep68 |
|------------------|---------------------------|-----------------|------------------------|
| ITR              | CTCAGTGAGCGAGCCAGCGCGCAGA | 87-111          | +                      |
| p5               | aagcccGAGtGAGCæGCagGgtct  | 260-284         | +                      |
| p19              | tcCAGTgGCGtGgætaatatgGA   | 814-838         | +                      |
| p40              | CTCAcgGAGCGtaaaæGgttGgtGg | 864-888         | +                      |
|                  | aTaAGTGAGCccaaaæGgGtGCgpg | 1824-1848       | ND                     |
|                  | acggGTGæCGAGtæAGttgçgæg   | 1838-1862       | ND                     |

+: interaction ADN/protéine Rep

ND: non déterminé

Figure 7-I: Interaction entre les promoteurs parvoviraux et des facteurs de transcription (Pereira *et al.*, 1997a; Pereira et Muzyczka, 1997 b et c)

-II Alignements de séquence entre les motifs RBS de l'extrémité virale et ceux des promoteurs p5, p19 et p40 (McCarty *et al.*, 1994b)

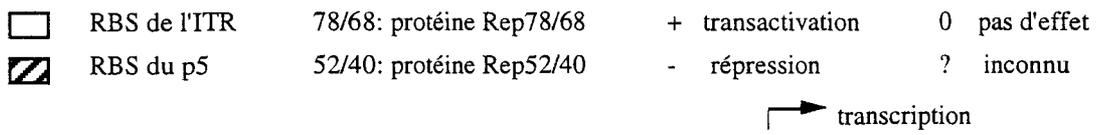
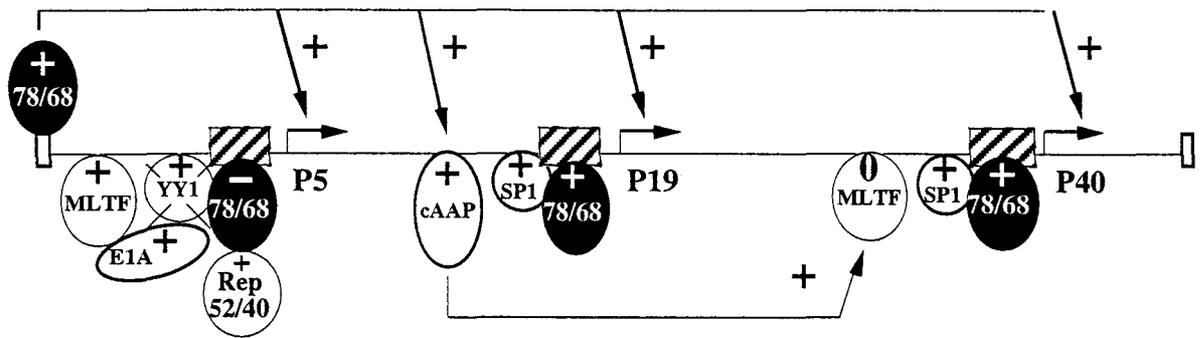
l'adénovirus de type 2 (Laughlin *et al.*, 1982) qui interagit avec les facteurs de transcription MLTF et YY1 fixés sur le promoteur p5 (Chang *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1991).

Les protéines Rep interviennent également dans le contrôle de l'activité du promoteur p5. La plupart des travaux publiés jusqu'à présent avaient révélé une transactivation du promoteur p5 par les protéines Rep78/68 et Rep52/40 (Labow *et al.*, 1986; Beaton *et al.*, 1989). Récemment, Pereira et Muzyczka analysant par transfection transitoire l'expression d'un gène rapporteur CAT sous le contrôle d'un promoteur p5 minimum (nt 143 à 310), ont démontré que les protéines Rep78/68 répriment la transactivation du promoteur p5 en interagissant sur le motif RBS (Pereira *et al.*, 1997a). Des expériences de mutagénèse dirigée sur les motifs RBS, YY1 et MLTF ont montré que seul le motif RBS du promoteur p5 est requis pour inhiber la transcription de ce promoteur (Pereira *et al.*, 1997a). Par ailleurs, les protéines Rep78/68 fixées sur le motif RBS de l'extrémité virale sont capables de transactiver le promoteur p5 (Pereira *et al.*, 1997a). Il apparaît donc que les protéines Rep78/68 sont capables de transactiver ou d'inhiber la transcription du promoteur p5, dépendant du motif RBS utilisé (p5 ou extrémité virale).

Ainsi, il a été suggéré qu'en présence d'adénovirus, les protéines Rep78/68 répriment le promoteur p5 en neutralisant les effets de transactivation des régions E1A de l'adénovirus. Cependant, les mécanismes de cette répression demeurent encore très obscurs. Quatre motifs (MLTF, TATA, 2 sites YY1) ont été identifiés sur le promoteur p5 comme nécessaires pour l'activité basale du promoteur. Des interactions entre les protéines Rep78/68 et l'un de ces facteurs de transcription seraient probablement responsables de la répression du promoteur p5. Tout d'abord, le chevauchement partiel des sites RBS et YY1 sur le promoteur p5 suggère que les protéines Rep et YY1 sont incapables de se fixer simultanément sur cette séquence. Il pourrait donc exister une compétition entre les protéines Rep78/68 et YY1 pour une fixation sur leurs sites respectifs. L'interaction des protéines Rep78/68 avec le site RBS pourrait donc être responsable de la répression de l'activité transcriptionnelle du promoteur p5, alors que la fixation des protéines YY1 sur cette même séquence pourrait transactiver le promoteur p5 (Kyöstiö *et al.*, 1995). Par ailleurs, les protéines Rep52/40 peuvent réverser les effets négatifs exercés par les protéines Rep78/68 sur le promoteur p5 (Kyöstiö *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1997a). Il apparaît donc que la synthèse des protéines Rep78/68 et Rep52/40 doit être strictement contrôlée ainsi que le rapport quantitatif entre ces 2 protéines.

### 1.2.2 Régulation du promoteur p19

Lors d'une infection productive, la transcription initiée à partir du promoteur p19 est activée (figure 8) (Beaton *et al.*, 1989). On dispose, à l'heure actuelle, de très peu d'informations



**Figure 8:** Régulation de la transcription des 3 promoteurs d'AAV-2 en présence de virus auxiliaire, (d'après Pereira *et al.*, 1997a; Pereira et Muzyczka, 1997b,1997c))

concernant les interactions cellulaires et virales régulant l'activité du promoteur p19. Cependant, plusieurs sites putatifs de fixation de facteurs de transcription ont été identifiés (figure 7-IB):

- **un motif GGT** (nt 758-763) qui interagit faiblement avec la protéine SP1 (Pereira et Muzyczka, 1997b).

- **2 motifs RBS putatifs** (nt 814-838; nt 864-888), identifiés par analogie de séquence avec le motif RBS de l'extrémité virale (figure 7-II) (McCarty *et al.*, 1992; 1994b), interagissent faiblement avec la protéine Rep68 (Pereira et Muzyczka, 1997b).

- **un site "CArG-like"** (nt 730-740) qui interagit spécifiquement avec une protéine de 34 kDa présente dans des extraits nucléaires de cellules HeLa (Pereira et Muzyczka, 1997b). Cette protéine, baptisée cAAP (cellular AAV activating protein), contribue à la fois à l'activité basale du promoteur p19 et à la médiation, par les protéines Rep, de l'activation de ce promoteur (Pereira et Muzyczka, 1997b). Cependant, pour l'instant aucune donnée ne permet de savoir si cette activation nécessite la fixation des protéines Rep et cAAP sur leur site de fixation spécifique ou si la protéine cAAP fixée sur son site s'hétérodimérise avec les protéines Rep.

- **2 sites SP1** (nt 746-753; 819-831) (Pereira et Muzyczka, 1997b).

Un premier site, localisé entre les nucléotides 746 et 753, interagit spécifiquement avec le facteur de transcription SP1 qui semble se fixer sur cette séquence sous une forme phosphorylée ou non (Pereira et Muzyczka, 1997b). Cette interaction est nécessaire pour l'activité du promoteur p19, ceci en présence ou en absence de virus auxiliaire (Pereira et Muzyczka, 1997b).

Une deuxième région (nt 819-831) interagit faiblement avec le facteur de transcription SP1 (Pereira et Muzyczka, 1997b). D'autres protéines apparentées à la protéine SP1, comme les protéines SP2 ou SPR3, pourraient être d'excellentes candidates impliquées dans cette interaction (Pereira et Muzyczka, 1997b).

L'induction du promoteur p19 est particulièrement sensible à l'interaction des protéines Rep et SP1, dont l'hétérodimérisation a été récemment démontrée (Hermonat *et al.*, 1997b; Pereira et Muzyczka, 1997b). La faible affinité des protéines Rep68 pour le motif RBS du promoteur p19 suggèrent que ces protéines transactiveraient plutôt le promoteur p19 par des interactions protéines-protéines (SP1-Rep68) que par une interaction directe avec la séquence promotrice. Ainsi, le complexe Rep-SP1-p19 serait requis pour la transactivation du promoteur p19 induite par les protéines Rep (Pereira et Muzyczka, 1997b).

En présence des protéines Rep68 et SP1, Pereira et collaborateurs ont montré, en microscopie électronique, que les régions promotrices p5 et p19 peuvent s'apparier et former des boucles d'ADN (Pereira et Muzyczka, 1997c). Ainsi, la régulation de l'activité du promoteur p19

pourrait être dépendante de la fixation, sur un motif RBS (p5 ou ITR) des protéines Rep78/68 qui interagiraient ensuite avec les protéines SP1 fixées sur le promoteur p19.

### 1.2.3 Régulation du promoteur p40

En présence de virus auxiliaire, la transcription initiée à partir du promoteur p40 est activée (figure 8).

L'analyse de la séquence du promoteur p40 a révélé l'existence de plusieurs motifs présentant des homologies de séquence avec les séquences de fixation de certains facteurs de transcription (figure 7-IC):

- **1 site ATF** putatif (nt 1774-1779)

- **1 site AP1** putatif (nt 1813-1819)

- **2 sites RBS** putatifs (nt 1822-1848; nt 1837-1863), identifiés par homologie de séquence avec le motif RBS de l'extrémité virale (figure 7-II) (McCarty *et al.*, 1992), fixant faiblement la protéine Rep68.

- **1 site MLTF** (nt 1742-1752) interagissant faiblement avec des extraits nucléaires de cellules HeLa. Des expériences de compétition en retard sur gel et de pontage aux UV semblent indiquer que le facteur MLTF se fixe effectivement sur ce motif, mais cette interaction ne semble pas contribuer à l'activité du promoteur p40 (Pereira et Muzyczka, 1997c).

- **2 sites SP1 like et 1 site SP1** (nt 1757-1763; nt 1785-1791; nt 1808-1816).

Des expériences d'empreinte à la DNaseI, de retard sur gel et de pontage aux UV ont révélé la présence, dans le promoteur p40, d'un site SP1 fixant avec une très forte affinité le facteur de transcription SP1. La fixation de la protéine SP1 sur le promoteur p40 semble, une fois de plus, faciliter l'interaction de la protéine Rep68 avec ce promoteur et favoriser ainsi la transcription du promoteur p40 (Pereira et Muzyczka, 1997c).

Trois régions du génome d'AAV-2 apparaissent importantes pour l'induction du promoteur p40 par les protéines Rep:

- le **promoteur p40** (boîte TATA, site SP1 (nt 1808-1816), motif SP1 like (nt 1785-1791))

- le **motif CArG** du promoteur p19. En effet, des mutations au sein de ce motif CArG affectent l'activité du promoteur p40 induite par les protéines Rep. Il apparaît donc que l'interaction entre la protéine cAAP et le motif CArG du promoteur p19 est requise pour la transactivation du promoteur p40 par les protéines Rep (Pereira et Muzyczka, 1997c).

- Le **motif RBS** du promoteur p5 ou de l'extrémité virale est nécessaire pour la transactivation du promoteur p40 (Pereira *et al.*, 1997a).

La transactivation des promoteurs p19 et p40 nécessite la fixation sur ces séquences des protéines SP1 ainsi que le recrutement d'un site RBS (p5 ou ITR) (Pereira et Muzyczka, 1997c). Les protéines Rep68, fixées sur le motif RBS (p5 ou ITR), pourraient alors s'hétérodimériser avec les protéines SP1 (fixées sur les promoteurs p19 ou p40) conduisant ainsi à une transactivation des promoteurs p19 et p40. Ce mode de régulation de l'activité transcriptionnelle nécessiterait alors la formation de boucles d'ADN entre les régions p5/ITR et les promoteurs p19 et p40. Par ailleurs, la formation de boucles d'ADN entre les promoteurs p19 et p40 mais également entre les 3 promoteurs viraux pourrait également être envisagée.

### 1.3 Assemblage des capsides

Au cours d'une infection productive, de nouvelles particules virales infectieuses doivent être produites, les virions nouvellement synthétisés vont alors pouvoir infecter d'autres cellules permettant ainsi la propagation et la maintenance du génome viral. La formation de particules virales se déroule en 2 parties.

Tout d'abord, les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3, nouvellement synthétisées dans le cytoplasme, migrent vers le noyau et s'accumulent dans le nucléole où elles s'assemblent alors pour former une capsid (Wistuba *et al.*, 1997). L'assemblage de la particule virale requiert nécessairement les 3 protéines VP1, VP2 et VP3 (Muralidhar *et al.*, 1994), retrouvées respectivement dans les proportions 1:1:10. Les capsides préformées s'accumulent dans des aires intranucléolaires qui contiennent également les protéines Rep et l'ADN viral (Wistuba *et al.*, 1997). L'ADN monocaténaire synthétisé est alors encapsidé. A l'heure actuelle, les signaux d'encapsidation n'ont pas été localisés précisément sur le génome viral; cependant, ils semblent être présents au niveau de l'extrémité virale. En effet, l'ADN de vecteurs recombinants, ne comportant qu'une seule extrémité virale pour toute séquence parvovirale, a été encapsidé efficacement (Samulski *et al.*, 1989). Les protéines Rep et VP doivent probablement interagir pour permettre l'encapsidation de l'ADN viral dans les capsides préformées. En effet, les protéines Rep52/40 sont nécessaires pour l'accumulation de l'ADN simple brin (Chejanovsky et Carter, 1989). De plus, dans les particules virales infectieuses, les protéines Rep78 sont associées de

façon covalente à l'ADN monocaténaire, suggérant que les protéines Rep78 doivent jouer un rôle au cours du processus d'assemblage (Prasad et Trempe, 1995).

L'association covalente entre la protéine Rep78 et l'ADN viral pourrait donc jouer un rôle clef au cours du cycle viral conduisant soit à une réplication immédiate du génome viral soit à une intégration du virus dans l'ADN cellulaire évitant ainsi toute synthèse au préalable des protéines Rep78.

## 2 Infection latente

En l'absence de virus auxiliaire, l'expression limitée des protéines parvovirales conduit à l'intégration du virus dans l'ADN cellulaire et à l'établissement d'une infection latente.

### 2.1 Intégration *in vivo*

L'infection cryptique d'AAV-2 a été relatée pour la première fois, en 1972, par Hoggan et collaborateurs sur des cellules rénales de singes verts africains ainsi que sur des cellules humaines embryonnaires rénales. Dans cette étude, 20% des cellules de singe et 1 à 2% des cellules humaines montraient une production d'AAV-2 suite à une infection par un adénovirus purifié (Hoggan *et al.*, 1972), ce qui présupait d'une infection latente d'AAV-2 *in vivo*. Par ailleurs, des données de séroépidémiologie semblaient conforter cette hypothèse. En effet, 80% de la population américaine a été décelée séropositive pour AAV-2 (Mayor *et al.*, 1976) et cette infection semble avoir eu lieu principalement au cours de la prime-enfance.

Jusqu'au début des années 90, peu d'informations avaient été accumulées concernant le tropisme tissulaire d'AAV-2 chez l'homme. L'essor récent de la PCR (polymerase chain reaction) a enfin rendu possible la détection de séquences virales, présentes en faible quantité, dans des tissus humains et a ainsi facilité l'identification d'organes pouvant être le siège d'une infection par AAV-2 (tableau 5).

Initialement, Grossman et collaborateurs ont détecté, par PCR, la présence de séquences d'AAV-2 dans des leucocytes issus soit de donneurs sains (4%), soit de patients atteints d'hémophilie (1,2%) (Grossman *et al.*, 1992). Ainsi pour la première fois, on mettait en évidence une latence d'AAV-2 *in vivo*, sans pour autant conclure à l'implication d'AAV-2 dans une quelconque pathologie humaine.

D'autres membres de la famille des parvovirus, comme le parvovirus B19V sont, entre autre, pathogènes pour l'embryon et le nouveau-né. Afin de savoir si la sphère génitale ainsi que

| Tissus et pathologies   | % d'échantillon positif pour AAV-2                 |                         |                | Références                          |
|---|--|-------------------------|----------------|-------------------------------------|
|   | PCR  | Southern Blot (SB)      | Total PCR + SB |                                     |
| cellules sanguines périphériques<br>- donneurs sains<br>- hémophiles  | 3,6% (2/55)<br>1,2% (2/16)                         |                         |                | Grossman <i>et al.</i> , 1992       |
| moëlle osseuse<br>- donneurs sains<br>- leucémies + autres pathologies sanguines  | 14% (3/21)<br>17% (18/106)                         |                         |                | Anderson <i>et al.</i> , 1997       |
| utérus<br>placenta<br>- avortements spontanés<br>1 <sup>er</sup> trimestre<br>2 <sup>ème</sup> trimestre<br>3 <sup>ème</sup> trimestre  | 63% (19/30)<br>40% (12/30)<br>0% (0/3)<br>0% (0/3) | 0% (0/16)<br>64% (9/14) | 51% (21/41)    | Tobiasch <i>et al.</i> , 1994       |
| col de l'utérus   | 50% (9/18)   |                         |                | Han <i>et al.</i> , 1996            |
| placenta<br>- IVG 1 <sup>er</sup> trimestre<br>- avortements spontanés 1 <sup>er</sup> trimestre<br>- villosités 1 <sup>er</sup> trimestre<br>prélèvements génitaux HSV suspectés | 0% (0/24)<br>0% (0/38)<br>0% (0/11)<br>18% (11/61) |                         |                | Friedman-Einat <i>et al.</i> , 1997 |

**Tableau 5:** Détection de séquences d'AAV-2 dans des tissus humains

les tissus foetaux pouvaient être la cible d'une infection par AAV-2, l'équipe de Jörg Schlehofer a recherché, par PCR et/ou "Southern Blot", l'ADN d'AAV-2 dans ces tissus. Ainsi, des séquences d'AAV-2 ont été détectées dans des biopsies de tissus utérins (63 %) et dans du matériel provenant d'avortements spontanés (51%) du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994). De plus, les tissus utérins et d'origine placentaire, plus particulièrement le syncytiotrophoblaste, ont été détectés positifs par hybridation *in situ* pour la présence de séquences d'ADN viral et par immunofluorescence pour la présence des protéines Rep et VP (Tobiasch *et al.*, 1994; Walz *et al.*, 1997a). Ces résultats suggèrent une réplication possible du virus dans ces tissus. Il semble donc que le placenta puisse être une cible naturelle de l'infection par AAV-2. La présence de séquences virales intégrées dans l'ADN génomique de 3 lignées placentaires humaines (JAR, JEG-3 et BeWo) corrobore cette hypothèse (Dutheil *et al.*, 1997); ces résultats seront présentés dans la seconde partie. Ultérieurement, d'autres équipes ont montré que 50% des frottis utérins, provenant de patientes de l'Arkansas, contenaient également des séquences virales (Han *et al.*, 1996). Par ailleurs, une équipe israélienne n'a détecté la présence de séquences d'AAV-2 que dans le tractus génital de femmes supposées infectées par HSV (Friedman-Einat *et al.*, 1997), alors que les villosités chorioniques et les tissus provenant d'avortements spontanés ou induits (TVG) du premier trimestre de la grossesse apparaissaient indemnes de toute présence virale. Ces résultats, en contradiction avec ceux obtenus en Allemagne, en France et aux Etats-Unis, pourraient suggérer des différences épidémiologiques entre les populations pour l'incidence d'AAV-2.

Récemment, d'autres tissus ont été détectés positifs pour la présence de séquences d'AAV-2:

- les cellules CD34+ de patients sains (14%) ou atteints de diverses pathologies affectant la moëlle osseuse (17%) (Anderson *et al.*, 1997)
- des cellules amniotiques (30%) (Burguete *et al.*, 1997)
- des biopsies cardiaques (détection par PCR et Southern Blot) (Klein-Bauernschmitt et Bauernschmitt, 1997)
- des lavages broncho-alvéolaires (Malhomme *et al.*, 1997).

Il est fort probable que, dans un futur proche, de nouveaux tissus se révéleront contenir des séquences virales et représenteront donc de nouvelles cibles naturelles pour l'infection par AAV-2.

## 2.2 Intégration *in vitro*

Afin de caractériser l'état de latence du virus, des cellules humaines ont été infectées par AAV-2 à une multiplicité d'infection très élevée (100 à 250 pfu/cellule), puis sous-clonées en dilution limite (Berns *et al.*, 1975). Le fait que 30% des clones, après surinfection par Ad2, conduisent à la production d'AAV-2 suggère fortement l'existence de séquences parvovirales

intégrées dans l'ADN cellulaire qui fut ensuite démontrée par plusieurs équipes (Handa *et al.*, 1977; Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986). Toutefois, le génome viral semble également pouvoir se maintenir sous forme d'épisme (Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986).

L'analyse par "Southern Blot", d'ADN provenant de plusieurs clones infectés de façon latente par AAV-2, a révélé une diversité dans la taille des fragments contenant les séquences virales suggérant ainsi une intégration aléatoire du génome viral dans l'ADN cellulaire. Cependant, plusieurs clones distincts présentaient une intégration des séquences virales sur le bras long du chromosome 19, favorisant plutôt l'hypothèse d'une intégration virale dans une séquence spécifique du génome humain (Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991).

Grâce à une génothèque de cellules infectées de façon latente par AAV-2 (Kotin et Berns, 1989) une jonction cellulaire, baptisée **AAVSI** (site d'intégration d'AAV-2), a pu être caractérisée (Kotin *et al.*, 1992). L'hybridation de ces différents clones cellulaires avec la séquence AAVSI a montré que 70 à 100% de ces clones présentaient une intégration du génome viral dans la séquence AAVSI (Kotin et Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991), lui conférant ainsi le statut de **site préférentiel d'intégration du parvovirus AAV-2**.

Toutefois, ces résultats laissent entrevoir l'existence d'autres sites potentiels d'intégration pour AAV-2. Des résultats, basés sur l'analyse en FISH (hybridation *in situ* fluorescente) de chromosomes métaphasiques de cellules HeLa infectées de façon latente par AAV-2, indiquaient une intégration du génome viral dans une séquence du chromosome 17 (Walz et Schlehofer, 1992). Cependant, la construction d'une banque d'ADN génomique nous a permis de démontrer que le génome viral est en réalité intégré dans la séquence AAVSI. L'analyse des chromosomes nous a également permis de mettre en évidence l'existence de nombreuses translocations impliquant des séquences du chromosome 19. Ces résultats seront présentés dans la deuxième partie.

Une intégration du génome d'AAV-2 dans le chromosome 17 semble avoir été détectée dans des cellules de mélanome humain infectées de façon latente par AAV-2 (Bantel-Schaal, 1995). Aucune co-hybridation des sondes AAV-2 et  $\alpha$  satellite du chromosome 17 n'a pu être observée. L'isolement et la caractérisation de cette séquence cellulaire pourront seuls permettre de savoir si le génome d'AAV-2 est intégré dans un nouveau site cellulaire ou s'il s'agit, une fois de plus, de la séquence AAVSI. De plus, l'existence de nombreux réarrangements chromosomiques dans les cellules tumorales pourrait suggérer de fréquentes translocations entre des séquences des chromosomes 17 et 19.

### 2.3 Caractérisation de la séquence AAVSI

Le parvovirus AAV-2 s'intègre préférentiellement dans la séquence **AAVSI** (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). Cette séquence a été localisée, par FISH et cartographie d'hybrides somatiques, sur le bras long du chromosome 19 en position **19q1.3qter** (Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991). Cette séquence, unique dans le génome humain, a également été détectée chez le singe mais semble absente d'autres espèces, comme la levure, le poulet, le rat, la souris, le lapin, le chien et le boeuf (Samulski *et al.*, 1991).

Le criblage d'une génothèque de fibroblastes embryonnaires de poumon humains (cellules WI38) a abouti à l'isolement puis à l'analyse d'un fragment de 4 kb contenant la séquence AAVSI et présentant les caractéristiques suivantes (Kotin *et al.*, 1992) (figure 9-A):

\_ **une séquence minisatellite** de 36 nucléotides est répétée 10 fois entre les nucléotides 3660 et 4021. Cette séquence a été également retrouvée dans une soixantaine de sites, localisés exclusivement sur le bras long du chromosome 19.

\_ **21 répétitions directes** d'au moins 11 nucléotides, ou **DRS** (short direct repeats), ont été localisées au niveau des 1500 premiers nucléotides d'AAVSI, mais aussi entre les nucléotides 2801 et 3600.

\_ **un contenu en bases GC** de 65%, pouvant atteindre **85% pour les 900 premiers nucléotides**.

\_ L'isolement fréquent d'îlots CpG dans les séquences régulatrices de certains gènes ne possédant aucune boîte TATA, a suscité la recherche, dans la séquence 5' d'AAVSI, de sites putatifs d'interaction pour des facteurs de transcription. L'interrogation des banques de données a permis d'identifier plusieurs motifs, mais leur fonctionnalité n'a pas encore été démontrée:

- **1 site CRE** (cyclic AMP responsive element) entre les nucléotides 279 et 286.

- **9 sites UBF1** (upstream binding factor 1) localisés dans le 5' d'AAVSI aux positions 87, 347, 455, 497, 585, 587, 603, 689 et 690;

et **3 sites UBF1** situés en aval de cet îlot CpG aux nucléotides 2130, 2782 et 3341.

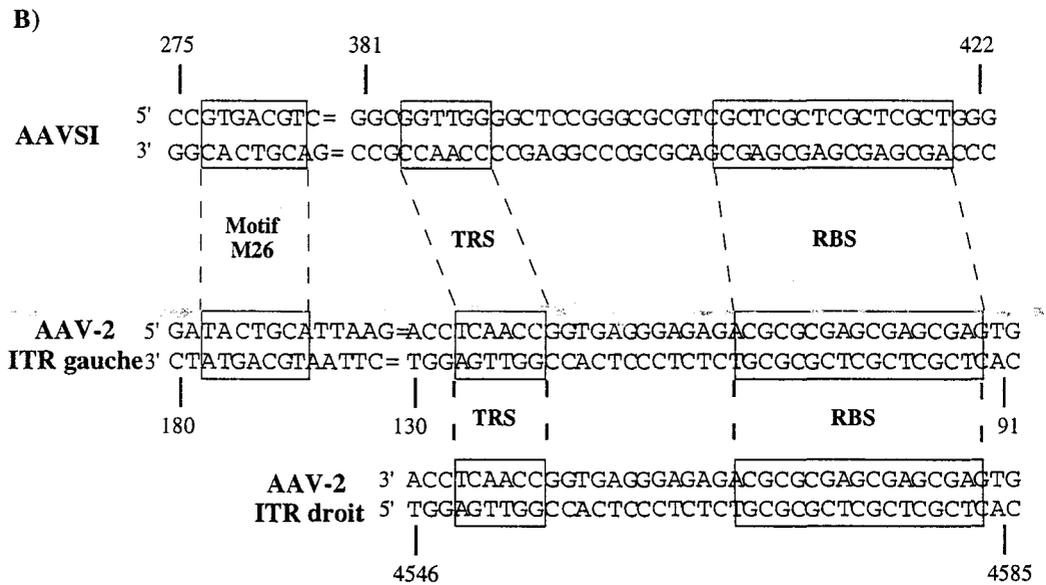
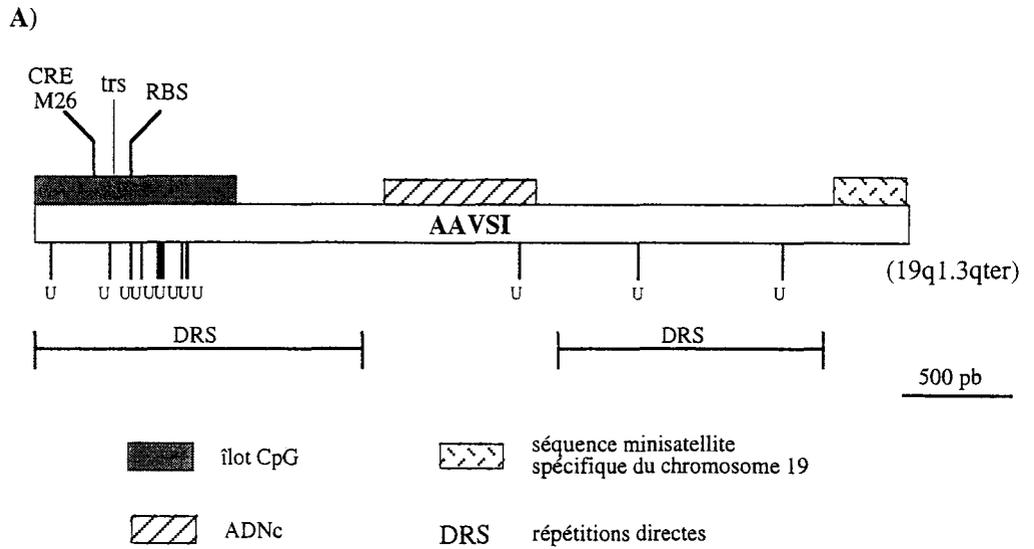


Figure 9- A: Caractéristiques du site de préintégration AAVSI (Kotin *et al.*, 1991)

B: Homologies de séquence entre les motifs RBS, trs et M26 des séquences AAVSI et AAV-2 (Chiorini *et al.*, 1996)

\_ plusieurs motifs, également présents dans le génome viral, ont été détectés dans la région 5' d'AAVSI (figure 9B):

- **un motif RBS** (nt 405-420), présentant plus de 90% d'homologie avec le motif RBS de l'extrémité virale, interagit *in vitro* avec les protéines Rep78/68 (figure 9-B) (Chiorini *et al.*, 1994a ; Weitzman *et al.*, 1994).

- **un site trs** (nt 384 à 389) (Snyder *et al.*, 1993b), localisé à proximité du motif RBS, peut être clivé, *in vitro*, par les protéines Rep78/68 fixées sur la séquence AAVSI (Urcelay *et al.*, 1995). La distance contenue entre les sites RBS et trs d'AAVSI est comparable à celle trouvée pour l'extrémité virale (figure 9-B).

- une séquence heptanucléotidique (nt 278-284) présente plus de 85% d'homologie avec le **motif M26**, requis pour la recombinaison à haute fréquence dans le gène *ade6* de levure (Schuchert *et al.*, 1991). Ce motif chevauche partiellement le site CRE. Les séquences virales et cellulaires contiennent toutes les deux un motif M26, situé à la même distance des motifs RBS et trs (figure 9-B).

\_ **une faible activité transcriptionnelle** a été détectée uniquement par RT-PCR et criblage d'une cDNAthèque de fibroblastes embryonnaires de peau humaine. Cet ADNc (nt 1620-2318) contient une phase ouverte de lecture putative de 95 acides aminés, ne présentant aucune homologie avec des protéines déjà identifiées, suivie de multiples codons de terminaison de la traduction. Pour l'instant, aucune donnée supplémentaire n'a été relatée concernant la caractérisation de cet ARN et l'éventuelle synthèse d'une protéine AAVSI.

#### 2.4 Caractéristiques des jonctions virales et cellulaires

Plusieurs conclusions se dégagent des études de caractérisation moléculaire réalisées sur les jonctions entre les séquences virales et cellulaires de clones ayant intégré le génome d'AAV-2 (figure 10):

- Malgré une intégration préférentielle d'AAV-2 dans la séquence AAVSI, le génome viral n'a jamais été retrouvé intégré à la même position nucléotidique. Au contraire, les différents **sites d'intégration identifiés ont été localisés sur une centaine de paires de bases** aux nucléotides 1026-1030, 1144-1146 ainsi que dans une région s'étalant entre les nucléotides 920 et 950 (figure 10) (Kotin et Berns, 1989; Samulski *et al.*, 1991).

Banque d'ADN génomique  
(Kotin *et al.*, 1991)

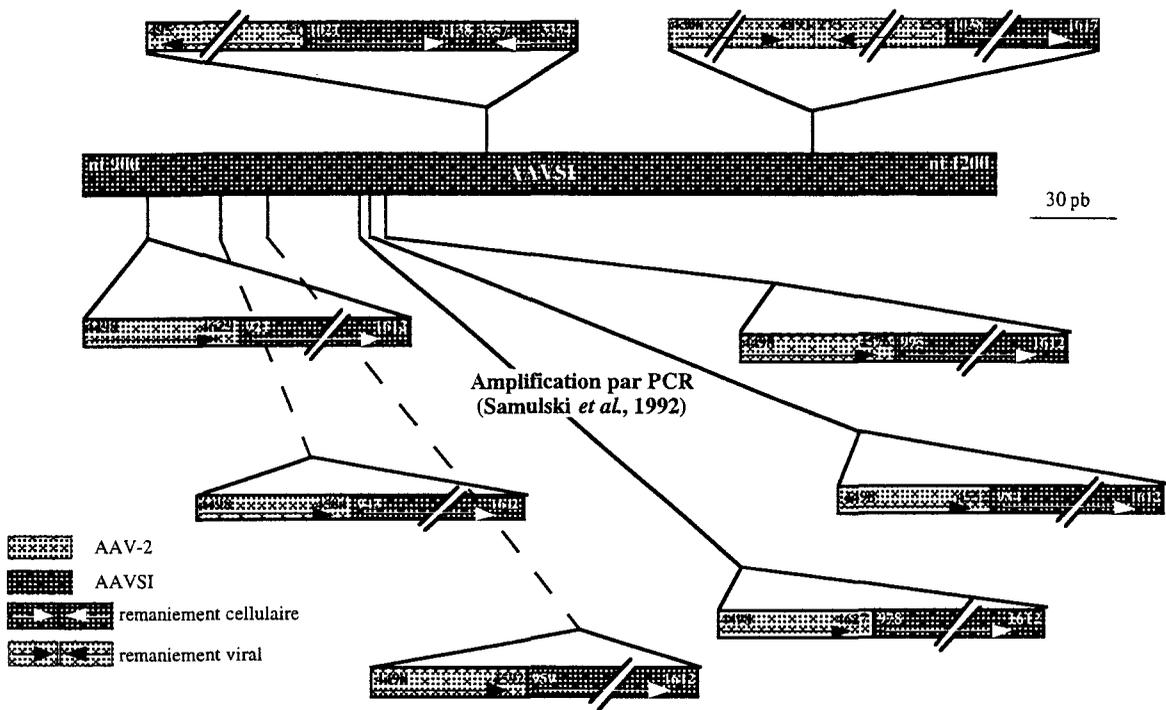


Figure 10: Représentation schématique des jonctions AAV-2/AAVSI dans des cellules infectées de façon latente par AAV-2

- La seule homologie, retrouvée entre les séquences virales et cellulaires au niveau du site d'intégration, réside dans le **recouvrement de quelques paires de bases** (variant généralement de 1 à 5) (figure 11), suggérant ainsi un mécanisme de recombinaison non homologue pour l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI (Kotin et Berns, 1989 ; Samulski *et al.*, 1991).

- **L'extrémité virale** (ITR), fréquemment présente à la jonction cellulaire, comporte des **délétions** variant entre le tiers et les deux tiers (figure 11) (Kotin et Berns, 1989; Samulski *et al.*, 1991).

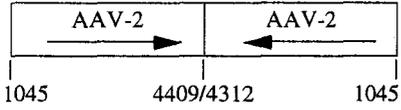
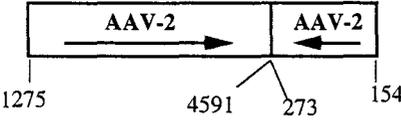
- La majorité des clones analysés possèdent plusieurs copies virales intégrées dans un même site et sont le plus souvent organisés en **tandem** (Laughlin *et al.*, 1986; Walz et Schlehofer, 1992) et plus rarement en **queue à queue** (figure 11) (Kotin et Berns, 1989). Une organisation tête-bêche ou queue à queue semble pouvoir être la conséquence d'une réplication de l'ADN viral au cours de l'intégration. Par contre, une organisation en tandem demeure plus difficile à interpréter et pourrait rendre compte soit d'un événement de recombinaison soit d'un mode de réplication en cercle roulant, non identifié à l'heure actuelle pour AAV-2.

- Tous les clones analysés possèdent au moins **une copie AAVSI intacte**, non touchée par l'intégration de séquences virales (Kotin et Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). Cette observation pourrait suggérer soit une incapacité du génome viral à s'intégrer dans toutes les séquences AAVSI, soit une létalité cellulaire induite par l'intégration du génome viral dans toutes les séquences AAVSI (Samulski *et al.*, 1991).

- **L'intégration d'AAV-2 dans la séquence AAVSI induit de nombreux remaniements tant au niveau cellulaire que viral** (figure 11) (Kotin et Berns, 1989 ). De plus, la comparaison des profils de digestion obtenus avec l'enzyme SmaI, entre les passages précoces et tardifs d'un clone infecté de façon latente par AAV-2, a mis en évidence des réarrangements des séquences virales intégrées (Cheung *et al.*, 1980). Par conséquent, le génome viral semble être en permanence dans un état dynamique aussi bien au cours de son processus d'intégration que pendant le stade où il est effectivement intégré.

## 2.5 Facteurs déterminant la spécificité d'intégration d'AAV-2

La séquence AAVSI semble être l'élément prépondérant responsable de l'intégration spécifique d'AAV-2. Cependant, la structure chromatiniennne du bras long du chromosome 19 pourrait également jouer un rôle majeur lors du processus d'intégration.

| Jonctions  | $\Delta$ ITR (%) | Motif RBS/trs présent | Technique     | Référence                        |
|--|------------------|-----------------------|---------------|----------------------------------|
| <b>Jonctions AAV-2 /AAVSI</b>  |                  |                       |               |                                  |
| AAV-2                      AAVSI<br>61            56                      1026    1031<br>                                                  <br>CGGGCC   <b>CGAAA</b>   TTGACC | 35%<br>(51/145)  | trs<br>RBS            | Banque d'ADNg | Kotin <i>et al.</i> ,<br>1989    |
| 163            158                      1142    1147<br>                                                  <br>TCCCCA   <b>CTCC</b>   TGTTC                                     | 100%             |                       | Banque d'ADNg | Kotin <i>et al.</i> ,<br>1989    |
| 4621    4626                      924    929<br>                                                  <br>GCTTTG   <b>CCC</b>   CACTTC   | 31%<br>(46/145)  | trs<br>RBS            | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| 4576    4581                      946    951<br>                                                  <br>GCTCGC   <b>TCA</b>   ACTGGC   | 62%<br>(91/145)  | trs<br>RBS            | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| 4584    4589                      962    967<br>                                                  <br>ACTGAG   <b>GCC</b>   ACTCTG   | 57%<br>(83/145)  | trs<br>RBS            | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| 4620    4625                      980    985<br>                                                  <br>ACCTTT   <b>GG</b>   CCTCCT  | 33%<br>(48/145)  | trs<br>RBS            | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| 4545    4550                      986    991<br>                                                  <br>ATGGAG   <b>TT</b>   ACCATT  | 84%<br>(123/145) | 1/2 trs               | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| 4568    4573                      998    1003<br>                                                  <br>GCGCGC   <b>TCG</b>   ACCTAC  | 68%<br>(99/145)  | trs<br>1/2 RBS        | PCR           | Samulski <i>et al.</i> ,<br>1991 |
| <b>Jonction AAV-2/AAV-2</b>  |                  |                       |               |                                  |
|   | 100%             |                       | Banque d'ADNg | Kotin <i>et al.</i> ,<br>1989    |
| <b>Remaniements viraux</b>   |                  |                       |               |                                  |
|   |                  | 2 trs<br>2 RBS        | Banque d'ADNg | Kotin <i>et al.</i> ,<br>1989    |
| <b>Remaniements cellulaires AAVSI/AAVSI</b>  |                  |                       |               |                                  |
| 3348    3353                      1134    1129<br>                                                  <br>GCCCAG   <b>GACA</b>   AAGTCC  |                  |                       | Banque d'ADNg | Kotin <i>et al.</i> ,<br>1989    |

paires de bases communes entre 2 séquences

RBS/trs: motifs RBS et trs du génome viral

**Figure 11:** Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI (cellules infectées de façon latente par AAV-2)

Afin de répondre à cette question, Giraud et collaborateurs ont développé un système basé sur l'utilisation d'un vecteur navette EBV portant la séquence cellulaire AAVSI (Giraud *et al.*, 1994). Ce vecteur a tout d'abord été transfecté dans une lignée cellulaire humaine qui exprime de façon constitutive le gène *EBNA-1* permettant ainsi la maintenance du vecteur sous forme épisomale. Ces cellules ont été ensuite infectées par AAV-2, ayant pour conséquence une intégration du génome viral dans l'ADN extrachromosomique et/ou cellulaire. Afin de caractériser les éventuels sites d'intégration du génome viral dans le vecteur navette, l'ADN extrachromosomique a été isolé puis les jonctions entre les séquences cellulaires et virales ont été analysées.

Il apparaît clairement que **seule la structure primaire du site de préintégration dirige l'intégration spécifique d'AAV-2** (Giraud *et al.*, 1994). Par ailleurs, **les 510 premiers nucléotides de la séquence AAVSI sont nécessaires et suffisants pour l'intégration du génome viral** (Giraud *et al.*, 1995).

De nombreuses similitudes ont été retrouvées entre les jonctions des clones recombinants et des cellules infectées de façon latente par AAV-2 (figure 12). Ces homologies concernent l'existence de quelques paires de bases communes entre les séquences virales et cellulaires, des délétions de l'extrémité virale, des intégrations virales en tandem et enfin des réarrangements au sein des séquences cellulaires et virales. Au niveau de la jonction entre les séquences virales et cellulaires, l'orientation de l'ADN cellulaire a été majoritairement identifiée vers le 3' de la séquence AAVSI.

Cependant, quelques différences notables ont pu être observées.

Tout d'abord, quelques recombinants, possédant une première jonction entre les séquences AAVSI et AAV-2, présentent une intégration virale dans une séquence possédant de fortes homologies avec le **transposon humain Line-1** (long interspersed element) (figure 12). La persistance d'éléments L1 sous forme extrachromosomique, dans certaines lignées cellulaires (comme dans les cellules HeLa) (Jones et Potter, 1985), pourrait suggérer une acquisition de cette séquence, par certains vecteurs navettes, avant tout événement d'intégration.

Par ailleurs, **l'intégration du génome viral a été majoritairement détectée dans le 5' de la séquence AAVSI**, et plus précisément au niveau du motif RBS (figure 13-A). L'intégration du génome viral dans cette séquence cellulaire a lieu essentiellement au niveau des extrémités virales ou à proximité du promoteur p5 (figure 13-B), contrairement aux sites d'intégration identifiés dans le génome de cellules infectées *in vitro* par AAV-2 et évoqués précédemment (Kotin et Berns, 1989; Samulski *et al.*, 1991).

| N°<br>jonction | Jonctions AAV-2 /AAVSI  |       | Δ ITR             | Motif<br>RBS/trs<br>présent                    | Orientation<br>AAVSI | Jonctions AAV-2 /L1                   |    |
|----------------|---|-------|-------------------|--|----------------------|---------------------------------------|----|
|                | AAV-2   | AAVSI |                   |  |                      | AAV-2                                 | L1 |
| (1)            | 263 268 1612 1617<br>       <br>CCCGAG <b>TGAGC</b> GGATCC      |       | 100%              | trs ?<br>RBS ?                                 | 5' → 3'              |                                       |    |
| (2)            | 246 251 431 436<br>       <br>CACGCT <b>GGG</b> CGGTGC          |       | 100%              | trs ?<br>RBS ?                                 | 5' → 3'              |                                       |    |
| (3)            | 282 287 487 492<br>       <br>TCTCCA <b>T</b> GCCCGG            |       | 100%              | trs ?<br>RBS ?                                 | 5' → 3'              | 1357 1352<br>   <br>GCCTCC <u>L1</u>  |    |
| (4)            | 88 83 426 431<br>       <br>AGGCCG <b>GG</b> GCGGGC             |       | 56%<br>(81/145)   | trs<br>RBS                                     | 5' → 3'              | 4590 4595<br>   <br>TTGAGG <u>L1</u>  |    |
| (5)            | 282 287 386 391<br>       <br>TCTCCA <u>CT</u> TGGGG            |       | 100%              | <u>RBS</u><br><u>2/3 trs</u><br>trs ?<br>RBS ? | 5' → 3'              |                                       |    |
| (6)            | 110 105 417 422<br>       <br>CTGCGC <b>GCTCGCTCGCTC</b> GCTGGG |       | 64%<br>(93/145)   | trs<br>1/4 RBS<br><u>RBS</u>                   | 5' → 3'              | 282 287<br>   <br>TCTCCA <u>L1</u>    |    |
| (7)            | 4587 4592 636 631<br>       <br>AGGCCG <b>GGCG</b> GCGCGC       |       | 50%<br>(73/145)   | trs<br>RBS                                     | 5' ← 3'              |                                       |    |
| (8)            | 4625 4630 415 420<br>       <br>TGCCCG TCGCTG                   |       | 27%<br>(40/145)   | trs ?<br>RBS ?<br><u>1/2 RBS</u>               | 5' → 3'              |                                       |    |
| (9)            | 4537 4542 387 392<br>       <br>CCCTAG TGGGGC                   |       | 88%<br>(128 /145) | <u>RBS</u><br><u>1/2 trs</u>                   | 5' → 3'              |                                       |    |
| (10)           | 741 749 416 421<br>       <br>GGAGGC <u>ACGTTGGTCCGCTGG</u>     |       | 100%              | <u>1/4 RBS</u>                                 | 5' → 3'              |                                       |    |
| (11)           |   |       |                   |  |                      | 4609 4603<br>   <br>CTTTGGT <u>L1</u> |    |

  paires de bases communes entre 2 séquences

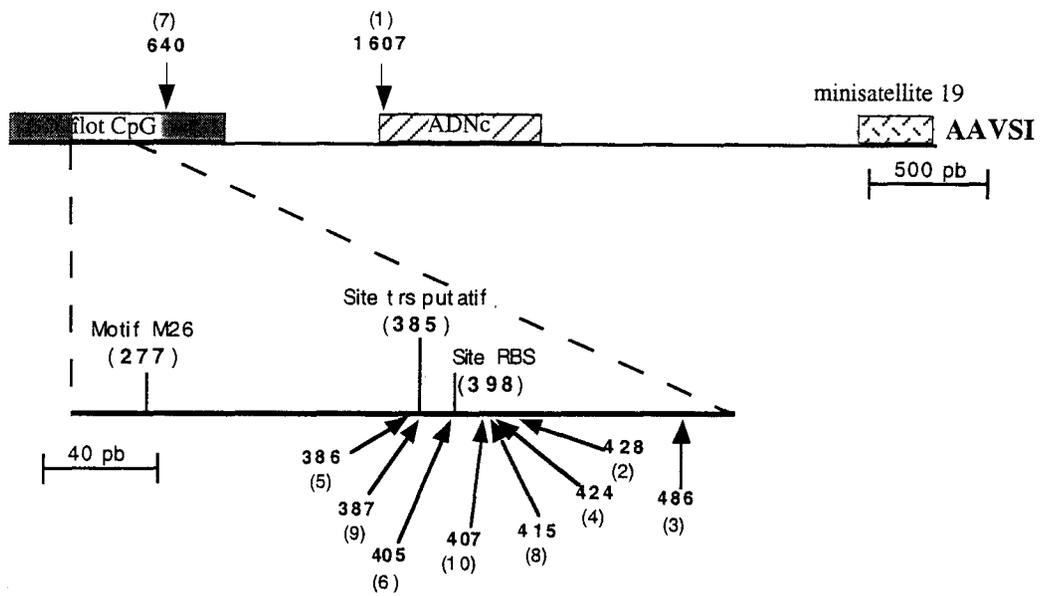
NNN paires de bases différentes entre 2 séquences

RBS/trs: motifs RBS et trs du génome viral

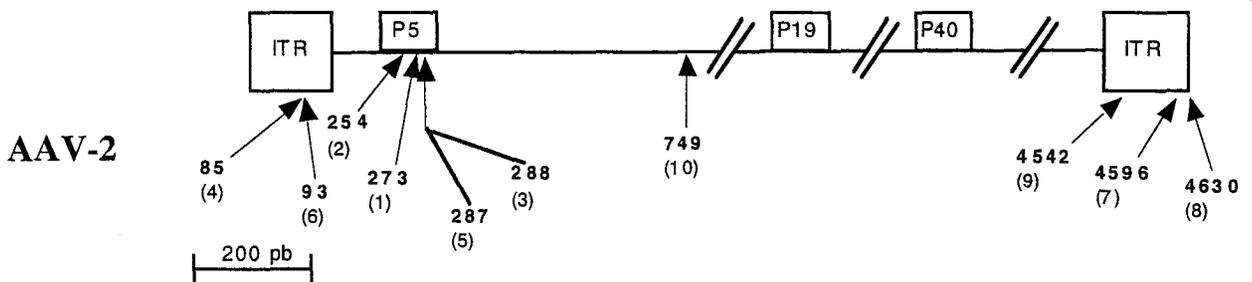
RBS/trs: motifs RBS et trs de la séquence AAVSI

**Figure 12:** Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans le vecteur navette (d'après Giraud *et al.*, 1995)

**A: Jonctions identifiées dans la séquence cellulaire AAVSI**



**B: Jonctions identifiées dans la séquence virale AAV-2**



(1-10): numéro des recombinants (présenté figure 15)

85 : nucléotide (des séquences virales ou cellulaires) impliqué dans l'intégration

**Figure 13:** Représentation schématique des jonctions entre les séquences AAV-2 et AAVSI, identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans le vecteur navette (Giraud *et al.*, 1195)

Pressentant le site RBS comme l'élément critique pour l'intégration virale, Linden et collaborateurs ont réalisé des expériences de mutagenèse dirigée, afin de définir la séquence cellulaire minimale requise pour l'intégration virale (Linden *et al.*, 1996a). Il en résulte qu'une séquence cible de 33 nucléotides (figure 9-B), comprenant les motifs RBS et trs, contient toute l'information nécessaire pour diriger l'intégration spécifique d'AAV-2 dans la séquence AAVSI.

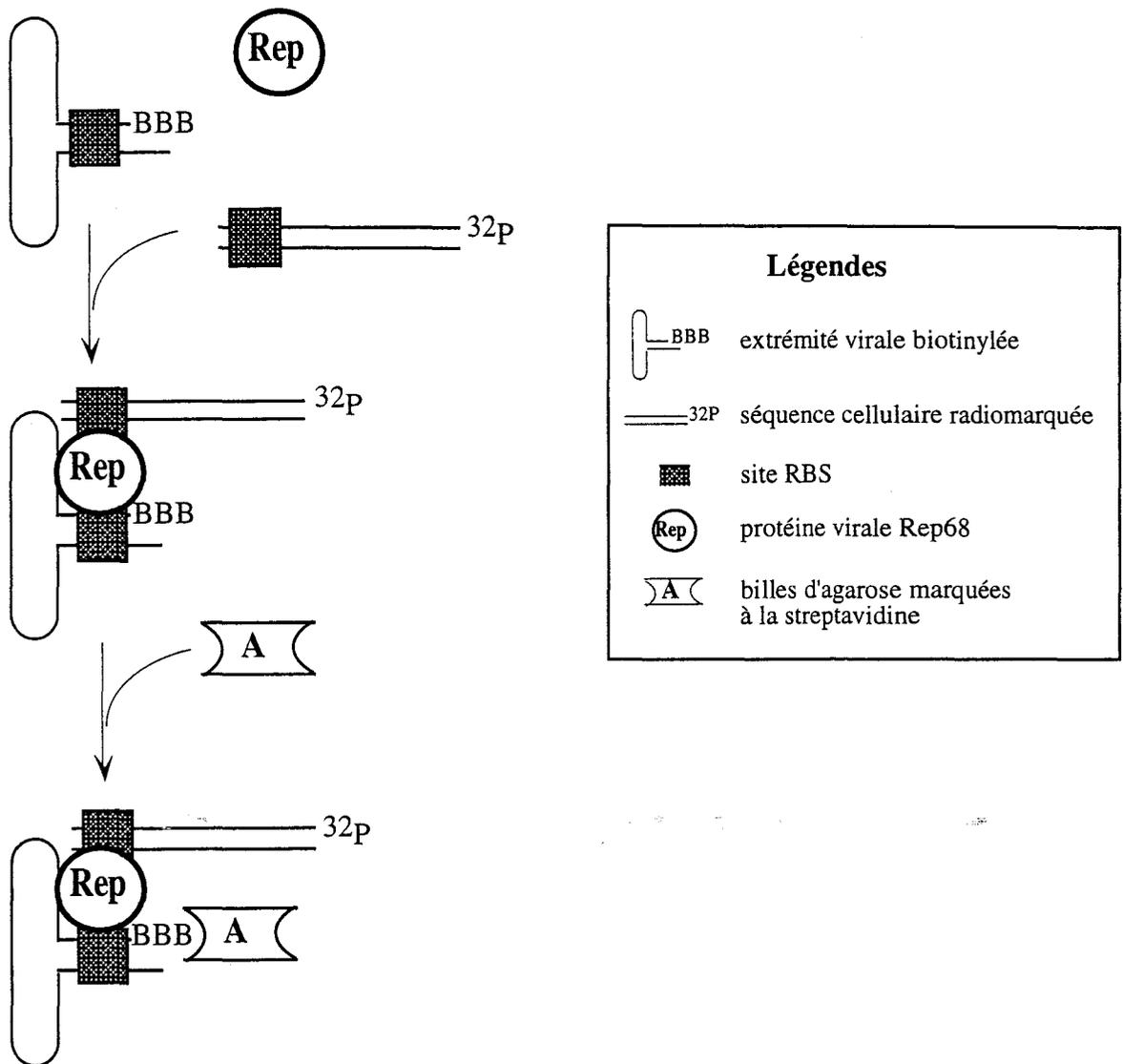
Par ailleurs, il ressort également de cette étude qu'un fragment de la séquence AAVSI (nt 209-326) contenant le **motif M26**, non requis pour l'intégration virale, est associé à une **instabilité génétique**. Il semblerait ainsi que les translocations du 5' d'AAVSI, observées indifféremment en présence ou en absence d'infection virale (Giraud *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 1996a), soient générées par ce motif M26. Ce motif M26 pourrait alors jouer un rôle important en déstabilisant la séquence AAVSI et contribuerait ainsi à l'intégration du génome viral dans cette séquence cellulaire (Linden *et al.*, 1996a).

Le fait que les motifs RBS et trs soient nécessaires et suffisants pour diriger l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI laisse pressentir l'intervention des **protéines Rep** au cours du processus d'intégration. Des expériences de retard sur gel, réalisées par Weitzman, ont démontré l'existence d'une interaction spécifique entre les protéines Rep78/68 et un fragment AAVSI de 110 pb (nt 353 à 468), suggérant ainsi, pour la première fois, un lien direct entre les protéines virales et le site de préintégration (Weitzman *et al.*, 1994). Par interférence de méthylation, 4 résidus G du motif GCTC apparaissent primordiaux dans cette interaction.

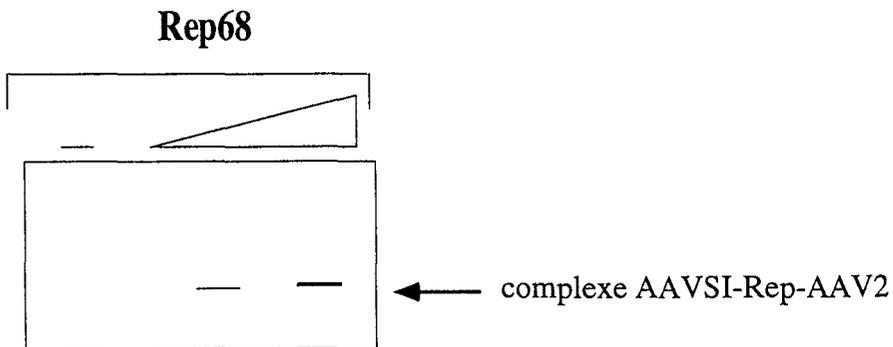
Après avoir démontré la capacité des protéines Rep78/68 à interagir à la fois avec l'ADN viral et cellulaire, il restait à établir la preuve d'une interaction directe entre ces 3 parties. Afin de tester cette hypothèse, Weitzman a développé un système basé sur l'utilisation de billes d'agarose marquées à la streptavidine pour piéger, en présence des protéines Rep, les complexes formés entre l'extrémité virale marquée à la biotine et l'ADN cellulaire radiomarqué (figure 14). Il s'avère que la quantité de séquence cellulaire radiomarquée immunoprécipitée est proportionnelle à la quantité de protéines Rep78/68 apportées, démontrant ainsi la capacité des protéines Rep78/68 à interagir simultanément avec les séquences virales et cellulaires. Cette interaction nécessite obligatoirement le motif RBS de la séquence AAVSI (Weitzman *et al.*, 1994).

En plus de leur capacité à interagir avec l'ADN, les protéines Rep78/68 peuvent également cliver l'ADN cellulaire au niveau du site trs (Urcelay *et al.*, 1995), permettant ainsi l'intégration du virus dans la séquence AAVSI.

A: principe



B: formation du complexe AAV2-Rep-AAVSI



**Figure 14:** Principe schématisé de la formation de complexes entre les protéines Rep68 et les séquences AAV-2 et AAVSI (d'après Weitzmann *et al.*, 1994)

## 2.6 Sites potentiels d'intégration

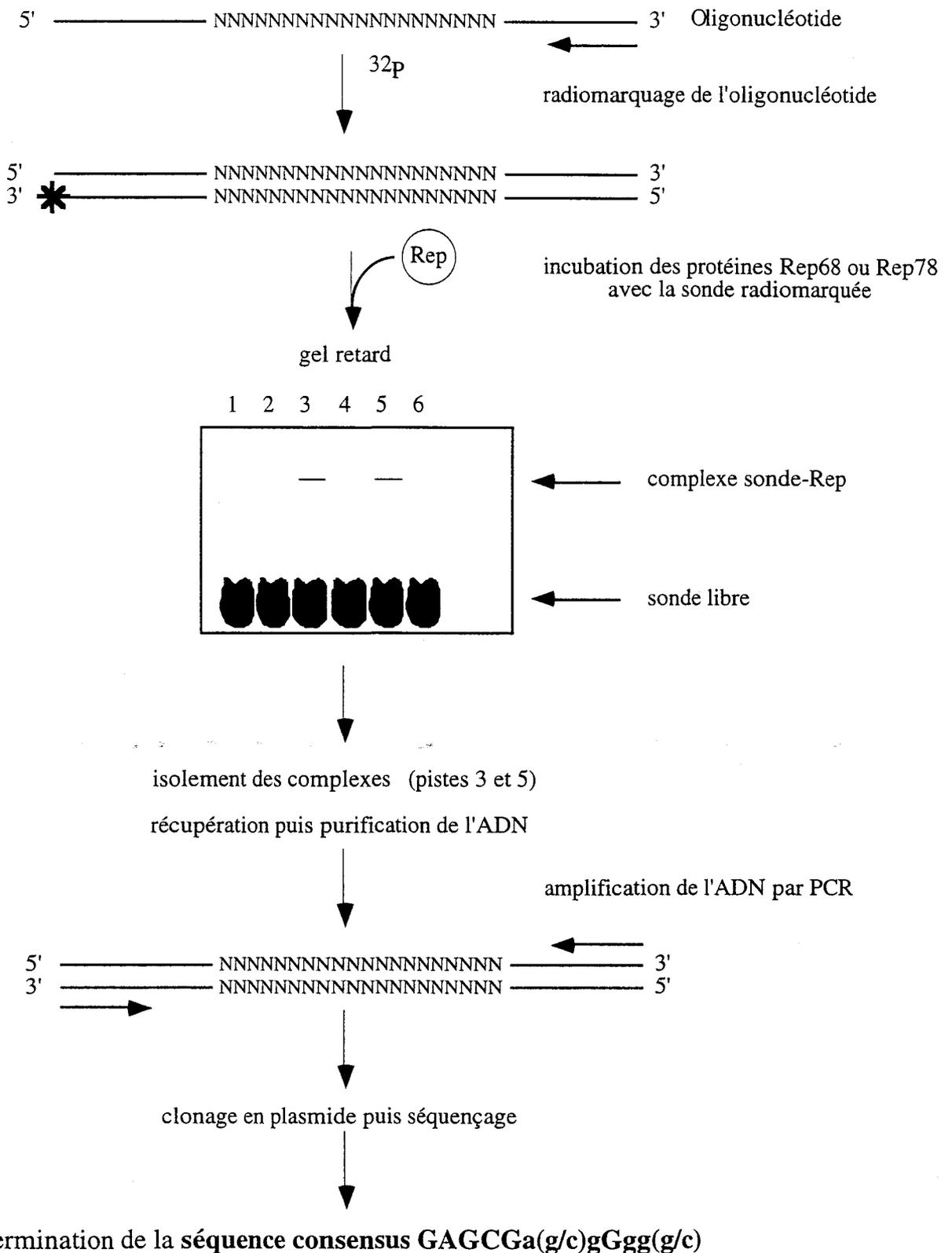
La détection de séquences génomiques virales dans l'ADN de cellules embryonnaires de hamster (CHO) en dépit de l'absence de site AAVSI a laissé présager le fait qu'il puisse exister d'autres sites d'intégration (Winocour *et al.*, 1992; Samulski *et al.*, 1991). Deux approches différentes ont été utilisées pour tester cette hypothèse.

Afin d'identifier de nouveaux sites d'intégration, Chiorini et collaborateurs ont réalisé des expériences de sélection et d'amplification par PCR de sites de fixation (SAAB: selected and amplified binding sites). Cette technique repose sur le radiomarquage d'oligonucléotides contenant une séquence aléatoire de 20 paires de bases (figure 15). Afin d'isoler les complexes spécifiques entre les protéines Rep78/68 et ces différentes sondes radiomarquées, des expériences de retard sur gel ont été réalisées puis la séquence d'ADN qui interagit spécifiquement avec les protéines Rep78/68 a été clonée et séquencée. La comparaison des différents sites d'interaction a permis l'identification du site GAGCGa(g/c)gGgg(g/c) comme séquence consensus de fixation des protéines Rep78/68 (Chiorini *et al.*, 1995). Ce motif a été identifié dans le gène EGR-1 (early growth response gene) et interagit spécifiquement, *in vitro*, avec les protéines Rep68. Cependant, pour l'instant aucun rôle physiologique n'a été mis en évidence.

Une seconde approche, basée sur la recherche d'homologie entre le motif RBS et les banques de données disponibles, a permis l'identification d'une **vingtaine de nouveaux sites RBS putatifs** présents dans plusieurs gènes du génome humain (figure 16-A) (Batchu *et al.*, 1994; Wonderling et Owens, 1996; 1997a). Généralement, ces motifs RBS ont été identifiés en dehors de régions codantes, le plus souvent en amont du codon initiateur de la traduction, ou plus rarement dans le 3' de l'ARNm en aval du codon stop (figure 16-B). Par ailleurs, des motifs RBS ont été détectés exceptionnellement dans des régions codantes. Bien que ces nouveaux sites RBS interagissent spécifiquement, *in vitro*, avec la protéine Rep68, il apparaît peu probable que le génome viral puisse s'intégrer dans ces séquences car ces gènes ne contiennent aucun site trs à proximité du motif RBS.

Des expériences de retard sur gel ont montré, d'une façon complètement inattendue, une interaction à peine détectable entre le motif RBS de la séquence AAVSI et les protéines Rep68, et ceci même après plusieurs jours d'autoradiographie (Wonderling et Owens, 1997a). Il semblerait donc que, malgré une faible interaction entre les protéines Rep78/68 et le motif RBS d'AAVSI, la présence d'un site trs à proximité d'un motif RBS (configuration détectée à l'heure actuelle uniquement pour la séquence AAVSI) soit suffisante pour promouvoir la séquence AAVSI comme le site préférentiel d'intégration du parvovirus AAV-2 dans le génome humain.

Cependant, l'identification de sites RBS dans les régions régulatrices de gènes impliqués dans des phénomènes de réplication cellulaire, pourrait conférer aux protéines Rep un rôle



**Figure 15:** principe de la détermination de la séquence consensus de fixation des protéines Rep78/68 (d'après Wonderling *et al.*, 1997)

A)

|                      |       |      |      |         |
|----------------------|-------|------|------|---------|
| AAV-ITR              | GAGC  | GAGC | GAGC | GCCG    |
| TKA-1                | GAGC  | GAGC | GAGC | GCCG    |
| CSF-1                | GAGC  | GAGC | GAGC | GaGC    |
| IGFBP-2              | gAGC  | GAGC | GAGC | GgGC    |
| Histone H2B.1        | GAGC  | GAGC | GAGC | GCc a   |
| perlecan             | GAGC  | GAGC | GAGC | GaG a   |
| AF-9                 | aAGC  | GAGC | GAGC | GaGC    |
| AAVSI                | cAGC  | GAGC | GAGC | GaGC    |
| Inhibine             | GAGC  | GAGC | GAGC | GgG g   |
| ILF                  | GAGC  | GAGC | GAGC | G g c g |
| p63                  | agGC  | GAGC | GAGC | GCGg    |
| hSNF2L               | GAGC  | GAGC | GAGC | G t a g |
| β actine             | GAGC  | GAGC | GAGC | G t c t |
| c-sis                | ct aC | GAGt | GAGC | c CGa   |
| c-myc                | GAGg  | GAGC | GAGC | GgGC    |
| MC                   | GgcC  | GAGt | GAGC | aCGC    |
| α-A crystalline      | GccC  | cAGt | GAGC | aCGC    |
| Transporteur glucose | cccC  | GAGt | GAGC | cCGa    |

|                      |      |      |      |       |
|----------------------|------|------|------|-------|
| AAVSI                | CAGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| CSF-1                | CAGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| CSF-1                | gAGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| AF-9                 | aAGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| AAV-ITR              | CAGt | GAGC | GAGC | GAGC  |
| CSF-1                | CAGC | cAGC | GAGC | GAGC  |
| ILF                  | CgGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| MK                   | CAGC | GAGC | GAGt | GAGC  |
| CSF-1                | gAGC | GAGC | GAGC | GAGg  |
| perlecan             | gAGC | GAGC | GAGC | GAGa  |
| IGFBP-2              | ggGC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| IGFBP-2              | gAGC | GAGC | GAGC | GgGC  |
| TKA-1                | gAGC | GAGC | GAGC | GcGC  |
| BTAA                 | gAGC | aAGC | GAGC | GAGC  |
| gadd45               | gAGC | GAGC | GAGC | aAGC  |
| KIP2                 | gAGC | GAGC | GAGC | tAGC  |
| AAV-ITR              | gAGC | GAGC | GAGC | GcGC  |
| BRCA1                | gAGg | GAGC | GAGC | GAGC  |
| hSNF2L               | gAGa | GAGC | GAGC | GAGC  |
| ORF                  | gAGa | GAGC | GAGC | GAGC  |
| ERCC1                | gGC  | GAGC | GAGC | GAGg  |
| KIP2                 | CctC | GAGC | GAGC | GAGC  |
| c-sis                | CtaC | GAGt | GAGC | c gGa |
| c-myc                | gAGg | GAGC | GAGC | GgGC  |
| MC                   | CgcC | GAGt | GAGC | aCGC  |
| α-A crystalline      | cccC | cAGt | GAGC | aCGC  |
| Transporteur glucose | cccC | GAGt | GAGC | ccGa  |

■ motif RBS  
□ ATG

B)

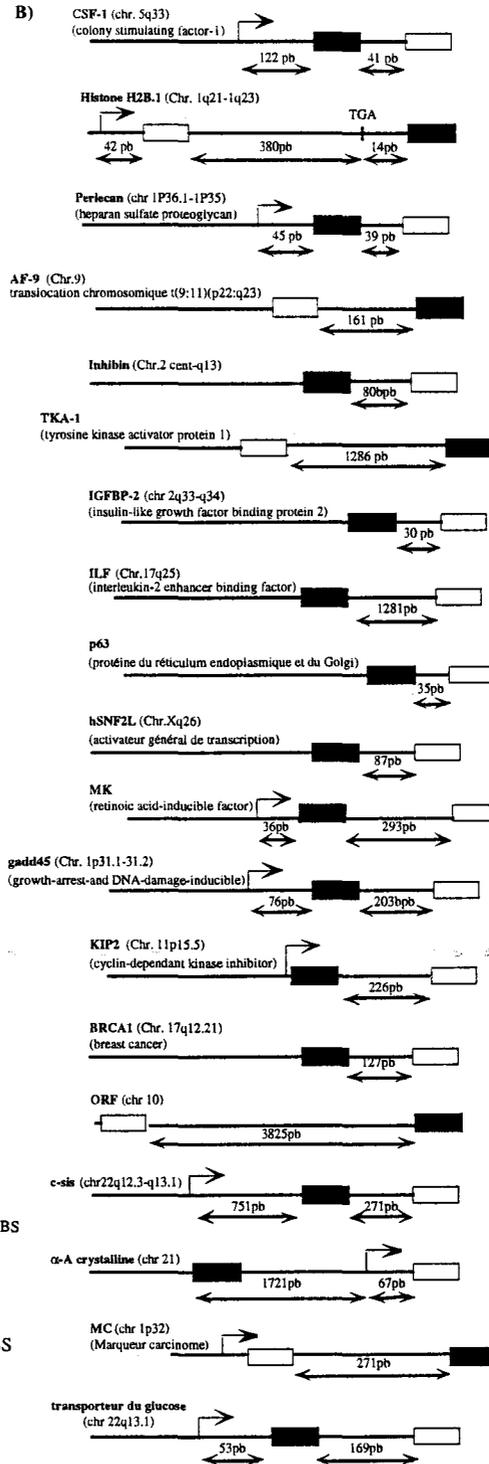


Figure 16 A: Comparaison des sites RBS putatifs et des motifs RBS de l'extrémité virale et de la séquence AAVSI

B: localisation génomique des sites RBS putatifs (Wonderling et Owens, 1996; 1997)

important dans la régulation de l'expression de ces gènes. Cette hypothèse pourrait être confortée par le fait que les protéines Rep peuvent inhiber ou activer l'expression de certains protooncogènes cellulaires (Hermonat, 1991; 1994a; Wonderling et Owens, 1996) et exercer de multiples effets sur les cellules humaines incluant des activités antinéoplasiques (Hermonat, 1989; Khleif *et al.*, 1991), cytostatiques (Yang *et al.*, 1994) et antivirales (Antoni *et al.*, 1991). Certains exemples seront développés dans le chapitre concernant les activités oncossuppressives des parvovirus adéno-associés.

## 2.7 Altération du phénotype cellulaire

Il apparaît donc probable que l'intégration de séquences virales dans le génome cellulaire puisse induire des **changements phénotypiques**.

En effet, des cellules HeLa (carcinome humain du col de l'utérus) infectées de façon latente par AAV-2 présentent quelques différences morphologiques comparées aux cellules parentales: ralentissement de la croissance, besoin accru en sérum, diminution de la capacité à former des colonies en agar mou, réduction de l'efficacité de clonage sur support plastique, sensibilité accrue à divers agents génotoxiques et sensibilité réduite vis à vis de l'effet cytolytique du parvovirus H-1PV (Walz et Schlehofer, 1992). Il ressort de ces observations que l'intégration de séquences virales dans des cellules HeLa, cellules hautement tumorigènes, induit une réversion partielle du phénotype transformé. En conséquence, l'expression de certains gènes cellulaires, incluant des protooncogènes, semble être modulée au cours d'une infection latente.

Des cellules de mélanome humain, infectées de façon latente par AAV-2, présentent également quelques différences comparées aux cellules parentales (Bantel-Schaal, 1995). Ces différences consistent en une diminution de la densité de saturation ainsi qu'une réduction de leur capacité à former des colonies. De plus, le clonage en dilution limite de ces cellules induit des changements morphologiques (cellules géantes multinucléées) et la synthèse de mélanine, caractéristique de leur différenciation terminale.

Enfin, Winocour et collaborateurs ont montré que l'intégration du génome d'AAV-2 dans des cellules de hamster (CHO) conduit à une augmentation de la sensibilité de ces cellules aux UV (254 nm) (Winocour *et al.*, 1992).

A l'heure actuelle, les mécanismes conduisant aux modifications phénotypiques observées après l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire n'ont pas encore été identifiés. Ces perturbations pourraient être liées directement à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire ou alors à la présence des protéines Rep qui exercent de multiples effets sur la régulation de différentes protéines cellulaires.

## 2.8 Régulation de la transcription

En l'absence de virus auxiliaire, la transcription des 3 promoteurs est réprimée (figure 17). Cependant, une activité basale de ces promoteurs a été parfois détectée, par RT-PCR, suggérant une synthèse des protéines virales en très faible quantité.

### Répression du promoteur p5

La répression du promoteur p5 peut être tout d'abord attribuée à la fixation du facteur de transcription YY1 sur les 2 sites YY1 (nt -60,+1) (Shi *et al.*, 1991).

Par ailleurs, le faible niveau d'expression des gènes *rep* suggère qu'AAV-2 doit réprimer sa propre expression. En effet, Kyöstiö et collaborateurs ont démontré que l'activité du promoteur p5 est efficacement réprimée par les protéines Rep78/68, dont seuls les 522 premiers acides aminés sont requis pour cette répression (figure 3) (Kyöstiö *et al.*, 1994). De plus, les protéines Rep52/40 sont également capables d'inhiber la transcription du promoteur p5 mais dans des proportions moindres (Kyöstiö *et al.*, 1994). Leur incapacité à se fixer sur un motif RBS suggère fortement que ces protéines Rep exercent leur activité inhibitrice en établissant des interactions avec d'autres protéines, d'origine cellulaire ou virale. Cette hypothèse semble par ailleurs être confortée par la découverte récente de la formation *in vivo* de complexes stables entre la protéine Rep52 et les protéines Rep78 ou Rep68 (Pereira *et al.*, 1997a).

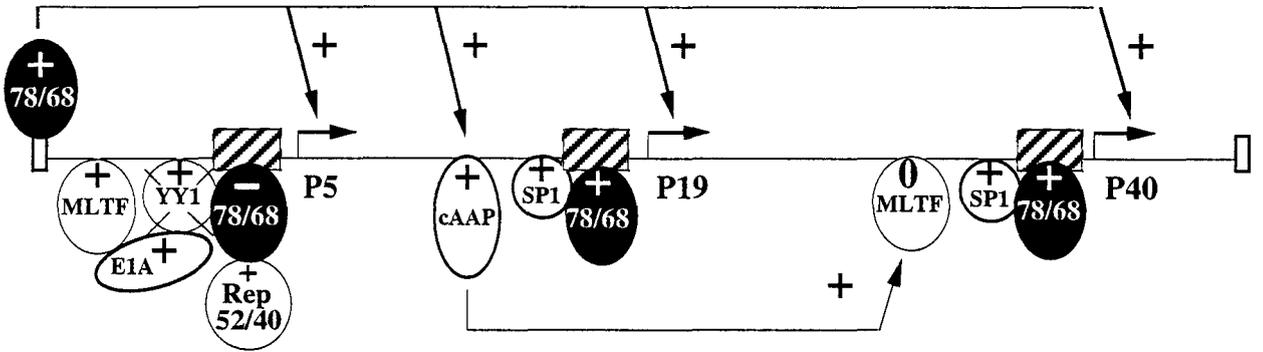
Il apparaît donc qu'en l'absence de virus auxiliaire, la répression du promoteur p5 se fasse soit directement par la fixation de la protéine Rep78/68 sur le motif RBS du p5, soit indirectement par des interactions entre les protéines Rep52/40 et d'autres protéines, d'origine cellulaire ou virale (Rep78/68). Ces 2 modes de régulation doivent probablement coexister et régulent ainsi l'activité transcriptionnelle du promoteur p5.

### Répression des promoteurs p19 et p40

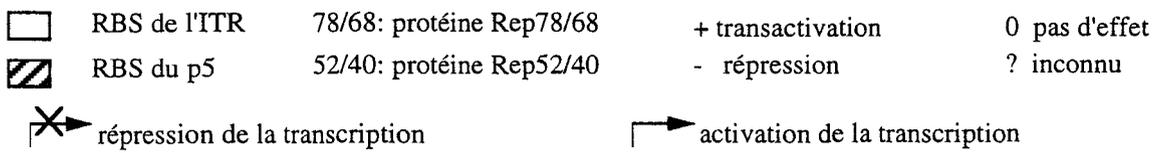
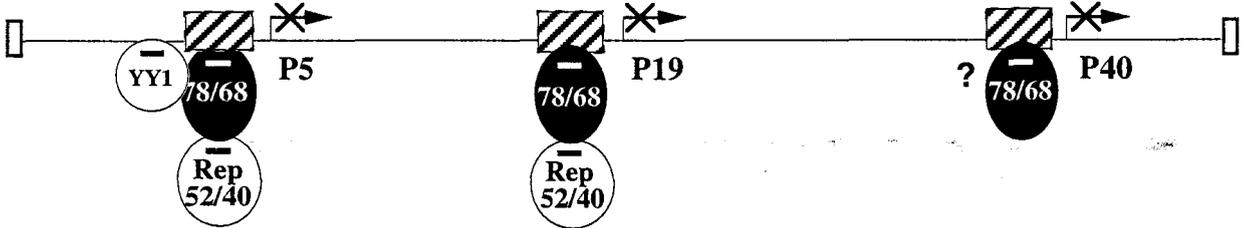
A l'heure actuelle, on dispose de très peu d'information concernant la régulation de l'expression des promoteurs p19 et p40 au cours d'une infection latente. Des mécanismes identiques pourraient conduire à une répression de l'activité de ces 2 promoteurs.

Pour l'instant, seule la répression efficace du promoteur p19 a été démontrée. Elle est exercée à la fois par les protéines Rep78/68 et Rep52/40 (figure 17) (Kyöstiö *et al.*, 1994; Hörer *et al.*, 1995). Afin d'expliquer les fonctions inhibitrices des protéines Rep78/68 sur l'activité du promoteur p19, Wonderling et collaborateurs ont suggéré que les fonctions ADN-ARN hélicases des protéines Rep78/68 pourraient jouer un rôle important dans ce processus (Wonderling *et al.*,

+ Ad2



- Ad2



**Figure 17:** Comparaison de la régulation de la transcription des 3 promoteurs d'AAV-2 en absence ou en présence de virus auxiliaire (d'après Pereira *et al.*, 1997a; Pereira et Muzyczka, 1997b; 1997c)

1995). La transcription nécessite le désenroulement de l'ADN bicaténaire et l'exposition de régions d'ADN sous forme simple brin. Le brin d'ADN anticodant, alors accessible, est utilisé comme matrice pour la synthèse d'ARNm. Les protéines Rep78/68, par leurs propriétés ADN-ARN hélicases, déplaceraient l'ARNm naissant de sa matrice et bloqueraient ainsi la production d'ARN de pleine longueur. Les protéines Rep78/68 pourraient également réprimer la transcription des promoteurs p5 et p40 par cette activité ADN-ARN hélicase.

La présence de 2 motifs RBS putatifs au sein du promoteur p40 suggère qu'une répression de l'activité transcriptionnelle du promoteur p40 puisse également être médiée par les protéines Rep78/68. Cependant, aucune donnée ne permet de l'affirmer dans l'état actuel des connaissances.

En l'absence de virus auxiliaire, une faible activité transcriptionnelle des 2 promoteurs viraux permettrait la synthèse des protéines Rep, nécessaires pour l'intégration du génome viral et probablement pour maintenir le génome viral dans son état intégré. Au cours d'une infection latente, la synthèse des protéines Rep doit être strictement régulée. En effet, ces protéines, indispensables pour toutes les phases du cycle viral, sont surexprimées lors d'un cycle réplicatif et réprimées au cours d'une infection cryptique.

Par ailleurs, l'état de phosphorylation de ces protéines Rep pourrait également jouer un rôle prépondérant dans la détermination du cycle viral. En effet, les protéines Rep78/68 et 52/40 sont dans un état non phosphorylé au cours d'une infection latente, puis subissent une phosphorylation suite à une infection par l'adénovirus de type 2 (Collaco *et al.*, 1997). Il apparaît donc probable qu'en fonction de leur état de phosphorylation, les protéines Rep agissent soit en tant que répresseurs (sous une forme non phosphorylée), soit en tant qu'activateurs (sous une forme phosphorylée), et modulent ainsi l'activité transcriptionnelle des 3 promoteurs parvoviraux.

## 2.9 Modèle d'intégration

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'intégration des séquences virales dans l'ADN génomique apparaissent, à l'heure actuelle, encore bien obscurs.

Tout d'abord, avant toute intégration dans le génome cellulaire, l'ADN viral monocaténaire doit être converti en une forme bicaténaire. Deux mécanismes différents ont été incriminés nécessitant soit l'appariement de 2 molécules d'ADN de polarité différente, soit l'achèvement d'un premier cycle réplicatif. Cette dernière hypothèse impliquerait un arrêt rapide du cycle réplicatif, car aucune réplication virale n'a été détectée au cours d'une infection latente. Par ailleurs, l'intégration du génome viral nécessite la présence des protéines Rep78/68. Dans la particule infectieuse, les protéines Rep78 sont déjà associées de façon covalente à l'ADN viral, évitant ainsi

toute transcription et traduction virales (Prasad et Trempe, 1995; Prasad *et al.*, 1997). Les protéines Rep78 seraient alors transportées directement jusqu'au noyau pour y exercer pleinement leurs fonctions.

L'élaboration d'un modèle, s'efforçant d'expliquer l'intégration préférentielle du génome d'AAV-2 dans une séquence spécifique du génome humain, doit prendre en considération les différentes observations faites au cours de l'infection latente. Ce modèle doit tenir compte du rôle primordial joué par les protéines Rep et par les motifs RBS et trs des séquences virales et cellulaires, des intégrations fréquentes à proximité de l'extrémité virale ou du promoteur p5, des intégrations virales en tandem, tête-bêche ou queue à queue, des réarrangements cellulaires et viraux induits au cours du processus d'intégration et enfin de l'intégration possible des séquences virales dans un site relativement éloigné (à environ 1 kb) des motifs RBS et trs de la séquence AAVSI.

Un premier modèle concernant l'intégration ciblée du génome viral, a été proposé par Kotin et requiert une induction de la réplication virale ainsi que le rapprochement des séquences virales et cellulaires (figure 18) (Kotin, 1994).

Les protéines Rep, probablement sous forme multimérique, interagissent spécifiquement avec les motifs RBS des séquences virales dont la même configuration est retrouvée pour les motifs cellulaires (étapes A-B). Grâce à l'activité endonucléasique des protéines virales, les séquences cellulaires et virales sont ensuite clivées au niveau du site trs, créant ainsi une extrémité 3'OH libre (étapes C-D). Les protéines Rep78/68, fixées de façon covalente à l'extrémité 5' du site clivé, interagissent alors avec le complexe de réplication (étape E) et conduisent soit à la synthèse d'une molécule virale bicaténaire (étape F), soit à la réplication unidirectionnelle de la séquence AAVSI (étape G). La progression du complexe de réplication le long de l'ADN cellulaire entraîne le déplacement du brin parental (étape G). Les protéines Rep initient la formation d'un complexe tripartite entre les protéines Rep78/68 et les séquences cellulaires et virales (étape H), permettant ainsi l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI, dans une région située en 3' du motif RBS (étapes I-J).

Un second modèle, proposé par Linden, requiert la circularisation du génome viral qui pourrait se produire soit par l'appariement des extrémités virales, soit par un événement de recombinaison impliquant ces mêmes extrémités virales (figure 19) (Linden *et al.*, 1996b).

Les premières étapes de ce modèle sont quasi identiques à celles décrites dans le modèle précédent (étapes I, II). La différence majeure repose sur l'interaction du site AAVSI avec une molécule virale circulaire, déjà complexée aux protéines Rep78/68. Les protéines Rep78/68 exercent à nouveau leur rôle médiateur entre les séquences virales et cellulaires. Après clivage de la séquence cellulaire, le motif RBS de la séquence AAVSI (extrémité 5' clivée) reste alors

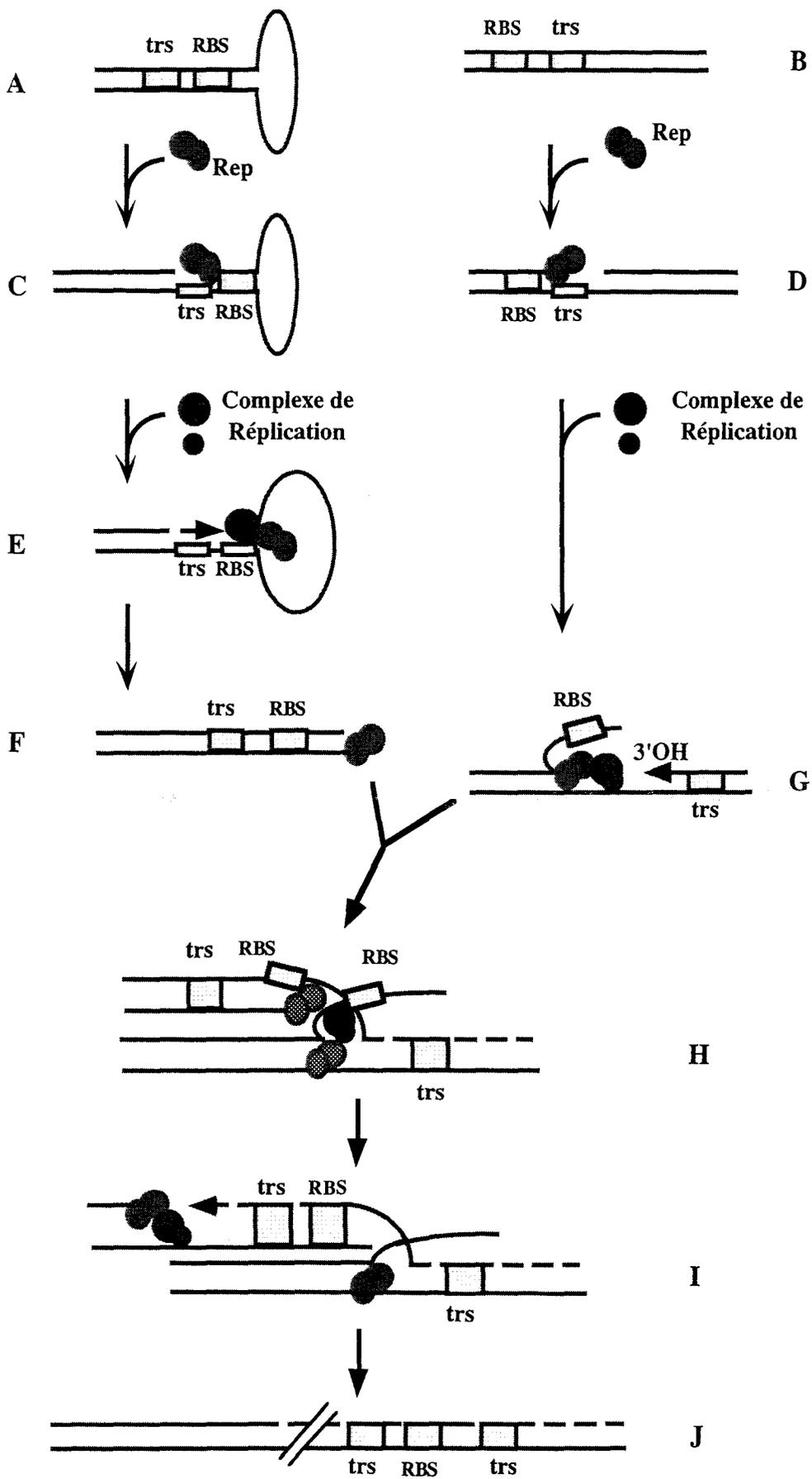
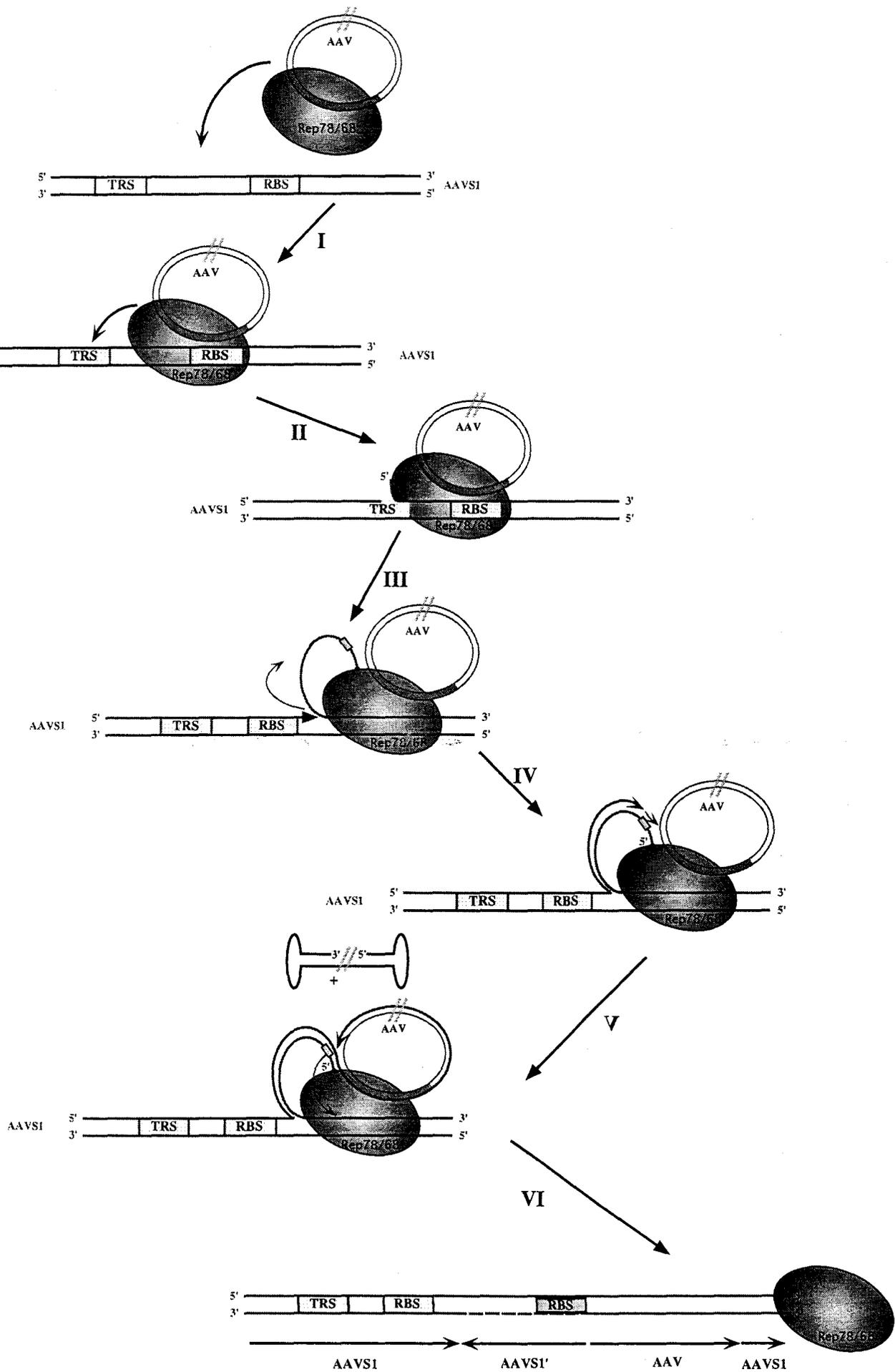


Figure 18: Modèle de l'intégration ciblée d'AAV-2 dans la séquence AAVSI (d'après Kotin *et al.*, 1994)



**Figure 19:** Modèle de l'intégration ciblée d'AAV-2 dans la séquence AAVSI (Linden *et al.*, 1996)

attachée, de façon covalente, aux protéines Rep78/68. Dans un but de simplification, les auteurs ont occulté l'éventualité d'un clivage de la séquence virale. La synthèse de l'ADN d'AAVSI, à partir de l'extrémité 3'OH libre, entraîne alors un déplacement du brin parental. Après une extension limitée de la réplication cellulaire, le brin cellulaire nouvellement synthétisé bascule sur le brin parental déplacé (strictement homologue) créant ainsi une inversion au sein de la séquence AAVSI (étape III). De la même façon, le brin AAVSI en cours d'élongation bascule à son tour sur la séquence virale (étape IV). La séquence virale est alors répliquée, puis un dernier basculement s'opère entre les séquences virales et cellulaires (étape V) entraînant dans cette dernière manoeuvre l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire. L'étape ultime consiste ensuite à réparer les séquences d'ADN (contenant les séquences virales) apportées au cours de ce processus.

Ces 2 modèles apportent des réponses quant à l'intégration du génome viral dans des sites relativement éloignés du motif RBS de la séquence AAVSI. De plus, le deuxième modèle rend compte des remaniements cellulaires induits au cours de l'intégration des séquences virales dans la séquence AAVSI. Cependant, l'inversion de la séquence AAVSI (étape V) mettant en relation d'une part un premier motif RBS de la séquence AAVSI avec la séquence virale et d'autre part un second motif RBS avec une séquence cellulaire localisée plus en aval n'a jamais été décrit dans la littérature. L'isolement de sites d'intégration à proximité du motif RBS de la séquence AAVSI, décrit en particulier pour le vecteur navette, pourrait être la conséquence d'une intégration des séquences virales au niveau du site RBS d'AAVSI, n'impliquant ainsi aucune synthèse et aucun remaniement de la séquence AAVSI.

## 2.10 Excision du provirus

Sous certaines conditions, le génome viral intégré dans l'ADN cellulaire peut être excisé puis répliqué, assurant la propagation du virus. Par conséquent, la perpétuation du génome d'AAV-2 requiert une excision efficace et précise des séquences virales. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'excision du génome viral, des plasmides recombinants contenant des séquences virales ont été utilisés (Samulski *et al.*, 1982). Ces études ont montré que l'excision du provirus nécessite la présence des protéines Rep78/68 et l'intégrité d'au moins une extrémité virale (Samulski *et al.*, 1983). Par ailleurs, la séquence D (de l'extrémité virale) est également requise pour une excision efficace du génome viral (Wang *et al.*, 1995; 1996). Il semblerait donc que les protéines virales Rep78/68 clivent l'ADN viral au niveau du site trs, permettant ainsi l'excision du génome d'AAV-2. Une protéine cellulaire (D-BP ou autre) fixée sur la séquence D permettrait ainsi de stabiliser l'interaction entre les protéines Rep78/68 et la séquence virale.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur l'excision de séquences virales intégrées dans le génome cellulaire. Deux mécanismes pourraient être envisagés. Tout d'abord, l'excision du génome viral pourrait conduire à une rupture et une désorganisation de l'ADN cellulaire. Deuxièmement, l'excision du provirus pourrait être suivie de la réparation des séquences cellulaires conduisant ainsi à la maintenance du génome viral dans l'ADN cellulaire et à l'intégrité des séquences cellulaires. Cette deuxième hypothèse a fait l'objet d'un modèle présenté par Samulski (Samulski, 1993) et représenté dans la figure 20:

L'ADN viral intégré est probablement clivé par la protéine Rep78/68 au niveau du site trs (étape I), permettant ainsi l'excision du génome viral et la création d'une extrémité 3'OH libre (étape II). Cette extrémité sert alors d'amorce pour répliquer le génome viral (étape III), puis les séquences virales et cellulaires sont liguées ce qui permet de maintenir l'ADN cellulaire dans son intégrité.

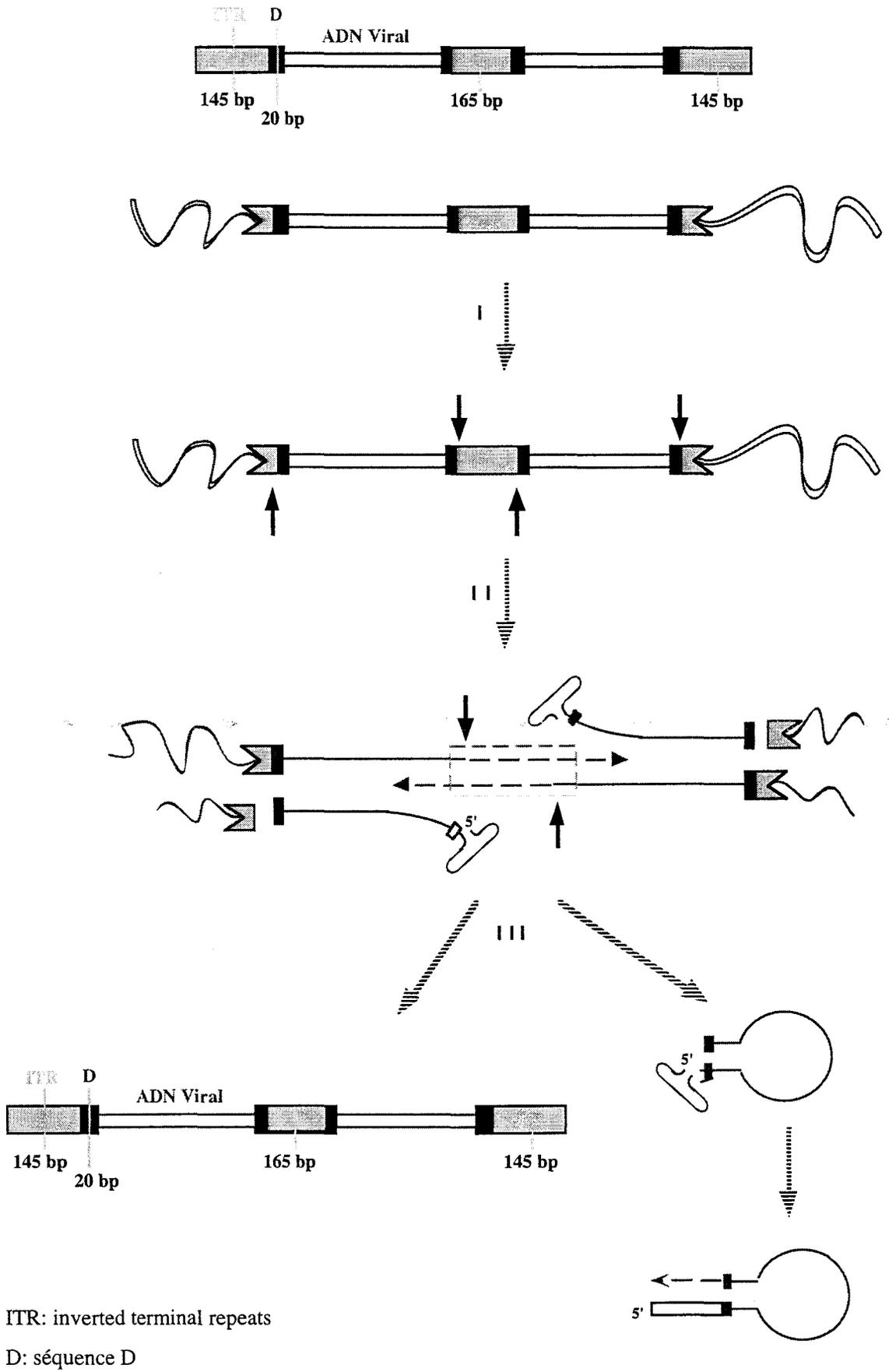


Figure 20: Modèle de l'excision du génome viral (Samulski, 1993)

### III ACTIVITES ANTITRANSFORMANTES DES PARVOVIRUS ADENO-ASSOCIES

Les parvovirus adéno-associés ont été depuis longtemps étudiés pour leur propriétés oncossuppressives observées *in vivo* (Kirschstein *et al.*, 1968; Mayor *et al.*, 1973; Cukor *et al.*, 1975; de la Maza et Carter, 1981) et pour leur capacité à inhiber la transformation cellulaire *in vitro* (Ostrove *et al.*, 1981; Katz et Carter, 1986; Hermonat, 1989; Walz et Schlehofer, 1992).

Le parvovirus AAV-2 peut interférer avec la tumorigenèse induite par l'adénovirus de type 12 (Kirschstein *et al.*, 1968; Mayor *et al.*, 1973; de la Maza et Carter, 1981). Par ailleurs, ces virus peuvent également inhiber la formation de tumeurs suite à la transplantation de cellules transformées *in vitro* par les adénovirus de type 2 ou 5 (de la Maza et Carter, 1981; Ostrove *et al.*, 1981) ou par l'herpès virus HSVII (Cukor *et al.*, 1975; Blacklow *et al.*, 1978). Enfin, des effets semblables ont été obtenus après l'inoculation de cellules HeLa (cellules tumorigènes), ayant intégré le génome d'AAV-2, à des souris immunodéficientes (Walz *et al.*, 1992).

Des résultats similaires obtenus *in vitro*, ont montré que le parvovirus AAV-2 inhibe la transformation cellulaire. L'infection par AAV-2 de cellules transformées s'accompagne d'une réversion partielle de leur phénotype, à savoir un ralentissement de leur croissance cellulaire, une diminution de leur capacité de clonage en agar mou et de leur oncogénicité après injection chez l'animal (Ostrove *et al.*, 1981; Katz et Carter, 1986; Hermonat, 1989; Walz et Schlehofer, 1992). Par ailleurs, des études de séroépidémiologie ont montré que des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus présentaient moins d'anticorps dirigés contre AAV que la population contrôle (Mayor *et al.*, 1976; Georg-Fries *et al.*, 1984). Ces résultats suggèrent que les parvovirus adéno-associés pourraient avoir un rôle protecteur vis à vis de l'induction de la tumorigenèse.

Différents mécanismes peuvent participer aux propriétés antitumorales des virus adéno-associés (Schlehofer, 1994).

#### 1 Sensibilisation des cellules aux stress

Des cellules soumises à des agents génotoxiques initiateurs de la tumorigenèse (rayonnement UV, chaleur, MNNG) peuvent répliquer le génome viral, et ceci en l'absence de tout virus auxiliaire (Walz *et al.*, 1992). Les virus AAV semblent agir sur les cellules infectées en les sensibilisant à l'effet génotoxique des substances mutagènes par une inhibition de l'amplification de l'ADN génomique (Bantel-Schaal, 1991). Des lignées humaines de cellules tumorales ainsi que des cellules fraîchement isolées de tumeurs humaines infectées par AAV-2 semblent être

sensibilisées à l'action génotoxique des rayonnements  $\gamma$  et d'agents chimiothérapeutiques (Walz *et al.*, 1992; Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1996).

Ainsi, les virus adéno-associés semblent renforcer la toxicité intrinsèque des agents initiateurs et sont ainsi susceptibles de diminuer le risque d'apparition et de persistance de cellules engagées dans la voie de la transformation.

## 2 Perturbation du cycle cellulaire

L'infection par AAV-2 de cellules humaines ou de hamster inhibe la prolifération cellulaire (Winocour *et al.*, 1988; Bantel-Schaal et Stöhr, 1992) et conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et G2/M. Des données récentes ont montré que l'infection par AAV-2 de cellules de fibroblastes humains inhibe la phosphorylation de protéines appartenant à la famille pRB (rétinoblastome) et conduit ainsi au blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Hermanns *et al.*, 1997). Il a été montré que l'état de phosphorylation des protéines pRB joue un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères (Cobrinik *et al.*, 1992).

Par ailleurs, l'infection par AAV-2 de cellules tumorales fraîchement établies entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire comparé aux cellules tumorales parentales ou normales (Bantel-Schaal, 1990).

La perturbation du cycle cellulaire induite par le parvovirus AAV-2 semble donc altérer la croissance cellulaire des cellules tumorales.

## 3 Induction de la différenciation

L'infection par AAV-2 de cellules cancéreuses conduit à une réversion du phénotype indifférencié de ces cellules qui s'accompagne de changements d'expression de certaines protéines cellulaires (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). En effet, l'infection par AAV-2 de kératinocytes humains induit l'expression de marqueurs de différenciation (comme la cytokératine 10 et l'involucrine) et module l'expression de certains oncogènes cellulaires. On pourra citer, par exemple, une inhibition de la synthèse des protooncogènes c-myc et c-fos ou une augmentation de la synthèse de c-fos (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992).

Par ailleurs, des particules vides d'AAV-2 peuvent également induire la différenciation de cellules cancéreuses ou embryonnaires et s'accompagne également de changements d'expression de gènes, tout comme pour la différenciation cellulaire induite par des agents classiques (résultats présentés dans la deuxième partie). Il apparaît donc que l'une des étapes de détransformation induite par AAV-2 pourrait ne pas nécessiter l'intervention de séquences d'ADN viral mais impliquerait plutôt une cascade de signaux initiée par l'interaction entre la particule virale et son récepteur membranaire.

Les gènes *rep* sont directement impliqués dans la suppression d'événements associés à la carcinogenèse. En effet, les protéines Rep78/68 peuvent réguler l'expression de gènes viraux ou de protooncogènes et agissent le plus souvent en tant que répresseurs.

Des expériences de cotransfection ont montré que les gènes *rep* suppriment la transformation induite par BPV (bovine papillomavirus) sur des cellules murines (Hermonat, 1989) et ceci par activation de l'oncogène *H-ras* (Hermonat, 1991). La réplication d'autres virus appartenant à la famille des papillomavirus, comme HPV16, peut également être inhibée par AAV-2 (Hermonat, 1994b). La région régulatrice URR (upstream regulatory region) d'HPV16 est directement impliquée dans l'inhibition médiée par les protéines Rep (Hörer *et al.*, 1995), cependant aucun motif RBS n'a pu être identifié. Il semblerait donc que les protéines Rep78/68 ne se fixent pas directement sur le promoteur viral mais modulerait plutôt l'activité de ce dernier en interférant avec les facteurs généraux de la machinerie transcriptionnelle et/ou avec des facteurs de transcription interagissant spécifiquement avec ces régions promotrices (Hörer *et al.*, 1995).

Les protéines Rep78/68 sont aussi capables d'inhiber l'expression des gènes du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH) ainsi que sa réplication (Antoni *et al.*, 1991; Mendelson *et al.*, 1992; Rittner *et al.*, 1992; Oelze *et al.*, 1994). Contrairement aux exemples précédemment décrits, l'action inhibitrice des protéines Rep78/68 semble être médiée par leur fixation sur une séquence GCGC répétée présente au niveau des séquences répétées terminales (ou LTR, long terminal repeat) du génome du VIH et plus particulièrement dans la région régulatrice TAR (*trans*-activation response) (Batchu et Hermonat, 1995).

L'expression de certains protooncogènes peut également être modulée par les protéines Rep78/68.

Tout d'abord, ces protéines inhibent l'expression des protooncogènes *c-fos* et *c-myc* (Hermonat, 1994a). L'amplification de séquences d'ADN du protooncogène *c-fos* a été décrite dans des cancers du col de l'utérus (Riou *et al.*, 1984). En inhibant l'expression de ces oncogènes, les protéines Rep semblent donc interférer directement avec le processus de carcinogenèse.

Ensuite, l'inhibition de l'expression du protooncogène *c-Ha-ras* semble être directement exercée par les protéines Rep78/68 (Batchu *et al.*, 1994). En effet, des expériences de retard sur gel ont montré une interaction spécifique entre les protéines Rep78/68 et un motif GCTC répété, présent dans la séquence promotrice de ce gène (Batchu *et al.*, 1994). Cependant, pour l'instant aucun test fonctionnel n'a permis de montrer une régulation de ces promoteurs par les protéines Rep78/68.

Les protéines Rep78/68 sont également capables de transactiver certains promoteurs viraux et cellulaires. A l'heure actuelle, 2 exemples ont été décrits dans la littérature.

Premièrement, l'expression du protooncogène *c-cis* est activée par les protéines Rep78/68. La région promotrice de ce gène contient également un motif GCTC répété interagissant spécifiquement avec les protéines Rep68 (Wonderling et Owens, 1996).

Un mécanisme différent semble intervenir dans la transactivation des gènes précoces du cytomégalovirus humain (HCMV) médiée par les protéines Rep68 (Wonderling *et al.*, 1997b). Ces protéines pourraient interagir avec d'autres facteurs de transcription afin de transactiver le promoteur de HCMV, car ce dernier est dépourvu de motif GCTC répété. Ainsi, en augmentant l'effet cytopathique de HCMV (McPherson *et al.*, 1985), le parvovirus adéno-associé pourrait être un facteur modulateur dans la pathogénicité de HCMV.

Les mécanismes impliqués dans les activités antitransformantes et oncossuppressives des parvovirus adéno-associés doivent encore être élucidés. Cependant, l'interférence de ces virus avec le processus de carcinogenèse pourrait les promouvoir comme vecteurs de thérapie anticancéreuse.

## IV APPLICATIONS POTENTIELLES DES PARVOVIRUS ADENO-ASSOCIES

Les propriétés des parvovirus en font actuellement des vecteurs de choix pour une utilisation en thérapie génique mais aussi cellulaire.

### A Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire désigne l'ensemble des procédures dont l'objectif est d'utiliser des cellules à des fins thérapeutiques, à l'exception des modifications du génome. Les applications de la thérapie cellulaire concernent de nombreuses disciplines médicales (dermatologique, endocrinologie, neurologie, oncohématologie), les données sont les plus avancées l'oncologie. La recherche en oncologie s'est déployée suite à la découverte des oncogènes et des gènes supresseurs de tumeurs. La dérégulation de l'expression de ces gènes ou l'apparition de mutations géniques sont très souvent responsables de l'apparition de cancers. Ainsi, le concept de thérapie cellulaire visant à inhiber sélectivement les effets biologiques des protooncogènes apparaît très attrayant. Des molécules transdominantes inhibant l'expression génique ont été développées et sont basées soit sur l'inhibition des ARN (ARN antisens, ribozymes) soit sur celle des protéines (protéines transdominantes).

Ainsi, des oligonucléotides synthétiques (ARN antisens), interagissant spécifiquement avec l'ARNc, inhibent l'expression du gène cible. Les mécanismes mis en jeu semblent accélérer la dégradation des hybrides ARN sens/ARN antisens par la RNaseH. Cette stratégie a été utilisée afin d'inhiber la transcription du virus de l'immunodéficience humaine (Chatterjee *et al.*, 1992). Ainsi, un ARN antisens complémentaire de la région TAR du VIH et du signal de polyadénylation, cloné dans un vecteur adéno-associé, induit une répression de l'activité transcriptionnelle du VIH. De plus, l'expression de l'ARN antisens augmente la protection par une réduction de la production virale.

Une autre stratégie est basée sur l'utilisation des ribozymes qui clivent spécifiquement une molécule d'ARN par la reconnaissance d'un motif Rz propre à chaque ARN. Ainsi, des oligonucléotides codant des ribozymes spécifiques ont été clonés dans des vecteurs adéno-associés permettant ainsi d'inhiber l'expression des protooncogènes *H-ras* (Kashani *et al.*, 1992), *bcr-abl* (Snyder *et al.*, 1993a) ou des gènes précoces des virus HPV-16 ou 18 (Lowy *et al.*, 1994).

Afin de développer des traitements anticancéreux non toxiques et efficaces, de nouvelles approches doivent être développées et concernent entre autre l'utilisation de vecteurs viraux. Cependant, de nombreuses questions restent encore sans réponse quant à l'utilisation des vecteurs adéno-associés chez l'homme.

## B Thérapie génique

Le but de la thérapie génique consiste à corriger *in vivo* un gène non fonctionnel, chez des patients atteints d'une maladie héréditaire récessive. La correction de ce défaut génétique nécessite le transport d'un gène fonctionnel jusqu'à son tissu cible. L'utilisation d'un vecteur est impérative pour véhiculer l'ADN dans l'organisme humain et pour délivrer le matériel génétique au niveau du tissu cible.

Les vecteurs de thérapie génique doivent donc franchir différents obstacles avant de pouvoir exercer leurs effets thérapeutiques (Afione *et al.*, 1995). Tout d'abord, ces vecteurs doivent atteindre la surface cellulaire, puis pénétrer à l'intérieur de la cellule. Cette étape nécessite, pour les virus non-enveloppés, une interaction entre le vecteur et son récepteur membranaire. L'entrée du virus recombinant dans la cellule est donc limitée par la présence des récepteurs membranaires à la surface cellulaire. Enfin, le matériel génétique doit être transporté jusqu'au noyau où il peut s'intégrer ou persister sous une forme extrachromosomique.

Les vecteurs de thérapie génique disponibles à l'heure actuelle sont pour la plupart viraux. Ils exploitent les propriétés des rétrovirus, des adénovirus ou des virus adéno-associés pour pénétrer efficacement dans la cellule et y exprimer leur matériel génétique (Smith, 1995). Pour l'instant, aucun de ces vecteurs viraux ne possède toutes les qualités requises pour être utilisé en toute sécurité chez l'homme. Bien que des essais cliniques aient déjà été réalisés chez l'homme (Flotte *et al.*, 1994; Smith, 1995), l'utilisation de vecteurs viraux en thérapie génique reste encore à discuter. D'une façon indéniable, les vecteurs viraux disponibles à l'heure actuelle devront être améliorés; voire même remplacés par des vecteurs non viraux.

Les caractéristiques des trois principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont résumées dans le tableau 6.

### 1 Les vecteurs rétroviraux

Les rétrovirus ne peuvent effectuer leur cycle répliatif que dans des cellules en division active (hormis pour le VIH), limitant ainsi leurs applications (Smith, 1995). L'inconvénient majeur des recombinants rétroviraux repose sur l'intégration aléatoire des séquences rétrovirales dans l'ADN génomique, ayant pour conséquence un risque élevé d'induction de mutations au sein du génome cellulaire. Cependant, après son intégration dans l'ADN cellulaire, l'ADN viral est maintenu de façon stable permettant ainsi une expression à long terme du recombinant. Par ailleurs, la production de stocks de vecteurs recombinants en grande quantité représente un atout majeur pour ces vecteurs (Smith, 1995).

|                                  | rétrovirus            | adénovirus  | virus adéno-associés  |
|----------------------------------|-----------------------|---|---|
| génomé                           | ARN simple brin       | ADN double brin   | ADN simple brin   |
| taille insert                    | 10 kb                 | 10 kb   | 5 kb  |
| cellules                         | cellules en division  | cellules en division<br>en phase stationnaire             | cellules en division<br>en phase stationnaire                     |
| persistance du<br>génomé         | intégration aléatoire | épisode   | intégration spécifique (virus)<br>intégration spécifique?(rAAV-2) |
| risque de mutation               | +++                   | -   | ?   |
| durée de l'expression            | long terme            | court terme<br>répétitions des dosages                    | long terme  |
| titre des stocks<br>recombinants | élevé                 | élevé<br>10 <sup>12</sup> particules/ml                   | faible<br>10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> particules/ml          |
| toxicité                         | ND                    | réaction inflammatoire<br>réponse cytotoxique<br>apoptose | ND  |
| stabilité du virion              | fragile               | stable  | très stable   |

ND: non déterminé

**Tableau 6:** Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique (d'après Smith *et al.*, 1995)

## 2 Les vecteurs adénovirus

Les principaux avantages des adénovirus recombinants reposent sur l'infection de cellules en phase stationnaire et sur l'obtention de titres élevés de particules recombinantes (Smith, 1995). Cependant, la persistance de l'ADN recombinant sous une forme épisomale conduit à une expression transitoire du gène recombinant ce qui nécessite des injections répétées des vecteurs. De plus, l'infection par un adénovirus provoque non seulement des réponses inflammatoire et cytotatique mais induit également l'apoptose des cellules infectées (Smith, 1995).

## 3 Les vecteurs adéno-associés

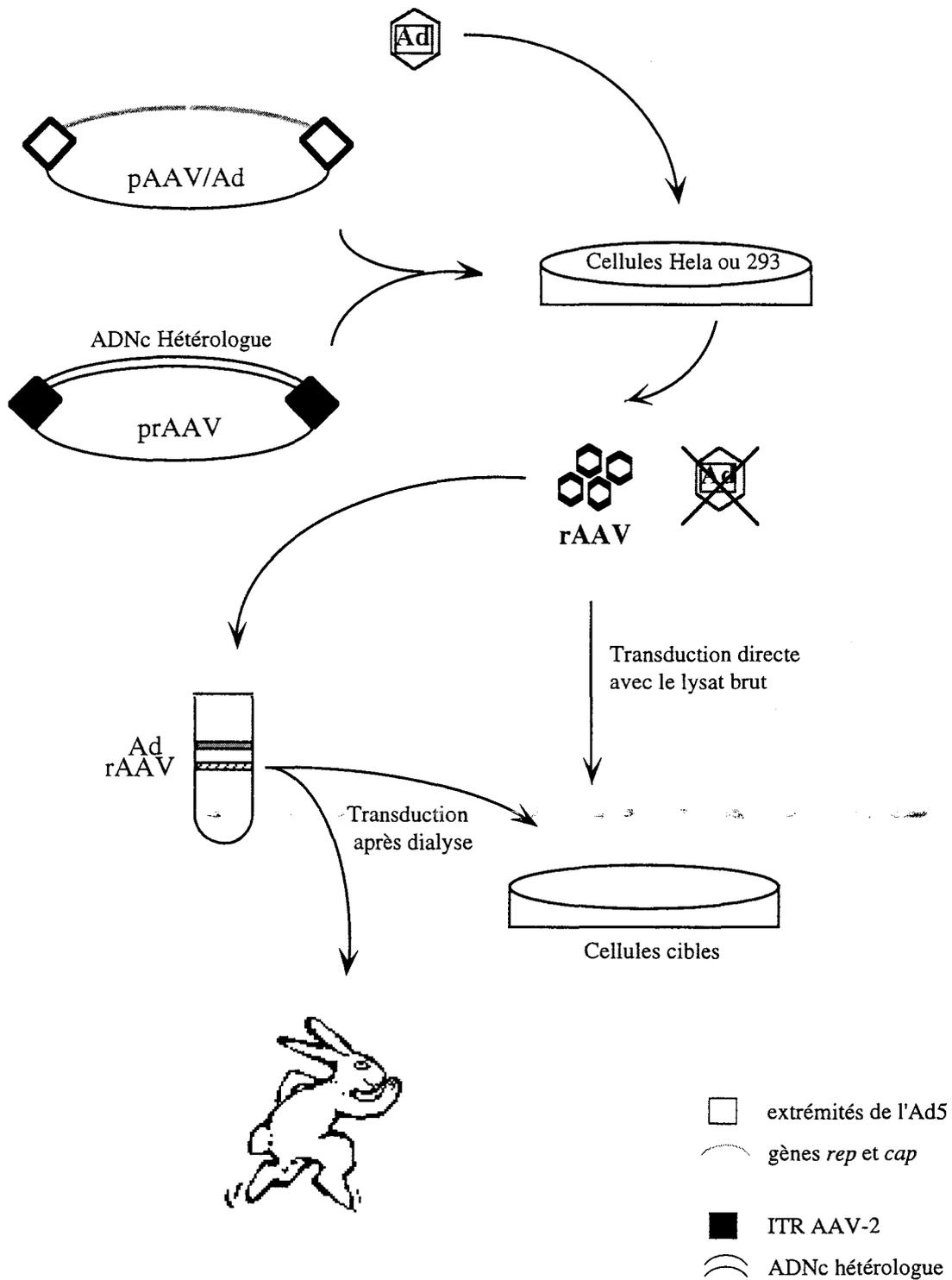
Les propriétés d'intégration du parvovirus AAV-2 en font actuellement un vecteur de choix pour la thérapie génique (Muzyczka, 1992). En effet, contrairement aux rétrovirus, le virus AAV-2 est capable de s'intégrer dans un site préférentiel localisé sur le chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1991; 1992; Samulski *et al.*, 1991). Par ailleurs, à l'heure actuelle aucune pathologie humaine n'a été associée à ce virus.

Cependant, des travaux récents ont permis de détecter le parvovirus AAV-2 dans des tissus génitaux humains et dans du matériel provenant d'avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994; Malhomme *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997a), suggérant que ces tissus constituent une cible naturelle pour l'infection par AAV-2. La présence de séquences virales intégrées dans le génome humain pourrait conduire à une recombinaison entre les séquences du vecteur recombinant et celles du virus sauvage. Afin de limiter ce risque, les recombinants utilisés ne possèdent que les extrémités virales pour toute séquence parvovirale.

L'identification d'organe(s) cible(s) d'AAV-2 demeure néanmoins essentielle avant toute utilisation de ce vecteur en thérapie génique.

### 3.1 Production des vecteurs recombinants

La production de vecteurs recombinants AAV apparaît en théorie très simple (figure 21) (Trempe, 1996). Dans le plasmide vecteur, tous les gènes viraux sont éliminés et remplacés par le gène d'intérêt encadré par les 2 extrémités virales (ITR). La production de vecteurs recombinants est ensuite obtenue en cotransfectant ce plasmide recombinant avec un second plasmide dépourvu des séquences terminales mais contenant les gènes *rep* et *cap*. Les cellules sont alors infectées par un adénovirus conduisant ainsi à la réplication puis à l'encapsidation du vecteur recombinant. Le virus auxiliaire est également répliqué, mais éliminé par la suite lors des étapes de purification du vecteur recombinant. Il est important de noter que l'absence des 2 extrémités virales, dans le plasmide portant les gènes *rep* et *cap*, empêche toute encapsidation du génome viral. Ainsi, seul le plasmide recombinant peut être encapsidé. De plus, afin d'éviter toute recombinaison, les 2



**Figure 21:** Stratégie pour la production de vecteurs recombinants AAV (Trempe, 1996)

plasmides ne doivent partager aucune séquence parvovirale. En effet, les premiers recombinants possédaient de grandes homologies de séquence avec le plasmide contenant les gènes *rep* et *cap*. Une encapsidation majoritaire du virus sauvage était alors observée, au détriment du vecteur recombinant (Tratschin *et al.*, 1985; La Face *et al.*, 1988; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988).

A l'heure actuelle, les protéines Rep et VP ne sont apportées que transitoirement en *trans*. Pour l'instant, la constitution de lignées stables d'encapsidation s'est soldée par un échec, car les protéines Rep et VP ont un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. La production de vecteurs recombinants AAV donne de faible titre ( $10^6$  particules/ml) en comparaison avec le virus sauvage ( $10^{11}$  particules/ml).

La taille du transgène, pouvant être insérée entre 2 ITR, est un facteur limitant pour les applications possibles de ces virus. En effet, une encapsidation efficace nécessite une molécule d'ADN ayant une taille comprise entre 3,2 et 5,1 kb.

### 3.2 Infections

La possibilité d'infecter des cellules au repos, contrairement aux rétrovirus, est l'un des points forts de ces vecteurs (Podsakoff *et al.*, 1994). Les recombinants AAV-2 peuvent tout aussi bien transduire des cellules primaires que des lignées cellulaires établies d'origine humaine, simienne ou murine (Zhou *et al.*, 1993; Goodman *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). Des gènes rapporteurs ont tout d'abord été introduits dans des vecteurs AAV conduisant à une expression satisfaisante du transgène (Hermonat et Muzyczka, 1984b; Tratschin *et al.*, 1984b). Ces premiers résultats ont permis de développer par la suite d'autres recombinants plus sophistiqués pour transduire des gènes dont l'altération entraîne de graves maladies chez l'homme. On pourra citer, entre autre, le développement de vecteurs recombinants ayant comme passager l'ADNc de la  $\beta$ globine ( $\beta$ thalassémies) (Ohi *et al.*, 1989; Dixit *et al.*, 1991), le gène du CFTR (cystic fibrosis conductance regulatory) (mucoviscidose) (Ohi *et al.*, 1989; Dixit *et al.*, 1991; Flotte *et al.*, 1993a; 1993b) ou de la tyrosine hydroxylase de type II (maladie de Parkinson) (Kaplitt *et al.*, 1994). Des travaux de plus en plus nombreux, utilisant des recombinants AAV pour transduire différents gènes, sont relatés dans la littérature.

### 3.3 Intégration

Les caractéristiques concernant l'intégration de quelques recombinants AAV-2 sont résumées dans le tableau 7.

L'intégration ciblée du génome d'AAV-2 dans la séquence AAVSI (localisée sur le chromosome 19) constitue en théorie un des atouts majeurs pour l'utilisation des recombinants AAV en thérapie génique. Cependant, il s'avère que ces vecteurs, contenant uniquement les ITR

| gène rapporteur | génom viral | cellule       | MOI             | % de rAAV intégré dans l'ADNg | % rAAV intégré dans le chr 19 |   | expression             | références                          |
|-----------------|-------------|---------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|---|------------------------|-------------------------------------|
|                 |             |               |                 |                               | PCR ou SB                     | FISH  |                        |                                     |
| CMV-LacZ        | ITR         | 293           | 10 <sup>5</sup> |                               | 0% (PCR)                      |   | 2 j: 95%<br>13 j: 2%   | Surosky <i>et al.</i> ,<br>1997     |
| CMV-LacZ        | ITR-Rep     | 293           | 10 <sup>5</sup> |                               | 0% (PCR)                      |   | 2 j: 95%<br>4 j: 5-10% |                                     |
| CMV-LacZ        | ITR-Rep     | 293           | 10 <sup>5</sup> | 24% (7/29) SB                 | 85% (6/7) SB                  | 40% (2/5): 19q1.3<br>40% (2/5): ?<br>20% (1/5): 19p | 60j: 100%              |                                     |
| néo             | ITR-Rep     | HeLa<br>+G418 | ND              |                               | 66% (4/6) SB                  |   |                        | Shelling <i>et al.</i> ,<br>1997    |
| néo             | ITR-Rep     | 293<br>+G418  | ND              |                               | 82% (14/17) SB                |   |                        |                                     |
| NGFR            | ITR         | K562          | 1,3             |                               |                               |   | 4j: 34,8%<br>60j: 3,5% | Malik <i>et al.</i> ,<br>1997       |
| NGFR            | ITR         | K562          | 130             |                               |                               |   | 4j: 94%<br>60j: 62%    |                                     |
| NGFR            | ITR         | K562          | 1,3 DL          | 2%                            |                               |   |                        |                                     |
| NGFR            | ITR         | K562          | 130 DL          | 49%                           |                               |   |                        |                                     |
| Néo             | ITR         | KB            | 1               | 100%(10/10)                   | 0%                            |   |                        | Ponnazhagan <i>et al.</i> ,<br>1997 |
| Néo             | ITR-Rep     | KB            | 1               | 100%                          | 0%                            | 0%  |                        |                                     |
| CFTR            | ITR         | CF            | 500 DL          |                               |                               | 19 clones: chr 19<br>12 clones: ≠ chr 19            |                        | Kearns <i>et al.</i> ,<br>1996      |
| Néo             | ITR         | 293           | ND              |                               | 0%                            |   |                        | Balagué <i>et al.</i> ,<br>1997     |
| Néo             | ITR-Rep     | 293           | ND              |                               | 62%(5/8)                      |   |                        |                                     |
| GFP             | ITR         | 293           | ND              |                               | 0%                            |   | 14j: 5,3%              |                                     |
| GFP             | ITR-Rep     | 293           | ND              |                               | 55%(5/9)                      |   | 14j: 47%               |                                     |

ND: non déterminé DL: dilution limite

Tableau7: Caractéristiques des recombinants AAV-2

pour toute séquence virale, s'intègrent au hasard dans l'ADN génomique de cellules primaires ou de lignées cellulaires humaines (Kearns *et al.*, 1996; Ponnazhagan *et al.*, 1997; Surosky *et al.*, 1997). Néanmoins, l'apport des protéines Rep conduit à une intégration ciblée de l'ADN recombinant dans la séquence AAVSI, mais nécessite des infections à des multiplicités élevées (variant de  $10^2$  à  $10^5$  particules/cellule) (Shelling et Smith, 1994; Kearns *et al.*, 1996; Balagué *et al.*, 1997; Surosky *et al.*, 1997). En effet, malgré l'apport en *cis* des séquences *rep*, Ponnazhagan et collaborateurs n'ont pu détecter l'intégration du gène *neo* dans la séquence AAVSI et ceci après une infection par une particule par cellule (Ponnazhagan *et al.*, 1997).

Récemment, des résultats obtenus avec les recombinants AAV sont à rapprocher de ceux obtenus, par Giraud et collaborateurs, avec le vecteur navette décrit précédemment. En effet, Surosky et collaborateurs ont montré, en présence des protéines Rep, une intégration des séquences LacZ dans le motif RBS de la séquence AAVSI (au nt 419) (Surosky *et al.*, 1997). Une seconde jonction impliquant les séquences AAVSI et LacZ n'a pu être détectée; cette jonction fait intervenir trois séquences d'ADN différentes. En effet, l'ITR du recombinant est intégré dans une séquence de 20 nucléotides, présentant une homologie de 100% avec les séquences Alu (hautement répétées dans le génome humain). Cette séquence Alu est alors associée à une séquence ne présentant aucune homologie avec les séquences connues. De plus, ces mêmes auteurs ont analysé, par "Southern Blot", 5 clones montrant une intégration des séquences LacZ dans le site AAVSI. L'analyse de ces mêmes clones par FISH a conduit à un résultat complètement différent. Il s'avère que pour 2 clones les séquences LacZ sont effectivement intégrées sur le bras long du chromosome 19, à proximité ou dans le site AAVSI. Un troisième site d'intégration a été localisé sur le bras court du chromosome 19 alors que le chromosome impliqué dans l'intégration n'a pu être identifié pour les 2 derniers recombinants. Initialement, les 2 extrémités du plasmide étaient peut être associées à la séquence AAVSI, puis par un mécanisme inconnu le plasmide s'est ensuite intégré dans un autre locus. Ces réarrangements pourraient également être indépendants de toute intégration et résulter de l'activité des protéines Rep.

Enfin, en comparant les profils de digestion obtenus à partir d'un même clone cellulaire sur 2 passages différents, Shelling et collaborateurs ont observé des différences dans la migration des fragments représentant une intégration du génome recombinant dans la séquence AAVSI (Shelling et Smith, 1994).

### 3.4 Expression *in vivo*

Ces dernières années, des modèles animaux ont été développés afin de tester, *in vivo*, l'expression des transgènes. Ainsi, l'infection de cellules neuronales de rat adulte par des recombinants AAV a permis de détecter une expression du gène de la tyrosine hydroxylase 2 à 3 mois après l'injection du vecteur (Kaplit *et al.*, 1994). Une expression stable du gène du CFTR a également été décelée 6 mois après l'infection de lapins (Flotte *et al.*, 1993b) ou de singes (Conrad

*et al.*, 1996) par un vecteur CFTR recombinant. En l'absence des séquences *rep*, aucune intégration n'a pu être détectée dans le génome simien et le transgène est maintenu sous une forme épisomale (Conrad *et al.*, 1996). L'analyse des tissus simiens n'a révélé aucune inflammation, néoplasie ou destruction tissulaire suggérant une relative sécurité quant à l'utilisation, *in vivo*, des recombinants AAV sous forme épisomale (Conrad *et al.*, 1996).

### 3.5 Problèmes posés par l'utilisation des recombinants AAV

- Les stocks de vecteurs recombinants contiennent toujours des quantités significatives de particules adénovirales dont la présence peut gêner l'interprétation des résultats expérimentaux concernant l'efficacité des vecteurs. L'obtention de cellules d'encapsidation (cellules "emballeuses") permettrait de résoudre ce problème.

- Des données de séroépidémiologie ont montré que 80% de la population est séropositive pour AAV2 (Mayor *et al.*, 1976); cependant, le pourcentage de la population possédant des anticorps neutralisants demeure inconnu. L'introduction de recombinants AAV par voie intraveineuse pourrait ainsi se solder par une neutralisation de ces particules recombinantes et mener à un échec de l'effet thérapeutique recherché. L'administration de recombinants AAV pourrait donc se faire directement au niveau de l'organe cible.

De plus, cette forte prévalence laisse présager une persistance du génome viral dans l'organisme humain. Il est également intéressant de noter que certains tissus peuvent être infectés à la fois par AAV-2 et par l'un de ses virus auxiliaires. Par exemple, la sphère génitale peut être le siège d'une infection par AAV-2 et HPV16 (Walz *et al.*, 1997a). D'autre part, les adénovirus possèdent un tropisme pour les voies aériennes supérieures alors que les liquides broncho-alvéolaires ont été détectés positifs pour la présence de séquences d'AAV-2 (Malhomme *et al.*, 1997). Quelles seraient alors les conséquences d'une infection par un virus auxiliaire d'AAV-2 sur l'expression d'un transgène intégré dans l'ADN cellulaire?

Si le génome viral est intégré dans la séquence AAVSI, qu'advierait-il du transgène au cours d'un traitement thérapeutique utilisant un vecteur recombinant AAV-2? Si les motifs RBS et trs persistent au niveau de la jonction, le transgène pourrait alors s'intégrer soit dans la séquence AAVSI soit dans le génome viral. Par contre, si l'un de ces motifs est délété au cours de l'intégration du génome viral, il semblerait alors que le transgène ne puisse s'intégrer dans l'ADN cellulaire. A l'heure actuelle, les jonctions caractérisées suite à l'intégration des séquences virales dans l'ADN génomique (cellules infectées de façon latente par AAV-2 ou utilisation d'un vecteur navette) ont révélé, dans la majorité des cas analysés, la persistance d'au moins un motif RBS et trs (Kotin et Berns, 1989; Samulski *et al.*, 1991; Giraud *et al.*, 1995). Cependant, dans quelques rares cas, ces motifs ne sont pas présents au niveau de la jonction (Kotin et Berns, 1989; Giraud *et al.*, 1995). Nous avons également décrit que l'activité transcriptionnelle des promoteurs viraux est réprimée au cours d'une infection latente. Ainsi, il semble intéressant de déterminer si l'intégration

d'un transgène, à proximité d'une séquence virale déjà intégrée dans la séquence AAVSI, peut moduler l'expression de gènes viraux.

- L'intégration ciblée du génome recombinant dans la séquence AAVSI nécessite la présence des protéines Rep78/68 (Weitzman *et al.*, 1994) qui possèdent, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses activités. Elles sont, entre autre, capables de moduler l'expression de gènes cellulaires (Batchu *et al.*, 1994; Hermonat, 1994a; Wonderling et Owens, 1996) mais peuvent aussi s'hétérodimériser avec des protéines cellulaires (Hermonat *et al.*, 1997b). L'apport de ces protéines Rep pourrait donc perturber l'activité cellulaire et se révéler toxique pour la cellule.

Ensuite, l'intégration du génome viral ou recombinant dans l'ADN cellulaire induit non seulement des remaniements au niveau de la séquence AAVSI mais aussi au niveau du gène viral ou du transgène (Kotin et Berns, 1989; Giraud *et al.*, 1995; Surosky *et al.*, 1997).

Les remaniements créés dans le transgène, au cours de l'intégration des séquences recombinantes, pourraient conduire à une alteration de ce gène et à sa non fonctionnalité.

Les remaniements cellulaires et l'instabilité de la région AAVSI, observés lors de l'intégration des séquences virales (Giraud *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 1996a), méritent de plus amples investigations. Il apparaît indispensable d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la genèse de ces remaniements. Une discrimination devra être effectuée entre l'événement d'intégration par lui-même et le rôle des protéines Rep78 au cours de l'intégration.

Par ailleurs, un ARN AAVSI d'une longueur de 1 kb a été isolé à partir d'une cDNAthèque de fibroblastes humains (Kotin *et al.*, 1992). Cependant, aucun site de polyadénylation et aucune région régulatrice n'ont été détectés suggérant que cet ARNm n'a pas encore été caractérisé dans sa totalité. Enfin, une phase ouverte de lecture putative de 95 acides aminés est contenue dans cet ADNc; toutefois aucune protéine AAVSI n'a été identifiée à l'heure actuelle. Il apparaît donc indispensable d'obtenir des informations supplémentaires concernant l'activité transcriptionnelle de cette région AAVSI.

Enfin, l'intégration de séquences virales ou recombinantes dans le génome humain préserve toujours l'intégrité d'une copie AAVSI (Kotin et Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991; Shelling et Smith, 1994; Ballagué *et al.*, 1997; Surosky *et al.*, 1997). Cette observation suggère donc soit une incapacité du génome viral ou recombinant à pouvoir s'intégrer dans toutes les séquences AAVSI, soit une létalité cellulaire induite par la destruction de la totalité des séquences AAVSI. Si la séquence AAVSI se révèle indispensable pour la survie cellulaire, il apparaît alors peu souhaitable d'envisager une intégration ciblée des transgènes dans ce site.

Dans l'état actuel de nos connaissances et avant toute utilisation des vecteurs adéno-associés en thérapie génique, il apparaît donc indispensable d'acquérir de plus amples informations sur l'intégration des séquences virales et recombinantes dans le génome humain, la persistance des séquences virales dans l'organisme humain et les tissus cibles du virus AAV-2.

L'avenir des vecteurs adéno-associés en tant qu'agents thérapeutiques demeure donc encore incertain.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **ARTICLE I**

**Particle-mediated expression of differentiation-associated antigens in  
parvovirus-infected HaCat cells**

## I Résumé

L'intérêt fondamental des parvovirus a été suscité par leur aptitude à tuer sélectivement la plupart des cellules transformées. Ces virus possèdent à la fois des propriétés oncosuppressives *in vivo* et inhibent la transformation cellulaire *in vitro* (Rommelaere et Tattersall, 1990 ; Schlehofer, 1994). Les parvovirus adéno-associés perturbent le déroulement du cycle cellulaire (Bantel-Schaal et Stöhr, 1992; Hermanns *et al.*, 1997; Winocour *et al.*, 1988) et induisent la différenciation de lignées cellulaires humaines et murines (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). Cette induction de la différenciation pourrait être impliquée dans les propriétés oncosuppressives de ces virus. Ainsi, la différenciation de cellules tumorales, cellules fortement indifférenciées, pourrait conduire à la perte du phénotype tumoral.

Afin de déterminer si l'induction de la différenciation médiée par AAV-2 dépend de la réplication virale ou de l'expression de gènes viraux, nous avons choisi d'utiliser, comme modèle expérimental, une lignée cellulaire de kératinocytes humains immortalisés (HaCat). En effet, l'infection de ces cellules par AAV-2 conduit à l'expression de 2 marqueurs de la différenciation kératinocytaire, à savoir l'involucrine et la cytokératine 10 (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). Pour répondre à cette question, nous avons infecté des cellules HaCat par des particules virales dépourvues de l'ADN des parvovirus H-1PV ou AAV-2; par ailleurs, ces capsides ont été au préalable irradiées aux UV.

Ainsi, nous avons mis en évidence, par immunofluorescence et Western Blot, une expression de la cytokératine 10 et de l'involucrine après infection des cellules HaCat par des particules vides (H-1PV ou AAV-2). Cette induction de différenciation semble être spécifique des parvovirus H-1PV et AAV-2, car l'infection des cellules HaCat par un adénovirus, irradié aux UV, n'entraîne aucune différenciation kératinocytaire.

Il apparaît donc que la réplication ou l'expression de gènes viraux ne semble pas requise pour l'induction de la différenciation des cellules HaCat. Une interaction entre la membrane cellulaire et la particule virale semble être suffisante pour activer toute une cascade de signaux intracellulaires conduisant ainsi à la différenciation cellulaire.

## Particle-mediated expression of differentiation-associated antigens in parvovirus-infected HaCaT cells

Petra KLEIN-BAUERNSCHMITT <sup>1,\*</sup>

Nathalie DUTHEIL <sup>2</sup>

Jürgen KLEINSCHMIDT <sup>1</sup>

Thierry DUPRESSOIR <sup>2</sup>

Jörg R. SCHLEHOFER <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Deutsches Krebsforschungszentrum, FS Angewandte Tumorstudiologie

Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

Phone : (49) 6221 - 42 49 75

Fax : (49) 6221 - 42 49 62

<sup>2</sup> Unité d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur de Lille

1, rue Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

Phone : (33) 20 87 77 29

Fax : (33) 20 87 79 08

---

\* corresponding author

*Key words:* parvovirus, adeno-associated virus, H-1 virus, HaCaT cells,  
keratinocytes, differentiation

*Running title:* Parvovirus particle-mediated cell differentiation

### Abstract

Cultured cells of human and mouse origin had been shown to be induced to express differentiation-associated proteins after infection with the human parvovirus, adeno-associated virus type 2 (AAV-2). To analyse whether the induction of synthesis of differentiation-related antigens is dependent on the presence or replication of parvoviral DNA or on transcription of viral genes, we investigated cells of the human keratinocyte cell line, HaCaT for expression of cytokeratin 10 and involucrin after inoculation with uv-inactivated AAV-2, empty viral particles of AAV-2 and uv-irradiated parvovirus H-1 empty particles. Using immunofluorescence and immuno blot analyses, it could be demonstrated that differentiation-associated antigens are expressed after exposure to parvoviruses devoid of infectious DNA. The number of cells accumulating these antigens was increasing with time after inoculation. These data indicate that induction of differentiation-linked antigens does not require synthesis of viral macromolecules nor viral DNA and may rather be mediated by an interaction of parvoviral particles with the cellular membrane.

## Introduction

Parvoviruses exhibit tumor suppressive properties *in vivo* and inhibit cellular transformation *in vitro* reviews (Rommelaere & Cornelis, 1991; Schlehofer, 1994) The human helper virus-dependent parvovirus, adeno-associated virus (AAV) has been shown to perturb the cell cycle (Klein-Bauernschmitt et al., 1992; Winocour et al., 1988) and to induce differentiation-associated antigens in human keratinocytes, in cells of the leukaemia line, HL60, in murine embryonic stem cells and in teratocarcinoma cell lines (Botquin, 1994; Botquin et al., 1993; Klein-Bauernschmitt, et al., 1992) Induction of differentiation may be involved in the tumor suppressive properties of parvoviruses and also in the developmental perturbances observed in young animals from different species, infected with autonomous parvoviruses either *in utero* or up to 4 days after birth review (Siegl et al., 1985) . A similar effect on development has recently also be shown in mouse embryos infected with AAV (Botquin et al., 1994) and may be involved in the association of AAV with early abortion in humans (Tobiasch et al., 1994)

## Methods

*Virus* : Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) was propagated in HeLa cells using adenovirus type 2 (Ad2) as a helper. When Ad2-induced cytopathic effect was complete, cells were lysed by freeze-thawing and centrifuged in a SS-34 rotor (Sorvall, Du Pont, Wilmington, USA) at 22,000 rpm for 3h. Virus was extracted from the pellets by the deoxycholate-trypsin method (Rose, 1974) and AAV-2 virions were separated from Ad2 virions by equilibrium centrifugation through a CsCl gradient, as described previously (de la Maza & Carter, 1980) To obtain infectious AAV-2, the band of 1.41 g/cm<sup>3</sup> was collected (adenovirus type 2 was banded at 1.35 g/cm<sup>3</sup>). Empty AAV-2 capsids were obtained by infecting HeLa cells with AAV-2 (m.o.i.  $1 \times 10^{3-4}$  p.f.u./cell) and superinfection with adenovirus type 2. After four days, empty viral capsids were obtained from the 1.32 g/cm<sup>3</sup> fraction of the CsCl gradient and controlled with electron microscopy. As a control, titration of virus particles was performed as described for uv-inactivation (see below) revealing the absence of replication-competent virus.

AAV-2 was dialysed against 0.3 M NaCl, 50 mM TRIS-HCl pH 8.0 and heated to 56°C for 30 min to inactivate any residual infectious Ad2. The titer of purified AAV-2 was determined by dot-blotting of AAV+Ad2 - infected HeLa cultures on nylon membranes (Gene-Screen, Du Pont-NEN, Dreieich, Germany) followed by hybridisation with radiolabeled AAV-2 DNA as described elsewhere (Bantel-Schaal & zur Hausen, 1988). Infection of cells with AAV-2 (m.o.i.: 10 p.f.u./cell) was performed by inoculating phosphate-buffered saline (PBS)-washed cells for 30 min at 37°C. Infected cells were washed twice with PBS in order to remove unadsorbed virus and were cultured in appropriate culture medium. Controls were done using as "mock infection" a dialysed fraction of 1.41 g/cm<sup>3</sup> collected from a CsCl containing only adenovirus type 2 (heat-inactivated).

H-1 parvovirus was propagated in NB-E cells and purified according to Tattersall et al. (Tattersall et al., 1976) Since H-1 full virions replicate in HaCaT cells inducing a cytopathic effect (Chen et al., 1989) the fraction of a buoyant density of 1.32 g/cm<sup>3</sup> (CsCl) corresponding to empty particles (full particles: buoyant density 1.42 g/cm<sup>3</sup>) was recovered.

Empty particles were uv-inactivated (irradiation at  $7.5 \text{ J/m}^2/\text{s}$ ) and inoculation onto cells was performed for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  (the number of particles/cell was determined by haemagglutinating units according to (Toolan, 1967)) to determine the number of non infectious virus particles. To analyse the efficiency of uv-inactivation of AAV-2, HaCaT cells were inoculated with irradiated AAV-2 (irradiation at  $7.5 \text{ J/m}^2/\text{s}$ ) and super infected with adenovirus type 2 as a helper. After four days, cells were transferred onto nylon membranes using a dot blot apparatus (Schleicher & Schüll, Dassel, Germany). After lysis of the cells and denaturation of DNA in lysis buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), filters were hybridised with cloned AAV-2 DNA (pTAV-2 (Heilbronn et al., 1990)), radiolabeled by random priming (Feinberg & Vogelstein, 1984) Autoradiographs of the dot-blot revealed that uv-inactivated virus was not replicated, whereas replication of AAV-2 occurred in HaCaT cells infected with intact virions after superinfection with helper virus (Fig. 2A).

The replicative capacity of H-1 full virus, empty particles and uv-irradiated samples thereof were tested by inoculating Hela indicator cells with the respective virus particles. Virus replication was monitored after probing of the dispersed cell assays according to Chen et al. (Chen, et al., 1989) Autoradiographs of the filters revealed that only full H-1 virus was replicated (Fig. 2B)

Two different doses of particles/cell were used in the experiments with HaCaT cells: uv-irradiated AAV-2, 10 and 100 particles/cell; uv-irradiated H-1 empty particles, 1 and 10 particles/cell, respectively.

#### *Competition with anti-AAV monoclonal antibodies*

Prior to inoculation, the virus particles (100 particles / cell) were pre-incubated during 30 min with monoclonal antibody (mAb) containing hybridoma supernatants (B1, B21, VP87) raised against the AAV-2 capsid proteins VP1, VP2 and VP3. As a control, cells were exposed to uv-inactivated Adenovirus type 2 (100 or 1000 particles/cell, as indicated in figure 1). Cells were harvested and prepared for SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (Laemmli, 1970) 4 days after infection.

### *Western blots*

AAV-2- or mock-infected cells were lysed in a protein sample buffer (5% SDS, 5 mM TRIS-HCl, 200 mM DTT, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue), and proteins were separated through an SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schüll, Dassel, Germany) and incubated for three hours with mAb against cytokeratin 10 (BioScience, Emmenbrügge, Switzerland), then washed five times with TBST (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl) and incubated for one hour with alkaline phosphatase- labeled, goat anti-mouse antibodies (Dianova, Hamburg, Germany), diluted 1 : 5000 in TBST. After three additional washings, cytokeratin 10 protein was analysed by staining with BCIP/NBT (Sigma, Deisenhofen, Germany).

For immuno blot analysis of H-1-inoculated cells, cytosolic extracts were prepared, at different times after exposure to the uv-irradiated H-1 capsids, with 10% TRIS-HCl-buffered glycerol, 5%  $\beta$ -Mercapto Ethanol, 2% SDS and 0.1% bromophenol blue. Protein concentration was determined using the Biorad protein microassay method (Biorad). Extracts (30  $\mu$ g protein/lane) were subjected to SDS-PAGE (8% or 10% polyacrylamide) and transferred onto nitrocellulose. To inhibit non-specific binding of antibodies, nitrocellulose was incubated for 2 h at 37°C in PBS containing 10% milk powder and 0.05% Tween 20 (D buffer) prior to incubation with specific antibodies (mouse anti-CK 10 [1/50] from Boehringer (Boehringer Mannheim, Germany) or rabbit anti-involucrin [1/50] from Dianova, respectively). After washing with D buffer, the appropriate second antibodies (rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit [1/100], respectively) were applied for 1 h at 37°C (same dilution buffer as above). After washing, the blots were incubated with  $^{125}$ I-labelled protein A (NEN Products, Les Ulis, France) in 3% milk powder / 0,05% Tween 20 for 3 h, followed by washing and drying prior to autoradiography.

Films were analysed for band intensities with the Bio-Profil application (Vilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and relative quantifications were established taking into account the band intensity corresponding to uninfected cells at each time.

### *Immunofluorescence*

Cells were grown on glass cover slips, fixed with methanol (-20°C) and acetone (-20°C). After rehydration with PBS, cells were incubated with mAb against CK 10 for 1 h, washed five times with PBS, followed by incubation with FITC-labelled goat anti-mouse antibody (Dianova) and a final washing with PBS.

Immunofluorescence analysis on the expression of CK 10 and of involucrin in HaCaT cells inoculated with uv-irradiated empty capsids of H-1 was performed as described above with the modification that acetone-fixed cells were washed with solution A (5 mM Pipes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, in PBS), and permeabilised with Triton X-100 for 10 min prior to incubation with antibodies (polyclonal rabbit antibodies to involucrin [Dianova]; FITC-conjugated swine anti-rabbit IgG [Dako, Hamburg, Germany]). Cells were mounted, and immunofluorescence analysis was performed using a Leitz fluorescence microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) with appropriate filters. The onset of differentiation-associated antigens was monitored 24h, 48h and 72h after exposure to virus particles. To determine the number of cells expressing differentiation-associated antigens, at least 500 cells were analysed in each experiment.



## Results

To assess whether parvovirus-mediated induction of expression of differentiation-associated proteins is dependent on viral DNA replication or viral gene expression, we performed experiments using cells of the differentiation competent, immortalised human keratinocyte line, HaCaT which had previously been shown to express cytokeratin 10 (CK 10) and involucrin after infection with AAV type 2 (AAV-2) (Klein-Bauernschmitt, et al., 1992) Involucrin and cytokeratin 10 are highly specific markers of differentiation in HaCaT cells (Boukamp et al., 1988; Breitzkreutz et al., 1989; Moll et al., 1982; Ryle et al., 1989)

To ascertain that infection with AAV-2 induces synthesis of CK 10, we infected HaCaT cells with purified AAV-2 virions and with AAV-2, incubated for 30 min with different concentrations of antibodies against AAV-2 capsid proteins (Ruffing et al., 1994)

Infection of HaCaT cells with AAV-2 virions incubated with decreasing amounts of the anti-capsid monoclonal antibodies (mAbs B1, B21, VP87) prior to infection, resulted in an increasing expression of CK 10 (Fig. 1) demonstrating that the synthesis of this differentiation-specific antigen was induced by the virus. Surprisingly, the sole addition of the antibodies B1 and VP87 (Fig. 1) or of rabbit anti AAV-2 polyclonal serum (data not shown) also induced a faint expression of CK10 suggesting that the binding of some components of serum or hybridoma supernatants to the cellular membrane can trigger similar modifications as the binding of the virus. However, the monoclonal antibody B21, which did not by itself induce expression of CK 10 (Fig. 1) specifically inhibited the AAV-mediated synthesis of CK 10. The nature of serum- or hybridoma-induced CK 10 expression is not clear, but the antibody- and virus-induced accumulations of the marker (CK 10) are not additive (Fig. 1). This demonstrates the specificity of the virus-mediated CK induction and excludes a protein concentration effect, notably since the addition of higher amounts of mAbs decreased the signal induced by AAV (Fig. 1), even when the antibody preparation alone was able to induce a slight CK 10 expression.

To determine whether replication- competent virus is required for induction of differentiation-associated antigens, HaCaT cells were inoculated with either uv-irradiated AAV-2 or uv-

irradiated H-1 empty particles. To analyse the efficiency of AAV-2 uv-inactivation, HaCaT cells were inoculated with irradiated virus and super infected with adenovirus type 2 (Ad2) as a helper. Autoradiographs of dot-blot of virus-exposed cells revealed that uv-inactivated virus was not replicated, whereas parvovirus replication occurred in HaCaT cells infected with intact virions (after superinfection with helper virus for AAV-2) (Fig. 2A). Similarly, H-1 empty capsids (irradiated or not) and uv-irradiated full H-1 virions did not give rise to any virus DNA replication after inoculation into Hela indicator cells (Fig. 2B).

As a control for general effects of virus binding to cells, HaCaT cells were inoculated with uv-inactivated Ad2 at similar concentrations of virus particles as in the experiments with parvoviruses, and analysed for induction of CK 10. As shown in Fig. 1, inactivated Ad2 did not induce synthesis of CK10.

To test whether uv-inactivated AAV-2 and H-1 capsids were able to induce expression of CK 10, we performed immunofluorescence analyses of HaCaT cells, revealing expression of CK 10 in cells inoculated with uv-inactivated AAV-2 (Fig. 3G) at the same level as in cells infected with the untreated virus (Fig. 3F). This demonstrates that induction of CK 10 is not restricted to replication-competent virus.

In addition, immunofluorescence analysis on the expression of involucrin (Fig.3 A, C, E) and of CK 10 (Fig.3 B, D, F) was performed in HaCaT cells exposed to either infectious (wt) AAV-2 or uv-irradiated empty capsids of H-1. Involucrin appeared early (24h) after infection with both AAV-2 and H-1 particles in 2-7% of infected cells and increased to 10-15% of the HaCaT cells, 72h p.i.. CK 10, which is synthesized later in keratinocyte maturation (Boukamp, et al., 1988) was induced to expression 48h after infection in 2 to 5% of the cells. 72h p.i., about 10% of the cells exhibited CK 10 expression (Table 1).

As reported previously, we were unable to detect AAV-2 RNA or protein expression at any time after infection of HaCaT cells with AAV-2 in the absence of helper virus (Klein-Bauernschmitt, et al., 1992) To evaluate whether the presence of viral DNA is necessary to induce expression of CK 10, HaCaT cells were incubated (30 min) either with empty capsids of AAV-2 or with uv-inactivated H-1 empty particles and grown for three days. SDS-PAGE of cell extracts followed by immuno blotting showed an increase of expression of CK 10 in

cells inoculated with empty AAV-2 particles (Fig. 4A) indicating that viral DNA is not required for induction of this differentiation-associated protein. For H-1-infected cells, cytosolic extracts were prepared at different times after exposure of HaCaT cells to uv-irradiated H-1 capsids.(Fig. 4B-C) demonstrating that H-1 induced expression of CK 10 and of involucrin does not require viral gene expression nor presence of complete viral DNA, paralleling the results observed with AAV-2 particles (cf. also Fig. 3). Moreover, quantification of the band intensities showed that the total amount of the studied markers increased with time and was at least 15fold for involucrin and 9fold for CK10 between day 6 and day 2 after H-1 particles inoculation(data not shown).

## Discussion

The results presented herein show that expression of differentiation markers in HaCaT cells induced by AAV-2 or H-1 involves mainly viral capsid components. Experiments with uv-inactivated viruses and empty capsids strongly suggest that viral gene expression is not required for induction of differentiation processes which may be triggered, at least in HaCaT cells, by an interaction between viral capsid proteins and the cellular membrane.

It has been shown previously that a capsid component of the incoming parvovirus minute virus of mice (MVM, which is closely related to H-1) regulates host cell susceptibility (Gardiner & Tattersall, 1988) Cell cycle progression was found to be delayed when uv-inactivated parvovirus LuIII was adsorbed to HeLa cells in the S phase of the cell cycle (Siegl & Gautschi, 1973). Interestingly, defective AAV particles, with genomes consisting predominantly of the inverted terminal repetition sequences were found to inhibit adenovirus 12 tumorigenesis in newborn hamsters (de la Maza & Carter, 1981)

It has been reported that the presence of integrated AAV-2 DNA modifies some biological properties of human tumor cells (Walz & Schlehofer, 1992) and of transformed animal cells (Winocour et al., 1992) and furthermore, micro injection of AAV-2 DNA fragments in fertilised mouse oocytes led to an arrest of embryo development (Botquin, et al., 1994) Whether this arrest is correlated with an induction of differentiation processes is yet to be clarified. With the experiments presented here, we cannot totally exclude the possibility that in addition to viral capsid proteins, incoming viral DNA fragments may contribute to the described effects by interaction with cellular factors or by integration in the host cell genome. However, if viral DNA was involved, the residual DNA content of the viral "light" ( $d=1,32 \text{ g/cm}^3$ ) fractions isolated as empty capsids should induce expression of differentiation-related antigens less efficiently than (full) uv-inactivated virions. This was not observed in our experiments. Furthermore, at least for the experiments involving H-1 particles, we can exclude a possible "external DNA carrier" effect of the particles since they had been submitted to an extensive micrococcal nuclease digestion step during the purification process.

In a paper describing growth arrest and cell cycle disturbance after inoculation of uv-inactivated AAV-2 in non-permissive cell cultures (Winocour, et al., 1988), the question was addressed whether an alteration of cell membrane properties by viral capsids may influence progression through cell cycle. Our results may partially answer this question since viral particles devoid of DNA were found to be sufficient to induce intracellular events, at least expression of differentiation associated proteins. The fact that two different parvoviruses (which have probably different cellular receptors) and also other proteins (present in e.g. hybridoma supernatants) suggests that membrane constituents interacting with proteins and, more efficiently, with parvoviral capsids may trigger the accumulation of differentiation-associated polypeptides. The modification of differentiation patterns mediated by viral capsids may enhance the multiple direct effects of a parvovirus infection, i.e., the tumor suppressive effects and the interferences with development in infected young animals, by spreading of both infectious, defective and empty parvoviral particles from (a few) permissive host cells towards other cells.

The capacity of parvovirus particles to induce differentiation-linked antigens (and possibly also other, as yet unidentified, proteins) in keratinocytes may also be important concerning the use of parvovirus-based vectors in gene or cancer therapy.

### Acknowledgements

We thank N. Fusenig for HaCaT cells, H.W. Zentgraf for electron microscopy and V. Chaney for excellent technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by the E.C. Biomed Program. N.D. is supported by a grant from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

## References

- Bantel-Schaal, U., & zur Hausen, H. (1988). Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells. *Virology*, **164**, 64-74.
- Botquin, V. (1994) Influence of the human adeno-associated virus type 2 on development: a mouse model. Ph.D. Thesis, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Botquin, V., Cid, A., & Schlehofer, J. R. (1993). Induction of differentiation of embryonic cells and interference with development of mouse embryo by adeno-associated virus type 2. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **119**, 24.
- Botquin, V., Cid-Arregui, A., & Schlehofer, J. R. (1994). Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *Journal of General Virology*, **75**, 2655-2662.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771.
- Breitkreutz, D., Boukamp, P., Stark, H.-J., Ryle, C., & Fusenig, N. (1989). Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation. *Pharmacol. Scin*, **3**, 8-14.
- Chen, Y. Q., Tuynder, M. C., Cornelis, J. J., Boukamp, P., Fusenig, N. E., & Rommelaere, J. (1989). Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic. *Carcinogenesis*, **10**, 163-7.
- de la Maza, L., & Carter, B. J. (1980). Heavy and light particles of adeno-associated virus. *J Virol*, **33**, 1129-37.
- de la Maza, L., & Carter, B. J. (1981). Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J Natl Cancer Inst*, **67**, 1323-6.
- Feinberg, A., & Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **137**, 266-267.

- Gardiner, E. M., & Tattersall, P. (1988). Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J. Virol.*, **62**, 1713-1722.
- Heilbronn, R., Bürkle, A., Stephan, S., & zur Hausen, H. (1990). The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J. Virol.*, **64**, 3012-3018.
- Klein-Bauernschmitt, P., zur Hausen, H., & Schlehofer, J. R. (1992). Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type-2. *Journal of Virology*, **66**, 4191-4200.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Moll, R., Franke, W. W., & Schiller, D. L. (1982). The catalogue of human cytokeratin polypeptides: pattern of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**, 11-24.
- Rommelaere, J., & Cornelis, J. J. (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods*, **33**, 233-251.
- Rose, J. A. (1974). Parvovirus reproduction. In H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner (Eds.), *Comprehensive Virology* (pp. 1-16). New York: Plenum Press.
- Ruffing, M., Heid, H., & Kleinschmidt, J. A. (1994). Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J. Gen. Virol.*, **75**, 3385-3392.
- Ryle, C. M., Breitzkreutz, D., Stark, H.-J., Leigh, I. M., Steinert, P. M., Roop, D., & Fusenig, N. (1989). Density-dependent modulation of synthesis of keratin 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*, **40**, 42-54.
- Schlehofer, J. R. (1994). The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutation Research*, **305**, 303-313.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E., & Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*, **23**, 61-73.

- Siegl, G., & Gautschi, M. (1973). The multiplication of parvovirus Lu3 in a synchronized culture system. I. Optimum conditions for virus replication. *Arch Gesamte Virusforsch*, **40**, 105-18.
- Tattersall, P., Cawte, P. J., Shatkin, A. J., & Ward, D. C. (1976). Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J Virol*, **20**, 273-89.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Laruë-Charlus, S., Severin, F., & Schlehofer, J. R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.*, **44**, 215-222.
- Toolan, H. W. (1967). Agglutination of the H-viruses with various types of red blood cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **124**, 144-146.
- Walz, C., & Schlehofer, J. R. (1992). Modification of Some Biological Properties of HeLa Cells Containing Adeno-Associated Virus DNA Integrated into Chromosome-17. *J Virol*, **66**, 2990-3002.
- Winocour, E., Callahan, M. F., & Huberman, E. (1988). Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology*, **167**, 393-9.
- Winocour, E., Puzis, L., Etkin, S., Koch, T., Danovitch, B., Mendelson, E., Shaulian, E., Karby, S., & Lavi, S. (1992). Modulation of the cellular phenotype by integrated adeno-associated virus. *Virology*, **190**, 316-329.

## Legends to figures

Fig. 1. Western blot analysis of cytokeratin 10 (CK 10) protein accumulation in HaCaT cells inoculated with AAV-2. Prior to inoculation, the particles were incubated with decreasing amounts of different mAbs (B1, B21, VP87) against viral capsid proteins for 30 min. As a control, cells were inoculated with uv-inactivated adenovirus type 2 (Ad2). Cells were harvested and prepared for SDS-PAGE 4 days p.i.

Fig. 2. A : Lack of replication of uv-inactivated AAV-2 in HaCaT cells superinfected with adenovirus type 2 (Ad2). About  $2 \times 10^4$  cells were infected with (1) : 100% live AAV-2, (2) : 25% uv-inactivated / 75% live AAV-2, (3) : 50% uv-inactivated / 50% live AAV-2, (4) : 100% uv-inactivated AAV-2. Cells were cultured until the Ad2-induced cytopathic effect was complete, frozen and thawed (3x) and dot-blotted onto Genescreen and hybridised with  $^{32}\text{P}$ -labeled AAV-2 DNA.

B : Lack of replication of H-1 empty particles (7), uv-inactivated H-1 (6) and uv-inactivated H-1 empty particles (8) 24h after inoculation of  $10^5$  Hela cells with 100 particles/cell . Cells inoculated with the respective particles were analysed by the dispersed cell assay and hybridised with  $^{32}\text{P}$ -labeled H-1 DNA probe.

(5) is the dispersed cell assay of Hela cells 24h after infection with H-1 live virus (m.o.i.=100 p.f.u./cell).

Fig. 3. Immunofluorescence analysis of involucrin (A, C, E) and/or CK10 (B, D, F, G) expression in HaCaT cells either mock-infected (A, B), infected with H-1 virus empty particles (C, D), intact (E, F) or uv-inactivated (G) AAV-2 particles (10 particles/cell for each type of virus). Cells were fixed for analysis 48h p.i. Immunofluorescence was performed with monoclonal antibodies against involucrin and CK10, respectively.

Fig. 4. Western blot analysis of differentiation antigens accumulation in HaCaT cells.

(A) CK10 expression after inoculation with empty AAV-2 particles, wt AAV-2 particles and uv-inactivated AAV-2 particles 4 days p.i.

(B) CK10 expression after inoculation with H-1 virus empty particles 2, 3 and 6 days p.i., respectively

(C) Involucrin expression after inoculation with H-1 virus empty particles 2,3 and 6 days p.i., respectively

AAV-2 (particles/cell)  
 anti AAV mAb A69 ( $\mu$ l)  
 anti AAV mAb B1 ( $\mu$ l)  
 treated Ad-2 (part./cell)

|        |     |        |        |        |        |        |        |
|--------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|        |     | $10^1$ | $10^2$ | $10^3$ |        | $10^3$ | $10^3$ |
|        |     |        |        |        |        |        |        |
|        | 100 |        |        |        | 100    | 10     | 100    |
| $10^3$ |     |        |        |        | $10^3$ |        |        |

|   |        |        |        |     |        |        |
|---|--------|--------|--------|-----|--------|--------|
| 0 | $10^2$ | $10^2$ | $10^2$ |     |        | $10^2$ |
|   | 100    | 50     | 25     | 100 |        |        |
|   |        |        |        |     |        |        |
|   |        |        |        |     | $10^2$ |        |

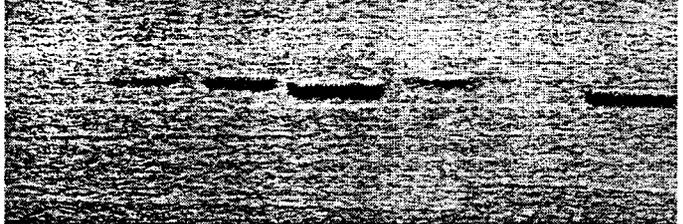
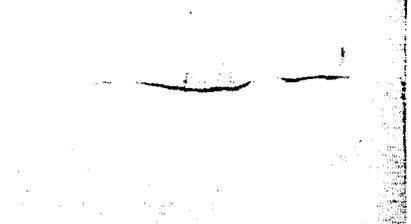


Figure 1

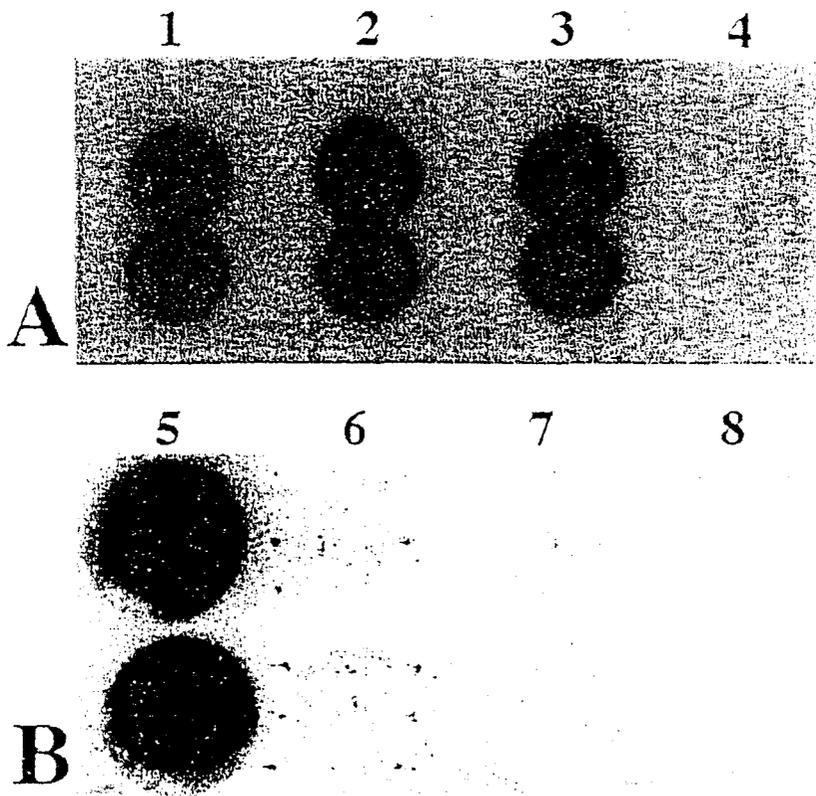


Figure 2

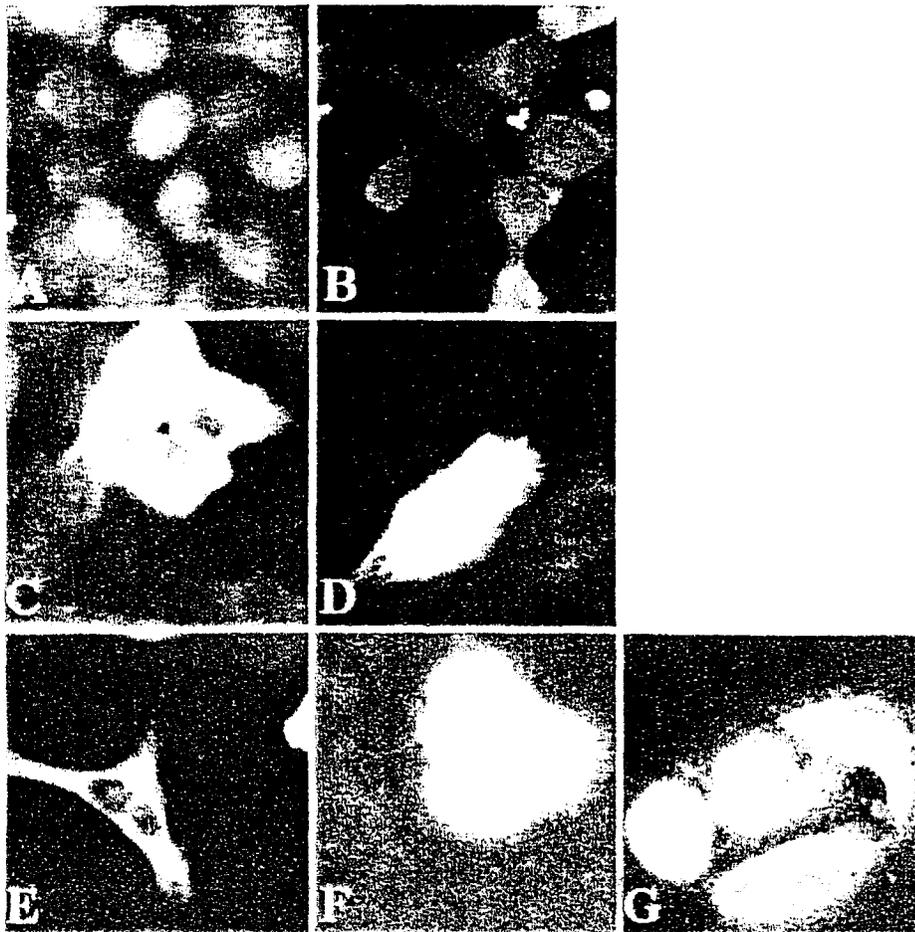


Figure 3

Table 1

| involucrin          | Particles/cell |     |     |
|---------------------|----------------|-----|-----|
|                     | 24h            | 48h | 72h |
| mock                | 0              | 0   | 0   |
| H-1 empty particles | 1              | 2   | 3   |
| H-1 empty particles | 10             | 7   | 10  |
| AAV-2               | 10             | 2   | 2,5 |
| AAV-2               | 100            | 3   | 4   |

| CK 10               | Particles/cell |     |     |
|---------------------|----------------|-----|-----|
|                     | 24h            | 48h | 72h |
| mock                | 0              | 0   | 0   |
| H-1 empty particles | 1              | 0   | 0   |
| H-1 empty particles | 10             | 0   | 5   |
| AAV-2               | 10             | 0   | 4,5 |
| AAV-2               | 100            | 0   | 5   |

Table I:

Immunofluorescence analysis of the number of cells (percent) showing parvovirus particles-induced accumulation of differentiation associated proteins at different times after infection. At least 500 cells were counted.

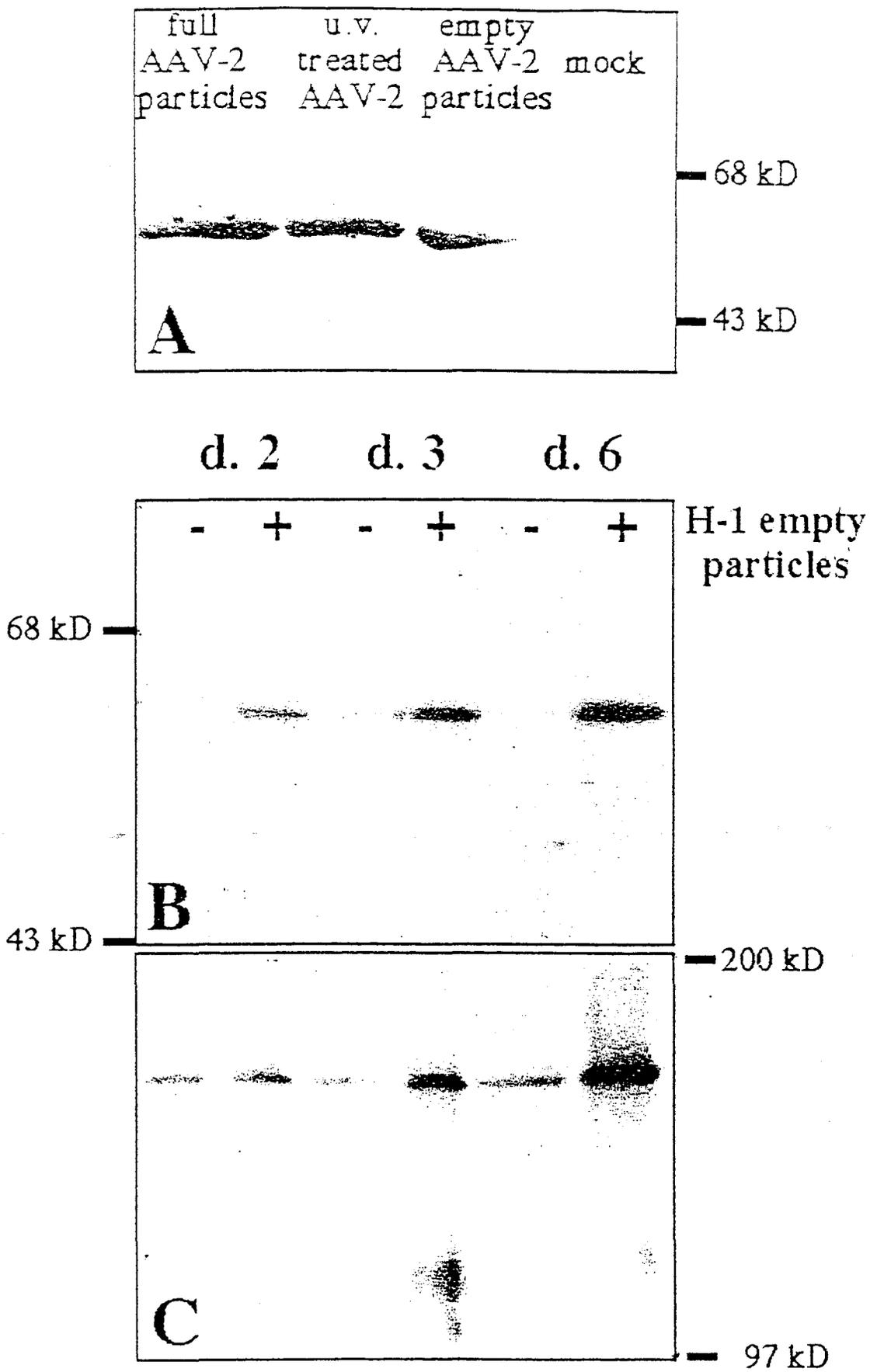


Figure 4

## II Discussion

L'ensemble de ces résultats suggère que la réplication et l'expression des gènes viraux ne sont pas requis pour l'induction de la différenciation des cellules HaCat. Il semble donc que l'interaction entre la particule virale et la membrane cellulaire soit suffisante pour induire cette différenciation. Cependant, une contamination des particules défectives par de l'ADN viral ne peut être totalement exclue en ce qui concerne AAV-2. L'induction de la différenciation pourrait alors être liée à la présence de séquences d'ADN résiduelles et non à une interaction entre la particule virale et la membrane cellulaire. En effet, l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire modifie les propriétés biologiques de certaines lignées cellulaires. De plus, l'interaction de protéines cellulaires avec l'ADN viral pourrait conduire à une déplétion de ces facteurs et induire un changement phénotypique. Par contre, en ce qui concerne les expériences réalisées avec les capsides vides de H1-PV, une contamination des particules par de l'ADN viral peut être totalement écartée car aucun ADN n'est présent dans ces particules vides. De plus, lors des étapes de purification des virions, ces particules ont été soumises à des traitements intensifs avec la nucléase micrococcale dégradant ainsi toute séquence d'ADN éventuellement piégée à l'extérieur des particules. Ce traitement permet aussi d'éliminer totalement la protéine non structurale NS1 du parvovirus H-1PV qui est réputée rester associée au virion de façon covalente avec l'ADN encapsidé.

Le fait que 2 parvovirus différents, interagissant probablement avec des récepteurs membranaires distincts, soient tous deux capables d'induire une différenciation cellulaire suggère que des constituants membranaires interagissent avec la particule virale. Un premier récepteur a été récemment identifié pour AAV-2. Il s'agit d'une protéine ubiquiste de 150 kDa, de nature encore inconnue (Mizukami *et al.*, 1996). Une glycoprotéine de type héparane sulfate semblerait constituer un second récepteur pour AAV-2 (Summerford et Samulski, 1997). Cette protéine jouerait un rôle dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (Summerford et Samulski, 1997). L'obtention d'informations supplémentaires sur ces récepteurs nous permettra d'identifier les voies de transduction du signal conduisant à la différenciation cellulaire induite par les capsides vides de H1-V ou de AAV-2.

Par ailleurs, l'infection par AAV-2 de fibroblastes primaires humains entraîne une induction rapide de l'expression de p21<sup>WAF-1</sup> puis une répression de l'expression de ce gène est observée dès 3 heures p.i. (Hermanns *et al.*, 1997). L'induction de l'expression de p21<sup>WAF-1</sup> semble être indépendante de la réplication et de l'expression des gènes parvoviraux qui nécessitent un laps de temps beaucoup plus important. Il semblerait plutôt que l'interaction d'AAV-2 avec un récepteur membranaire puisse stimuler toute une cascade de signaux de transduction conduisant alors à l'induction de l'expression de p21<sup>WAF-1</sup>. Il est intéressant de noter que cette protéine p21<sup>WAF-1</sup> possède des activités antisuppressives et exerce de multiples effets sur la régulation du cycle

cellulaire, la sénescence et la différenciation cellulaire. La protéine p21<sup>WAF-1</sup> induit la différenciation terminale des cellules musculaires mais également des cellules humaines promyélocytaïres HL60. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par Petra Klein-Bauernschmitt montrant une induction de la différenciation des cellules HL60 par le parvovirus AAV-2 (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). L'hypothèse suivante apparaît alors très attrayante. L'interaction entre le parvovirus AAV-2 et la membrane cellulaire pourrait déclencher toute une cascade d'activation conduisant à l'induction de la protéine p21<sup>WAF-1</sup> puis à la différenciation terminale des cellules HL-60. De plus, l'induction de la différenciation médiée par les particules virales des parvovirus H-1PV et AAV-2 pourrait être impliquée dans les propriétés antitumorales de ces virus. Ainsi, les parvovirus AAV-2 et H-1PV pourraient représenter des agents intéressants en thérapie anticancéreuse, du moins comme adjuvent.

## **ARTICLE II**

**Transient expression of differentiation-associated proteins in embryonic cells after infection with adeno-associated virus type2**

## I Résumé

Il a été démontré récemment que le parvovirus AAV-2 pouvait perturber le développement embryonnaire de la souris. En effet, des expériences réalisées *in vitro* ont montré que la microinjection de l'ADN d'AAV-2 dans un oeuf de souris conduit à un arrêt du développement embryonnaire au stade morula (Botquin *et al.*, 1994). De plus, l'infection par AAV-2 de souris gestantes entraîne des avortements précoces et la mort du fœtus.

Ainsi, nous avons cherché à savoir si des cellules souches embryonnaires murines (ES-D3) ou de tératocarcinome murin (F9) ou humain (Ep2102) pouvaient se différencier après une infection par le parvovirus AAV-2. Nous avons ainsi mis en évidence, par immunofluorescence et Western Blot, l'expression de marqueurs (fibronectine, laminine, Troma-1), impliqués dans la différenciation de ces cellules sur la voie endodermique.

---

**TRANSIENT EXPRESSION OF DIFFERENTIATION-ASSOCIATED  
PROTEINS IN EMBRYONIC CELLS AFTER INFECTION WITH ADENO-  
ASSOCIATED VIRUS TYPE 2**

Valérie BOTQUIN <sup>1,#</sup>

Nathalie DUTHEIL <sup>2</sup>

Thierry DUPRESSOIR <sup>2</sup>

Jörg R. SCHLEHOFER <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Deutsches Krebsforschungszentrum, FS Angewandte Tumorstudiologie

Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

<sup>2</sup> Unité d'Oncologie Moléculaire, CNRS URA 1160, Institut Pasteur de Lille

1, rue Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

---

\* Corresponding author: Priv.Doiz. Dr.med. Jörg R. Schlehofer  
DKFZ, ATV, Abt. 610  
Im Neuenheimer Feld 242  
D-69120 Heidelberg, Germany  
Fax: +49 - 6221-42 49 62; Phone: +49 - 6221-42 49 75

# Present address: European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Meyerhofstr. 1, D-69117 Heidelberg, Germany

*Keywords* : Adeno-associated virus; differentiation; ES cells; F9 cells; murine cells

*Running title*: ES cell differentiation by AAV

### Summary

The human helper virus-dependent adeno-associated virus type 2 (AAV-2) was recently demonstrated to interfere with early mouse embryo development. Since AAV-2 has been shown to induce expression of differentiation-associated proteins in various human cell lines, we analysed differentiation-associated proteins in AAV-2-infected pluripotent mouse embryonic stem cells (ES-D3), in murine (F9) and human (Ep2102) teratocarcinoma cells to investigate whether interference with differentiation might be involved in AAV-induced disturbance of development. Using immunofluorescence techniques, expression of antigens related to the endodermal pathway (TROMA-1, laminin, fibronectin, in murine cells, in human cells) was detected in the embryonic cells analysed, after infection with AAV-2. Thus, premature expression of differentiation-associated proteins might be involved in the mechanisms leading to perturbation of embryo development.

Adeno-associated viruses (AAV, types 1-5) are members of the family of parvoviridae which consist of small (about 20 nm diameter), icosahedral, non-enveloped viruses containing a single-stranded DNA genome of approximately 5000 nucleotides with identical palindromic termini of 145 bases (Siegl *et al.*, 1985). For replication, these viruses strongly depend on host cell functions (Berns and Bohensky, 1987), and, usually, on coinfection with helper viruses such as adenovirus, herpesvirus or vaccinia virus (Berns and Bohensky, 1987; Buller *et al.*, 1981; Schlehofer *et al.*, 1986; Siegl *et al.*, 1985). In certain cell systems, treatment with chemical or physical carcinogens can support low level replication of AAV in the absence of a helper virus (Schlehofer *et al.*, 1983; Yakobson *et al.*, 1987; Yalkinoglu *et al.*, 1988). Previous results from our laboratory had shown that human keratinocytes (HaCaT cells) as well as leukemic cells (HL60) are induced to differentiate by infection with AAV in the absence of helper viruses (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). This may be involved in the mechanisms by which these viruses exert their tumor suppressive activities <sup>review:</sup> (Schlehofer, 1994).

To assess whether AAV-mediated induction of differentiation-associated changes may play a role in the recent finding of AAV-2-induced perturbation of early embryo development including early abortion in mice after infection (Botquin *et al.*, 1994) we analysed the expression of differentiation-related antigens in pluripotent embryonic cells. This appeared of particular interest in view of recent detection of AAV-2 DNA and proteins in human material from spontaneous abortion (Tobiasch *et al.*, 1994).

Embryonic carcinoma and embryo-derived stem cells share the capacity to differentiate *in vitro* into a variety of different cell types in response to inducers of differentiation (e.g., retinoic acid) and are useful model systems to study processes which occur in the developing embryo (Brulet *et al.*, 1980; Doeschman *et al.*, 1985; Solter and Damjanov, 1979). In normal embryogenesis, the earliest differentiated cells are those of the parietal endoderm (Evans and Kaufman, 1981). Endodermal differentiation in murine cells is characterised *in vitro* by production of laminin, fibronectin and intermediate filaments of the cytoskeleton (TROMA-1) in the two cell types

analysed here (ES-D3, F9; cf., (Brulet *et al.*, 1980; Cooper *et al.*, 1983; Duprey, 1988; Griep and De Luca, 1988).

In this study, we present evidence that infection with AAV-2 induces expression of antigens associated with the endodermal pathway in murine embryonic stem cells (ES-D3) and in a pluripotent murine teratocarcinoma cell line (F9). Similar results were obtained with human embryonic cells (the teratocarcinoma cell line, Ep2102) which expressed differentiation-linked proteins after infection with AAV-2.

The ability of AAV-2 particles to adsorb to the membrane of ES-D3 and F9 cells was visualised by immunofluorescence microscopy, using capsid antibodies, 1 h after infection (p.i.) and was still detectable 24 h p.i., albeit with a decreased intensity. To determine whether ES-D3 and F9 cells are permissive for AAV-2 infection, cells were coinfecting with AAV-2 and adenovirus type 2 as a helper. This yielded infectious AAV-2 progeny (data not shown).

To assess AAV-2-induced synthesis of differentiation-associated antigens in mouse embryonic stem cells, ES-D3 cells were infected with 10-100 AAV-2 infectious particles per cell (without helper virus). Immunofluorescence analyses using specific antibodies, revealed relatively large amounts of laminin (Figure 1A, 1B), fibronectin (Figure 1D, 1E) and the trophectodermal cytokeratin-like filament (TROMA-1) (Figure 1G, 1H) in 20% of the cells, six days after infection (d p.i.). Similarly, laminin, fibronectin and TROMA-1 were found in AAV-2 infected cells (6 d p.i.) of the murine teratocarcinoma cell line, F9 (Fig. 2). An induction of differentiation-specific antigens could also be observed in a human teratocarcinoma cell line (Ep2102) (Botquin et al., 1994). However, as could be expected under these conditions of infection, i.e., in the absence of helper virus, neither AAV2 DNA synthesis nor transcription of AAV-2 RNA was detected (by Southern or Northern blot analyses, respectively; data not shown).

In order to ascertain that these antigens are also expressed in embryonic cells when treated with well known inducers of differentiation, ES-D3 and F9 cells were cultured in the presence of retinoic acid, which triggers these cells to differentiate into the endodermal pathway (Hogan *et*

*al.*, 1981). TROMA-1 (Figure 1C, 2C), fibronectin (Figure 1F, 2F) and laminin (Figure 1I, 2I) were detected three days after retinoic acid treatment, in both cell lines, to the same extent as after AAV-2 infection.

The mechanisms by which AAV-2 influences differentiation-associated processes are unclear. The lack of detectable DNA and RNA synthesis suggests that expression of AAV genes after infection is not necessary for this effect. Recent results from our laboratory have shown that UV-inactivated AAV-2 as well as empty capsids of AAV-2 are sufficient to mediate expression of differentiation-associated antigens in keratinocytes .

Further investigation is needed to determine whether expression of differentiation-associated antigens is involved in the disturbance of embryo development after infection with AAV-2 (Botquin *et al.*, 1994). It is tempting to speculate that untimely expression of differentiation-related proteins might interfere with early development. Recently, DNA and proteins of AAV-2 could be detected in the placental cells of about 50% of early human miscarriages (Tobiasch *et al.*, 1994). Our results should stimulate investigations of differentiation processes in material from early abortion in humans in order to assess whether AAV-mediated perturbation of differentiation might be involved in miscarriage.

### Acknowledgements

We thank R. Kemler for ES-D3 cells, H. Stöppler for Ep2102 cells, C. Laughlin and R. Heilbronn for cloned AAV-2 DNA, J. Kleinschmidt for AAV-2 anti-rep and anti-VP antibodies, P. Klein-Bauernschmitt for helpful discussion, and H. zur Hausen for support and encouragement.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by a research grant to J.R.S. within the Co-operative Program in Cancer Research of the Deutsches Krebsforschungszentrum and the National Council for Research and Development (Israel).

---

### References

- Bantel-Schaal, U. and zur Hausen, H.** 1988. Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells. *Virology*. **164**: 64-74.
- Berns, K.I. and Bohensky, R.A.** 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv. Virus Res.* **32**: 243-306.
- Botquin, V., Cidarregui, A. and Schlehofer, J. R.** 1994. Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *J. Gen. Virol.* **75**: 2655-2662.
- Brulet, P., Babinet, C., Kemler, R., and Jacob F.** 1980. Monoclonal antibodies against trophoblast-specific markers during mouse blastocyst formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 4113-4117.
- Buller, R. M. L., Janik, J. E., Sebring, E. D. and Rose, J. A.** 1981. Herpes simplex virus type 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**: 241-247.
- Coon, H.G.** 1986. Clonal culture of differentiated rat liver cells. *J. Cell. Biol.* **39**: 29a.
- Cooper, A.R., Taylor, A. and Hogan, B.L.M.** 1983. Changes in the rate of laminin and antactin synthesis in F9 embryonal carcinoma cells treated with R.A. and cyclic-AMP. *Dev. Biol.* **99**: 510-516.
- de la Maza, L. M. and Carter, B. J.** 1981. Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J. Natl. Cancer. Inst.* **67**: 1323-1326.
- Doeschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R.** 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryonal. Exp. Morph.* **87**: 27-45.
- Duprey, P.** 1988. Expression of the cytokeratin endoA gene during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8835-8838.

- Evans, M.J. and Kaufman, M.H.** 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*. **292**: 154-156.
- Griep, A.E. and DeLuca, H.F.** 1988. Antisens myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 6806-6810.
- Hilton, D.J.** 1992. LIF: lots of interesting functions. *TIBS*. **17**: 72-76.
- Hogan, B.L.M., Taylor, A. and Adamson, E.D.** 1981. Cell interaction modulates embryonal carcinoma cell differentiation into parietal and visceral endoderm. *Nature*. **291**: 235-237.
- Klein-Bauernschmitt, P., zur Hausen, H. and Schlehofer, J. R.** 1992. Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type-2. *J. Virol.* **66**: 4191-4200.
- Schlehofer, J. R., Ehrbar, M. and zur Hausen, H.** 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology*. **152**: 110-117.
- Rose, J.A., Berns, K.I., Hoggan, M.D. and Koczot, F.J.** 1969. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **64**: 863-863.
- Schlehofer, J.R., Heilbronn, R., Georg-Fries, B. and zur Hausen, H.** 1983. Inhibition of initiator-induced SV40 gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells by infection with a defective parvovirus. *Int. J. Cancer*. **32**: 591-595.
- Schlehofer, J.R., Ehrbar, M. and zur Hausen, H.** 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependant parvovirus. *Virology*. **152**: 110-117.
- Schlehofer, J. R.** 1994. The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat. Res.* **305**: 303-313.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. and Tattersall, P.** 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*. **23**: 61-73.

**Smith, A.G. and Hooper, M.L.** 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **121**: 1-9.

**Solter, D. and Damjanov, I.** 1979. Teratocarcinoma and the expression of oncodevelopmental genes. *Meth. Cancer Res.* **18**: 277-332.

**Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Laruecharlus, S., Severin, F., Becker, N. and Schlehofer, J. R.** 1994. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* **44**: 215-222.

### Legends to the figures

#### Figure 1

Immunofluorescence analysis of laminin, fibronectin and TROMA-1 in mouse embryonic stem cells (ES-D3). A, D, G : mock-infected cells stained with antibodies to laminin (A), fibronectin (D), TROMA-1 (G); B, E, H : AAV-2 infected cells stained with antibodies to laminin (B), fibronectin (E), TROMA-1 (H); C, F, I : cells treated with  $10^{-6}$  M retinoic acid and stained with antibodies to laminin (C), fibronectin (F), TROMA-1 (I).

Embryonic stem cells, ES-D3 originally derived from an XY blastocyst of the 129/Sv+/+ mouse strain (Doeschman *et al.*, 1985), were grown on gelatine-coated plates (0.1%) in D-MEM (Minimal essential Medium, Dulbecco's modification, GIBCO, Karlsruhe, Germany) supplemented with 20% heat-inactivated (56°C, 30 min) foetal calf serum (GIBCO), 1% antibiotics, 1% of a 100 x stock of nonessential amino acids (Flow Laboratories, Irvine, UK.),  $10^{-4}$  M beta-mercapto-ethanol and BRL-conditioned medium (Smith and Hooper, 1987). BRL-conditioned medium was a 2 days supernatant of BRL cells (Buffalo rat liver cells), a clonal isolate from the liver of a 5-week-old Buffalo rat (Coon, 1986) producing leukaemia-inhibiting factor (LIF, (Hilton, 1992) which inhibits spontaneous differentiation of ES-D3 cells and stimulates their growth. Medium was changed every two days. Cells were grown by incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air. To stimulate differentiation with retinoic acid exponentially growing cells were subcultured at  $1 \times 10^6$  cells/dish and grown for three days in the presence of  $10^{-6}$  M retinoic acid (Sigma, Deisenhofen, Germany).

Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) was propagated in HeLa cells using adenovirus type 2 (Ad2) as a helper. When Ad2-induced cytopathic effect was complete, cells were lysed by freeze-thawing and centrifuged in a SS-34 rotor (Sorvall, Du Pont, Wilmington, USA) at 22,000 rpm for 3h. Virus was extracted from the pellets by the deoxycholate-trypsin method (Rose *et al.*, 1969), and AAV-2 virions were separated from Ad2 virions by equilibrium centrifugation through a

CsCl gradient, as described previously (de la Maza and Carter, 1980). To obtain infectious AAV-2, the band of  $1.41 \text{ g/cm}^3$  was collected (adenovirus type 2 was banded at  $1.35 \text{ g/cm}^3$ ). AAV-2 was dialysed against  $0.3 \text{ M NaCl}$ ,  $50 \text{ mM TRIS-HCl}$  pH 8.0 and heated to  $56^\circ\text{C}$  for 30 min to inactivate any residual infectious Ad2. The titer of purified AAV-2 was determined by dot-blotting of AAV+Ad2 infected HeLa cultures on nylon membranes (Gene-Screen, Du Pont-NEN, Dreieich, Germany) followed by hybridisation with radiolabeled AAV-2 DNA as described elsewhere (Bantel-Schaal and zur Hausen, 1988). Infection of cells with AAV-2 (M.O.I.: 10 PFU/cell) was performed by inoculating phosphate-buffered saline (PBS)-washed cells for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . The infected cells were washed twice with PBS in order to remove unabsorbed virus and were cultured in appropriate culture medium. Controls were done using as "mock infection" a dialysed fraction of  $1.41 \text{ g/cm}^3$  collected from a caesium-chloride gradient containing only (in addition heat-inactivated) adenovirus type 2.

For immunofluorescence analysis, cells grown on glass coverslips were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 15 minutes (for detection of TROMA-1 or laminin) or in 3,7% formaldehyde (for detection of fibronectin). Fixed cells were briefly washed and incubated with monoclonal antibodies against intermediate filament proteins (TROMA-1), laminin (Dianova, Hamburg, Germany) or fibronectin (Dianova) for 40 min at  $37^\circ\text{C}$ . After washing twice with PBS, the coverslips were incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  with the corresponding second antibodies, i.e. fluorescein-conjugated anti-rat IgG (against TROMA-1) (Dianova) or anti-rabbit IgG (against laminin and fibronectin) (Dianova). After washing twice in PBS, the coverslips were mounted with 90% glycerol / 10% PBS.

**Figure 2**

Immunofluorescence analysis (for details, cf., figure 1) of laminin, fibronectin and TROMA-1 in mouse teratocarcinoma cells (F9). A, D, G : mock-infected cells stained with antibodies to laminin (A), fibronectin (D), TROMA-1 (G); B, E, H : AAV-2 infected cells stained with antibodies to laminin (B), fibronectin (E), TROMA-1 (H); C, F, I : cells treated with  $10^{-6}$  M retinoic acid and stained with antibodies to laminin (C), fibronectin (F), TROMA-1 (I).

F9 cells were cultured on 0.1% gelatine-coated substrate in D-MEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum and 1% antibiotics at  $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ . Infection with AAV2 and treatment with retinoic acid was performed as described for ES-D3 cells (Fig. 1).

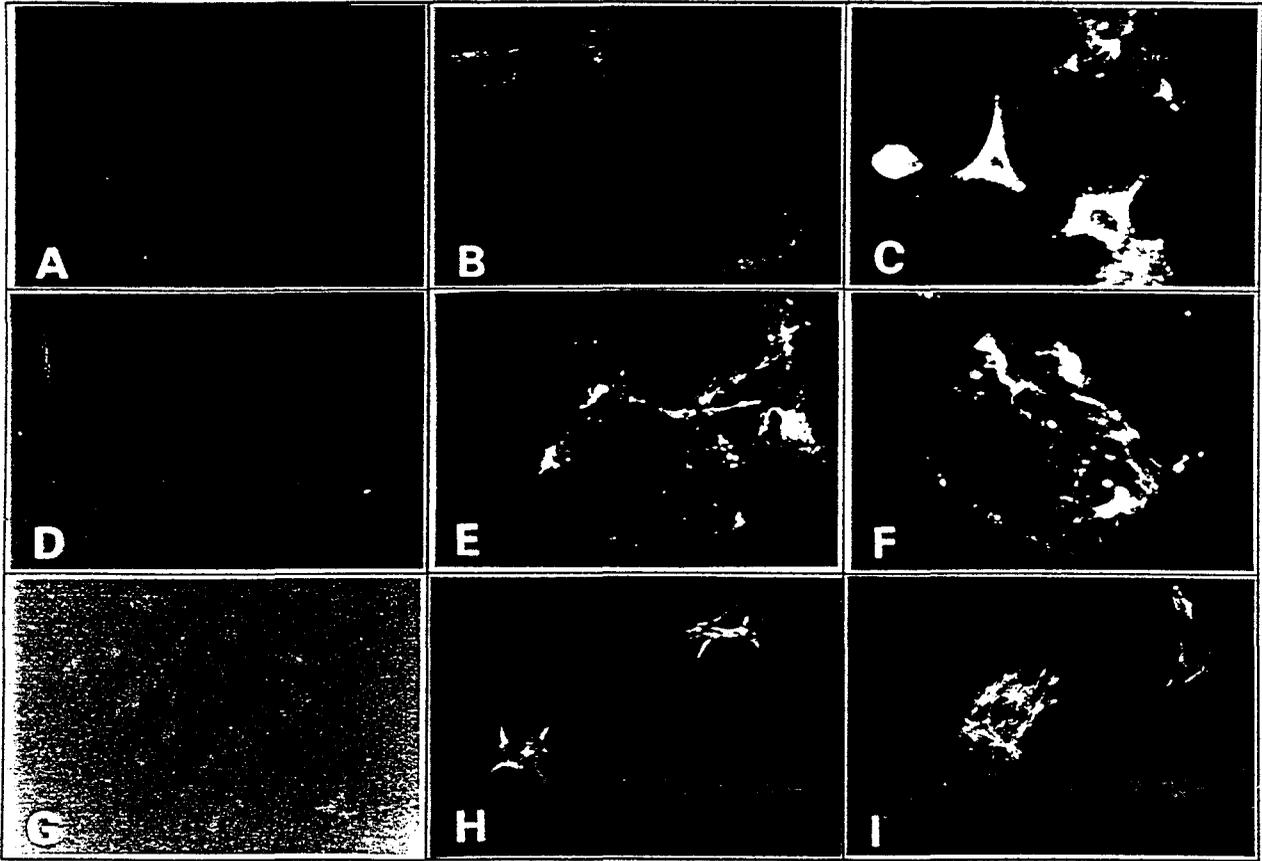


Figure 1

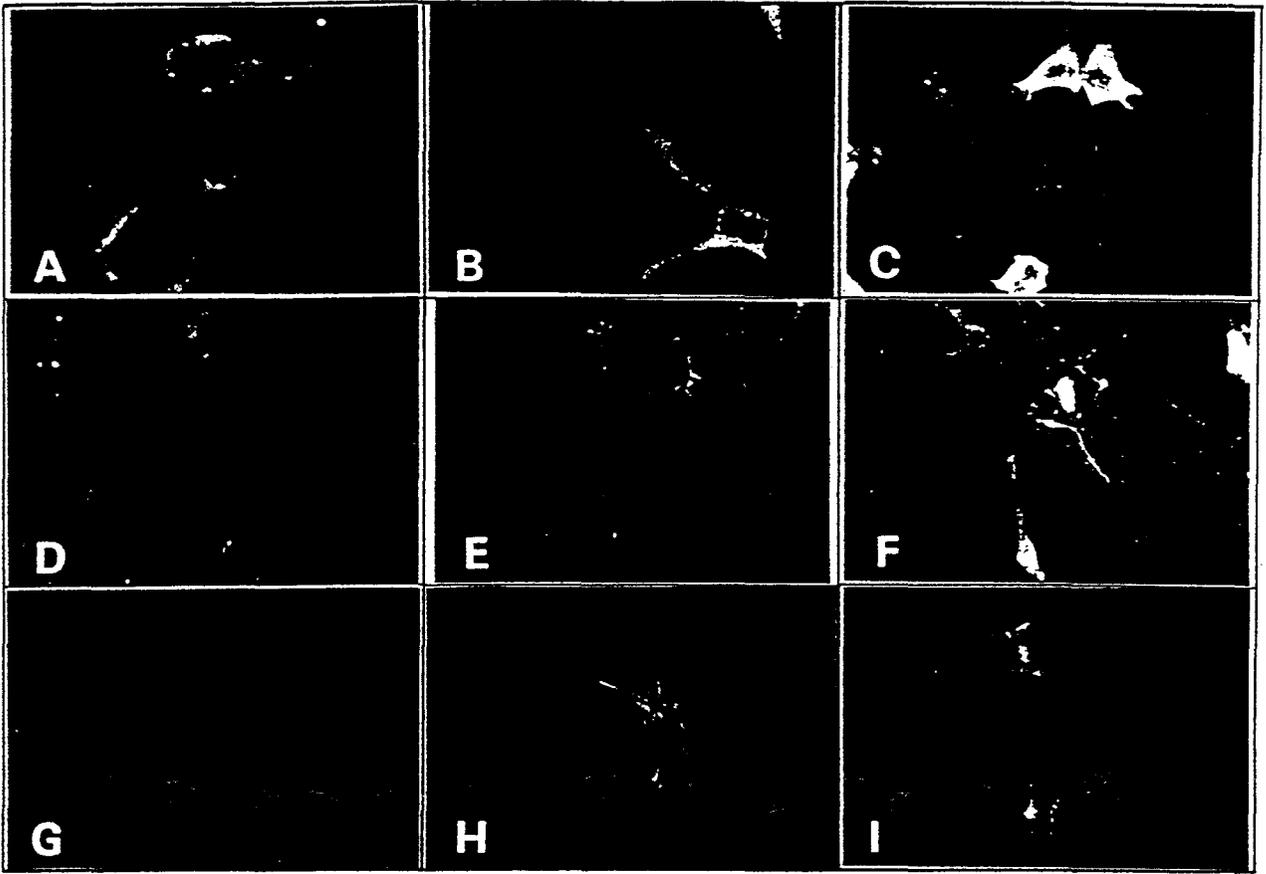


Figure 2

## II Discussion

Nous avons pu mettre en évidence que l'infection, par le parvovirus AAV-2, de cellules souches embryonnaires et de tératocarcinome conduit à l'expression de marqueurs impliqués dans la différenciation endodermique de ces cellules. Il semblerait que l'expression des gènes viraux ne soit pas requise pour induire cette différenciation, car aucune expression des gènes *rep* et *cap* n'a été détectée par "Northern Blot", après l'infection de ces cellules par AAV-2. Cette hypothèse semble confirmée par les résultats présentés précédemment concernant l'induction de la différenciation par des capsides parvovirales dépourvues de tout génome viral.

L'ADN d'AAV-2 a été fréquemment détecté dans des tissus provenant d'avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Malhomme *et al.*, 1997). Ce virus semble également capable de perturber le développement embryonnaire de la souris (Botquin *et al.*, 1994). Il reste donc à déterminer si l'induction de la différenciation de cellules embryonnaires pourrait entraîner un arrêt prématuré du développement embryonnaire. Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons pu établir aucune relation directe entre les avortements spontanés et la présence d'ADN d'AAV-2 dans les tissus utérins.

### **ARTICLE III**

**Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA**

## I Résumé

La détection d'ADN du parvovirus AAV-2 a été fréquemment détecté dans des échantillons humains provenant d'avortements spontanés et dans des biopsies utérines (Han *et al.*, 1996; Tobiasch *et al.*, 1994; Walz *et al.*, 1997a). La détection par immunofluorescence des protéines Rep et VP nous a conduit à rechercher si ces tissus pouvaient également contenir des séquences nucléotidiques des virus auxiliaires pour la réplication d'AAV-2.

Ainsi, nous avons détecté par PCR l'ADN des papillomavirus dans 60% des tissus utérins et dans 70% des lésions cervicales contenant des séquences d'AAV-2. Cependant, aucune séquence nucléotidique des virus auxiliaires "classiques" (Ad2, HCMV, HSV) permettant la réplication du génome viral d'AAV-2 n'a été détectée dans des échantillons utérins positifs pour la présence d'ADN d'AAV-2.

Ainsi, les papillomavirus pourraient être les virus auxiliaires permettant la réplication d'AAV-2 dans les tissus utérins.

## Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA

Olivier Malhomme,<sup>1</sup> Nathalie Dutheil,<sup>1</sup> Michèle Rabreau,<sup>2</sup> Edecio Armbruster-Moraes,<sup>3</sup>†  
Jörg R. Schlehofer<sup>1,3</sup> and Thierry Dupressoir<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 319, Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

<sup>2</sup> Institut d'Histo Cyto Pathologie, 114 av. Léon Blum, F-33495 Le Bouscat, France

<sup>3</sup> Deutsches Krebsforschungszentrum, FS Angewandte Tumovirologie, Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

The detection of DNA of the helper virus-dependent adeno-associated virus type 2 (AAV-2) in biopsies of material from spontaneous abortion and in tissue samples from the uterus raises the question of whether sequences of known helper viruses can be detected simultaneously within the same specimen despite the lack of histological evidence for the presence of lytic viruses. Therefore, we performed PCR analyses with primers detecting DNA sequences of viruses (adenovirus, herpes simplex virus and human cytomegalovirus) known for their helper activity in the replication of adeno-associated viruses. In addition, PCR was performed to detect DNA of human papillomaviruses (HPV), which were recently shown to be able to help AAV replication *in vitro*. In no cases were sequences of the known helper viruses found. However, HPV DNA was detected in  $\approx 60\%$  of paraffin sections from uterus biopsies and cervical lesions containing AAV DNA and in  $\approx 70\%$  of material from early miscarriage. This finding suggests that HPV may be a helper virus for AAV.

Recently, DNA of the helper virus-dependent adeno-associated virus human type 2 (AAV-2) has been detected, for the first time, in genital biopsies including material from spontaneous abortion (Tobiasch *et al.*, 1994). This observation

was confirmed and AAV-2 DNA sequences were found to be present in clinical samples from human genital tissues (Friedman-Einat *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1996). In order to assess the presence of co-infecting helper viruses in histological (paraffin embedded) sections of biopsies, we performed PCR analyses to detect the presence of DNA sequences of viruses known to help AAV replication, i.e. adenovirus (Ad), herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) and human cytomegalovirus (HCMV) (Buller *et al.*, 1981; Georg-Fries *et al.*, 1984; McPherson *et al.*, 1985; Myers *et al.*, 1980). In addition, the presence of human papillomavirus (HPV) DNA sequences was investigated since this virus has recently been demonstrated to be a potential helper virus for AAV (Walz *et al.*, 1997).

Table 1 presents the primers and PCR conditions used in this study. Briefly, deparaffinization, DNA extraction from the sections and PCR analysis for the presence of AAV-2 DNA were carried out as described by Tobiasch *et al.* (1994).

For detection of HCMV, HSV, HPV or Ad sequences, 80 pM/ml, or 100 pM/ml for HPV, of each primer was mixed with buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 20  $\mu$ g/ml acetylated BSA) and 120  $\mu$ M of each dNTP plus 5 units of *Taq* polymerase. Concentrations of  $MgCl_2$  used were 1.5 mM for HCMV, HSV, HPV type-specific primers or Ad and 5 mM, 2.5 mM or 2 mM for HPV general primers respectively. PCR cycles were as described in the references in Table 1. Type-specific PCR of HPV was performed with single pairs of primers and not as multiplex.

As positive control samples, DNA of HCMV-, HSV-1- or HSV-2-infected MRC5 cells, HCMV-positive urine samples, DNA of Ad type 2-infected HeLa cells, DNA from HeLa and SiHa cells (containing HPV-18 and HPV-16 DNA respectively) and DNA from a *condyloma acuminatum* biopsy (containing HPV-11 DNA) were used.

For detection of AAV, the positive control was obtained after treatment, as above, of paraffin-embedded sections from

Author for correspondence: Thierry Dupressoir.

Fax +33 3 20 87 79 08. e-mail tdupress@infobiogen.fr

† Present address: Gynecology and Obstetrics Department of the Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo and Human Genetics Section of the Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil.

Table 1. Primers used for PCR analysis

In the given sequences, S represents (G, C), W represents (A, T), and Y represents (C, T).

| Virus              | Primer        | Sequence                                       | Reference                              |
|--------------------|---------------|--|--|
| AAV                | Pan1          | AAC TGG ACC AAT GAA AAC TTT CC                 | Tobiasch <i>et al.</i> (1994)          |
|                    | Pan3          | AAA AAG TCT TTG ACT TCG TGC TT                 |  |
|                    | Probe*        | TTG CAA GAC CGG ATG TTC AAA TTT                |  |
| HCMV               | Primer 1      | 171756† GAC CGG CTG TTT CCA GAG TTG CCC GAA G  | Buifone <i>et al.</i> (1990)           |
|                    | Primer 2      | 17249† GGA GCA CTG AGG CAA GTT CTG CAA TGC TGC |  |
|                    | Probe*        | GCC ATC CAC ATC TCC CGC TTA TCC TCA GG         |  |
| HSV-1              | Primer 1      | 93536‡ ACG ACG ACG TCC GAC GGC GA              | Puchhammer-Stockl <i>et al.</i> (1990) |
|                    | Primer 2      | 93813‡ GTG CTG GTG CTG GAC GAC AC              |  |
|                    | Probe*        | 93696‡ ATA GTG CCA CGC CCA CCA CGT TCG         |  |
| HSV-1/2            | Primer 1      | 632‡ TTT TCT GCT CCA GGC GGA CT                | Shimizu <i>et al.</i> (1994)           |
|                    | Primer 2      | 193‡ TTC AGG GAG TGG CGC AGC TG                |  |
|                    | Primer 3      | 614‡ TGT TCG TCA GGG TCT CGG AG                |  |
| HPV<br>(general)II | CP-I          | TTA TGA MAT GCC CAY TGT ACC AT                 | Baay <i>et al.</i> (1996)              |
|                    | CP-IIg        | ATG TTA ATW SAG COW CCA AAA TT                 | Walboomers <i>et al.</i> (1992)        |
|                    | GP5           | TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC                     |  |
|                    | GP6           | ACT AAA TGT CAA ATA AAA AG                     |  |
|                    | CP1           | TGG TAC AAT GGG ATA TGA T                      |  |
|                    | CP2           | AAT GGC TTT TGG AAT TTA CA                     |  |
| HPV<br>(specific)  | HPV-6.1       | TAG TGG GCC TAT GGC TCG TC                     | Walboomers <i>et al.</i> (1992)        |
|                    | HPV-6.2       | TCC ATT AGC CTC CAC GGG TG                     |  |
|                    | HPV-11.1      | GGA ATA CAT GCG CCA TGT GG                     |  |
|                    | HPV-11.2      | GGA GCA GAC GTC CGT CCT CG                     |  |
|                    | HPV-16.1      | TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA                     |  |
|                    | HPV-16.2      | ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC                     |  |
|                    | HPV-18.1      | AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA                     |  |
|                    | HPV-18.2      | CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT                     |  |
|                    | HPV-31.1      | ATG GTG ATG TAC ACA ACA CC                     |  |
|                    | HPV-31.2      | GTA GTT GCA GGA CAA CTG AC                     |  |
|                    | HPV-33.1      | ATG ATA GAT GAT TGA ACG CC                     |  |
|                    | HPV-33.2      | GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG                     |  |
|                    | HPV<br>probes | HPV-6*   |  |
| HPV-11*            |               | CGC CTC CAC CAA ATG GTA CAC TGG AGG ATA        |  |
| HPV-16*            |               | GCA AAC CAC CTA TAG GGG AAC ACT CGG GCA        |  |
| HPV-18*            |               | TGG TTC AGG CTG GAT TCC GTC GCA AGC CCA        |  |
| HPV-31*            |               | ACC TGC GCC TTG GGC ACC AGT GAA GGT GTG        |  |
| HPV-33*            |               | CAA ATG CAG GCA CAG ACT CTA GAT GGC CAT        |  |
| Adenovirus         | Primer 1      | 3946§ TCG TTT CTC AGC AGC TGT TG               | Zhang <i>et al.</i> (1993)             |
|                    | Primer 2      | 4805§ CAT CTG AAC TCA AAG CGT GG               |  |
|                    | Probe*        | ATG TTC AGA TAC ATG GGC ATA AGC                |  |

\* Nucleotide sequence within the respective amplified fragment used for confirmation of specificity by radiolabelled hybridization.

† Positions of primers in the published sequence of HCMV.

‡ Positions of primers in the published sequences of HSV-1 and HSV-2.

§ Positions of the primers in the published sequence of Ad-2. According to EMBL and GenBank databanks, these primers recognize sequences common to Ad types 2, 5 and 7. Respective positions in Ad-5 are 3955 and 4815.

|| GP1/GP2, GP5/GP6 and CP-I/CP-IIg are generic primers for any HPV type.

Table 2. Analysis by PCR for the presence of viral DNA sequences in tissue samples (paraffin sections)

|                                     | AAV |   | Tested for Ad* | Tested for HCMV† | Tested for HSV-1‡<br>(HSV-1/2)§ | Tested for HPV  <br>generic primers |    |    | HPV types<br>specific anti-<br>contamination<br>primers | Tested<br>for all<br>viruses |    |
|-------------------------------------|-----|---|----------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----|----|---|------------------------------|----|
|                                     | n   | + | n              | n                | n                               | n                                   | -  | +  | Type  |                              | n  |
|                                     |     |   |                |                  |                                 |                                     |    |    | Type  |                              | n  |
| Early miscarriage                   | 26  | + | 24             | 26               | 25 (16)                         | 26                                  | 8  | 18 | HPV-16<br>HPV-18<br>HPV-16/18<br>HPV-11                 | 5<br>2<br>2<br>3             | 24 |
|                                     | 1   | - | 1              | 1                | 1 (1)                           | 1                                   | 0  | 1  | HPV-18  | 1                            | 1  |
| Induced abortion                    | 1   | + | 1              | 1                | 1 (0)                           | 1                                   | 0  | 1  | HPV-16/18   | 1                            | 1  |
| Extrauterine gravidity              | 2   | + | 2              | 2                | 2 (2)                           | 2                                   | 1  | 1  | HPV-16<br>HPV-11  | 2<br>1                       | 2  |
| Uterus mucosa                       | 9   | + | 9              | 9                | 9 (7)                           | 9                                   | 6  | 3  | HPV-16<br>HPV-18<br>HPV-16/18<br>HPV-11                 | 1<br>1<br>1<br>1             | 9  |
| Cervix uteri<br>(normal/metaplasia) | 6   | + | 6              | 6                | 6 (5)                           | 6                                   | 1  | 5  | HPV-16<br>HPV-18<br>HPV-11                              | 1<br>2<br>1                  | 6  |
|                                     | 1   | - | 1              | 1                | 1 (1)                           | 1                                   | 0  | 1  | HPV-16  | 1                            | 1  |
| CIN I-II-III                        | 7   | + | 7              | 7                | 7 (5)                           | 7                                   | 2  | 5  | HPV-18<br>HPV-16/18                                     | 1<br>2                       | 7  |
| Total                               | 53  |   | 51             | 53               | 52 (37)                         | 53                                  | 18 | 35 |   |                              | 51 |

\* 51 samples were examined for Ad, all of which were tested for HCMV, HSV-1 and HPV and 37 of which were tested for HSV-1/2.

† 53 samples were examined for HCMV, of which 51 were tested for Ad, 52 for HSV-1, 37 for HSV-1/2 and 52 for HPV.

‡ 52 samples were examined for HSV-1, of which 52 were tested for HCMV, 51 for Ad, 37 for HSV-1/2 (shown in brackets; see also following footnote) and 52 for HPV.

§ 37 samples were examined for HSV-1/2, all of which were tested for HCMV, HSV-1 and HPV and 36 of which were tested for Ad.

|| 52 samples were examined for HPV, of which 52 were tested for HCMV, 51 for Ad, 52 for HSV-1 and 37 for HSV-1/2.

tumours in nude mice after injection of HA16 cells containing AAV-2 DNA (Walz & Schlehofer, 1992).

PCR-amplified products were separated by agarose gel electrophoresis and, in most cases, confirmed for specificity by Southern blot analysis using radiolabelled DNA oligonucleotide probes (5'-end-labelled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP) hybridizing within the amplified sequences after Southern blotting (Table 1).

We analysed (Table 2) by PCR 13 histological (paraffin) sections of the cervix uteri, nine endometrium biopsies, 26 samples of abortion material, two samples of curettage material of extrauterine gravidity and one sample of socially indicated abortion, which were previously confirmed as positive for AAV-2 DNA. Fifty-three samples were tested for HCMV, 51 for Ad, 52 for HSV-1 and 37 for HSV-2. Fifty-one samples were tested for all of these viruses in parallel (Table 2). None of the specimens containing AAV-2 DNA contained sequences of the known helper viruses mentioned above. One sample from early abortion and one cervical biopsy which did not contain AAV-2 DNA, used as controls, were also negative for helper virus DNA sequences.

However, in material from the uterus, sequences of HPV DNA were detected using general primers in 13 out of 21 AAV DNA-containing samples. In material from early abortion, HPV DNA sequences were found in 18 out of 26 specimens positive for AAV DNA (Table 2). The number of HPV-positive samples may be underestimated since it is

known that general primers sometimes fail to detect HPV sequences in paraffin sections (Baay *et al.*, 1996).

When possible, depending on the amount of material, the presence of genital HPV types was confirmed for HPV-positive samples using type-specific anti-contamination primers (van den Brule *et al.*, 1989). DNAs of HPV-16, -18 and -11 were identified; sometimes more than one type was found within the same sample [two uterus mucosa, two cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and one early miscarriage samples were positive for both HPV-16 and HPV-18 DNA, one early miscarriage sample was positive for HPV-16, HPV-18 and HPV-11 DNA, one extrauterine gravidity sample was positive for both HPV-16 and HPV-11, and one cervix uteri sample was positive for both HPV-18 and HPV-11]. None of the samples contained HPV-6 or HPV-31/-33 DNA.

Some samples which were positive for the presence of HPV DNA could not be identified as containing one of the HPV types tested in our experiments. On the other hand, eight samples which were found to be negative when using generic HPV primer pairs were later typed as HPV-16, HPV-18 or HPV-11, confirming the lower sensitivity of general primers compared to type-specific ones (Walboomers *et al.*, 1992).

In order to extend the above results, which were obtained with paraffin-embedded cervical tissues, 17 additional, freshly excised, cervix uteri samples (CIN lesions) were examined using PCR for AAV, HPV-16 and HPV-18 DNAs (Fig. 1). Out of 13 AAV-positive samples, seven were also HPV-16-positive

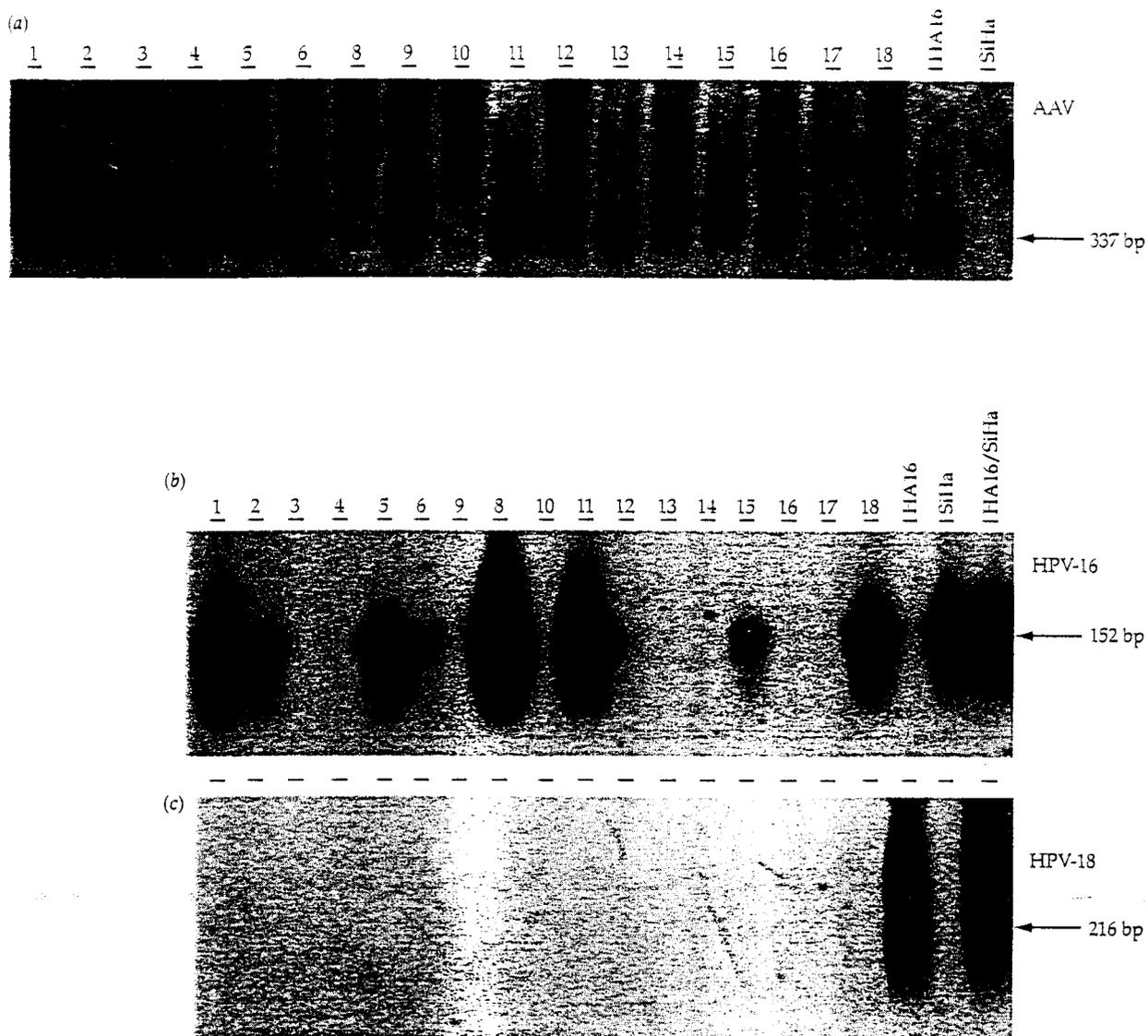


Fig. 1. Analysis by PCR for the presence of AAV-2, HPV-16 and HPV-18 DNA sequences in fresh cervical biopsies (CIN lesions). (a) Southern blot of PCR-amplified AAV-2 sequences probed with a  $\gamma$ - $^{32}$ P-labelled oligonucleotide as described in Tobiasch *et al.* (1994). Controls are HA16 cells containing both HPV-18 and AAV-2 DNA (Walz & Schlehofer, 1992) and SiHa cells containing HPV-16 DNA. Cervix uteri biopsy samples are numbered 1 to 18 (number 7 is absent). (b) Southern blot of PCR-amplified HPV-16 sequences probed with a  $\gamma$ - $^{32}$ P-labelled oligonucleotide as described in Walboomers *et al.* (1992). Controls are those used in (a), plus an additional control containing mixed DNAs from HA16 and SiHa, added to exclude the possibility of cross-hybridization. Cervix uteri samples are numbered 1 to 18 (number 7 is absent and 8 and 9 are inverted). (c) Southern blot of PCR-amplified HPV-18 sequences probed with a  $\gamma$ - $^{32}$ P-labelled oligonucleotide as described in Walboomers *et al.* (1992). Controls and sample numbers are as in (b).

and none were HPV-18-positive. Small differences in band sizes or hybridization signals suggested amplification of sequences of different AAV types [the pan1 and pan3 primers detect sequences of AAV-2, -3 and -5 (Tobiasch *et al.*, 1994)]. To exclude this possibility, amplification products were sequenced and identified as AAV-2 DNA (data not shown) and so were not due to amplification of AAV-3 (Muramatsu *et al.*, 1996) or AAV-5 (E. Tobiasch, personal communication) sequences.

In view of the frequent detection of HPV in human genital

tissue (Burk *et al.*, 1986; von Knebel Doeberitz, 1992) and in view of our recent *in vitro* results (Walz *et al.*, 1997), it is possible that HPV may provide at least some helper function for AAV replication, adding another virus to the list of potential helpers for this parvovirus. The detection of the oncosuppressive parvovirus AAV in the cervix uteri, the same tissue that is transformed by oncogenic papillomaviruses (von Knebel Doeberitz, 1992; zur Hausen, 1991), seems to be of particular interest. Epidemiological studies have demonstrated an inverse correlation between the prevalence of serum

antibodies to AAV and cervical carcinoma (see review by Schlehofer, 1994). It is tempting to speculate on the influence of AAV on the tumorigenic activity of HPV. This is supported by the finding of down-regulation of HPV gene expression by AAV (Hermonat, 1994; Hörer *et al.*, 1995). AAV has been demonstrated to induce differentiation in various cell systems (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992) and this may in addition contribute to an interference with HPV functions in view of the involvement of differentiation processes in the maturation of papillomaviruses (Dürst *et al.*, 1992; Stoler *et al.*, 1989; cf. also Rabreau & Schlehofer, 1995).

We reported previously the detection of large amounts of AAV-2 DNA and of AAV gene expression in the syncytiotrophoblast of abortion material (Tobiasch *et al.*, 1994). Possibly, persistent AAV becomes reactivated during pregnancy and can infect specific cells. Whether papillomaviruses, which are known to be reactivated during pregnancy (Monsonogo *et al.*, 1991; Patsner *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1987), help in this process remains to be determined.

HPV DNA detected in abortion material could indicate infection of embryonic tissues with these viruses. However, contamination of the curettage material by cells of the cervix uteri (in which HPV DNA is frequently present) cannot be excluded. DNA of papillomaviruses has also recently been reported in amniotic fluids (Armbruster-Moraes *et al.*, 1993, 1994).

Recent results (Friedman-Einat *et al.*, 1997) confirm our finding of AAV DNA sequences in the genital tract, although discrepancies in the number of samples positive for AAV DNA and DNA of possible helper viruses obtained by Han *et al.* (1996) and Friedman-Einat *et al.* (1997) remain to be elucidated. Our data suggest that papillomaviruses could provide helper functions for AAV-2 within human genital tissues. However, it cannot be excluded that functions of known AAV helper viruses (Ad, HCMV and HSV) have contributed to the establishment of AAV infection within the genital area.

We thank D. Neumann-Haefelin and F. Hufert for information on primers to detect DNA of HCMV and HSV, D. Falke and H. P. Grunert for proposing primers for HSV DNA, C. Verwaerde for suggesting adenovirus-specific oligonucleotide sequences, C. Vanpachterbeke for the kind gift of an HPV-11-positive biopsy and Y. Caudrelier for supplying uninfected and HSV/HCMV-infected MRC5 cells as well as HCMV-positive urine samples. D. Guittard is gratefully acknowledged for his expert technical assistance. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by a grant to E.A.M. by the Dr Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung. O.M. is a recipient of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, N.D. is a recipient of a CNRS/Conseil Régional Nord - Pas de Calais research grant.

## References

- Armbruster-Moraes, E., Ioshimoto, L. M., Leao, E. & Zugaib, M. (1993). Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in amniotic fluid during different periods of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **169**, 1074-1075.
- Baay, M. F., Quint, W. G., Koudtstaal, J., Hollema, H., Duk, J. M., Burger, M. P. M., Stolz, E. & Herbrink, P. (1996). Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA in paraffin-embedded cervical carcinomas. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 745-747.
- Buffone, G. J., Hine, E. & Demmler, G. J. (1990). Detection of mRNA from the immediate early gene of human cytomegalovirus in infected cells by in vitro amplification. *Molecular and Cellular Probes* **4**, 143-151.
- 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. *Journal of Virology* **40**, 241-247.
- Burk, R. D., Kadish, A. S., Calderin, S. & Romney, S. L. (1986). Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: correlation with biopsy results and Papanicolaou smear. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **154**, 982-989.
- Dürst, M., Glitz, D., Schneider, A. & zur Hausen, H. (1992). Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* **189**, 132-140.
- Friedman-Einat, M., Grossman, Z., Mileguir, F., Smetana, Z., Ashkenazi, M., Barkai, G., Varsano, N., Glick, E. & Mendelson, E. (1997). Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 71-78.
- 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.
- Han, L., Parmley, T. H., Keith, S., Kozlowski, K. J., Smith, L. J. & Hermonat, P. L. (1996). High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* **12**, 47-52.
- Hermonat, P. L. (1994). Adeno-associated virus inhibits human papillomavirus type 16: a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Research* **54**, 2278-2281.
- Hörer, M., Weger, S., Butz, K., Hoppe-Seyler, F., Geisen, C. & Kleinschmidt, J. A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *Journal of Virology* **69**, 5485-5496.
- Klein-Bauernschmitt, P., zur Hausen, H. & Schlehofer, J. R. (1992). Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type-2. *Journal of Virology* **66**, 4191-4200.
- McPherson, R. A., Rosenthal, L. J. & Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**, 217-222.
- Monsonogo, J., Magdalena, T., Catalan, F., Coscas, Y., Zerat, L. & Sastre, X. (1991). Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions. *International Journal of Cancer* **48**, 533-539.
- Muramatsu, S.-I., Mizukami, H., Young, N. S. & Brown, K. E. (1996). Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* **221**, 208-217.
- Myers, M. W., Laughlin, C. A., Jay, F. T. & Carter, B. J. (1980). Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *Journal of Virology* **35**, 65-75.

- Patsner, B., Baker, D. A. & Orr, J. W., Jr (1990). Human papillomavirus genital tract infections during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 33, 258-267.
- Puchhammer-Stöckl, E., Popow-Kraupp, T., Heinz, F. X., Mandl, C. W. & Kunz, C. (1990). Establishment of PCR for the early diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Journal of Medical Virology* 32, 77-82.
- Rabreau, M. & Schlehofer, J. R. (1995). Antagonism of two virus infections in the development of cervical cancer? *Oncology Reports* 2, 95-97.
- Robertson, D. I., Paslawski, D., Duggan, M. A., Stuart, G. C. E. & Nation, J. G. (1993). Estrogen and progesterone receptor, human papillomavirus, and DNA ploidy analysis in invasive carcinoma of the cervix in pregnancy. *American Journal of Clinical Pathology* 100, 18-21.
- Schlehofer, J. R. (1994). The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutation Research* 305, 303-313.
- Schneider, A., Hotz, M. & Gissmann, L. (1987). Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *International Journal of Cancer* 40, 198-201.
- Shimizu, C., Shimizu, H., Mitsuda, T., Tsukuda, M., Ichikawa, S. & Yokota, S. (1994). One-step determination of herpes simplex virus types I and II by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 8, 193-198.
- Stoler, M. H., Wolinsky, S. M., Whitbeck, A., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1989). Differentiation linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message specific RNA probes. *Virology* 172, 331-340.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletnky, K., Larué-Charlus, S., Severin, F. & Schlehofer, J. R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *Journal of Medical Virology* 44, 215-222.
- van den Brule, A. J. C., Claas, E. C. J., du Maine, M., Melchers, W. J. G., Heimerhorst, T., Quint, W. G. V., Lindeman, J., Meijer, C. J. L. M. & Walboomers, J. M. M. (1989). Use of anticontamination primers in the polymerase chain reaction of the detection of human papilloma virus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *Journal of Medical Virology* 29, 20-27.
- von Knebel Doeberitz, M. (1992). Papillomaviruses in human disease. Part I. Pathogenesis and epidemiology of human papillomavirus infections. *European Journal of Medicine* 1, 415-423.
- Walboomers, J. M. M., Meikert, P. W. J., van den Brule, A. J. C., Snijders, P. J. F. & Meijer, C. J. L. M. (1992). The polymerase chain reaction for human papillomavirus screening in diagnostic cytopathology of the cervix. In *Diagnostic in Molecular Pathology: A Practical Approach*, pp. 154-172. Edited by C. S. Herrington & J. O'D. McGee. Oxford: IRL Press.
- Waiz, C. & Schlehofer, J. R. (1992). Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome-17. *Journal of Virology* 66, 2990-3002.
- Waiz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M. & Schlehofer, J. R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *Journal of General Virology* 78, 1441-1452.
- Zhang, W. W., Fang, X., Branch, C. D., Masur, W., French, B. A. & Roth, J. A. (1993). Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome mediated transfection and PCR analysis. *Biotechniques* 15, 868-872.
- zur Hausen, H. (1991). Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184, 9-13.

---

Received 27 February 1997; Accepted 21 March 1997

## II Discussion

Le travail auquel nous avons participé apporte une information importante sur la co-infection des tissus génitaux humains par un virus aux propriétés antitransformantes (AAV-2) et un virus oncogène (HPV). Ces résultats corroborent, au niveau de la mise en évidence des génomes viraux, les données séroépidémiologiques qui suggèrent que les parvovirus pourraient effectuer dans la sphère uro-génitale, une sorte de surveillance anti-cancéreuse. Ce travail conforte enfin la mise en évidence, *in vitro*, de l'activité aidante des HPV pour la réplication des AAV et la régulation négative de l'expression des gènes E6 et E7 d'HPV par les produits de l'expression des gènes d'AAV (Hermonat, 1994b; Hörer *et al.*, 1995; Walz *et al.*, 1997b).

Nos travaux sur l'induction de l'expression de marqueurs de différenciation dans les cellules infectées par AAV (voir plus haut) abondent dans le sens d'une interférence complexe entre les virus AAV et HPV puisque la différenciation de la cellule hôte favorise la réplication d'HPV au détriment de son intégration et de l'expression des oncogènes E6 et E7.

## **ARTICLE IV**

**Presence of integrated DNA sequences of adeno-associated virus type  
2 in four cell lines of human embryonic origin**

## I Résumé

En quête d'un modèle d'infection *in vitro* de cellules humaines placentaires, nous avons utilisé des cellules trophoblastiques humaines d'origine choriocarcinomeuse ainsi que des cellules amniotiques, toutes établies en culture.

A notre grande surprise, les 3 lignées cellulaires placentaires (JAr, JEG-3 et BeWo) ainsi que les cellules amniotiques FL se sont révélées contenir de l'ADN d'AAV-2 intégré dans leur génome, et détectable tant par PCR que par "Southern Blot".

Bien que ces 4 lignées cellulaires soient permissives pour la réplication d'un virus auxiliaire, comme l'adénovirus de type 2, l'infection de ces cellules par l'adénovirus ne conduit pas à la réplication du génome d'AAV-2. Cependant, ceci ne semble pas lié à un blocage intrinsèque de la réplication d'AAV-2, car une co-infection de ces cellules par les virus AAV-2 et Ad2 conduit à la réplication du génome d'AAV-2 exogène. Cette incapacité de réplication du génome viral suggère l'existence de réarrangements dans l'ADN viral intégré. Certains de ces réarrangements ont pu être mis en évidence.

L'infection "spontanée" des cellules trophoblastiques et amniotiques corrobore fortement l'idée selon laquelle les tissus d'origine embryonnaire pourraient être une des cibles naturelles de l'infection par AAV-2.

## Presence of integrated DNA sequences of adeno-associated virus type 2 in four cell lines of human embryonic origin

Nathalie Dutheil,<sup>1</sup> Olivier Malhomme,<sup>1</sup> Nathalie Provost,<sup>1</sup> Paul Becquart,<sup>1</sup> Tatiana Burguete,<sup>2</sup> Jörg R. Schlehofer<sup>1,2</sup> and Thierry Dupressoir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, CNRS UMR 319, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, F-59019 Lille Cedex, France

<sup>2</sup>Deutsches Krebsforschungszentrum, FS Angewandte Tumoriologie, Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

The human helper virus-dependent parvovirus adeno-associated virus (AAV) has been found in human female genital tissues including material from first trimester miscarriage. In the latter case, AAV type 2 (AAV-2) DNA and viral proteins were detected mainly in the trophoblast cell layer of placenta. In this report, we present evidence that AAV DNA is also present in established human trophoblast cell lines (JEG-3, JAr, BeWo) and in the human amnion cell line FL. In cells of these lines, AAV-2 DNA could be detected both by PCR and Southern blot analysis. Restriction enzyme analysis indicated that AAV DNA was integrated into the host cell genome. Although the cell lines supported AAV replication when infected with AAV-2 and adenovirus type 2 (Ad2) as a helper virus, superinfection with Ad2 alone did not induce replication of AAV DNA, i.e. it failed to rescue AAV from its integrated state. This is probably due to rearrangements within the integrated AAV genome. The presence of AAV DNA in cells derived from human embryonic tissue corroborates the suggestion that human embryonic tissue may be one of the targets of AAV infection.

The human helper virus-dependent parvovirus adeno-associated virus (AAV) is thought to be non-pathogenic (Berns & Bohenzky, 1987) but to exert oncosuppressive activity (Schlehofer, 1994). In light of this, and because of its ability to integrate its genome into the host cell genome at preferential sites (Kotin & Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1990; Walz & Schlehofer, 1992), AAV has attracted much interest as a gene transduction vector (Muzyczka, 1992; Flotte & Carter, 1995). In natural infections in humans, AAV has been identified in

female genital tissue and in material from spontaneous abortion (Tobiasch *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Friedman-Einat *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997). In samples from first trimester miscarriage, DNA and proteins of AAV were detected predominantly in trophoblast cells (Tobiasch *et al.*, 1994). This finding prompted us to analyse the choriocarcinoma-derived human trophoblast cell lines BeWo (Pattillo & Gey, 1968), JEG-3 (Kohler & Bridson, 1971) and JAr (Pattillo *et al.*, 1971), as well as the human amnion-derived FL cell line (Fogh & Lund, 1957), for AAV. Analysis by PCR using primers amplifying sequences of AAV (Tobiasch *et al.*, 1994) indicated the presence of DNA of AAV type 2 (AAV-2) within the human trophoblast cell lines (Fig. 1*a*). These results could be confirmed using primers proposed by Han *et al.* (1996) (data not shown). In addition, Southern blot analysis revealed AAV-2 sequences migrating with high molecular mass cellular DNA, when DNA digested with restriction enzymes that did not cut within the AAV-2 DNA sequence was separated by agarose gel electrophoresis [e.g. see Fig. 1(*b*) for restriction with *Bgl*III]. When cellular DNA was digested with enzymes which cleave within the AAV-2 DNA sequence, typically sized AAV-2 DNA fragments (Srivastava *et al.*, 1983) were observed (Fig. 1*b*). However, transcription from sequences of AAV-2 could not be detected by RT-PCR or Northern blot analysis (data not shown).

In order to test whether AAV-2 DNA present in trophoblast cells can be rescued, we infected BeWo, JEG-3, and JAr cells with adenovirus type 2 (Ad2). As shown in Fig. 2, no viral DNA replication nor production of viral particles could be achieved by infection of these cells with helper virus, in contrast to HA16 control cells which contain integrated and rescuable AAV-2 DNA (Walz & Schlehofer, 1992). To ensure that these cell lines can be productively infected with adenovirus and/or AAV, cells of the BeWo, JEG-3 and JAr lines were infected with Ad2 (m.o.i. of 5 p.f.u. per cell) and co-infected with AAV-2 (m.o.i. of 10 p.f.u. per cell). Fig. 2 shows that AAV-2 replicates in cells co-infected with AAV-2 and Ad2. This indicates that a non-functional AAV-2 DNA sequence exists within trophoblast cell lines which is probably due to rearrangements of AAV DNA. Indeed, in JEG-3 cells, a

Author for correspondence: Thierry Dupressoir.  
Fax +33 3 20 87 79 08. e-mail tdupress@infobiogen.fr

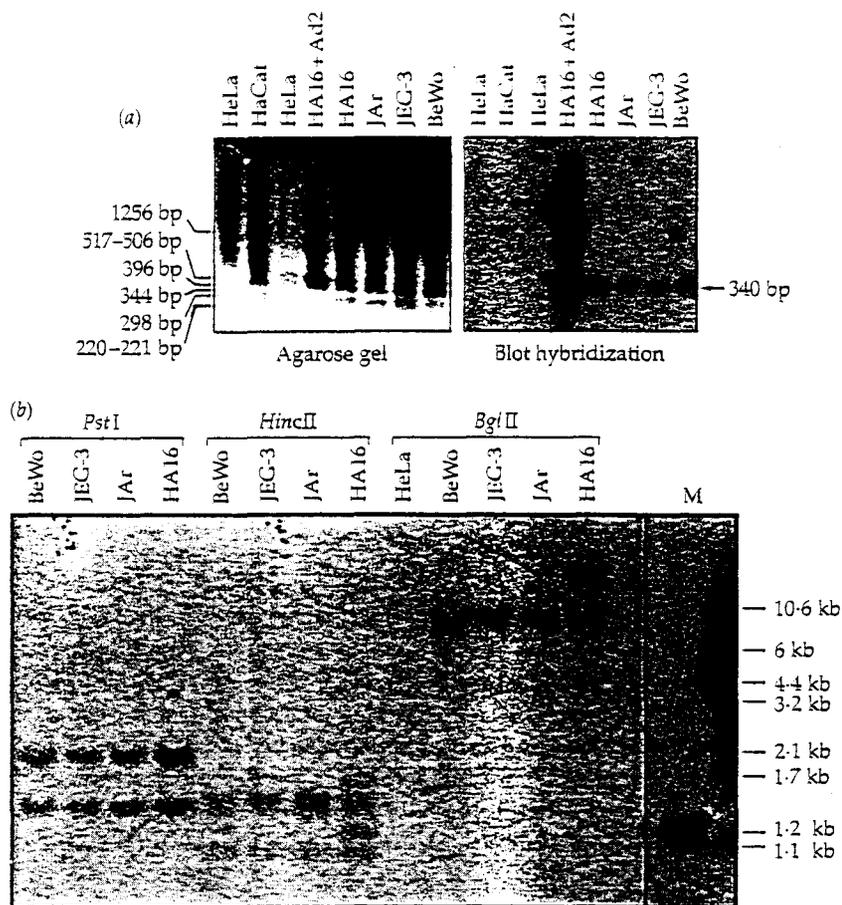


Fig. 1. Characterization of AAV-2 DNA sequences integrated in the genomic DNA of BeWo, JAr and JEG-3 cells. (a) Detection by PCR analysis of AAV-2 DNA in BeWo, JAr and JEG-3 cells. Left panel: ethidium bromide staining of an agarose gel of the amplification products obtained after PCR (as described by Tobiasch *et al.*, 1994) on the cellular DNA of HeLa and HaCat (negative controls), HA16 (positive control; superinfected or not infected with Ad2), JAr, JEG-3 and BeWo cells, respectively. Molecular sizes are indicated on the left. Right panel: hybridization of the corresponding Southern blot with a specific  $\gamma$ - $^{32}$ P-end-labelled AAV-2 oligonucleotide probe (nt 1640-1670). The expected 340 bp product is indicated. (b) Analysis of genomic DNA from BeWo, JAr and JEG-3 cells. Cellular DNA (10  $\mu$ g) was digested with *Hinc*II or *Pst*I, which cut within the AAV-2 genome, or *Bgl*II, a non-cutting enzyme, as indicated. DNA was separated by agarose gel electrophoresis, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with a  $\alpha$ - $^{32}$ P-radiolabelled AAV-2 probe obtained after restriction of the pTAV2 plasmid (Heilbronn *et al.*, 1990) with *Nco*I (positions 625 and 3762 within AAV-2 DNA sequence). HeLa and HA16 DNAs, respectively, were used as negative and positive controls for AAV-2 integration in cellular DNA. Molecular size markers (kb) are indicated.

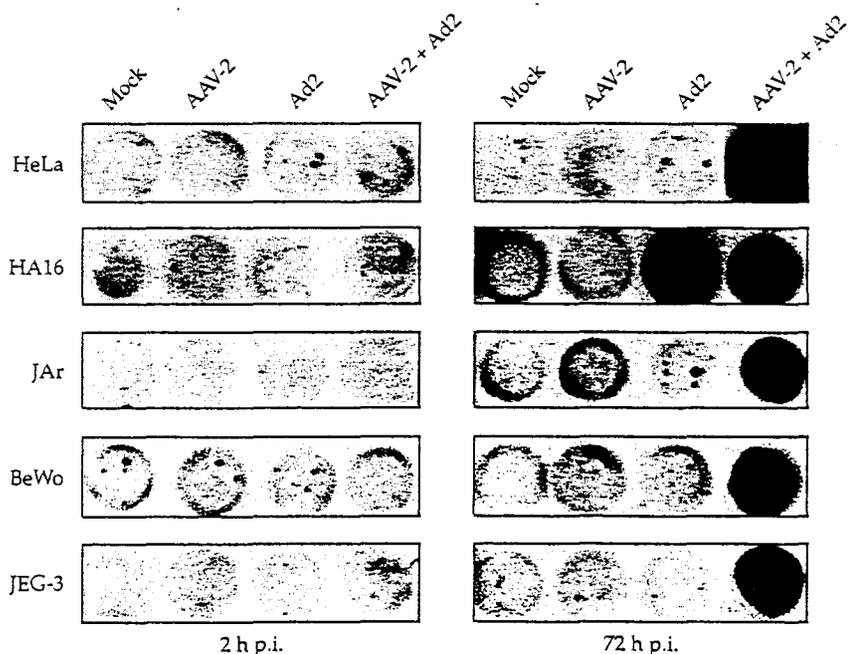


Fig. 2. Replication of AAV-2 DNA after adenovirus infection of BeWo, JAr and JEG-3 cells. Cells were infected with PBS (mock infection), Ad2 (m.o.i. of 5 p.f.u. per cell), AAV-2 (m.o.i. of 10 p.f.u. per cell) or Ad2 + AAV-2 (m.o.i. of 5 and 10, respectively), and harvested at 2 h post-infection (p.i.) and after complete cytopathogenic effect (72 h p.i.). Cells were then disrupted by freeze-thawing and transferred to a nitrocellulose filter with a dot-blot apparatus. After immobilization, denaturation and renaturation, filters were hybridized with an  $\alpha$ - $^{32}$ P-radiolabelled AAV-2 probe as in Fig. 1 (b). HA16 cells are used as a positive control for AAV rescue after Ad2 infection. In JAr, JEG-3 and BeWo cells, Ad2 infection is not able to rescue AAV.

point mutation was found at base position number 499. This specific mutation has been reported to suppress Rep activity (Hermonat *et al.*, 1984).

In JAr cells, it was not possible to amplify AAV DNA sequences when using the *rep* specific primers (p1, nt 960-941; p2, nt 305-320) described by Samulski *et al.* (1991) (un-

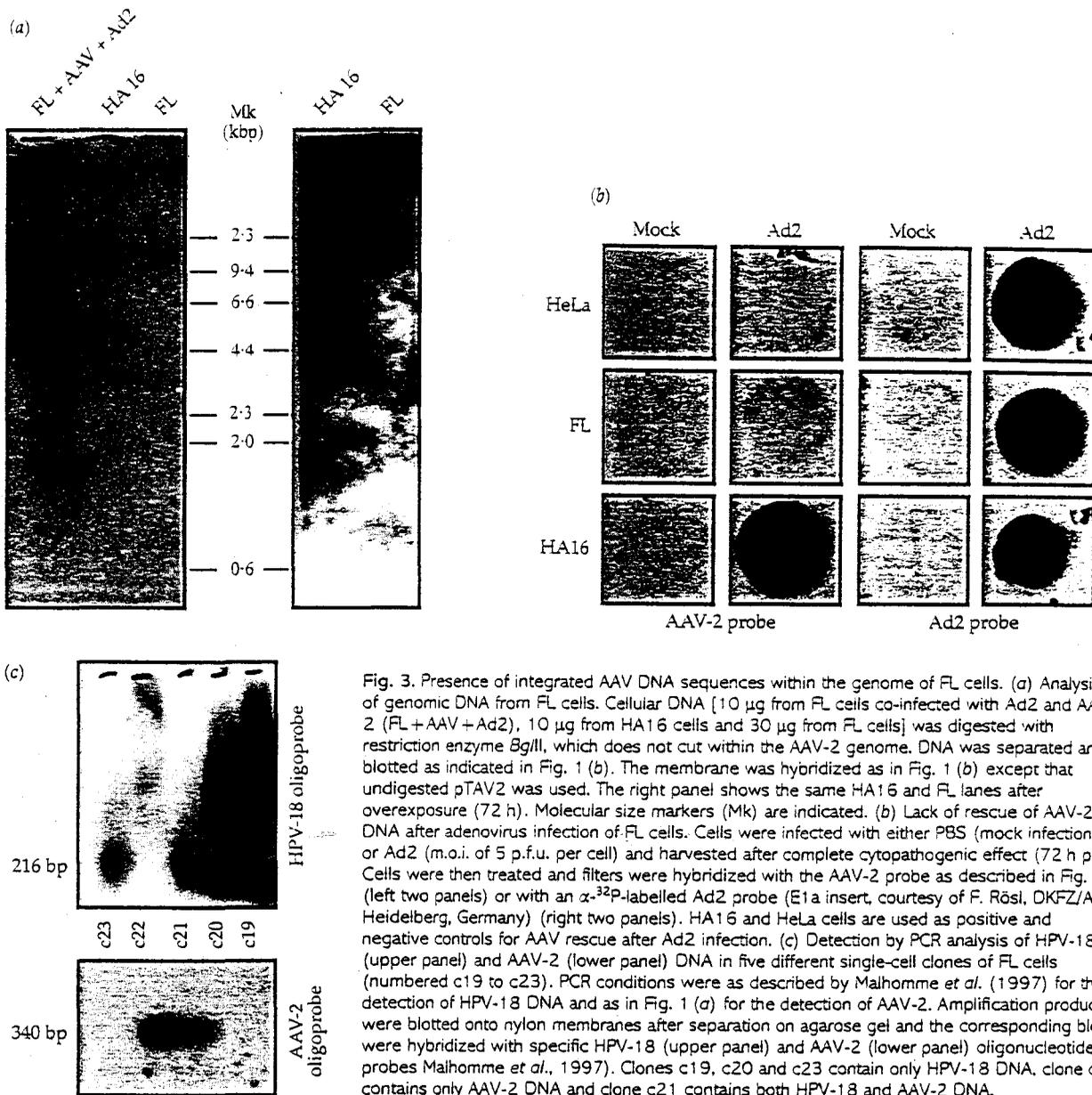


Fig. 3. Presence of integrated AAV DNA sequences within the genome of FL cells. (a) Analysis of genomic DNA from FL cells. Cellular DNA [10 µg from FL cells co-infected with Ad2 and AAV-2 (FL+AAV+Ad2), 10 µg from HA16 cells and 30 µg from FL cells] was digested with restriction enzyme *Bgl*II, which does not cut within the AAV-2 genome. DNA was separated and blotted as indicated in Fig. 1 (b). The membrane was hybridized as in Fig. 1 (b) except that undigested pTAV2 was used. The right panel shows the same HA16 and FL lanes after overexposure (72 h). Molecular size markers (Mk) are indicated. (b) Lack of rescue of AAV-2 DNA after adenovirus infection of FL cells. Cells were infected with either PBS (mock infection) or Ad2 (m.o.i. of 5 p.f.u. per cell) and harvested after complete cytopathogenic effect (72 h p.i.). Cells were then treated and filters were hybridized with the AAV-2 probe as described in Fig. 2 (left two panels) or with an  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-labelled Ad2 probe (E1a insert, courtesy of F. Rösl, DKFZ/ATV, Heidelberg, Germany) (right two panels). HA16 and HeLa cells are used as positive and negative controls for AAV rescue after Ad2 infection. (c) Detection by PCR analysis of HPV-18 (upper panel) and AAV-2 (lower panel) DNA in five different single-cell clones of FL cells (numbered c19 to c23). PCR conditions were as described by Malhomme *et al.* (1997) for the detection of HPV-18 DNA and as in Fig. 1 (a) for the detection of AAV-2. Amplification products were blotted onto nylon membranes after separation on agarose gel and the corresponding blots were hybridized with specific HPV-18 (upper panel) and AAV-2 (lower panel) oligonucleotide probes Malhomme *et al.*, 1997). Clones c19, c20 and c23 contain only HPV-18 DNA, clone c22 contains only AAV-2 DNA and clone c21 contains both HPV-18 and AAV-2 DNA.

published observations). These preliminary data suggest a deletion within the *rep* coding region of the AAV DNA.

Similarly, another human cell line (FL) of embryonic origin was found to contain AAV DNA sequences by PCR and Southern blot analysis (Fig. 3a). Also, the AAV genome could not be rescued in these cells after superinfection with helper virus (Fig. 3b), although these cells were permissive for AAV DNA amplification after superinfection with Ad2 (Fig. 3a, first lane). This cell line, used in many virology laboratories, is derived from human amnion tissue and displays epithelial-like morphology (Fogh & Lund, 1957). FL cells are known to exhibit HeLa cell markers and are suspected to be contaminated by HeLa cells (ATCC catalogue information). Since HeLa cells contain sequences of human papillomavirus type 18 (HPV-18),

we analysed clonal isolates of these cells for the presence of AAV-2 and HPV-18. Using specific primers and probes, we found that the FL cell line is indeed a mixture of cells. HPV-18 DNA sequences were observed in 16 out of 21 single cell clones. Eleven HPV-positive clones also contained AAV-2 DNA sequences. A minority of clones contained only AAV-2 DNA (two out of 21) or were negative for the presence of both viral DNA sequences (Fig. 3c).

AAV-2 has been repeatedly found with notable frequency in the human genital tract (Tobiasch *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Friedman-Einat *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997). The data presented herein show, for the first time, the presence of AAV-2 DNA integrated within the cellular genome of established human cell lines of choriocarcinoma (JAr, JEG-3 and BeWo) or

amion (FL) origin. The AAV DNA sequences were found repeatedly, either by PCR or Southern blot, in cells from different suppliers or laboratories (see Acknowledgements) thus excluding the possibility of recent contamination in our laboratory.

In contrast to other cell lines containing integrated AAV DNA after experimental infection or transfection (Laughlin *et al.*, 1986; Waiz & Schlehofer, 1992), AAV could not be rescued from JAr, JEG-3, BeWo or FL cells after superinfection with Ad2. The fact that these cell lines supported replication of AAV when co-infected with AAV-2 and Ad2, indicates that the integrated AAV-2 sequences underwent molecular modifications preventing excision and replication by helper viruses. This is substantiated by our results of some rearrangements within the AAV DNA integrated in the genome of trophoblast cells.

After digestion of the cellular DNA of trophoblast cells, the fragments hybridizing to AAV probes revealed slightly different mobilities, suggesting different integration sites in different cells. However, our results do not indicate that multiple integration of rearranged and/or tandemly organized AAV-2 DNA molecules has occurred in naturally infected JAr, JEG-3 and BeWo cells. In previously described experimental systems leading to AAV-2 DNA integration, virus sequences were found integrated predominantly within a cellular sequence named AAVS1 (Linden *et al.*, 1996). Since it is unlikely that the AAVS1 sequence is organized differently in cells from placental origin (Kotin *et al.*, 1990), it is conceivable that the unique, high molecular mass, AAV-2 DNA band observed, even if slightly smaller in BeWo cells, may represent a single integration site.

On the other hand, the *Bgl*III restriction pattern of DNA from FL cells (Fig. 3a) is reminiscent of that observed previously with experimentally infected cells such as HeLa, KB and Detroit-6. These cells all exhibit HeLa markers [KB, ATCC information; Detroit-6 cells, Mikhailova *et al.* (1977)] which are also present in FL cells (ATCC information, our results). This might suggest that integration of multiple copies of AAV-2 DNA in multiple integration sites is a particular feature of HeLa or HeLa-contaminated cell lines.

To answer these questions, analysis of the integration pattern of AAV-2 sequences in trophoblast cells as well as cloning of integrated molecules are currently under investigation in our laboratory.

In view of the oncosuppressive activity of AAV, it was surprising to find AAV-2 DNA sequences 'naturally' integrated within the genome of tumour (choriocarcinoma) cells. Possibly, modified (unrescuable) AAV-2 DNA sequences do not express oncosuppressive activity.

Altogether, our data, as well as previous reports (e.g. Tobiasch *et al.*, 1994), indicate that human embryonic cells might be a target of natural AAV infection, although we cannot exclude an infection with AAV in the very early steps of the establishment of JEG-3, JAr, BeWo and FL cells.

However, it seems unlikely that these cells, which were obtained at different times and in different laboratories, could have been the only AAV-contaminated cell lines among the multitude of other human embryonic cells cultured *in vitro*; for instance, the human Tera-I cell line of teratocarcinoma origin was negative for the presence of AAV-2 DNA sequences (T. Burguete, unpublished results). Nonetheless, it seems important to note that some human embryonic cell lines which are used in many laboratories are persistently infected with AAV-2.

We are indebted to H. Zeichhardt for FL cells and to N. Müller-Lantsch for Tera-I cells. We are grateful to Y. de Launoit, J. Simard and L. Zimmer for providing us with JEG-3, JAr and BeWo cells from their laboratories. We thank E. Tobiasch for AAV-5 sequence information. We are grateful to J. M. Merchez for expert processing of photographs. N. D. is a recipient of Conseil Régional Nord - Pas de Calais/Institut Pasteur de Lille. O.M. is a recipient of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schl 203/4-2).

## References

- Berns, K. I. & Bohenzky, R. A. (1987). Adeno-associated viruses: an update. *Advances in Virus Research* 32, 243-306.
- Flotte, T. R. & Carter, B. J. (1995). Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Therapy* 2, 357-362.
- Fogh, J. & Lund, R. O. (1957). Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 94, 532-537.
- Friedman-Einat, M., Grossman, Z., Mileguir, F., Smetana, Z., Ashkenazi, M., Barkai, G., Varsano, N., Glick, E. & Mendelson, E. (1997). Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 71-78.
- Han, L., Parmley, T. H., Keith, S., Kozlowski, K. J., Smith, L. J. & Hermonat, P. L. (1996). High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* 12, 47-52.
- Heilbronn, R., Burkle, A., Stephan, S. & zur Hausen, H. (1990). The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *Journal of Virology* 64, 3012-3018.
- Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., Berns, K. I. & Muzyczka, N. (1984). Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *Journal of Virology* 51, 329-339.
- Kohler, P. O. & Bridson, W. E. (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology* 32, 683-687.
- Kotin, R. M. & Berns, K. I. (1989). Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170, 460-467.
- Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. & Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 2211-2215.
- Laughlin, C. A., Cardellicchio, C. B. & Coon, H. C. (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *Journal of Virology* 60, 515-524.

- Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 11288–11294.
- Maihomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., Armbruster-Moraes, E., Schliehofer, J. R. & Dupressoir, T. (1997). Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *Journal of General Virology* **78**, 1957–1962.
- Mikhailova, G. R., Rodova, M. A., Gadashevich, V. N., Demidova, S. A. & Zhdanov, V. M. (1977). Karyological study of the continuous cell lines. Comparative analysis of the HeLa and Detroit-6 cell lines. *Tsitologiya* **19**, 786–790.
- Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **158**, 97–129.
- Pattillo, R. A. & Gey, G. O. (1968). The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblast cells in vitro. *Cancer Research* **28**, 1231–1236.
- Pattillo, R. A., Ruckert, A., Hussa, R., Bernstein, R. & Delfs, E. (1971). The JA<sub>3</sub> cell line – continuous human multihormone production and controls. *In Vitro* **6**, 398–399.
- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N. & Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO Journal* **10**, 3941–3950.
- Schliehofer, J. R. (1994). The tumor suppressive properties of Adeno-Associated viruses. *Mutation Research* **305**, 303–313.
- Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology* **45**, 555–564.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larüe-Charlus, S., Severin, F., Becker, N. & Schliehofer, J. R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *Journal of Medical Virology* **44**, 215–222.
- Walz, C. & Schliehofer, J. R. (1992). Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome-17. *Journal of Virology* **66**, 2990–3002.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M. & Schliehofer, J. R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *Journal of General Virology* **78**, 1441–1452.

---

Received 9 July 1997; Accepted 24 July 1997

## II Discussion

L'ADN du parvovirus humain AAV-2 a été fréquemment détecté dans des tissus génitaux humains et dans du matériel provenant d'avortements spontanés du premier trimestre de la grossesse (Tobiasch *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1996; Malhomme *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997a).

L'utilisation de cellules d'origine placentaire (JAr, JEG-3, BeWo) et amniotique (FL) nous a permis de montrer une intégration du génome d'AAV-2 dans l'ADN de ces 4 lignées cellulaires, ce qui constitue ainsi le premier exemple caractérisé d'infection "naturelle" ou tout du moins non expérimentale. Du fait des propriétés oncosuppressives du parvovirus AAV-2, il nous semblait surprenant que des cellules tumorales puissent être le siège d'une infection latente par AAV-2. Contrairement à la majorité des cellules infectées de façon latente par AAV-2 et ayant intégré l'ADN viral dans leur génome, la surinfection de ces cellules par l'adénovirus de type 2 n'entraîne aucune excision et réplication des séquences parvovirales intégrées. Cette observation est en accord avec les réarrangements viraux identifiés au sein des séquences virales intégrées. Ainsi, des séquences d'ADN d'AAV-2 défectives pourraient être dépourvues de toute propriété oncosuppressives.

Contrairement aux travaux publiés par Kotin et collaborateurs (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991), les fragments d'ADN génomique, hybridant avec une sonde AAV-2, possèdent une taille similaire pour les 3 lignées placentaires. Ces lignées cellulaires ont été isolées dans 2 laboratoires différents et représentent donc un événement unique d'intégration (Kohler et Bridson, 1971; Patillo et Gey, 1968; Patillo *et al.*, 1971). Par conséquent, le fait que des événements similaires concernant l'intégration du génome viral se soit déroulés dans des cellules différentes mérite d'être analysé plus en détail. Par ailleurs, Shelling et collaborateurs, utilisant un vecteur recombinant portant le gène de la néomycine et les séquences codant les protéines Rep78/68, ont obtenu le même profil de digestion pour plusieurs recombinants intégrés dans la séquence AAVSI (Shelling et Smith, 1994).

La caractérisation du site d'intégration des séquences virales dans les cellules JAr, JEG-3 et BeWo est indispensable. Afin d'identifier ces sites d'intégration, nous avons utilisé une stratégie mise au point par Samulski et collaborateurs et basée sur l'amplification par PCR de jonctions entre les séquences AAV-2 et AAVSI (Samulski *et al.*, 1991). Cependant, aucun produit n'a pu être amplifié à partir de l'ADN génomique de ces 3 lignées cellulaires. Il semble donc que les sites d'intégration du génome d'AAV-2 dans l'ADN des cellules JAr, JEG-3 et BeWo soient différents de ceux précédemment décrits par Kotin et Samulski. Malgré ce résultat négatif, l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI ne peut être exclue. En effet, comme tous les sites d'intégration, décrits à cette époque, avaient été localisés entre les nucléotides 900 et 1200 de la séquence AAVSI, Samulski et collaborateurs avaient utilisés des oligonucléotides situés dans cette région. Ultérieurement, d'autres sites d'intégration ont été caractérisés tout le long de la séquence

AAVSI, et plus particulièrement à proximité du motif RBS à l'aide d'un système extrachromosomique (Giraud *et al.*, 1995). Il est donc tout à fait envisageable que l'ADN d'AAV-2 soit effectivement intégré dans la séquence AAVSI mais à des sites différents de ceux identifiés précédemment. Il apparaît donc raisonnable de rechercher une intégration des séquences virales à proximité du motif RBS de cette séquence cellulaire. De plus, l'intégration des séquences virales dans l'ADN cellulaire peut induire des remaniements plus ou moins importants du génome viral intégré ainsi que des délétions des extrémités virales. L'existence de telles variations, au sein des séquences virales intégrées dans les cellules placentaires, empêcheraient ainsi l'appariement d'oligonucléotides sur le génome viral.

La construction d'une génothèque à partir de l'ADN génomique des cellules placentaires et amniotiques nous permettra peut être de caractériser le site d'intégration du génome viral dans ces cellules et de déterminer le statut du génome viral.

## **ARTICLE V**

**Molecular characterization of AAV-2 integration sites in latently  
infected HeLa cells**

## I Résumé

En l'absence de tout virus auxiliaire, l'ADN du parvovirus AAV-2 s'intègre *in vitro* dans le génome de cellules en culture (Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986; Walz et Schlehofer, 1992) et probablement aussi *in vivo* au cours d'infections naturelles. Le génome d'AAV-2 s'intègre préférentiellement dans la séquence AAVSI, localisée sur le bras long du chromosome 19. Cependant, d'autres travaux ont suggéré l'existence de sites potentiels d'intégration différents pour AAV-2 (Bantel-Schaal, 1995; Walz et Schlehofer, 1992). En effet, l'analyse par FISH de chromosomes métaphasiques de cellules HA16, cellules HeLa infectées de façon latente par AAV-2, semblaient indiquer une intégration du génome viral dans une séquence du chromosome 17. Ainsi, afin d'identifier ce(s) site(s) d'intégration, nous avons construit une génothèque à partir de l'ADN génomique des cellules HA16, puis nous avons analysé les jonctions entre les séquences virales et cellulaires.

A notre grande surprise, il s'est révélé que le génome viral était intégré dans la séquence AAVSI (localisée sur le chromosome 19) et non, comme attendu, dans une séquence du chromosome 17. Ce résultat suggérerait donc l'existence de translocations entre des séquences des chromosomes 17 et 19. L'analyse de chromosomes en métaphases nous a effectivement permis de mettre en évidence l'existence de multiples translocations impliquant des séquences du chromosome 19.

Nous avons également montré, pour la première fois, une intégration du génome viral à proximité du motif RBS de la séquence AAVSI et ceci dans des cellules infectées de façon latente par AAV-2. Par ailleurs, nous avons également localisé d'autres sites d'intégration tout le long de la séquence AAVSI, mais aussi dans un élément transposable de type Line1 (L1) situé dans la région 3' de la séquence AAVSI.

Enfin, l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI a induit des remaniements tant au niveau viral que cellulaire.

## **Molecular characterization of AAV-2 integration sites in latently infected HeLa cells**

**Nathalie Dutheil<sup>1</sup>,  
Alexias Deprez<sup>1</sup>,  
Agnès Bègue<sup>1</sup>,  
Bruno Delobel<sup>3</sup>,  
Claire Montpellier<sup>1</sup>,  
Christian Walz<sup>1,§</sup>,  
Jörg R. Schlehofer<sup>4</sup> and  
Thierry Dupressoir<sup>1,\*</sup>.**

<sup>1</sup>CNRS UMR 319, Mécanismes du développement et de la cancérisation, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, F-59019 Lille Cédex, France

<sup>3</sup>Centre de cytogénétique, Hopital Saint-Antoine, F-59008 Lille Cédex, France

<sup>4</sup>Angewandte Tumorstudiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany

<sup>§</sup> present address: Loyola University Chicago  
Loyola University Medical Center, Stritch School of Medicine  
Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Research  
2160 South First Road  
Maywood, Illinois 60153, USA

\* corresponding author at <sup>1</sup>, E-mail: tdupress@infobiogen.fr,  
Telephone (33)(0)320 87 72 09, Fax: (33)(0)320 87 79 08.

## INTRODUCTION

The human helper virus-dependent parvovirus, adeno-associated virus (AAV) has been shown to interfere with tumorigenesis at different stages of tumour development (for a review, see reference (48)) Even if the mechanisms of this oncosuppression are not yet elucidated, it is known that AAV can impede the growth of virus- or oncogene-induced tumors in experimental animal models (7;8;21-24;28;29;40;42).

On the other hand, AAV DNA has been found repeatedly by PCR experiments in a number of human tissue (1;13;18;19;38;51;52). Moreover, adeno-associated virus type-2 (AAV-2) DNA sequences were found integrated in the genomic DNA prepared from biopsies of human genital tissue (51;52) or established cell lines from human embryonic origin (11). In biopsies, AAV-2 is able to replicate since viral replication-associated proteins (Rep) were found to be expressed by immunohistochemistry.

These findings suggest that human genital tissue, at least, could be a target for *in vivo* integration of AAV DNA, thus allowing the development of a latent or persistent infection, susceptible to interfere with cell transformation.

This is consistent with the data obtained from previous serological studies suggesting a somewhat protective effect of AAV infection against cervical carcinoma (14;39;49) .

The AAV DNA has been shown to integrate specifically in a locus on human chromosome 19 (AAVS1) review in (37) providing the viral non-structural Rep protein is present. Recombinants AAV molecular vectors lacking the Rep genes and introduced in cell target where the Rep protein is not provided in trans, integrate randomly (45) in the host cell DNA whatever these cells are dividing or not (43). However, AAV has aroused substantial interest as a vector for human gene therapy, despite the lack of information on its possible association with human disease and probably due to its broad host-cell range *in vitro* and its ability to stably integrate in the host cell genome in the absence of conditions allowing replication and/or viral products expression.

Main conclusions of the integration models presented by Linden et al.(36) and Kotin et al. (30) point at the major role of Rep proteins in the AAVS1 specific integration of AAV-2 DNA and

propose that the AAV ITR could be involved mainly in the rescue of integrated AAV proviral sequences rather than in the specific targeting of AAV integration.

These proposal raised the question of the fate of integrated AAV DNA molecules after long term cultures, situation which suppose that full length AAV sequences carrying both the ITR and the Rep molecules should undergo excision/integration events along with lifespan in culture as cells undergo stress.

Targeted integration in the AAVS1 sequence is obtained, in experimentally infected cells, with a maximum described efficiency of only 70% (33). Moreover, integration of AAV DNA molecule was described in different locations (3;54;59), even in conditions where the « specifying » elements , i.e. Rep proteins, Rep binding site (RBS) and terminal repetition sequence (trs), where present. Rep binding sequences have been mapped all along the (characterized) human genome which may serve as either target sequences for the effects of Rep proteins of putative alternate integration sites (58). Last, long term culture of integrated AAV-carrying cells has for long been described to release episomal forms of AAV sequences in addition to integrated ones (5;34;50) and multiple rearrangements of either AAVS1 and AAV sequences have been pointed out to occur after integration of AAV DNA within the host cell genome (15;31;41). In order to adress the question of a possible « mobility » of AAV--containing or integrated AAV sequences after more than 100 passages in culture, we analysed the previously described HeLa-derived, AAV-containing HA16 cells in which at least two integration sites of AAV-2 were found, a double one having been localised on chromosome 17 by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis (54).

In this paper, we present data showing that

- i) long term culture seems to allow integrated AAV sequences to leave the host cell genome.
- ii) remaining AAV-2 DNA sequences are integrated (multiple integrations) within different copies of the previously characterized AAVS1 preferential integration sequence, even (and perhaps rather) if the chromosomal region harbouring the AAVS1 sequence is translocated on chromosomes different from chromosome 19, normal location of this sequence.
- iii) a head-to-tail AAV-2/AAV-2 junction exists.

iv) AAV-2 sequences rearrangements occurred in a precise region suggesting that a « labile » junction could exist.

v) AAVS1 sequence rearrangements can be identified by Southern blot experiments, even if they were not picked out of the genomic library.

vi) integration of AAV-2 sequences occurred mainly in the vicinity of the RBS sequence of AAVS1

vii) AAV-2 sequences were repeatedly found integrated within a sequence resembling the Long Interspersed Nuclear Element (Line 1) sequence, found also located in the 3' region of the AAVS1 sequence carried by numerous plasmids.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture, sub-cloning and screening.

Human cervical carcinoma cells HeLa and AAV-containing HeLa cell-derived HA16 cells (54) as well as cell clones derived thereof, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France), antibiotics and glutamine. Cells were grown at 37°C, in a 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere.

Semi confluent HA16 cells were trypsinised and seeded onto 96-wells microplates after dilution to obtain one single cell per well. Outgrowing cell clones were first grown in HA16 cells-conditioned medium supplemented with 20% fetal calf serum, then maintained in standard conditions. Clones were designated HA16C1 to -C13. Resulting cell cultures were checked for the presence of AAV DNA by dispersed cell assay and rescue of the integrated AAV sequences after Ad2 superinfection as described previously (54). Clones displaying both rescuable AAV and a good growing capacity were maintained in culture. The number of passages indicated for clones is determined after sub-cloning. Clone HA16C5 was further used for complete analysis.

### Genomic library

DNA of HA16C5 cells at passage 9 was partially ( 5 min.) digested with the restriction enzyme Sau3A and fractionated through a sucrose gradient (46). The 15-20 kb fraction was recovered. This DNA fraction was ligated into BamHI  $\lambda$  DASHII arms (Stratagene, La Jolia CA, USA) and packaged into  $\lambda$  particles (Stratagene, La Jolia CA, USA). The SRB P2 lysogenic strain of *Escherichia coli* (Stratagene, La Jolia CA, USA) was used for screening. Bacteriophage recombinants containing AAV-2 DNA were identified by hybridization with a labelled AAV-2 probe. AAV positive phages were picked and replated at a lower density. The phages from the lysed bacteria were concentrated and the DNA was extracted as described (46). The phages containing AAV-2 sequences were digested with NotI and ligated into the NotI site of pBluescript (Stratagene, La Jolia CA, USA) . The plasmids were transfected into the SURE strain of *E. coli* and the cultures were grown at 30°C (The *E. coli* SURE strain minimizes DNA

rearrangements due to mutations in the *recB*, *uvrB*, *umuC* and *sbcC* genes (17) The plasmids were purified through CsCl gradients (46).

Plasmids numbered 2-6, 10, 14, 19-20, were analyzed by restriction mapping and Southern hybridizations with 3 different probes (between brackets) in order to identify the leftward (nt.1 to 499, PstI digestion), rightward (nt. 3762 to 4484, NcoI digestion) and middle (nt. 625 to 3762, NcoI digestion) part of the AAV-2 sequences, respectively. Plasmids as well as derived subcloned fragments, were partially sequenced to elucidate the primary structure of both cellular-viral and viral-viral junctions.

#### **DNA extraction and analysis.**

Southern-blot analysis of high-molecular weight cellular DNA digested with the restriction enzymes indicated was performed according to standard procedures (46) as described previously (53).

Restriction enzyme digestions were performed according to the manufacturers. Enzymes were obtained from Boehringer-Mannheim (Mannheim) and Pharmacia (St Quentin Falaviers, France). Digested DNA was analysed by electrophoresis in a 0,8% agarose gel in Tris Acetate EDTA buffer (TAE) at 25 Volt during 16 hours, and then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra-membrane, Amersham). DNA was immobilized and hybridized with radiolabeled  $\alpha$  <sup>32</sup>P-dCTP (Megaprime labeling kit, Amersham) DNA probes (see above). Hybridizations were performed in stringent conditions for 16 hours at 42°C (46). After extensive washings at 65°C in 1% SDS, 0,1 X SSC, membranes were exposed to X-ray film (Kodak).

#### ***In situ* hybridization**

Metaphase chromosomes from cells grown on glass coverslips were spread after hypotonic shock of the cell cultures with diluted fetal serum (1:5) and fixation with ethanol and acid acetic. Coverslips were stored at -20°C until use.

Standard cytogenetic preparations were used and mitotic cells were analysed by metaphase-FISH (Fluorescent *in situ* hybridization). Cloned AAV-2 DNA was biotinylated with the Bionick Labeling System (Gibco BRL). The COATASOME 19 total chromosome 19 probe, labeled with digoxigenin, and the chromosome 17  $\alpha$  satellite probe, direct-labeled with

fluorescein, were both obtained from Oncor. *In situ* detection of probes was performed with the « chromosome *in situ* kit » obtained from Oncor. For AAV-2 detection, a Fluor-Amp fluorescein amplification system was used (Oncor).

### **Viral plasmid constructs and hybridisation probes.**

The plasmids pAV2 (35) and pTAV2 (20) which comprise the full length AAV-2 genome were used as a source for AAV-2 DNA probes. Different AAV-2 genomic inserts were prepared from pAV2 or pTAV2:

- Xba-EcoRV AAV-2 probe is 4.6 Kb and covers ~100% of the genome.

derived leftward, rightward and middle probes were derived and are described in the « genomic library » section (see above).

Probes were also prepared for the visualisation of:

- L1 sequences by subcloning in pKS from plasmid p3, a 282 b.p. fragment.

- AAVS1 sequences by subcloning in pKS from plasmid p5, a 1088 b.p. PstI<sub>(1438)</sub>/PstI<sub>(2526)</sub> fragment.

The sequence of restriction fragments was determined completely before use as probes.

Restriction fragments were radio labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dTTP (NEN Dupont, Les Ulis, France) by nick translation (44) or with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (NEN Dupont, Les Ulis, France) by the random priming technique (12).

### **Polymerase chain reaction.**

PCR for the detection of AAV sequences was performed as described in (51). Confirmation PCR for the presence of AAV-cellular DNA junctions in the genomic DNA of HA16 cells or HA16-derived clones, were performed. using primer pairs as follows :

• AAV2-L1 junction:           AVL           <sub>1973</sub> CTCgCATTgTCTgCAgggAAA <sub>1953</sub>

L1pr<sub>0119</sub> gATAgTTTgCTgAgTgAT<sub>0103</sub>

PCR cycling was : 94°C, 8 min.; [94°C, 1 min.; 58°C, 4 min.]<sub>40</sub>; 72°C, 4 min.

as expected from the characterised sequence, the amplified band size was 483 b.p.

• AAV-AAVS1 junctions

- Plasmid p19 junction: AV19<sub>4480</sub> gTTTCCATggCTACgTAgATAAgTAgCATG<sub>4509</sub>

AS19<sub>1272</sub> gAACTCTgCCCTCTAACg<sub>1289</sub>

PCR cycling was : 94°C, 8 min.; [94°C, 1 min.; 50°C, 4 min.]<sub>40</sub>; 72°C, 4 min.

as expected from the characterised sequence, the amplified band size was 290 b.p.

- Rearranged junction (plasmids p2, -4, -5, -10)

AVr1<sub>4498</sub> ATAAgTAgCATggCgggTTA<sub>4517</sub>

ASr1<sub>643</sub> CATCAgACgCgCCTCgTCCA<sub>623</sub>

PCR cycling was : 94°C, 8 min.; [94°C, 1 min.; 58°C, 4 min.]<sub>40</sub>; 72°C, 4 min.

the amplified band size expected from the characterised sequence was 280 b.p.

an additional, preferentially amplified product (488 b.p.; sequence not present in cloned materials, see results) was characterised and sequenced.

The previously cloned rearranged junction was confirmed with corroborative PCR primers.

AVr1<sub>4498</sub> ATAAgTAgCATggCgggTTA<sub>4517</sub>

ASr2<sub>452</sub> ATCCTCTCCggACATCgC<sub>433</sub>

as expected from the characterised sequence, the amplified band size was 248 b.p.

In all cases, full genomic DNA of the samples was phenol/chloroform-extracted and used as template. The reaction was performed with the Amplitaq Gold polymerase from Perkin Elmer Cetus (Paris Nord II, France) in 1 x reaction buffer supplemented with 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, except for plasmid p19 AAV-AAVS1 junction (1.5 mM)

## RESULTS

### Sub-cloning of HA16 cells

The previously described HeLa cell-derived, AAV DNA-containing, HA16 cell (54) showed with time and culture passages, a decrease in the AAV specific response from Southern blots experiments (e.g., fig.1A and B, HA16). Thawing and seeding of cells previously stored as glycerol/DiMethylSulfOxide long conservation cryo vials led to rapidly decreasing AAV-2 signals as stated by Southern blot experiments (data not shown). These observations suggested a possible loss of AAV-2 sequences after either long term culture or unfreezing and recultivation. Therefore, the HA16 cell population was subcloned by limited dilution. Out of 96 seeded wells, 37 were shown to contain a single cell and exhibited different growth behaviours. 12 expanded single cell clones were analyzed for the presence, rescuability and replication capacity of the integrated AAV-2 sequences. AAV-2 replication was detected after Ad2 superinfection of 7 subclones, termed HA16C1, -2, -4, -5, -6, -8, -9. The other subclones were shown not to be able to support AAV rescue and replication after Ad2 superinfection, even if they were still harbouring AAV DNA sequences as shown after Southern blot screening (data not shown). The DNA from the rapidly growing subclones HA16C4, C5 and C6 was analysed by restriction with PvuII (non-cutting within the AAV-2 sequence and at position 510 within the AAVS1 sequence), Kpn (cutting in AAV at nt. 1910 and 4157; in AAVS1 at nt. 3536 and 3574), HindIII (non cutting within AAVS1 within the 4Kb sequenced region; AAV, nt. 1882), Xba (non cutting in AAV sequences, cutting AAVS1 at nt. 2617) (fig 1B). Fig 1B confirmed the presence of AAV-2 DNA in an integrated state, and the proviral DNA patterns were comparable to those described for the whole HA16 cell population [fig 1B, PvuII and (53)] However, some discrepancies appeared when comparing the digestion patterns of the different clones, thus confirming that cells grown out a single cell (53) can undergo molecular rearrangements of the integrated AAV DNA sequence with time in culture.

### **Genomic library of HA16C5 DNA**

To characterize in details the AAV-2 integration sites, the genomic DNA of the HA16C5 cells - which showed enzymatic digestion patterns representative of those found after digestion of the DNA of the whole HA16 cell population (e.g. fig.1B, PvuII) - was partially digested with Sau3A, and used for construction of a genomic library. Screening of the library (400000 phages) with an AAV-2 specific probe yielded 19 distinct phages containing AAV-2 DNA sequences out of which 9 phages have been successfully subcloned in a pBluescript. To minimize the DNA rearrangements, the SURE strain of E.coli was used for subsequent pBluescript clonings. Plasmids numbered 2-6, 10, 14, 19-20, were analyzed by restriction mapping and Southern hybridizations with 3 different probes in order to identify the leftward, rightward and middle part of the AAV-2 sequences involved in junctions with cellular DNA. Plasmids as well as derived subcloned fragments, were partially sequenced to elucidate the primary structure of both cellular-viral and viral-viral junctions.

### **Sequence analyses and PCR confirmations**

Figure 2 shows a schematic representation of the different locations of the characterized cellular-viral junctions along the previously described AAVS1 preferential integration locus 19q13.3-pter. In most of the plasmids (p2, -4, -5, -10, -14, -19, -20), AAV-2 was integrated in the AAVSI sequence, described previously as the AAV-2 preferential integration site (31-33;47). Two junctions have been characterized for which no location could be assigned : a viral-viral junction (p6) and a junction involving AAV- and Long Interspersed Nuclear sequence Line 1 (L1) (plasmids p3, -5).

In some cases, the presence of the junction in the host cell genomic DNA was confirmed by PCR amplification and sequencing of the amplified products. An additional AAV-AAVS1 junction was found by this way at the position nt. 620 of AAVS1 sequence.

### Junctions between AAV-2 and AAVS1

AAV-2 sequences involved in the characterized junctions were mainly 3' or 5' ends of the virus genome, cut down by 55 to 115 nt. (p2, -4, -5, -10 and p19). In two cases, the deleted AAV sequence was longer. In plasmid p20, the first 283 nt. of AAV are lacking, thus localizing the junction in the neighbourhood of the P5 promoter. Plasmid p14 was cut down by the complete ITR plus the first 250 nt of the *rep* gene.

In previous reports using an EBV based shuttle vector (15;16), the minimal target of site-specific AAV-2 integration has been defined as the first 510 b.p. of AAVS1. Two out of our 6 characterised cellular DNA-AAV junctions fitted in this criterion and were located at nt. 404 and 431 of the AAVS1 sequence, respectively. Figure 3 shows further details of each junction structure established after sequence determination. In the junction characterized from the plasmid p20, AAV and AAVS1 sequences were in opposite orientations and involved AAV<sub>(2141-283)</sub>-gT(g)<sub>5</sub>CTCgg-AAVS1<sub>(404-1612)</sub>. This organisation locates the RBS of the AAVS1 sequence only 17 nt. from the *trs*-like sequence described in the P5 promoter region of AAV (55).

Interestingly, the second junction, located at nt. 431 in AAVS1, was found in 4 different plasmids (p2, -4, -5, -10) and involved heavily rearranged AAV sequences (Fig. 3). This feature was shared by the AAV-AAVS1 junction, found by PCR, at nt. 621 of the AAVS1 sequence. Figure 3 shows in details the organisation of both rearranged AAV2 sequences near the junction point in plasmids p2, -4, -5, -10 and in the junctional region recovered from genomic DNA by PCR. These sequences contain a common motif: AAV<sub>(4498-4566)</sub>-N21-AAV<sub>(3047-3148)</sub>A. The sequence we termed N21 is detailed in fig.3 and can in fact be described as a « junction in the junction » since it is composed of AAV<sub>(1623-1610)</sub>-AAVS1<sub>(687-680)</sub>. This motif constitutes the only rearrangement of AAVS1 sequences we were able to characterize from the DNA library. It is to be noted that the sequence AAV<sub>(3047-3148)</sub> is a duplication, and not a displacement, of an internal sequence of the upstream *rep* genes which were shown to be complete by sequencing the region in the plasmid (not shown).

In plasmids p2, -4, -5, -10, the common motif is followed by AAV<sub>(4600-4565)</sub>-C-AAVS1<sub>(431-1612)</sub>. This structure places AAV and AAVS1 sequences in opposite orientations and, noteworthy, the

RBS site brought by the inverted AAV sequence is about 200 nt. upstream from the AAV *trs* carried by the common motif. The junction occurred in the vicinity of the AAVS1 RBS motif (nt. 405-420).

The situation is different on the genomic fragment isolated by PCR and the common motif (see above) precedes a second duplication of AAV sequences (nt. 4272-4548) joined to nt. 621 of AAVS1. The AAV RBS motif is no more present with this organisation. All the described duplications and inversions were found localized after the AAV2 polyadenylation signal.

The viral rearrangements were confirmed by PCR and sequencing analyses on genomic DNA, as already mentioned.

Plasmid p19 contains a junction AAVS1<sub>(930-1413)</sub>CgggAAV<sub>(4625-1239)</sub>. The presence of this junction in the genomic DNA of HA16C5 cells was verified after PCR amplification of the region and sequence analysis (not shown) The Cggg sequence is common to both AAV and AAVS1. The AAV ITR is cut down by 50 b.p. only and both the RBS and *trs* sites are present. This organisation is the sole example we found of AAVS1 sequences oriented towards the 5' end (i.e. « right junction » for both AAV and AAVS1).

A last AAV-AAVS1 junction was identified, by using plasmid p14, at nucleotide 2241 of the AAVS1 sequence. At the junction (see Fig.3) AAV (1241-569) and AAVS1 (2246-2760) sequences share 5 nucleotides (CCTTC). At this junction, AAV sequences were cut down by a large part including ITR, RBS and *trs* sequences as well as the P5 promoter and the beginning of the *rep* gene.

### **Junctions between AAV-2 and L1 sequence**

Another AAV2-cellular junction has been identified by using plasmids p3 and p5. The cellular sequence shares more than 90% homology, on the sequence nt.5-360, with the human line 1 element (L1, long interspersed nuclear sequences) (25). Close to the L1 sequence an AT rich region has been identified which contains 4 polyadenylation signals

(AATAAA) on both strands. The viral sequence (nt.1610-2500) lacks a large part of the *rep* gene in addition to the leftward regulatory regions, the P5 and the P19 promoters.

No RBS or trs motifs have been identified at this viral-cellular junction.

In order to avoid the possibility that transposition or rearrangement occurred during the different cloning steps, we verified by PCR that the AAV-L1 junction already existed in the genomic DNA of the HA16C5 cells (data not shown). In each case, amplification products were sequenced and the same organisation of the junction was found in both genomic DNA and plasmids p3, -5.

Noteworthy, a first AAV2-AAVSI junction has already been characterized in plasmid p5 (see above).

By restriction enzyme analyses and Southern blot hybridizations with the L1 probe obtained from plasmid p3, L1 (or L1-like) sequences were also detected in plasmids p2, -3, -4, -5, -19 (data not shown). This result suggests that the L1 sequence is present downstream (3') of the known AAVSI sequence, in our plasmids at least.

### AAV2-AAV2 junctions

The sequencing of plasmid p6 revealed a viral-viral junction organised in a head-to-tail configuration, with a « flip » orientation (see ref.(4) for terms). The junction contains AAV<sub>(449-4669)</sub>-CAgACTCAT-AAV<sub>(130-474)</sub>. At this junction, one AAV ITR is almost complete, 6 bases (nt. 1 to 6) from the small internal palindrome termed A were found to be deleted (ggCCAA). This ITR was followed by 9 bases which could not be assigned to AAV. The ITR downstream the junction was deleted almost completely and begins with the 4th base of the sequence termed D of the ITR. At this viral-viral junction, one trs and one RBS motif (from the left provirus) remained intact.

This head to tail viral organization was confirmed by Southern Blot analysis with enzymes cutting once within the viral genome (Fig. 4, open arrowhead, Bam HI lane).

### Southern blot analysis

Figure 4 shows a Southern blot analysis of the DNA from HeLa cells and HA16C5 clone after multiple restriction enzyme digestions and probing with both an AAV-2<sub>(total)</sub> probe (Fig.4A) and a AAVS1<sub>(nt.1438-2526)</sub> probe (Fig.4B).

Briefly, the analysis of these digestions indicates that:

- AAV-2 sequences underwent multiple integrations within different AAVS1 sequences.  
(e.g. PvuII digestion, black stars on figs. 4A and 4B)
- At least in one case, integrated AAV-2 sequences are organised in a head-to-tail tandem.  
(e.g. Bam HI digestion, open arrowhead on fig. 4A)
- Some fragments hybridized only with the AAV probe suggesting that AAV sequences could be integrated in locations different from AAVS1 (providing the AAVS1 probe is able to hybridize with the fragment)  
(e.g. BglII and Eco RV digestions, open circles on fig. 4A)
- At least one AAVS1 molecule seems to be free of AAV-2 sequences integration.  
(e.g. PvuII digestion, black arrow on fig. 4B)
- AAVS1 responsive bands exhibit apparent molecular weight smaller than the one of AAVS1 itself, suggesting rearrangements of AAVS1 sequences. Some of these rearrangements are apparently due to AAV-2 sequences integration.  
(e.g. BglII digestion, close circles on figs. 4A and 4B)

### **Analysis of AAV, AAVS1 and junctions status in different passages and different clones**

Southern blots (see fig.1) as well as PCR confirmations of junctions sequences brought informations on the discrete changes which occurred in the organisation of AAV integration sites within the genomic DNA of HA16 cells.

Fig.1 shows clearly the differences which exist between the digestion patterns of the DNA of HA16C4, -5 and 6 at the level of AAV sequences. Although the Xba digestion is not discriminating between the 3 cell clones, thus indicating that AAV sequences are clustered within the AAVS1 locus, KpnI digestion indicates that AAV sequences are somewhat longer in HA16C5 cell clone and reveals HA16C6 lacks a 5 Kb fragment which is present in both

in HA16C5 cell clone and reveals HA16C6 lacks a 5 Kb fragment which is present in both HA16C5 and -4 cell clones. Hind III digestion confirms the shortening of AAV fragments in HA16C5. Besides these discrete changes, PvuII digestion of the genomic DNA of the 3 cell clones shows numerous modifications of the restriction patterns, thus confirming that the 3 one cell-derived clones diverged during cultivation of the single cell-derived population of HA16 cells. PCR experiments were performed in order to demonstrate the presence, in the genomic DNA of HA16C5 cells, of the cloned and characterized AAV-cellular DNA junctions. These experiments (data not shown) revealed that the junction found in plasmid p19 is different (and cannot be found by this way) in the DNA of HA16C6 cell clone. The same junction was found to be present in the DNA of HA16C4 cell clone, in addition to a different junction as shown by using the same primers pair. The new C4 junction is arranged as follows:

AAVS1(1271, 1390) gAg AAV(4547, 4480). This new, and co-existing, organisation of the junction shortens the PCR fragment by ~100 nt. and suppresses the RBS site previously found on the AAV sequence. The gAg sequence is common to AAV and AAVS1 primary structures.

On the other hand, the AAV-L1 junctions was found to be remarkably conserved since it is present on HA16C5 passages 9 to 44, in HA16C4 and in the HA16 uncloned cell population.

The AAV rearrangement characterized from plasmids p2, -4, -5, -10, was also present in the genome of HA16C4 cell clone and along the culture passages of HA16C5.

### **FISH analysis of HA16C5 clone**

HA16 cells were previously described as containing AAV-2 sequences integrated in chromosome 17 (53). By FISH analysis, the authors found at least 2 different integration sites, one of which being on chromosome 17. In addition, a double AAV integration signal was found near the telomeric region of the long arm of an unidentified long chromosome. At the molecular level, our results show that, at least in a subclone of HA16 cells, AAV sequences are integrated in either AAVS1 and L1 sequences, perhaps inbetween both.

In order to reconcile our results, we performed FISH analyses on metaphase chromosomes from HA16C5 cells using a chromosome 19-specific painting probes, a centromeric chromosome 17 probe and an AAV2 specific probe.

Our results (Figure 5) show that:

HA16C5 cells seem to contain only one full size (entirely labeled) chromosome 19 and, in addition, numerous apparently translocated or rearranged chromosome 19 fragments dispersed on different chromosomal structures :

- one chromosome 19 lacking the telomeric part of the q arm,
- one short acrocentric chromosome from the G group (chromosome 21 or 22) labeled on the short arm,
- one large, yet unidentified chromosome labeled on the short arm,
- one small metacentric chromosome with a chromosome 19 label on one arm,
- one chromosome apparently belonging to the C group (chromosomes 8, 9, 10, 11) labeled on qter.

HA16C5 cells contain four chromosomes which are labeled with a centromeric chromosome 17-specific probe.

HA16C5 cells are indeed labelled twice with an AAV probe: a clear and reproducible signal at the extremity of the q arm of a large chromosome, a second weaker signal on one acrocentric small chromosome.

The double labeling of HA16C5 cells metaphase chromosomes with both chromosomes 19 and 17-specific probes revealed a translocation of a fragment labeled with the chromosome 19-painting probe on a chromosome body already labeled with the centromeric chromosome 17-probe. This translocation was still present in the parent HeLa cell line (not shown).

However, the final utilisation of chromosome 19, chromosome 17 and AAV probes at the same time showed that AAV sequences are integrated in chromosome 19 fragments translocated on yet unidentified chromosomes, one being seemingly a short acrocentric one, the other being an abnormal non-marker chromosome, probably modified in length by multiple additions/deletions of exogenous chromosomal fragments.

## DISCUSSION

The HA16 cell clone, at the time it was still a cell clone, was shown to carry multiple AAV integrated sequences in chromosome 17. The authors tried to exclude the possibility that this integration occurred in a fragment of chromosome 19 translocated on chromosome 17. The data presented here evidence the integration of AAV sequences in the adeno-associated virus specific integration site (AAVS1) normally found at position 19q13.3-qter. By FISH analysis, we found that all the AAVS1 sequences carrying AAV-2 information belong to portions of chromosome 19 translocated on other, yet unidentified, chromosomes. A 19t17 translocation effectively exists, which pre-existed in the parent HeLa cell population but this translocated sequence is free of detectable AAV-2 sequences. Altogether, we are unable to state whether AAV sequences have been or not, integrated in the chromosome 17 of HA16 cells. However, even if the data concerning HA16 cells have been misinterpreted, it remains true that chromosome 17 of the sister-cell clone HA3x was the target of AAV integration (54). Another possibility which cannot be ruled out is that integrated AAV sequences could undergo modifications allowing them to move when they are « mis-integrated ». This possibility addresses the question of the stability of integration of AAV sequences within the genome of the host cell.

Previous studies (5;34) showed evidences of episomal forms of AAV DNA in the host cell, especially after serial passages of the cell culture(5). Even if the same authors argued against large rearrangements of integrated AAV sequences and rather favoured a possible replication of AAV without excision (either in uninfected or Ad2 superinfected cells), it has never been excluded that AAV sequences can be modified after long term cultures. Molecular evidences of a maintenance of AAV sequences within a AAVS1 environment, could suggest that entire regions of the chromosome are modified, not necessarily due to AAV DNA integration.

Integration of AAV DNA has been previously shown to occur in chromosomes other than chromosome 19 (3;53;59). Other groups pointed at the possible AAV DNA integration within sequences showing molecular characteristics in agreement with those of AAVS1 (58) or integration of AAV DNA sequences in hamster cells genome (57) devoid of AAVS1 sequences (47).

Sub-cloning of the HA16 cell population after more than 100 passages in culture reveals that about 40 to 50% of the single-cell clones have lost the ability to rescue the integrated AAV sequences after an Adenovirus superinfection, despite half of the rescue-defective cells are still harbouring AAV DNA molecules integrated in their genome as stated by Southern blot analysis. These data corroborate the recent finding of Rutledge and collaborators (45) that integration of AAV sequences (in that case, recombinant genomes) often leads to molecular modifications of the integrant. In order to focus on modifications which do not affect the rescuability of AAV sequences, 3 well growing rescuable clones were further analysed by restriction analysis and Southern blot. Digestion of the genomic DNA of cell-clones HA16C5, HA16C4 and HA16C6 with the enzyme XbaI (non cutting in AAV sequences, nt.2617 in AAVS1) showed clearly that the large majority of AAV-2 sequences are present in a non restricted region and that, in both 3 cell-clones. Using KpnI (AAV: nt. 1910, 4157; AAVS1: nt 3536, 3574) or HindIII (non cut in AAVS1, AAV: nt. 1882) did not document large rearrangements of AAV-2 molecules and indicated only that HA16C5 cell-clone gives rise to larger fragments after digestion, thus suggesting that a yet unidentified deletion occurred in the coding regions of AAV sequences carried by both HA16C4 and-C6 cell-clones.

PvuII digestion of the genomic DNA revealed numerous differences in the restriction patterns of HA16C4, -C5 and -C6 respectively. This enzyme does not cut within an integer AAV-2 sequence and cuts only once (nt. 510) in the (characterized) AAVS1 sequence. AAVS1 probing on a Southern blot of genomic DNA digested with PvuII does not indicate gross modifications of the cellular sequence (except for the HA16C6 clone which seems to be affected by an additional PvuII cutting site). On the contrary, AAV fragments lengths are dramatically different from one cell-clone to the other. These discrepancies could indicate that the primary structure of the integrated AAV-2 DNA is prone to acquire PvuII sites or that some sequences are located in the neighbourhood of the nt. 510 of AAVS1. In addition, this precise location could represent a kind of « hot-spot » for AAV-2 rearrangement events. Noteworthy, this region was spotted as the preferential and minimal region of AAV integration in AAVS1-carrying, EBV-based, shuttle vector experiments (16). On the contrary, experimental systems using stable integration in

genomic DNA of cells in culture, rather focused on preferential integrations within the nt. 1000-1200 region (31;47).

In order to further characterize the possible integration of AAV-2 molecules in this precise AAVS1 region, a genomic library was made out of the DNA of HA16C5 cell-clone. AAV containing phages were isolated, sub-cloned in plasmids and analysed for the presence of leftward, rightward and middle parts of the AAV genome. Viral-cellular and viral-viral DNA junctions were thus isolated and characterized by Southern blot and sequencing analyses.

The same AAV-AAVS1 junction was found 4 times in 4 different plasmids. This repetitivity is likely due to the clonability of the fragment rather than an overrepresentativity of the sequence within the genomic DNA. However, we cannot exclude the possibility of an amplification of this sequence. The junction involves heavily rearranged AAV-2 sequences where joined AAV fragments are linked by a « junction -in-the-junction » sequence (see results). This junction is located at nucleotide 404 of the AAVS1 sequence. Interestingly, when trying to assess the physiological relevance of this junction by PCR amplification of the genomic DNA of early passage [passage 9, the same as for the constitution of the library] HA16C5 cells, a variant of this junction was found, involving the same core sequence (junction-in-the-junction) and different downstream AAV and AAVS1 sequences. This junction, which was not found in the library, is located at nt. 621 of the AAVS1 sequence. There is a need to remind that HA16C5 cells were freshly subcloned as a single-cell derived population. One possibility is that both arrangements of the junction (pre)existed in the cell, located on different AAVS1 molecules, the other possibility is that the second rearrangement (nt. 621) of AAV sequences occurred during the growth of expanding single cell-derived cultures.

The first rearrangement (nt. 430) was found to be present in both the cell-clone HA16C4 and the uncloned HA16 cells. The junction is fully « equipped » with RBS and *trs* sequences brought by the AAV part.

Another AAV-AAVS1 junction was found at nt. 404 of the AAVS1 sequence. This junction also carries the RBS sequence of AAVS1 and a *trs*-like sequence brought by AAV. AAVS1 and AAV-2 sequences are in opposite orientations and are joined by a 12 nt. stretch of unrelated sequence.

Two additional junctions were found between AAV and AAVS1.

One is located at nt. 1413 of the AAVS1 sequence and present an AAVS1 sequence orientated towards the 5' end of the AAV part (see fig.3). The, almost complete, right ITR of AAV-2 is thus linked to this AAVS1 region by a stretch of 4 shared nucleotides.

The last junction is located at nt. 2241 of the AAVS1 sequence and involves the left part of the AAV DNA, linked by 5 nucleotides common to both sequences to AAVS1 DNA. This AAV fragment is depleted of a large part, including the beginning of the *rep* genes.

However, when looking at both the orientations and sequences of the AAV-2 fragments involved in the two latter junctions, one could think that they are part of the same AAV genome, thus presenting two junctions within AAVS1. The cloned AAV sequence ends with an *Sau3A* restriction site, the enzyme which was used for the constitution of the library. Since no full length AAV DNA molecule was isolated from the library, we can not be sure that those two junctions belong a unique integration. Also, even if it is the case, we cannot say if the AAV fragments are part of a single genome or of a tandem array . Nevertheless, if the suspected arrangement of the integration really exists, it induces a more or less large disruption of the AAVS1 sequence (nt. 1413, 2241) depending on the size of the AAV integrant. Scrutation of the Southern blot comparing restriction fragments generated from both HeLa and HA16C5 cells after probing with AAV-2 and AAVS1 respectively, did not give information about a possible disruption of the AAVS1 sequence since the AAVS1 probe is precisely located in the putatively lacking region. The only thing we can say is that a full length AAV-2 molecule, either alone or in tandem array, should generate at least a 2,3 Kb band which is obviously present on the Southern blot (fig.4A) with a strong intensity.

Interestingly, one identified difference between cell-clones HA16C4, -5 and -6 is found in the « right » junction between AAV and AAVS1. PCR experiments performed on genomic DNA in order to show that the junction really exists showed that it is present only in HA16C4 and HA16C5 cells. Moreover, in HA16C4 cells, a shorter, additional band is co-amplified. Sequencing of this new product indicates that a shortened junction is also present in the genomic DNA of HA16C4 cells which led the RBS site carried by AAV to disappear. This constitutes the second instance of co-existing junctions, obviously rearranged from the same molecule, one of

them bearing a complete « integration sites set », the other, not. Once again, we were unable to date precisely the time of the modification.

The library allowed us to isolate a head-to-tail organisation of duplex AAV-2 DNA sequences which can be confirmed by the analysis of the Southern blot (fig. 4A). Such a head-to-tail organisation was already described to be present in the parent HA16 cells by Southern blot analysis (54)

The most intriguing result we obtained is the repetitive observation of an AAV-L1 junction. The L1 element is considered as a transposable gene (or pseudo-gene) (25) which can code for a polypeptide able to bind its own RNA (26). However, the L1 element joined to the AAV sequence is unlikely to be active since only 300 b.p. are present, upstream of an AT-rich region. Such polyAT regions have been isolated in the past at the 3' end of the L1 sequence (9;56) and contain several polyadenylation signals, suggesting that the L1 family may be transcribed and supporting the idea that the L1 sequence has a tendency to be inserted in an AT rich region (25). Moreover, the L1 sequences isolated show a high content of the CpG dinucleotide sequence at their 5' terminal regions (25). It is interesting to note that the first 900 nucleotids of AAVS1 also have a CG content of 82%. This finding raises the question of the origin of this L1 element joined to AAV-2 sequences. One possible explanation is that extrachromosomal L1 sequences (27) (i.e. transposon) recombine with both the virus DNA or the AAVS1 sequence before or during the integration process. Another possibility is that the transposition occurred in yet integrated AAV-2 sequences. The ultimate possibility is that L1 sequences were already present in the genomic DNA before the AAV integration occurred. The latter possibility is substantiated by the fact that plasmids p2, -4, -5 ; p3 and p19 hybridize with a L1 probe, more precisely, in plasmids and p5 at least, the L1 sequence is localised downstream of the AAVS1 sequence. However since we did not isolate AAVS1-L1 junctions, we can not conclude that L1 is part of the 3' sequence of AAVS1 in the genomic DNA.

Noteworthy, PCR experiments evidenced that characterized AAV-2-L1 junctions are not cloning artifacts and are really present in the genomic DNA of HA16C5 from passage 4 and also in HA16C4 and uncloned HA16 cells.

An overall conclusion of our work is that along with cultivation and passages, AAV DNA containing cells can undergo discrete modifications or rearrangements of certain integrated AAV-2 sequences. Surprisingly, integration of AAV within Line 1 element sequence, which was already described as occurring in the AAV carrying, EBV-based shuttle vector, seems to represent a stable anchoring point for AAV sequences whereas abundantly sustained AAV-2-AAVS1 junctions seem to be in a permanent dynamic and plastic state. One can address the question of cellular factors susceptible to specifically target, cut and ligate AAV sequences and/or AAV-AAVS1 junctions in the absence of the highly specific viral Rep proteins (2;50). The already described abundancy of DNA cutting sites for Topoisomerase I in the vicinity of junctional regions [Kotin, 1992 #32; Samulski, 1991 #180; our work], the recently depicted intervention of the HMG protein I in the promotion of Rep-associated DNA modification activities (6) and the for long known association of HMG protein I with the cellular Topoisomerases, including Topo I, during recombination and repair activities (10), could suggest that Rep-like activities can occur in the life of a cultured cell, modifying discretely the fragilized or destabilized areas of the genome.

## BIBLIOGRAPHY

- 1 **Anderson, R. J., Galatowicz, G., Macdonald, I. D., Lowdell, M. W., Corbett, T. J. and Prentice, H. G.** 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells. *Exp Hematol* **25**:256-62.
- 2 **Balague, C., Kalla, M. and Zhang, W. W.** 1997. Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol* **71**:3299-306.
- 3 **Bantel-Schaal, U.** 1995. Growth properties of a human melanoma cell line are altered by adeno-associated parvovirus type 2. *International Journal of Cancer* **60**:269-274.
- 4 **Berns, K. I. and Giraud, C.,** "Biology of Adeno-associated Virus.," Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy., ed. K.I. Berns, and C. Giraud. (Berlin, Heidelberg, New-York: Springer-Verlag, 1996) 1-24.
- 5 **Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W. and Berns, K. I.** 1980. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* **33**:739-48.
- 6 **Costello, E., Saudan, P., Winocour, E., Pizer, L. and 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**:5943-54.
- 7 **Cukor, G., Blacklow, N. R., Kibrick, S. and Swan, I. C.** 1975. Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpesvirus-transformed hamster cells. *J.Natl.Cancer Inst.* **55**:957-959.

- 8 **de la Maza, L. and Carter, B. J.** 1981. Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J Natl Cancer Inst* **67**:1323-6.
  
- 9 **DiGiovanni, L., Haynes, S. R., Misra, R. and Jelinek, W. R.** 1983. Kpn I family of long-dispersed repeated DNA sequences of man: evidence for entry into genomic DNA of DNA copies of poly(A)-terminated Kpn I RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:6533-7.
  
- 10 **Duguet, M.** 1997. When helicase and topoisomerase meet! *Journal of Cell Science* **110**:1345-1350.
  
- 11 **Dutheil, N., Malhomme, O., Provost, N., Becquart, P., Burguete, T., Schlehofer, J. R. and Dupressoir, T.** 1997. Presence of integrated DNA sequences of adeno-associated virus type 2 in four cell lines of human embryonic origin. *Journal of General Virology* **78**:in press.
  
- 12 **Feinberg, A. and Vogelstein, B.** 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **137**:266-267.
  
- 13 **Friedman-Einat, M., Grossman, Z., Mileguir, F., Smetana, Z., Ashkenazi, M., Barkai, G., Varsano, N., Glick, E. and Mendelson, E.** 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J. Clin. Microbiol.* **35**:71-78.
  
- 14 **Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J. and zur Hausen, H.** 1984. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* **134**:64-71.

- 15 **Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K. I.** 1995. Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J Virol* **69**:6917-6924.
- 16 **Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K. I.** 1994. Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:10039-10043.
- 17 **Greener, A.** 1990. E. coli SURE™ strain: clone "unclonable" DNA. *Strategies* **3**:5-6.
- 18 **Grossman, Z., Mendelson, E., Broksimoni, F., Mileguir, F., Leitner, Y., Rechavi, G. and Ramot, B.** 1992. Detection of Adeno-Associated Virus Type-2 in Human Peripheral Blood Cells. *J Gen Virol* **73**:961-966.
- 19 **Han, L., Parmley, T. H., Keith, S., Kozlowski, K. J., Smith, L. J. and Hermonat, P. L.** 1996. High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* **12**:47-52.
- 20 **Heilbronn, R., Burkle, A., Stephan, S. and zur, H. H.** 1990. The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol* **64**:3012-8.
- 21 **Hermonat, P. L.** 1994. Adeno-Associated virus inhibits human papillomavirus type 16 - a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Res* **54**:2278-2281.
- 22 **Hermonat, P. L.** 1989. The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* **172**:253-61.

- 23 **Hermonat, P. L.** 1994. Down-regulation of the human c-fos and c-myc proto-oncogene promoters by adeno-associated virus rep78. *Cancer Lett* **81**:129-136.
- 24 **Hermonat, P. L.** 1991. Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus rep78 transformation suppressor gene product. *Cancer Res.* **51**:3373-3377.
- 25 **Hohjoh, H., Minakami, R. and Sakaki, Y.** 1990. Selective cloning and sequence analysis of the human L1 (LINE-1) sequences which transposed in the relatively recent past. *Nucleic Acids Research* **18**:4099-4104.
- 26 **Hohjoh, H. and Singer, M. F.** 1997. Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *The EMBO Journal* **16**:6034-6043.
- 27 **Jones, R. S. and Potter, S. S.** 1985. L1 sequences in HeLa extrachromosomal circular DNA: evidence for circularization by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:1989-93.
- 28 **Katz, E. and Carter, B. J.** 1986. Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH 3T3 cells by ras gene and on tumorigenicity of an NIH 3T3 transformed cell line. *Cancer Res* **46**:3023-6.
- 29 **Kirschstein, R. L., Smith, K. O. and Peters, E. A.** 1968. Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **128**:670-673.
- 30 **Kotin, R. M.** 1994. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* **5**:793-801.

- 31 **Kotin, R. M., Linden, R. M. and Berns, K. I.** 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* **11**:5071-8.
- 32 **Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C. and Berns, K. I.** 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* **10**:831-4.
- 33 **Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. and Berns, K. I.** 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2211-5.
- 34 **Laughlin, C. A., Cardellichio, C. B. and Coon, H. C.** 1986. Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* **60**:515-24.
- 35 **Laughlin, C. A., Tratschin, J.-D., Coon, H. and Carter, B. J.** 1983. Cloning of infectious adeno-associated virus genome in bacterial plasmids. *Gene* **23**:65.
- 36 **Linden, R. M., Winocour, E. and Berns, K. I.** 1996. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7966-72.
- 37 **Linden, R. M., Winocour, E. and Berns, K. I.** 1996. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration - inaugural article. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:7966-7972.
- 38 **Malhomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., Armbruster-Moraes, E., Schlehofer, J. R. and Dupressoir, T.** 1997. Human genital tissues containing DNA of

adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *Journal of General Virology* **78**:1957-1962.

39 **Mayor, H. D., Drake, S., Stahmann, J. and Mumford, D. M.** 1976. Antibodies to adeno-associated satellite virus and herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **126**:100-104.

40 **Mayor, H. D., Houlditch, G. S. and Mumford, D. M.** 1973. Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters. *Nature New Biol.* **241**:44-46.

41 **McLaughlin, S. K., Collis, P., Hermonat, P. L. and Muzyczka, N.** 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* **62**:1963-73.

42 **Ostrove, J. M., Duckworth, D. H. and Berns, K. I.** 1981. Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology* **113**:521-33.

43 **Podsakoff, G., Wong, K. K. and Chatterjee, S.** 1994. Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* **68**:5656-5666.

44 **Rigby, P. W., Rhodes, C. and Bergs, P.** 1977. Labelling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* **113**:237-252.

45 **Rutledge, E. A. and Russell, D. W.** 1997. Adeno-associated virus vector integration junctions. *Journal of Virology* **71**:8429-8436.

- 46 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) .
- 47 Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N. and Hunter, L. A. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* **10**:3941-3950.
- 48 Schlehofer, J. R. 1994. The tumor suppressive properties of Adeno-Associated viruses. *Mutat Res* **305**:303-313.
- 49 Sprecher-Goldberger, S., Thiry, L., Lefèbvre, N., Dekegel, D. and de Halleux, F. 1971. Complement-fixation antibodies to adenovirus-associated viruses, adenoviruses, cytomegaloviruses and herpes simplex viruses in patients with tumors and in control individuals. *Am.J.Epidemiol.* **94**:351-358.
- 50 Surosky, R. T., Urabe, M., Godwin, S. G., McQuiston, S. A., Kurtzman, G. J., Ozawa, K. and Natsoulis, G. 1997. Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome [In Process Citation]. *J Virol* **71**:7951-9.
- 51 Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larüe-Charlus, S., Severin, F., Becker, N. and Schlehofer, J. R. 1994. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol* **44**:215-222.
- 52 Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M. and Schlehofer, J. R. 1997. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.* **78**:1441-1452.

- 53 **Walz, C. and Schlehofer, J. R.** 1992. Modification of Some Biological Properties of HeLa Cells Containing Adeno-Associated Virus DNA Integrated into Chromosome-17. *J Virol* **66**:2990-3002.
- 54 **Walz, C., Schlehofer, J. R., Flentje, M., Rudat, V. and zur Hausen, H.** 1992. Adeno-Associated Virus Sensitizes HeLa Cell Tumors to Gamma-Rays. *J Virol* **66**:5651-5657.
- 55 **Wang, X. S., Qing, K., Ponnazhagan, S. and Srivastava, A.** 1997. Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J Virol* **71**:3077-82.
- 56 **Wilde, C. D., Crowther, C. E., Cripe, T. P., Gwo-Shu Lee, M. and Cowan, N. J.** 1982. Evidence that a human beta-tubulin pseudogene is derived from its corresponding mRNA. *Nature* **297**:83-84.
- 57 **Winocour, E., Puzis, L., Etkin, S., Koch, T., Danovitch, B., Mendelson, E., Shaulian, E., Karby, S. and Lavi, S.** 1992. Modulation of the cellular phenotype by integrated adeno-associated virus. *Virology* **190**:316-29.
- 58 **Wonderling, R. S. and Owens, R. A.** 1997. Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J Virol* **71**:2528-34.
- 59 **Xiao, X., Devlaminck, W. and Monahan, J.** 1993. Adeno-Associated virus (AAV) vectors for gene transfer. *Advan Drug Delivery Rev* **12**:201-215.

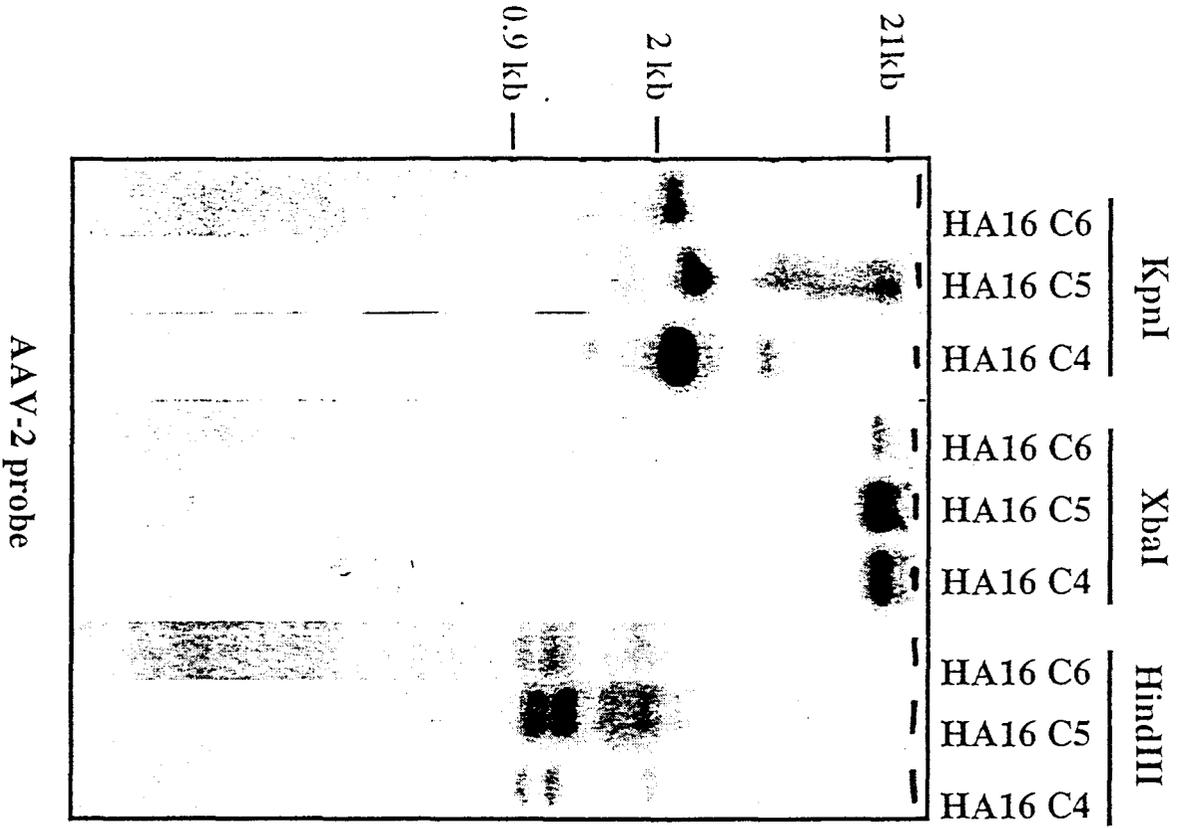
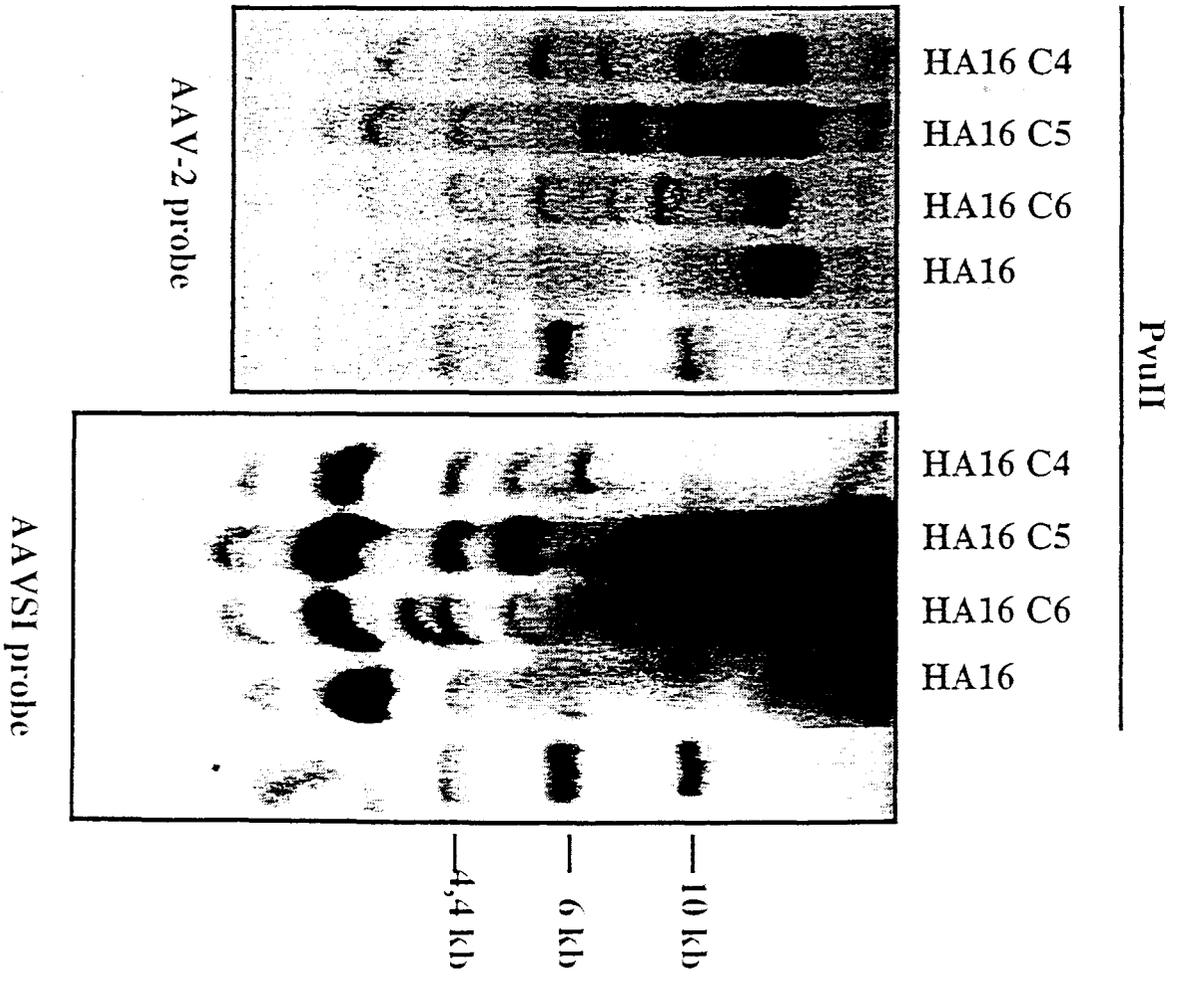
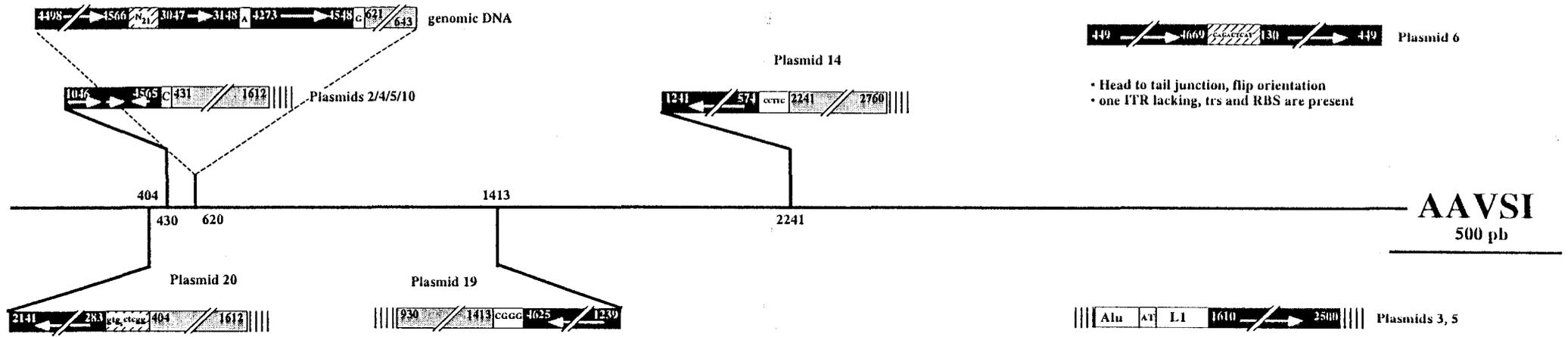


Figure 1



AAV-2 insertion points within the AAVSI sequence (HA16 C5 cells)



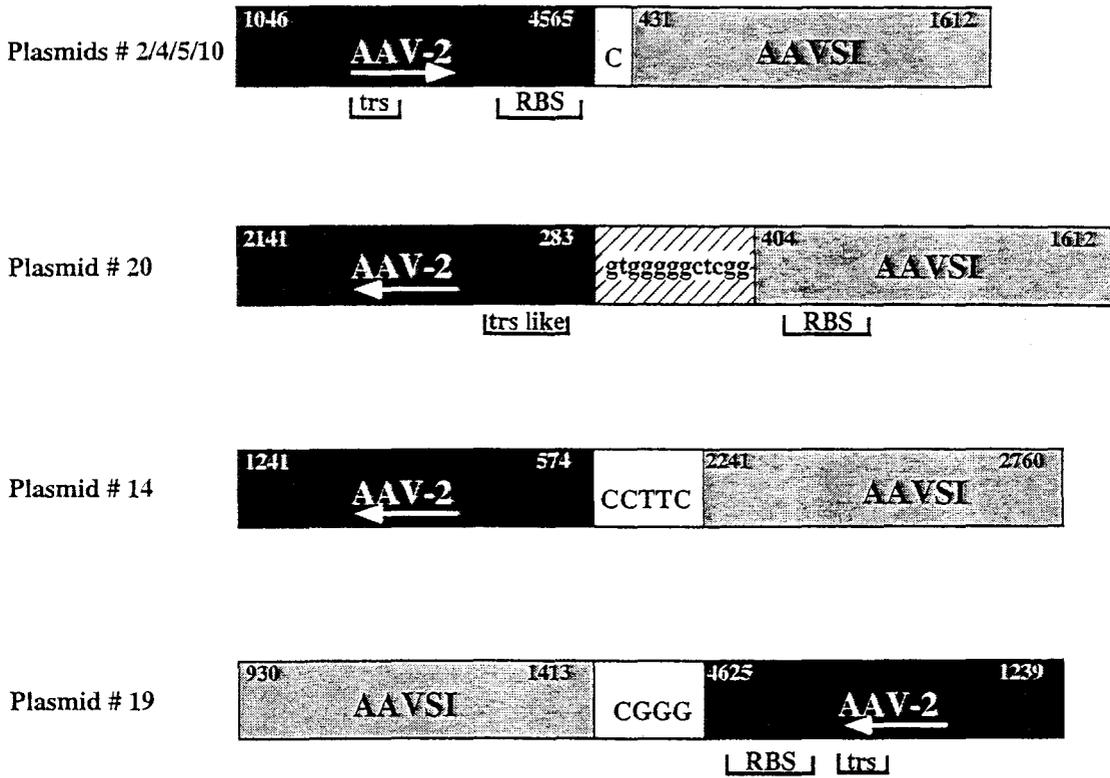
- trs (trs-like), RBS motif present (either in AAVSI or AAV-2 sequences)
- AAV-2 coding regions unaffected
- rearrangements by internal duplication of a *cap* gene sequence

- no signal
- AAV-2 coding regions affected

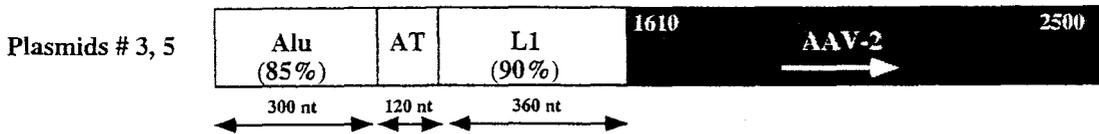
- Head to tail junction, flip orientation
- one ITR lacking, trs and RBS are present

- integration in a Line 1 (transposable) element
- p5 and p19 promoters deleted (*rep* genes also)
- no signal
- found located 3' of the AAVSI sequences in the plasmid

### Junctions between AAV-2 and AAVSI



### Junction between AAV-2 and L1 (human Line-1 element)



### Head to Tail arrangement (Flip orientation)



Figure 3

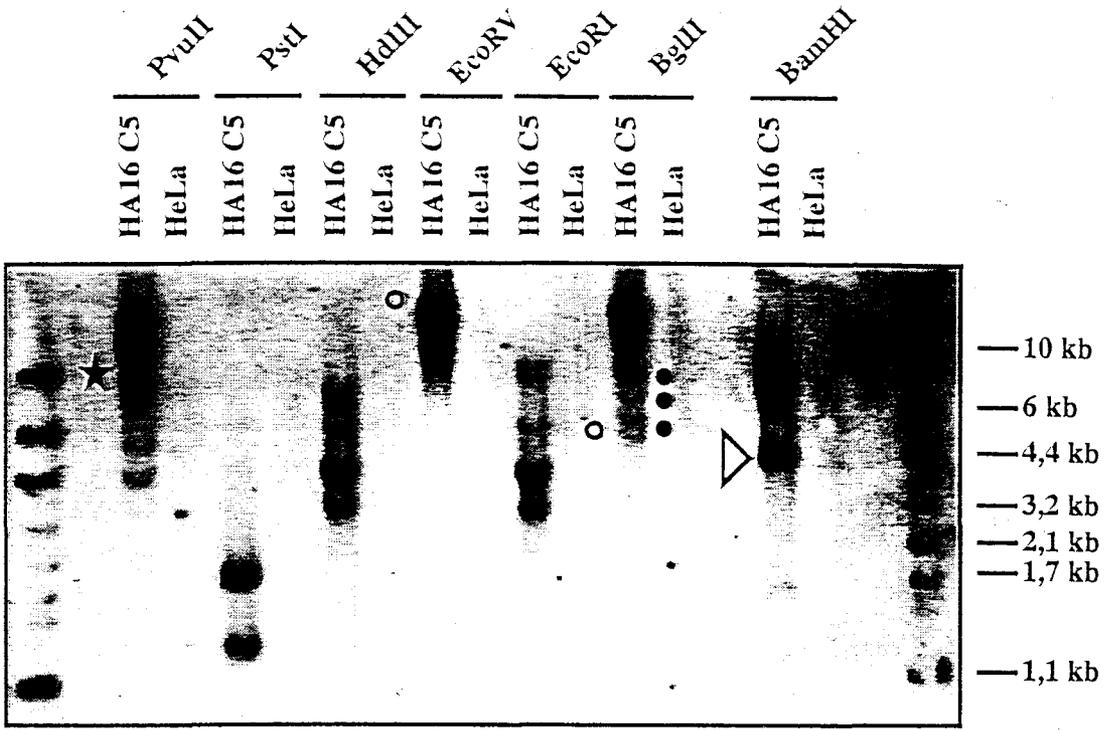


Figure 4A AAV-2 probe (total length)

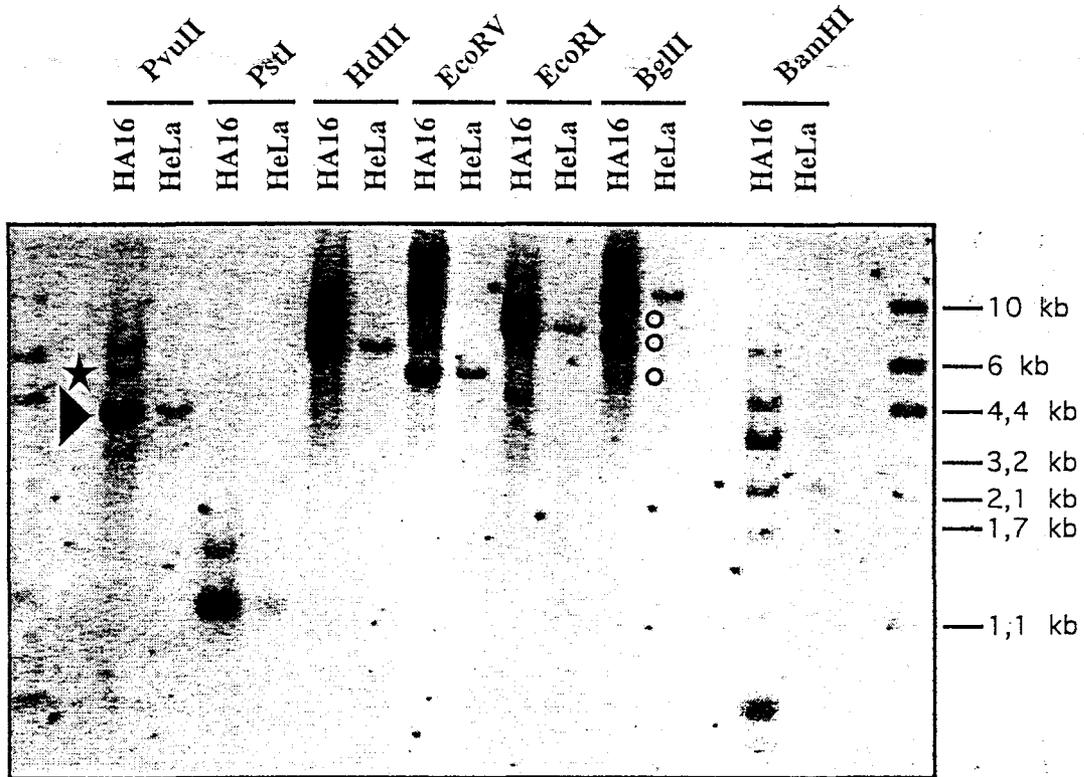
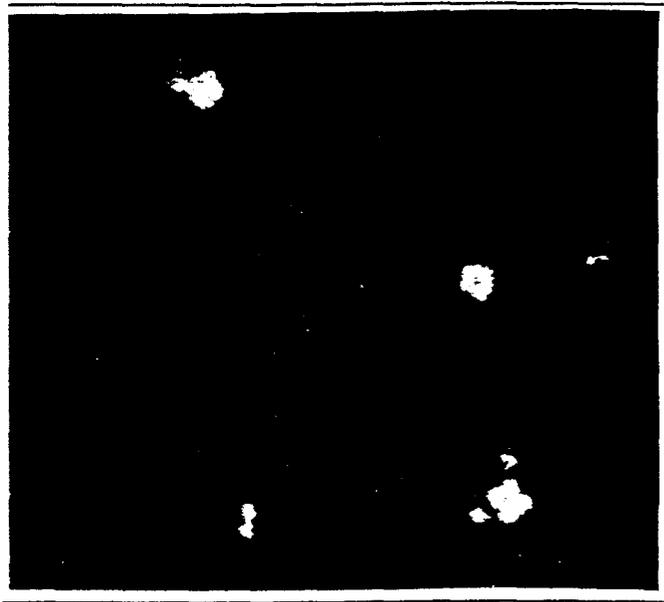
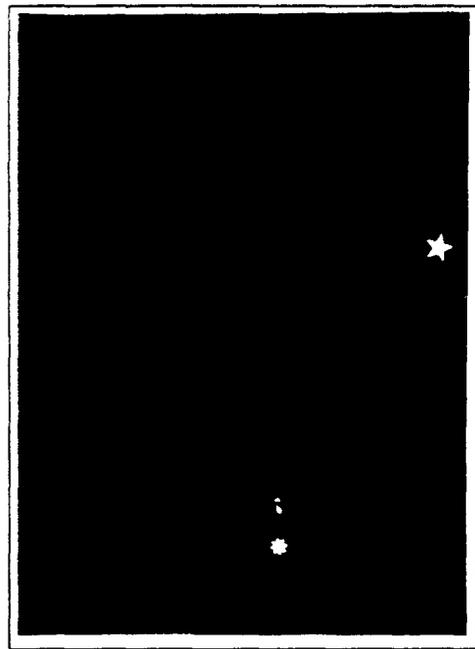


Figure 4B AAVSI probe: nt 1438-2526



total chromosome 19 probe



AAV-2 probe



AAV-2, total chromosome 19 and  
centromeric 17 chromosome probes

FIGURE 5

## II Discussion

En l'absence de tout virus auxiliaire, le parvovirus AAV-2 peut établir une infection latente des cellules en culture. Différents laboratoires ont montré une intégration préférentielle du génome d'AAV-2 dans la séquence AAVSI (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991), localisée sur le chromosome 19. Cependant, une intégration du génome viral dans ce site AAVSI n'a été détectée que dans 70% des clones cellulaires (Kotin *et al.*, 1990). Ces résultats suggèraient donc l'existence d'autres sites d'intégration. Par ailleurs, une intégration des séquences virales avait été détectée sur le bras long du chromosome 17 dans les cellules HA16 (cellules HeLa infectées de façon latente par AAV).

Ainsi afin de caractériser ce(s) site(s) d'intégration, nous avons tout d'abord reclone les cellules HA16 en dilution limite, puis sélectionné le clone cellulaire HA16C5 sur la base des similitudes observées, par "Southern Blot", avec les cellules HA16. Nous avons ensuite construit une génothèque à partir de l'ADN génomique de ce clone HA16C5.

Il s'avère nécessaire de faire un rappel concernant l'établissement des cellules HA16 (Walz et Schlehofer, 1992) afin de comparer les résultats obtenus sur l'intégration du génome viral dans l'ADN des cellules HA16 avec ceux déjà publiés dans la littérature. Des cellules HeLa ont été infectées à une multiplicité d'infection de 10 pfu/cellule puis clonées en dilution limite. Les différents clones obtenus ont tout d'abord été testés pour leur capacité à répliquer le génome viral après surinfection des cellules par l'adénovirus, puis analysés par "Southern Blot" pour déterminer le statut du génome viral (épisode ou intégration). Les cellules HA16 ont ainsi été sélectionnées car elles possèdent une dizaine de copies virales intégrées dans l'ADN cellulaire qui peuvent être répliquées après infection des cellules par un adénovirus. Il est important de noter que toutes les autres cellules infectées de façon latente par AAV-2 ont toujours été établies après infection des cellules à une forte multiplicité d'infection (100 à 250 pfu/cellule) (Cheung *et al.*, 1980; McLaughlin *et al.*, 1988; Samulski *et al.*, 1991) et possèdent un nombre restreint de séquences virales intégrées (variant de 1 à 5) dans le génome cellulaire.

L'analyse des différentes jonctions entre les séquences virales et cellulaires a révélé une intégration du génome d'AAV-2 dans la séquence AAVSI. Les différentes conclusions obtenues de cette étude sont présentées dans la figure 22.

La caractérisation moléculaire des jonctions entre les séquences virales et cellulaires présentes dans les cellules HA16 a permis de montrer pour la première fois une intégration du génome viral à proximité du motif RBS de la séquence AAVSI, et ceci dans des cellules infectées

| No<br>plasmide     | Jonctions AAV-2 /AAVSI   |       | $\Delta$ ITR                                 | Motif<br>RBS/trs<br>présent | Orientation<br>AAVSI | Jonctions  |    | Hyb<br>L1 |  |
|--------------------|--|-------|--|-----------------------------|----------------------|--|----|-----------|--|
|                    | AAV-2  | AAVSI |  |                             |                      | AAV-2  | L1 |           |  |
| (2)                | 4570 4565 431 436<br> <br>GCGTCT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> GCCACG  |       | 25 %<br>(37/145)                             | trs<br>RBS                  | 5' → 3'              |  |    | +         |  |
| (3)                |  |       |  |                             |                      | 1615 1610<br>   <br>CTCAAG <span style="border-bottom: 1px solid black; padding: 0 5px;">L1</span> |    | +         |  |
| (4)                | 4570 4565 431 436<br> <br>GCGTCT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> GCCACG  |       | 25 %<br>(37/145)                             | trs<br>RBS                  | 5' → 3'              |  |    | +         |  |
| (5)                | 4570 4565 431 436<br> <br>GCGTCT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> GCCACG  |       | 56 %<br>(81/145)                             | trs<br>RBS                  | 5' → 3'              | 1615 1610<br>   <br>CTCAAG <span style="border-bottom: 1px solid black; padding: 0 5px;">L1</span> |    | +         |  |
| (10)               | 4570 4565 431 436<br> <br>GCGTCT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T</span> GCCACG  |       | 25 %<br>(37/145)                             | trs<br>RBS                  | 5' → 3'              |  |    | -         |  |
| (14)               | 581 574 2241 2250<br>   <br>TCTCTC <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CCTTC</span> CTAGTC  |       | 100%   | trs                         | 5' → 3'              |  |    | -         |  |
| (19)               | 4616 4625 1413 1404<br>   <br>CCGAAA <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CGGG</span> TCCCCT   |       | 32 %<br>(46/145)                             | trs<br>RBS                  | 5' ← 3'              |  |    | +         |  |
| (20)               | 287 283 404 408<br>   <br>TGGAGGTGGGGGCTCGGCGCTC   |       | 100%   | trs P5                      | 5' → 3'              |  |    | -         |  |
| (6)                | <b>Jonctions AAV-2 /AAV-2</b>  |       |  |                             |                      |  |    |           |  |
|                    | 4664 4669 130 135<br>   <br>GGGAGT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CAGACTCAT</span> ATCACT  |       | D: 4 %<br>(6/145)<br><br>G: 90%<br>(130/145) | trs (D)<br>RBS (D)          |                      |  |    |           |  |
| (2 / 4/<br>5 / 10) | <b>Remaniements viraux</b>   |       |  |                             |                      |  |    |           |  |
|                    | <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>4200 4566 3047 3149</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin: 0 auto;">AAV N<sub>21</sub> AAV AAV AAVSI</div> </div> <div style="text-align: center;"> <p>4601 4564 430 700</p> </div> </div><br><div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>4498 4566 3047 3149</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin: 0 auto;">AAV N<sub>21</sub> AAV AAV AAVSI</div> </div> <div style="text-align: center;"> <p>621 623 4273 4548</p> </div> </div><br><div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>1623</p> <p>N<sub>21</sub>: TCCAGCAACTCAA</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1611 686 680</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin: 0 auto;">AAVSI</div> <p>CCCCAGC</p> </div> </div> |       |  |                             |                      |  |    |           |  |

   paires de bases communes entre 2 séquences    RBS/trs: motifs RBS et trs du génome viral  
   NNN paires de bases différentes entre 2 séquences    Hyb L1: hybridation des plasmides avec une sonde L1  
G: gauche    D: droit    trsP5: trs-like du promoteur P5     $\Delta$ ITR: % de délétion de l'extrémité virale

**Figure 22:** Caractéristiques des jonctions identifiées au cours de l'intégration du génome viral dans les cellules HA16

de façon latente par AAV-2. Ce type de jonction n'avait été identifié que par Giraud et collaborateurs en utilisant un système extrachromosomique (figure 23) (Giraud *et al.*, 1995). L'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire nécessite tout d'abord la présence des motifs RBS et trs présents à la fois dans la séquence AAVSI et dans les 2 extrémités virales (Giraud *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 1996a). Les protéines Rep78/68 sont également requises pour une intégration ciblée du génome viral dans la séquence AAVSI. En effet, ces protéines interagissent spécifiquement avec les motifs RBS des génomes viraux et cellulaires et sont ainsi capables de former un complexe tripartite (Weitzman *et al.*, 1994). Grâce à l'activité endonucléasique des protéines Rep78/68 (Snyder *et al.*, 1990b), les séquences cellulaires et virales sont clivées au niveau du site trs, permettant ainsi l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI. Jusqu'à présent, tous les sites d'intégration identifiés, dans le génome de cellules infectées de façon latente par AAV-2, avaient été localisés à plusieurs centaines de paires de bases en aval du site RBS de la séquence AAVSI (figure 23) (Kotin et Berns, 1989; Samulski *et al.*, 1991). Les modèles concernant l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI devaient donc tenir compte de cette observation. Ainsi, Kotin et Linden ont suggéré que l'extrémité 3'OH libre, générée par le clivage de la séquence AAVSI, permet alors la réplication de la séquence AAVSI (Kotin, 1994; Linden *et al.*, 1996b). Nos résultats suggèrent que le génome viral peut également s'intégrer dans la séquence AAVSI au niveau du site RBS, ne nécessitant ainsi aucune réplication de la séquence cellulaire. Ces 2 mécanismes semblent pouvoir se produire au cours de l'intégration ciblée de l'ADN d'AAV-2 dans la séquence AAVSI.

Nous avons également détecté une intégration du génome viral dans la région 3' de la séquence AAVSI et dans la phase ouverte de lecture putative, suggérant une éventuelle perturbation de l'expression de cette séquence cellulaire. Cependant, on ne dispose à l'heure actuelle d'aucune information concernant soit l'expression de cette séquence AAVSI soit la synthèse d'une protéine AAVSI. Il s'avère donc indispensable de caractériser plus précisément cette séquence cellulaire.

Les jonctions entre les séquences cellulaires et virales identifiées dans les cellules HA16 possèdent des caractéristiques déjà mentionnées auparavant par différentes équipes (Kotin *et al.*, 1989; Samulski *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1992; Giraud *et al.*, 1995). On peut noter l'existence de quelques paires de bases communes entre les séquences virales et cellulaires ainsi que des délétions fréquentes de l'extrémité virale. De plus, plusieurs copies virales organisées en tandem sont intégrées dans un même site cellulaire, suggérant une réplication possible du génome d'AAV-2 par un mécanisme en cercle roulant. Pour l'instant, ce mode de réplication n'a pas encore été décrit pour AAV-2.

Les cellules HA16 possèdent au moins une copie AAVSI intacte, particularité observée pour toutes les cellules infectées de façon latente par AAV-2 ou par des recombinants AAV. Il s'est avéré impossible d'isoler un clone cellulaire pour lequel toutes les séquences AAVSI auraient été



affectées par l'intégration de séquences virales. Ce résultat pourrait donc suggérer que l'intégration du génome viral dans toutes les séquences AAVSI entraînerait la mort du clone cellulaire.

Nous avons également mis en évidence, *in vivo*, une intégration du génome viral dans un élément transposable de type Line1 (L1) situé dans la région 3' de la séquence AAVSI. L'utilisation d'un système artificiel (vecteur navette) avait aussi révélé l'intégration de séquences virales dans un élément de type L1 (Giraud *et al.*, 1995). Le génome humain contient de multiples séquences L1. Cependant, un nombre limité de ces séquences code une transposase responsable de la transposition des éléments L1 dans le génome humain alors que la majorité de ces éléments intégrés dans l'ADN cellulaire sont incapables de transposer car ils contiennent des délétions importantes dans le gène de la transposase. L'élément L1 identifié au niveau de la jonction virale dans les cellules HA16 semble appartenir à cette dernière catégorie car seules 300 paires de bases présentent une homologie de plus de 90% avec une séquence L1. Ces éléments L1 ont été également détectés sous forme extrachromosomique dans les cellules HeLa (Jones et Potter, 1985). Trois hypothèses peuvent donc être envisagées pour expliquer la présence d'éléments L1 dans la région 3' de la séquence AAVSI dans les cellules HA16 (dérivées de cellules HeLa). Premièrement, la séquence L1 préexiste dans la région 3' de la séquence AAVSI, ainsi le génome viral s'est intégré dans un élément L1 déjà présent dans l'ADN cellulaire. Deuxièmement, une recombinaison est intervenue entre le génome viral et un élément L1 extrachromosomique avant toute intégration dans le génome cellulaire, puis ce recombinant AAV-L1 s'est intégré dans l'ADN cellulaire. Enfin, une recombinaison est intervenue entre un élément L1 extrachromosomique et une séquence virale déjà intégrée dans le génome cellulaire. Il semble donc important de définir l'origine de cet élément L1 identifié dans la région 3' de la séquence AAVSI.

L'analyse de l'ADN génomique de 3 clones cellulaires différents, obtenus par dilution des cellules HA16, a révélé des profils de digestion légèrement différents après hybridation avec des sondes AAV-2 et AAVSI. Ainsi, une population cellulaire, à l'origine monoclonale, a évolué et conduit à l'émergence de nouveaux clones cellulaires.

Afin de vérifier l'existence dans l'ADN génomique de plusieurs jonctions isolées à partir de la banque, des amplifications par PCR ont été réalisées. Même si toutes les jonctions clonées ont été retrouvées dans la cellule HA16C5, des différences sont apparues d'une part entre les clones cellulaires et d'autre part au sein d'un même clone où des variants de jonctions ont été caractérisés. Ceci suggère que le génome viral intégré garde une certaine mobilité dans la séquence AAVSI; il semble donc être en permanence dans un état dynamique.

Enfin, l'analyse de chromosomes métaphasiques, issus du clone cellulaire HA16C5, a révélé l'existence de nombreuses translocations impliquant des séquences du chromosome 19. Certaines translocations, observées pour le clone 5, ne sont pas retrouvées pour d'autres clones cellulaires issus également du clonage en dilution limite des cellules HA16. Enfin, plusieurs types cellulaires différents (analyse basée uniquement sur l'existence de translocations de séquences du

chromosome 19) ont été identifiés au sein des cellules HA16 (cellules monoclonales à l'origine), suggérant ainsi une évolution de la culture cellulaire au cours du temps. Ces résultats ne permettent, en aucun cas, d'établir une relation entre l'intégration du génome viral dans l'ADN des cellules HA16 et les remaniements chromosomiques observés. Toutefois, une instabilité génétique de la séquence AAVSI a été associée au motif M26 (Giraud *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 1996a). Il semble donc important de déterminer si l'intégration du génome viral dans la séquence AAVSI peut augmenter l'instabilité de la région chromosomique 19q13.3qter, déjà remarquée pour sa plasticité.

# CONCLUSION

## Conclusion

Le travail que nous avons effectué avait pour objectif d'identifier les cibles du parvovirus adéno-associé de type-2.

Nous avons tout d'abord montré que l'interaction entre la particule virale et la membrane cellulaire est suffisante pour induire une différenciation cellulaire. Cette interaction semble activer toute une cascade de signaux intracellulaires conduisant à une différenciation des cellules. L'induction de la différenciation médiée par AAV-2 pourrait ainsi être impliquée dans les propriétés antitransformantes de ces virus.

Nous avons ensuite recherché des sites d'intégration du parvovirus AAV-2 dans le génome de cellules infectées de façon latente par AAV-2. Ainsi, nous avons mis en évidence, pour la première fois, une intégration du génome viral à proximité des motifs RBS et trs de la séquence AAVSI ainsi que dans un transposon de type Line 1, localisé dans la région 3' de la séquence AAVSI, dont reste encore à déterminer. Des résultats encore préliminaires suggèrent que l'ADN viral intégré dans la séquence AAVSI garde une certaine mobilité et semble être en permanence dans un état dynamique.

Enfin à l'aide de ces outils moléculaires, nous allons pouvoir rechercher les sites d'intégration du génome d'AAV-2 dans l'ADN des cellules placentaires JAr, JEG-3 et BeWo ainsi que dans les cellules amniotiques FL mais également dans les tissus détectés positifs, par PCR ou Southern Blot, pour la présence de séquences d'ADN du parvovirus AAV-2. Il est important de déterminer le statut du parvovirus AAV-2 dans la sphère génitale qui apparaît de plus en plus comme l'un des tissus cibles de l'infection naturelle par AAV-2.

A l'heure actuelle, le parvovirus AAV-2 constitue un des vecteurs de choix la thérapie génique. En effet, le génome d'AAV-2 est capable de s'intégrer préférentiellement dans la séquence AAVSI (localisée sur le chromosome 19) en présence des protéines Rep. De plus, aucune pathologie humaine n'a été associée à ce virus. Cependant, la détection de séquences nucléotidiques d'AAV-2 dans des tissus utérins et dans du matériel provenant d'avortements spontanés pourrait suggérer une implication de ce virus dans ces pathologies. Il s'avère donc nécessaire d'identifier les organes infectés *in vivo* par AAV-2 et de déterminer si l'infection de tissus humains par AAV-2 est de nature opportuniste ou non.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Afione, S. A., Conrad, C. K. et Flotte, T. R.** 1995. Gene therapy vectors as drug delivery systems. *Clin. Pharmacokinet.* **28**: 181-189.

**Agbandje, M., Parrish, C. R. et Rossmann, M. G.** 1995. The recognition of parvovirus capsids by antibodies. *Seminars in Virology.* **6**: 219-231.

**Alitalo, K. et Schwab, M.** 1986. Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.* **47**: 235-281.

**Anderson, R. J., Galatowicz, G., MacDonald, I. D., Lowdell, M. W., Corbett, T. J. et Prentice, H. G.** 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells. *Exp. Hematol.* **25**: 256-262.

**Antoni, B. A., Rabson, A. B., Miller, I. L., Trempe, J. P., Chejanovsky, N. et Carter, B. J.** 1991. Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type-1 production in human cells. *J. Virol.* **65**: 396-404.

**Astell, C. R.** 1990. Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 61. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

**Atchison, R. W., Casto, B. C. et Hammon, W. M.** 1965. Adeno-associated defective virus particles. *Science.* **149**: 754-756.

**Balagué, C., Kalla, M. et Zhang, W. W.** 1997. Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J. Virol.* **71**: 3299-3306.

**Bantel-Schaal, U. et zur Hausen, H.** 1988. Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells. *Virology.* **164**: 64-74.

**Bantel-Schaal, U.** 1990. Adeno-associated parvoviruses inhibit growth of cells derived from malignant human tumors. *Int. J. Cancer.* **45**: 190-194.

**Bantel-Schaal, U.** 1991. Infection with adeno-associated parvovirus (AAV) leads to increased sensitivity of mammalian cells to stress. *Virology.* **182**: 260-268.

- Bantel-Schaal, U. et Stöhr, M.** 1992. Influence of adeno-associated virus on adherence and growth properties of normal cells. *J. Virol.* **66**: 773-779.
- Bantel-Schaal, U.** 1995. Growth properties of a human melanoma cell line are altered by adeno-associated parvovirus type 2. *Int. J. Cancer.* **60**: 269-274.
- Batchu, R. B., Kotin, R. M. et Hermonat, P. L.** 1994. The regulatory Rep protein of adeno-associated virus binds to sequences within the *c-H-ras* promoter. *Cancer Lett.* **86**: 23-31.
- Batchu, R. B. et Hermonat, P. L.** 1995. The *trans*-inhibitory Rep78 protein of adeno-associated virus binds to a TAR region DNA of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeats. *FEBS letters.* **367**: 267-271.
- Beaton, A., Palumbo, P. et Berns, K. I.** 1989. Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in *trans* by the Rep protein. *J. Virol.* **63**: 4450-4454.
- Becerra, S. P., Koczot, F., Fabisch, P. et Rose, J. A.** 1988. Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J. Virol.* **62**: 2745-2754.
- Berns, K. I. et Kelly, T. J.** 1974. Visualization of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Mol. Biol.* **82**: 267-271.
- Berns, K. I., Pinkerton, T. C., Thomas, G. F. et Hoggan, M. D.** 1975. Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology.* **68**: 556-560.
- Berns, K. I. et Linden, R. M.** 1995. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays.* **17**: 237-245.
- Berns, K. I. et Giraud, C.** 1996. Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **218**: 1-23.
- Blacklow, N. R., Cukor, S., Kibrick, S. et Quinnan, G.** 1978. Interaction of adeno-associated viruses with cell transformed by herpes simplex virus. In *Replication of Mammalian Parvoviruses*, pp. 87-98. Edited by D. C. Ward et P. Tattersall. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Bohenzky, R. A., LeFebvre, R. B. et Berns, K. I.** 1988. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology*. **166**: 316-327.

**Botquin, V., Cidarregui, A. et Schlehofer, J. R.** 1994. Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *J. Gen. Virol.* **75**: 2655-2662.

**Brown, K. E., Green, S. W., O'sullivan, M. G. et Young, N. S.** 1995. Cloning and sequencing of the simian parvovirus genome. *Virology*. **210**: 314-322.

**Buller, R. M. et Rose, J. A.** 1978. Characterization of adeno-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J. Virol.* **25**: 331-338.

**Buller, R. M. L., Janik, J. E., Sebring, E. D. et Rose, J. A.** 1981. Herpes simplex virus type 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**: 241-247.

**Burguete, T., Rabreau, M., Fontanges, M. et Schlehofer, J. R.** 1997. Evidence of AAV infection of the human embryo. In *VIIth International Parvovirus Workshop*, pp. 4.7. Heidelberg, Germany.

**Carter, B. J.** 1990. Adeno-associated virus gene expression and regulation. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 227-254. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.

**Carter, B. J., Antoni, B. A. et Klessig.** 1992. Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology*. **191**: 473-476.

**Carthew, R. W., Chodosh, L. A. et Sharp, P. A.** 1987. The major late transcription factor binds to and activates the mouse metallothioneinI promoter. *Genes Dev.* **1**: 973-980.

**Cassinotti, P., Weitz, M. et Tratschin, J. D.** 1988. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology*. **167**: 176-184.

**Chang, L. S., Shi, Y. et Shenk, T.** 1989. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J. Virol.* **63**: 3479-3488.

- Chang, L. S. et Shenk, T.** 1990. The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J. Virol.* **64**: 2103-2109.
- Chapman, M. S. et Rossmann, M. G.** 1993. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology.* **194**: 491-508.
- Chatterjee, S., Johnson, P. R. et Wong, K. K. J.** 1992. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science.* **258**: 1485-1488.
- Chejanovsky, N. et Carter, B. J.** 1989. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus *rep* gene: effects on viral DNA replication. *Virology.* **173**: 120-128.
- Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W. et Berns, K. I.** 1980. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* **33**: 739-748.
- Chiorini, J. A., Weitzman, M. D., Owens, R. A., Urcelay, E., Safer, B. et Kotin, R. M.** 1994a. Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **68**: 797-804.
- Chiorini, J. A., Wiener, S. M., Owens, R. A., Kyöstiö, S. R. M., Kotin, R. M. et Safer, B.** 1994b. Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats. *J. Virol.* **68**: 7448-7457.
- Chiorini, J. A., Yang, L., Safer, B. et Kotin, R. M.** 1995. Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J. Virol.* **69**: 7334-7338.
- Chodosh, L. A., Carthew, R. W., Morgan, J. G., Crabtree, G. R. et Sharp, P. A.** 1987. The adenovirus major late transcription factor activates the rat  $\gamma$ -fibrinogen promoter. *Science.* **238**: 684-688.
- Cobrinik, D., Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Mittnacht, S. et Weinberg, R. A.** 1992. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 312-315.

- Collaco, R., Prasad, K. M. R. et Trempe, J. P.** 1997. Phosphorylation of the adeno-associated virus replication proteins. *Virology*. **232**: 332-336.
- Conrad, C. K., Allen, S. S., Afione, S. A., Reynolds, T. C., Beck, S. E., Feemaki, M., Barraza-Ortiz, X., Adams, R., Askin, F. B., Carter, B. J., Guggino, W. B. et Flotte, T. R.** 1996. Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Therapy*. **3**: 658-668.
- Costello, E., Saudan, P., Winocour, E., Pizer, L. et 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.
- Cotmore, S. F. et Tattersall, P.** 1984. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science*. **226**: 1161-1165.
- Cotmore, S. F. et Tattersall, P.** 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**: 91-174.
- Cukor, G., Blacklow, N. R., Kibrick, S. et Swan, I. C.** 1975. Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpesvirus-transformed hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**: 957-959.
- Cukor, G., Blacklow, N. R., Hoggan, M. D. et Berns, K. I.** 1983. Biology of adeno-associated virus. In *The Parvovirus*, pp. 33. Edited by K. I. Berns. New York.
- de la Maza, L. M. et Carter, B. J.** 1981. Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J. Natl. Cancer. Inst.* **67**: 1323-1326.
- Dixit, M., Webb, M. S., Smart, W. C. et Ohi, S.** 1991. Construction and expression of a recombinant adeno-associated virus that harbors a human  $\beta$ -globin-encoding cDNA. *Gene*. **104**: 253-257.
- Dutheil, N., Malhomme, O., Provost, N., Becquart, P., Burguete, T., Schlehofer, J. R. et Dupressoir, T.** 1997. Presence of integrated DNA sequences of adeno-associated virus type 2 in four cell lines of human embryonic origin. *J. Gen. Virol.* **78**: 3039-3043.

El Dadah, A. N., Nathanson, N., Smith, K. O., Squire, R. A., Santos, G. W. et Melby, E. C. 1967. Viral hemorrhagic encephalopathy of rats. *Science*. **156**: 392-394.

Fife, K. H., Berns, K. I. et Murray, K. 1977. Structure and nucleotide sequence of the terminal regions of adeno-associated virus DNA. *Virology*. **78**: 475-487.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Solow, R., Drumm, M. L., Markakis, D., Guggino, W. B., Zeitlin, P. L. et Carter, B. J. 1993a. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**: 3781-3790.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Conrad, C., McGrath, S. A., Solow, R., Oka, H., Zeitlin, P. M., Guggino, W. B. et Carter, B. J. 1993b. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1993**: 10613-10617.

Flotte, T. R., Conrad, C. K., Afione, S. A., Reynolds, T. C., Guggino, W. B. et Carter, B. J. 1994. Preclinical trials of adeno-associated virus (AAV) vectors for cystic fibrosis (CF) gene therapy. In *Cystic fibrosis* conference, pp. S13.3.

Friedman-Einat, M., Grossman, Z., Mileguir, F., Smetana, Z., Ashkenazi, M., Barkai, G., Varsano, N., Glick, E. et Mendelson, E. 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 71-78.

Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J. et zur Hausen, H. 1984. Analyses of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology*. **134**: 64-71.

Giraud, C., Winocour, E. et Berns, K. I. 1994. Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 10039-10043.

Giraud, C., Winocour, E. et Berns, K. I. 1995. Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J. Virol.* **69**: 6917-6924.

Goodman, S., Xiao, X., Donahue, R. E., Moulton, A., Miller, J., Walsh, C., Young, N. S., Samulski, R. J. et Nienhuis, A. W. 1994. Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells. *Blood*. **84**: 1492-1500.

**Green, M. R. et Roeder, R. G.** 1980a. Transcripts of the adeno-associated virus genome: mapping of the major RNAs. *J. Virol.* **36**: 79-92.

**Green, M. R. et Roeder, R. G.** 1980b. Transcripts of a novel promoter for the major adenovirus-associated virus mRNA. *Cell.* **22**: 231-242.

**Grossman, Z., Mendelson, E., Broksimoni, F., Mileguir, F., Leitner, Y., Rechavi, G. et Ramot, B.** 1992. Detection of adeno-associated virus type-2 in human peripheral blood cells. *J. Gen. Virol.* **73**: 961-966.

**Han, L., Parmley, T. H., Keith, S., Kozlowski, K. J., Smith, L. J. et Hermonat, P. L.** 1996. High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 *rep* DNA in cervical material: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes.* **12**: 47-52.

**Handa, H., Shiroki, K. et Shimojo, H.** 1977. Establishment and characterization of KB cell lines latently infected with adeno-associated virus type 1. *Virology.* **82**: 84-92.

**Hermanns, J., Schulze, A., Jansen-Dürr, P., Kleinschmitt, J. A., Schmitt, R. et zur Hausen, H.** 1997. Infection of primary cells by adeno-associated virus type 2 results in a modulation of cell cycle-regulating proteins. *J. Virol.* **71**: 6020-6027.

**Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., Berns, K. I. et Muzyczka, N.** 1984a. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**: 329-339.

**Hermonat, P. L. et Muzyczka, N.** 1984b. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 6466-6470.

**Hermonat, P. L.** 1989. The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology.* **172**: 253-261.

**Hermonat, P. L.** 1991. Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus rep78 transformation suppressor gene product. *Cancer Res.* **51**: 3373-3377.

**Hermonat, P. L.** 1992. Inhibition of bovine papillomavirus plasmid DNA replication by adeno-associated virus. *Virology.* **189**: 329-333.

- Hermonat, P. L. et Batchu, R. B.** 1997a. The adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein forms multimeric complexes and the domain for this activity is contained within the carboxy-half of the molecule. *FEBS Letters*. **401**: 180-184.
- Hermonat, P. L., Santini, A. D. et Batchu, R. B.** 1997b. The adeno-associated virus Rep78 major regulatory/transformation suppressor protein binds cellular SP1 *in vitro* and evidence of a biological effect. *Cancer Res*. **56**: 5299-5304.
- Hermonat, P. L., Han, L. et Kokorina, N.** 1997c. Transduction and expression at map unit 96 of adeno-associated virus (AAV) and identification of a new AAV promoter, p81. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p28. Heidelberg, Germany.
- Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. et Rowe, W. P.** 1966. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **55**: 1467-1474.
- Hoggan, M. D., Thomas, G. F., Thomas, F. B. et Johnson, F. B.** 1972. Continuous "carriage" of adenovirus associated genome in cell cultures in the absence of helper adenovirus. In *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Lepetit Colloquium*. Cocoyac, Mexico. North Holland: Publishing Co., Amsterdam.
- Hong, G., Ward, P. et Berns, K. I.** 1992. *In vitro* replication of adeno-associated virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 4673-4677.
- Hörer, M., Weger, S., Butz, K., Hoppeseyler, F., Geisen, C. et Kleinschmidt, J. A.** 1995. Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J. Virol*. **69**: 5485-5496.
- Im, D. S. et Muzyczka, N.** 1989. Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol*. **63**: 3095-3104.
- Im, D. S. et Muzyczka, N.** 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*. **61**: 447-457.
- Im, D. S. et Muzyczka, N.** 1992. Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol*. **66**: 1119-1128.

- Janik, J. E., Huston, M. M. et Rose, J. A.** 1984. Adeno-associated virus proteins: origin of the capsid components. *J. Virol.* **52**: 591-597.
- Jay, F. T., Laughlin, C. A. et Carter, B. J.** 1981. Eukaryotic translational control: adeno-associated virus protein synthesis is affected by a mutation in the adenovirus DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2927-2931.
- Johnson, F. B., Thomson, T. A., Taylor, P. A. et Vlazny, D. A.** 1977. Molecular similarities among the adenovirus-associated virus polypeptides and evidence for a precursor protein. *Virology.* **82**: 1-13.
- Jones, R. S. et Potter, S.** 1985. L1 sequences in HeLa extrachromosomal circular-DNA: evidence for circularization by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 1989-1993.
- Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., Omalley, K. L. et During, M. J.** 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* **8**: 148-154.
- Kashani, S. M., Funato, T. et Tone, T.** 1992. Reversal of the malignant phenotype by an anti-ras ribozyme. *Antisense Res. Dev.* **2**: 3-15.
- Katz, E. et Carter, B. J.** 1986. Effect of adeno-associated virus on transformation of NIH 3T3 cells by ras gene and on tumorigenicity of an NIH 3T3 transformed cell line. *Cancer Res.* **46**: 3023-3026.
- Kawase, S., Garzon, S., Su, D.-M. et Tijssen, P.** 1990. Insect parvovirus diseases. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 213. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Kearns, W. G., Afione, S. A., Fulmer, S. B., Pang, M. G., Erikson, D., Egan, M., Landrum, M. J., Flotte, T. R. et Cutting, G. R.** 1996. Recombinant adeno-associated virus (AAV-2 CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Therapy.* **3**: 748-755.
- Khleif, S. N., Myers, T., Carter, B. J. et Trempe, J. P.** 1991. Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus *rep* gene. *Virology.* **181**: 738-741.
- Kilham, L. et Olivier, L. J.** 1959. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology.* **7**: 428-437.

**Kilham, L. et Margolis, G.** 1969. Transplacental infection of rats and hamsters induced by oral and parenteral inoculations of H-1 and rat viruses (RV). *Teratology*. **2**: 111-123.

**Kirschstein, R. L., Smith, K. O. et Peters, E. A.** 1968. Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**: 670-673.

**Klein-Bauernschmitt, P., zur Hausen, H. et Schlehofer, J. R.** 1992. Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type-2. *J. Virol.* **66**: 4191-4200.

**Klein-Bauernschmitt, P., Von Knebel, M., Ehrbar, M., Geletneky, K., Kleinschmitt, J. et Schlehofer, J. R.** 1996. Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells. *Eur. J. Cancer*. **32A**: 1774-1780.

**Klein-Bauernschmitt, P. et Bauernschmitt, R.** 1997. Detection of AAV DNA sequences in biopsies of human hearts. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p76. Heidelberg, Germany.

**Kohler, P. O. et Bridson, W. E.** 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol.* **32**: 683-687.

**Kotin, R. M. et Berns, K. I.** 1989. Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology*. **170**: 460-467.

**Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. et Berns, K. I.** 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 2211-2215.

**Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C. et Berns, K. I.** 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics*. **10**: 831-834.

**Kotin, R. M., Linden, R. M. et Berns, K. I.** 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J.* **11**: 5071-5078.

- Kotin, R. M.** 1994. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**: 793-801.
- Kyöstiö, S. R. M., Owens, R. A., Weitzman, M. D., Antoni, B. A., Chejanovsky, N. et Carter, B. J.** 1994. Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J. Virol.* **68**: 2947-2957.
- Kyöstiö, S. R. M., Wonderling, R. S. et Owens, R. A.** 1995. Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) p-5 promoter involves both the p-5 rep binding site and the consensus ATP-Binding motif of the AAV rep68 protein. *J. Virol.* **69**: 6787-6796.
- Kyöstiö, S. R. M. et Owens, R. A.** 1996. Identification of mutant adeno-associated virus Rep proteins which are dominant-negative for DNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 294-299.
- Labow, M. A., Graf, L. J. et Berns, K. I.** 1987. Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1320-1325.
- Labow, M. A., Hermonat, P. L. et Berns, K. I.** 1986. Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* **60**: 251-258.
- LaFace, D., Hermonat, P., Wakeland, E. et Peck, A.** 1988. Gene transfer into hematopoietic progenitor cells mediated by an adeno-associated virus vector. *Virology.* **162**: 483-486.
- Landchshultz, W.H., Johnson, P.F. et McKnight, S.L.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240**: 1759-1764.
- Laughlin, C. A., Myers, M. W., Risin, D. L. et Carter, B. J.** 1979. Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus. *Virology.* **94**: 162-174.
- Laughlin, C. A., Jones, N. et Carter, B. J.** 1982. Effect of deletions in adenovirus early region 1 genes upon replication of adeno-associated virus. *J. Virol.* **41**: 868-876.
- Laughlin, C. A., Tratschin, J.-D., Coon, H. et Carter, B. J.** 1983. Cloning of infectious adeno-associated virus genome in bacterial plasmids. *Gene.* **23**: 65-73.

- Laughlin, C. A., Cardellichio, C. B. et Coon, H. C.** 1986. Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J. Virol.* **60**: 515-524.
- Lavi, S.** 1981. Carcinogen-mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 6973-6977.
- Lebkowski, J. S., McNally, M. M., Okarma, T. B. et Lerch, L. B.** 1988. Adeno-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3988-3996.
- LeFebvre, R. B., Riva, S. et Berns, K. I.** 1984. Conformation takes precedence over sequence in adeno-associated virus DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1416-1419.
- Linden, R. M., Winocour, E. et Berns, K. I.** 1996a. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 7966-7972.
- Linden, R. M., Ward, P. et Berns, K. I.** 1996b. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 11288-11294.
- Lowy, D. R., Kirnbauer, R. et Schiller, J. T.** 1994. Genital human papillomavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2436-2440.
- Lubeck, M. D., Lee, H. M., Hoggan, M. D. et Johnson, F. B.** 1979. Adenovirus-associated virus structural protein sequence homology. *J. Gen. Virol.* **45**: 209-216.
- Lum, G. S. et Schreiner, A. W.** 1963. Study of a virus isolated from a chloroleukemic Wistar rat. *Cancer Res.* **23**: 1742-1747.
- Lusby, E., Fife, K. H. et Berns, K. I.** 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **34**: 402-409.
- Lusby, E., Bohenzky, R. et Berns, K. I.** 1981. Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J. Virol.* **37**: 1083-1086.
- Lusby, E. W. et Berns, K. I.** 1982. Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J. Virol.* **41**: 518-526.

**Malhomme, O., Deprez, A., Boitelle, A., Gosset, P., Schlehofer, J. R. et Dupressoir, T.** 1997. DNA sequences of adeno-associated virus detected in human broncho-alveolar lavages. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p75. Heidelberg, Germany.

**Malhomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., Armbruster-Moraes E., Schlehofer, J. R. et Dupressoir, T.** 1997. Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DAN sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *J. Gen. Virol.* **78**: 1957-1962.

**Mayor, H. D., Jamison, R. M., Jordan, L. E. et Melnick, J. L.** 1965. Structure and composition of a small particle prepared from a simian adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 235-242.

**Mayor, H. D. et Melnick, J. L.** 1966. Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (Picodnavirus group). *Nature.* **210**: 331-332.

**Mayor, H. D., Torikai, K. et Melnick, J. L.** 1969. Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions. *Science.* **166**: 1280-1282.

**Mayor, H. D., Houlditch, G. S. et Mumford, D. M.** 1973. Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumors in hamsters. *Nature New Biol.* **241**: 44-46.

**Mayor, H. D., Drake, S., Stahmann, J. et Mumford, D. M.** 1976. Antibodies to adeno-associated satellite virus and herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **126**: 100-104.

**McCarty, D. M., Ni, T. H. et Muzyczka, N.** 1992. Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **66**: 4050-4057.

**McCarty, D. M., Ryan, J. H., Zolotukhin, S., Zhou, X. H. et Muzyczka, N.** 1994a. Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat. *J. Virol.* **68**: 4998-5006.

**McCarty, D. M., Pereira, D. J., Zolotukhin, I., Zhou, X. H., Ryan, J. H. et Muzyczka, N.** 1994b. Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **68**: 4988-4997.

**McLaughlin, S. K., Collis, P., Hermonat, P. L. et Muzyczka, N.** 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**: 1963-1973.

**McPherson, R. A., Rosenthal, L. J. et Rose, J. A.** 1985. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology.* **147**: 217-222.

**Mendelson, E., Trempe, J. P. et Carter, B. J.** 1986. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J. Virol.* **60**: 823-832.

**Mendelson, E., Grossman, Z., Mileguir, F., Rechavi, G. et Carter, B. J.** 1992. Replication of adeno-associated virus type-2 in human lymphocytic cells and interaction with HIV-1. *Virology.* **187**: 453-463.

**Miller, J. L., Donahue, R. E., Sellers, S. E., Samulski, R. J., Young, N. S. et Nienhuis, A. W.** 1994. Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated expression of a human gamma-globin gene in human progenitor-derived erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 10183-10187.

**Mishra, L. et Rose, J. A.** 1990. Adeno-associated virus DNA replication is induced by genes that are essential for HSV-1 DNA synthesis. *Virology.* **179**: 632-639.

**Mizukami, H., Young, N. S. et Brown, K. E.** 1996. Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology.* **217**: 124-130.

**Muralidhar, S., Becerra, S. P. et Rose, J. A.** 1994. Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons - effects on regulation of synthesis and biological activity. *J. Virol.* **68**: 170-176.

**Murphy, F. A., Fauquet, C. M. et Bishop, D. H. L.** 1994a. *Parvoviridae*. In *Virus taxonomy. Archives of Virology. VI<sup>th</sup> report of international committee on taxonomy of viruses*, pp. 166-178.

**Muzyczka, N.** 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**: 97-129.

Myers, M. W., Laughlin, C. A., Jay, F. T. et Carter, B. J. 1980. Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *J. Virol.* **35**: 65-75.

Ni, T. H., Zhou, X. H., McCarty, D. M., Zolotukhin, I. et Muzyczka, N. 1994. *In vitro* replication of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **68**: 1128-1138.

Oelze, I., Rittner, K. et Sczakiel, G. 1994. Adeno-associated virus type 2 *rep* gene-mediated inhibition of basal gene expression of human immunodeficiency virus type 1 involves its negative regulatory functions. *J. Virol.* **68**: 1229-1233.

Ogston, K. R., Raj, K., Saudan, P., Hirt, B. et Beard, P. 1997. Effects of HPV-16 proteins on the replication of AAV-2. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p19.

Ohi, S., Dixit, M., Tillery, M. K. et Plonk, S. G. 1989. Construction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human beta-globin cDNA. *Gene.* **89**: 279-282.

Ostrove, J. M., Duckworth, D. H. et Berns, K. I. 1981. Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology.* **113**: 521-533.

Owens, R. A., Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M. et Carter, B. J. 1993. Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J. Virol.* **67**: 997-1005.

Ozawa, K., Kurtzman, G. et Young, N. S. 1987. Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells *in vitro*. *Blood.* **70**: 384-391.

Patillo, R. A. et Gey, G. O. 1968. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblast cells *in vitro*. *Cancer Res.* **28**: 1231-1236.

Patillo, R. A., Ruckert, A., Husa, R., Bernstein, R. et Delfs, E. 1971. The JAr cell line-continuous human multihormone production and controls. *In vitro.* **6**: 398-399.

Pereira, D. J., McCarty, D. M. et Muzyczka, N. 1997a. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J. Virol.* **71**: 1079-1088.

**Pereira, D. J. et Muzyczka, N.** 1997b. 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.

**Pereira, D. J. et Muzyczka, N.** 1997c. The adeno-associated virus type2 p40 promoter requires a proximal Sp1 interaction and a p19 CARG-like element to facilitate Rep transactivation. *J.Virol.* **71**: 4300-4309.

**Podsakoff, G., Wong, K. K. et Chatterjee, S.** 1994. Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J. Virol.* **68**: 5656-5666.

**Pollock, R. V. H. et Carmichael, L. E.** 1990. The canine parvoviruses. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 113-134. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Floride: CRC Press Inc.

**Ponnazhagan, S., Wang, X. S., Kang, L. Y., Woody, M. J., Nallari, M. L., Munshi, N. C., Zhou, S. Z. et Srivastava, A.** 1994. Transduction of human hematopoietic cells by the adeno-associated virus type 2 vectors is receptor-mediated. *Blood.* **84(suppl)**: 742a.

**Ponnazhagan, S., Erikson, D., Kearns, W. G., Zhou, S. Z., Nahreini, P., Wang, X. S. et Srivastava, A.** 1997. Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells. *Human Gene Therapy.* **8**: 275-284.

**Porter, D. D. et Larsen, A.** 1990. Mink parvovirus infection. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 87-101. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Floride: CRC Press Inc.

**Prasad, K. M. R. et Trempe, J. P.** 1995. The adeno-associated virus rep78 protein is covalently linked to viral DNA in a preformed virion. *Virology.* **214**: 360-370.

**Prasad, K. M. R., Zhou, C. et Trempe, J. P.** 1997. Characterization of the Rep78/68 adeno-associated virus complex. *Virology.* **229**: 183-192.

**Qing, K. Y., Wang, X.-S., Kube, D. M., Ponnazhagan, S., Bajpai, A. et Srivastava, A.** 1997. Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in AAV-mediated transgene expression. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p2.7. Heidelberg, Germany.

**Richardson, W. D. et Westphal, H.** 1981. A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *Cell.* **27**: 133-141.

- Riou, G., Barrois, M., Tordjman, I., Dutronquay, V. et Orth, G.** 1984. Detection of papillomavirus genomes and evidence for the amplification of the oncogenes *c-myc* and *c-Ha-ras* in invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *C.R. Acad. Sci.* **299**: 575-580.
- Rittner, K., Heilbronn, R., Kleinschmidt, J. A. et Sczakiel, G.** 1992. Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78rep/p68rep and the HIV-1 long terminal repeat. *J. Gen. Virol.* **73**: 2977-2981.
- Rommelaere, J. et Tattersall, P.** 1990. Oncosuppression by parvoviruses. In *Handbook of parvoviruses*, pp. 41-57. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Floride: CRC Press Inc.
- Rose, J. A., Maizel, J. V. J., Inman, J. K. et Shatkin, A. J.** 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* **8**: 766-770.
- Rossmann, M. G. et Palmenberg, A. C.** 1988. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology.* **164**: 373-382.
- Ryan, J. H., Zolotukhin, S. et Muzyczka, N.** 1996. Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **70**: 1542-1553.
- Salo, R. J. et Mayor, H. D.** 1979. Adenovirus-associated virus polypeptides synthesized in cells coinfecting with either adenovirus or herpesvirus. *Virology.* **93**: 237-245.
- Samulski, R. J., Berns, K. I., Tan, M. et Muzyczka, N.** 1982. Cloning of AAV into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **79**: 2077-2081.
- Samulski, R. J., Srivastava, A., Berns, K. I. et Muzyczka, N.** 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell.* **33**: 135-143.
- Samulski, R. J. et Shenk, T.** 1988. Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J. Virol.* **62**: 206-210.
- Samulski, R. J., Chang, L. S. et Shenk, T.** 1989. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* **63**: 3822-3828.

- Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N. et Hunter, L. A.** 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* **10**: 3941-3950.
- Samulski, R. J.** 1993. Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 74-80.
- Schlehofer, J. R., Ehrbar, M. et zur Hausen, H.** 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology.* **152**: 110-117.
- Schlehofer, J. R.** 1994. The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat. Res.* **305**: 303-313.
- Schneider, R. J., Weinberger, C. et Shenk, T.** 1984. Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus-infected cells. *Cell.* **37**: 291-298.
- Schuchert, P., Langsford, M., Käslin, E. et Kohli, J.** 1991. A specific DNA sequence is required for high frequency of recombinant in the *ade6* gene of fission yeast. *EMBO J.* **10**: 2157-2163.
- Scott, F. W.** 1990. Feline parvovirus infection. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 103-111. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Floride: CRC Press Inc.
- Senapathy, P., Tratschin, J. D. et Carter, B. J.** 1984. Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori-mutant and correction of terminal palindrome deletions. *J. Mol. Biol.* **179**: 1-20.
- Shelling, A. N. et Smith, M. G.** 1994. Targeted integration of transfected and infected adenoassociated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Therapy.* **1**: 165-169.
- Shi, Y., Seto, S., Chang, L. S. et Shenk, T.** 1991. Transcriptional repression by a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell.* **67**: 377-388.
- Siegl, G.** 1984. Biology and pathogenicity of autonomous parvovirus. In *the Parvoviruses*. Edited by K. I. Berns. New York: Plenum Press.

- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. et Tattersall, P.** 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*. **23**: 61-73.
- Smith, A. E.** 1995. Viral vectors in gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 807-838.
- Smith, R. H., Spano, A. J. et Kotin, R. M.** 1997. The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associated to form a hexameric complex in the presence of AAV *ori* sequences. *J. Virol.* **71**: 4461-4471.
- Smuda, J. W. et Carter, B. J.** 1991. Adeno-associated virus having nonsense mutations in the capsid genes: growth in mammalian cells containing an inducible amber suppressor. *Virology*. **184**: 310-318.
- Snyder, R. O., Im, D. S. et Muzyczka, N.** 1990a. Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) Rep protein to the ends of the AAV genome. *J. Virol.* **64**: 6204-6213.
- Snyder, R. O., Samulski, R. J. et Muzyczka, N.** 1990b. In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell*. **60**: 105-113.
- Snyder, D. S., Wu, Y. et Wang, J. L.** 1993a. Ribozyme-mediated inhibition of *bcr-abl* gene expression in Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood*. **82**: 600-605.
- Snyder, R. O., Im, D. S., Ni, T. H., Xiao, X., Samulski, R. J. et Muzyczka, N.** 1993b. Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral rep protein. *J. Virol.* **67**: 6096-6104.
- Srivastava, A., Lusby, E. W. et Berns, K. I.** 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**: 555-564.
- Summerford, C. et Samulski, R. J.** 1997. A role for integrin  $\alpha V\beta 5$  in AAV infection. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. p2. Heidelberg, Germany.
- Surosky, R. T., Urabe, M., Godwin, S. G., McQuiston, S. A., Kurtzman, G. J., Ozawa, K. et Natsoulis, G.** 1997. Adeno-associated virus Rep protein target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* **71**: 7951-7959.

- Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V. et Heilbronn, R.** 1994. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 *rep* gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology*. **204**: 304-311.
- Tijssen, P., Dea, S. et Carter, B. J.** 1990. Human parvovirus infections. In *Handbook of Parvoviruses*, pp. 205-211. Edited by P. Tijssen. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Laruecharlus, S., Severin, F., Becker, N. et Schlehofer, J. R.** 1994. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* **44**: 215-222.
- Toolan, H. W.** 1960. Experimental production of mongoloid hamsters. *Science*. **131**: 1446-1448.
- Toolan, H. W.** 1968. The picodna viruses: H, RV, and AAV. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 135-180.
- Tratschin, J. D., Miller, I. L. et Carter, B. J.** 1984. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed *in vitro* and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J. Virol.* **51**: 611-619.
- Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T. et Carter, B. J.** 1984b. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2072-2081.
- Tratschin, J. D., Miller, I. L., Smith, M. G. et Carter, B. J.** 1985. Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3251-3260.
- Trempe, J. P., Mendelson, E. et Carter, B. J.** 1987. Characterization of adeno-associated virus Rep proteins in human cells by antibodies raised against *rep* expressed in *Escherichia coli*. *Virology*. **161**: 18-28.
- Trempe, J. P. et Carter, B. J.** 1988. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J. Virol.* **62**: 3356-3363.
- Trempe, J. P.** 1996. Packaging systems for adeno-associated virus vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **218**: 35-50.

- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W. et Parrish, C. R.** 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. **251**: 1456-1464.
- Urcelay, E., Ward, P., Wiener, S. M., Safer, B. et Kotin, R. M.** 1995. Asymmetric replication *in vitro* from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **69**: 2038-2046.
- Walker, S. L., Wonderling, R. S. et Owens, R. A.** 1997a. Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep78 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity. *J. Virol.* **71**: 2722-2730.
- Walker, S. L., Wonderling, R. S. et Owens, R. A.** 1997b. Mutational analyses of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. *J. Virol.* **71**: 6996-7004.
- Walz, C. et Schlehofer, J. R.** 1992. Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome-17. *J. Virol.* **66**: 2990-3002.
- Walz, C., Schlehofer, J. R., Flentje, M., Rudat, V. et zur Hausen, H.** 1992. Adeno-associated virus sensitizes HeLa cell tumors to gamma-rays. *J. Virol.* **66**: 5651-5657.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M. et Schlehofer, J. R.** 1997a. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infection human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.* **78**: 1441-1452.
- Walz, C., Erles, K., Dürst, M. et Schlehofer, J. R.** 1997b. Cytotoxic effect of AAV-2 infection in organotypic cultures of HPV16 immortalized human keratinocytes. In *VIII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. 5.9. Heidelberg, Germany.
- Wang, X. S., Ponnazhagan, S. et Srivastava, A.** 1995. Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Mol. Biol.* **250**: 573-580.
- Wang, X. S., Ponnazhagan, S. et Srivastava, A.** 1996. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J. Virol.* **70**: 1668-1677.

- Wang, X. et Srivastava, A.** 1997a. A novel terminal resolution-like site in the adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* **71**: 1140-1146.
- Wang, X.-S., Qing, K., Ponnazhagan, S. et Srivastava, A.** 1997b. Adeno-associated virus type 2 DNA replication *in vivo* mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J. Virol.* **71**: 3077-3082.
- Ward, P., Urcelay, E., Kotin, R., Safer, B. et Berns, K. I.** 1994. Adeno-associated virus DNA replication *in vitro*: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein. *J. Virol.* **68**: 6029-6037.
- Ward, P. et Berns, K. I.** 1995. Minimum origin requirements for linear duplex AAV DNA replication *in vitro*. *Virology.* **209**: 692-695.
- Ward, P. et 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.
- Weindler, F. W. et 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.
- Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M., Kotin, R. M. et Owens, R. A.** 1994. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 5808-5812.
- Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M., Carter, B. J. et Owens, R. A.** 1996. Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA. *J. Virol.* **70**: 2440-2448.
- Winocour, E., Callaham, M. F. et Huberman, E.** 1988. Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology.* **167**: 393-399.
- Winocour, E., Puzis, L., Etkin, S., Koch, T., Danovitch, B., Mendelson, E., Shaulian, E., Karby, S. et Lavi, S.** 1992. Modulation of the cellular phenotype by integrated adeno-associated virus. *Virology.* **190**: 316-329.

**Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. et Kleinschmitt, J. A.** 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J. Virol.* **71**: 1341-1352.

**Wonderling, R. S., Kyöstiö, S. R. M. et Owens, R. A.** 1995. A maltose binding protein adeno-associated virus Rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J. Virol.* **69**: 3542-3548.

**Wonderling, R. M. et Owens, R. A.** 1996. The Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 stimulates expression of the platelet-derived growth factor B *c-sis* proto-oncogene. *J. Virol.* **70**: 4783-4786.

**Wonderling, R. S. et Owens, R. A.** 1997a. Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J. Virol.* **71**: 2528-2534.

**Wonderling, R. S., Kyöstiö, S. R. M., Walker, S. L. et Owens, R. A.** 1997b. The Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 increases RNA levels from the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Virology.* **236**: 167-176.

**Xie, Q., Hare, J., Pruett, P., Somasundaram, T. et Chapman, M. S.** 1997. Preliminary crystal characterization of adeno-associated virus 2. In *VII<sup>th</sup> International Parvovirus Workshop*, pp. 1.2. Heidelberg, Germany.

**Yakobson, B., Koch, T. et Winocour, E.** 1987. Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J. Virol.* **61**: 972-981.

**Yakobson, B., Hrynko, T. A., Peak, M. J. et Winocour, E.** 1989. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J. Virol.* **63**: 1023-1030.

**Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J. R. et zur Hausen, H.** 1988. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* **48**: 3123-3129.

**Yang, Q., Kadam, A. et Trempe, J. P.** 1992. Mutational analysis of the adeno-associated virus *rep* gene. *J. Virol.* **66**: 6058-6069.

**Yang, Q. C., Chen, F. et Trempe, J. P.** 1994. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *J. Virol.* **68**: 4847-4856.

**Zadori, Z., Stefancsik, R., Rauch, T. et Kisary, J.** 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology*. **212**: 562-573.

**Zhou, S. Z., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Harrington, M. A. et Srivastava, A.** 1993. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **21**: 928-933.

