

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

F  
50376  
1997  
435

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur  
d'Université en Sciences de la Vie et de la Santé.

par

Olivier MALHOMME

# INFECTION NATURELLE PAR LE PARVOVIRUS ADENO-ASSOCIE DE TYPE 2 (AAV-2)

Soutenue le 19 Décembre 1997 devant la commission d'examen:

**Président:** M. le Pr. Jean-Pierre VILAIN  
**Rapporteurs:** M. le Pr. Jörg R. SCHLEHOFER  
Mme le Dr. Perrine CAILLET-FAUQUET  
**Examineurs:** M. le Pr. Dominique STEHELIN  
M. le Pr. Jean-Jacques CURGY



Une thèse de doctorat, malgré sa présentation en tant que travail individuel, n'est jamais le produit d'une personne isolée.

Elle est le fruit d'efforts multiples, elle est une mosaïque de présences diverses, de personnes, de moyens...

La page des remerciements est en général vue comme un moyen de s'acquitter d'obligations morales diverses, et de glisser quelques mots pour ceux qui ont pu soutenir le travail de toutes les façons possibles.

Je ne fais pas de différence entre les deux. De nombreuses personnes ont concouru à l'existence de ce « tas de papier » que vous tenez actuellement entre vos mains. Certaines sont même mortes depuis des siècles.

J'aimerais donc que l'on considère cette thèse comme la concrétisation d'un travail collectif.

Les mots que nous prononçons, les idées que nous formulons ne sont pas les produits de nos seules personnes, ils englobent les pensées et le travail de ceux qui nous ont précédé; aussi, les mots, les idées formulés dans cet écrit ne pas sont attribuables à ma seule personne.

Ces remerciements viennent en témoigner. Ils ne sauront être exhaustifs, mais c'est un début...

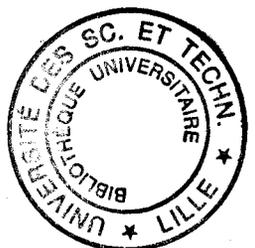
Sont remerciés ici:

Véronique, mon épouse adorée à qui je dédie ce travail...

Ma famille (sans rentrer dans les détails, il sera évident pour tout un chacun que sans un tel soutien depuis les tout-débuts, il n'y aurait pas grand-chose);

Dominique Stéhelin, pour m'avoir mis dans les conditions de travail que l'on sait, pour être l'origine, par son propre travail, d'une situation propice pour les nombreuses personnes à le suivre (que nous sommes);

Jörg R. Schlehofer, pour avoir initié les sujets, pour les avoir accompagnés, et pour ses nombreuses qualités humaines. De beaucoup de choses, je garderais des souvenirs;



Thierry Dupressoir, pour sa qualité de guide bonhomme à travers nos péripéties, aussi bien scientifiques que géographiques. Dieu sait qu'elles n'ont pas toujours été d'une grande facilité; pour « l'entraînement du champion avant la course » (et il en avait particulièrement besoin!), pour toutes les idées qui se sont révélées porteuses (les LBA pour n'en citer qu'une).

Nathalie Dutheil, pour nos moments à défricher tant bien que mal le monde impitoyable de la virologie adéno-associée;

Boris Michel. Là, il faudrait sérieusement résumer toutes les occasions où j'ai du faire appel à toi. Pfff... Ce ne sera pas possible...

Nicole et Marie-Christine, pour avoir patiemment enduré non seulement le lutinage incessant autour de l'imprimante, mais aussi les fêtes d'ortographe et de grammaire qu'ensemble la morale et M. Bescherelle réprovent de toutes leurs forces!

Et autour de ces gens se développe toute une constellation de personnes, voire d'endroits.

Tous ont à un moment ou à un autre, pesé sur ce travail. Domenico Scarlatti, David Sylvian, Marilyn Swerdlow, Takeshi Kitano, Christian Walz, Jean Sébastien Bach, Igor Stravinsky, John Cassavetes, Tennessee Williams, Claude Debussy, James Ellroy, Hal Hartley, Carson McCullers, Robert Fripp, Milan Kundera, Robby Aceto, John Huston, Michael Schenker, Yuki Takeuchi, Joseph Mankiewicz, Ryuichi Sakamoto, Brian Eno, Akira Kurosawa, Wilhelm Friedmann Bach, Richard Brooks, Ernest Hemingway, Joseph Losey, David Bowie, Steve Jansen, Richard Barbieri, Woody Allen, Dorothy Parker, Mr de Sainte Colombe, Ulrich Roth, et bien d'autres encore...

*" La physique, comme on le sait, sera terminée dans six mois "*

*Max Brown, prix Nobel de physique, 1928*

# TABLE DES MATIÈRES

<u>I/ INTRODUCTION ET PROPRIETES GENERALES</u>	6
<u>II/ ORGANISATION GENOMIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE</u>	9
<u>II.A ORGANISATION GÉNOMIQUE</u>	9
<u>II.B EXTREMITES OU ITR</u>	11
<u>II.C PROTEINES DE CAPSIDE</u>	15
<u>II.D PROTEINES NON STRUCTURALES Rep</u>	20
<u>A) GENERALITES</u>	20
<u>B) FONCTIONS</u>	22
<u>III BIOLOGIE</u>	31
<u>III.A INTRODUCTION</u>	31
<u>III.B REPLICATION VIRALE</u>	34
1) <u>ITR</u>	34
2) <u>Rep</u>	36
3) <u>mécanique</u>	37
<u>III.C DE LA « DEFECTIVITE », DES VIRUS « AIDANTS »</u>	41
<u>DES VIRUS AIDANTS</u>	41
<u>Adénovirus</u>	42
<u>Herpes Virus (HSV-1/2, HCMV, HHV-6)</u>	44
<u>Papillomavirus</u>	45
<u>III.D INTEGRATION ET EXCISION D'AAV</u>	48
<u>A) IN VIVO</u>	48
<u>B) IN VITRO</u>	49
<u>IV ONCOSUPPRESSION ET EMBRYOSUPPRESSION</u>	54

<u>IV.A HISTORIQUEMENT...</u>	54
<u>IV. B COMMENT RENDRE COMPTE DE L'ONCOSUPPRESSION ?</u>	55
1) <u>Effet sur les protéines virales des virus aidant</u>	55
2) <u>Amplification génique</u>	56
3) <u>Modifications biologiques</u>	57
4) <u>Sensibilisation aux drogues</u>	60
5) <u>Différenciation</u>	60
6) <u>Embryosuppression</u>	62
<u>V TRANSFERT DE GENES</u>	64
<u>V.A GENERALITES</u>	64
<u>V.B QUELQUES APPLICATIONS</u>	66
1) <u>Transfert dans les cellules hématopoïétiques</u>	66
B) <u>Transfert dans les cellules neuronales</u>	67
C) <u>Transfert dans les cellules épithéliales (mucoviscidose)</u>	68
D) <u>Et puis</u>	68
<u>VI AAV, COMPAGNON DE ROUTE (INFECTION NATURELLE)</u>	69
<u>VI.A 1ERE EPOQUE: LA SEROEPIDEMIOLOGIE</u>	70
<u>VI.B SECONDE EPOQUE</u>	72
<u>VII DE LA DEFECTIVITE</u>	77
<u>A) AAV PEUT SE REPLIQUER SANS VIRUS « AIDANT »</u>	77
<u>B) UNE MACHINERIE COMPLETE?</u>	78
<u>C) LA DISTINCTION PARVOVIRUS AUTONOMES/DEPENDOVIRUS EST FLOUE</u>	79
<u>D) CERTAINS CONCEPTS NE SONT PAS AISEMENT TRANSPOSABLES IN VIVO</u>	79

<u>E) AAV REPRIME SA REPLICATION</u>	4 80
<u>PUBLICATIONS</u>	82
Des tissus génitaux contenant l'ADN d'AAV ne contiennent pas d'ADN des virus aidant adénovirus, cytomégalovirus et herpes simplex, mais contiennent fréquemment de l'ADN de papillomavirus humains.	83
Présence d'ADN de séquences d'AAV-2 intégrées dans quatre lignées cellulaires d'origine embryonnaire	86
Les lavages broncho-alvéolaires contiennent des séquences d'ADN d'AAV ainsi que des séquences des virus aidant adénovirus, cytomégalovirus humain et papillomavirus	89
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	92
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	94

Nous présenterons cet écrit de la façon suivante:

Dans un premier temps, nous nous intéresserons en détail aux caractéristiques des virus AAV. Nous verrons leur organisation génomique, leur mode de réplication, leur interaction avec d'autres espèces virales, bref, aussi bien la constitution du virus que ses propriétés dont certaines (oncosuppression par exemple) sont assez peu usuelles.

Cette introduction nous permettra d'évoquer des points qui sont susceptibles de permettre la discussion, comme la nature défective du virus AAV pour la réplication.

Ensuite nous nous intéresserons aux publications issues de ces mêmes travaux. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence le virus AAV dans plusieurs situations physiologiques naturelles. Ces résultats nous amèneront à une conclusion générale où nous replacerons nos résultats dans le champ des perspectives de la parvovirologie.

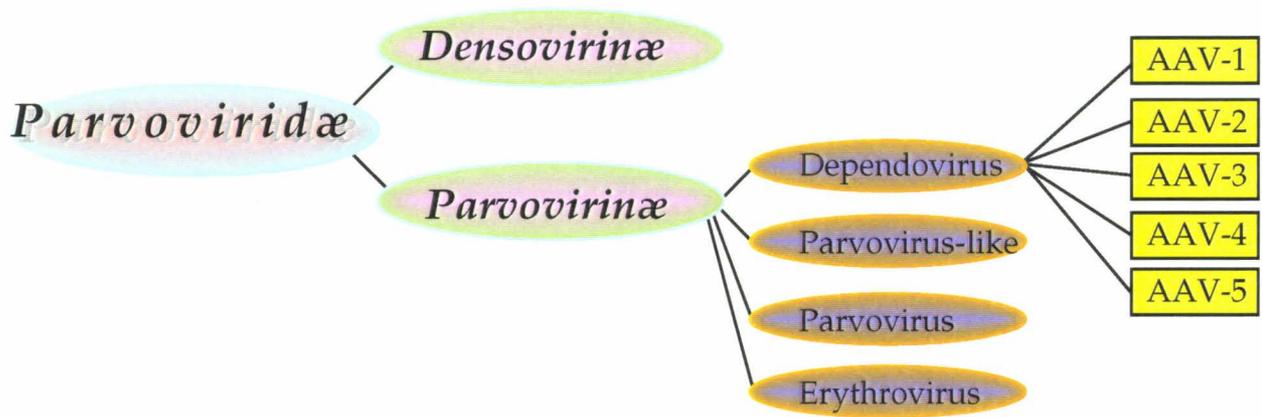


Fig. 1: Taxonomie des parvoviridæ, d'après le 6th report de l'ICTV, 1995

## I/ INTRODUCTION ET PROPRIETES GENERALES

Les parvovirus sont parmi les plus petits virus existant. Ils ont aussi une des structures les plus simples. Leur nom générique a été choisi à partir du mot latin *parvus*, qui signifie « petit ».

Le virion est non-enveloppé, icosaédrique, d'un diamètre de 20 à 26 nm. Il encapside un génome d'environ 5 kb formé d'ADN simple brin. Cette capside est constituée de 3 protéines différentes.

Ces virions possèdent une résistance exceptionnelle à la température, aux pH extrêmes, aux solvants organiques, ainsi qu'aux enzymes protéolytiques (Siegl, 1984), au point que deux d'entre eux, les parvovirus porcins et bovins PPV et BPV (Brauniger *et al.*, 1994; Lund *et al.*, 1996) ont été proposés comme modèle pour la validation de l'effet de procédures virucides.

La famille des *Parvoviridae* se décline gentiment en 2 sous-familles, *Densovirinae* et *Parvovirinae*. Cette dernière à son tour se subdivise en 5 genres (voir figure 1), dont seul le genre Dépendovirus nous intéressera. Les Dépendovirus, ou AAV (pour Adeno-Associated-Virus), qui se répliquent en présence d'un virus aidant (notamment vaccine, herpes, ou adénovirus) dans la majorité des cas (il existe des exceptions) et dont le génome s'intègre dans celui de la cellule hôte en un site spécifique.

Si le groupe d'études des parvovirus du comité international de la taxonomie des virus (ICTV) a accepté "Dependovirus" comme nom de genre, AAV reste toutefois plus usité et c'est le terme que nous utiliserons le plus souvent au long de cet écrit.

Leur carrière a commencé comme picodnavirus (Mayor & Melnick, 1966) jusqu'à ce que la taxonomie s'éclaircisse. La classification est parfois remise en question. En effet, sur la base de considérations moléculaires

telles que les sites de polyadénylation, les localisations des promoteurs, l'organisation des séquences génomiques terminales ou les mécanismes régulateurs de la réplication, certains auteurs proposent de rediviser ces genres (exemple: Berns, 1990). La dernière modification taxonomique a eu lieu en 1995 (6th Report, ICTV), pour aboutir au résumé présenté en figure 1.

Les premiers isollements sont, comme c'est souvent le cas, le fruit du hasard. Ainsi, les AAV ont été isolés à partir de stocks d'Adénovirus qu'ils contaminaient (Hoggan *et al.*, 1966; Melnick *et al.*, 1965).

La majorité des isolats proviennent de Mammifères. Les Parvovirus (ou autonomes) possèdent une spécificité d'hôte raisonnablement restreinte. Raisonnablement, car il existe des exceptions. Si, chez les autonomes le "Minute Virus of Mice" (MVM) est bien connu pour infecter la souris, ou H-1, le rat, les virus "Canine Parvovirus" (CPV) et "Mink Enteritis Virus" (MEV) —ce dernier infecte le vison— sont des variants du "Feline Parvovirus" (FPV).

Chez les AAV (il y en a plusieurs), la spécificité d'hôte est plus qu'à géométrie variable. AAV-2, AAV-3 et AAV-5 sont connus pour être des virus humains, et AAV-1 et AAV-4 des virus simiens (quoique AAV-1 entre aussi en compétition pour le rôle de virus murin).

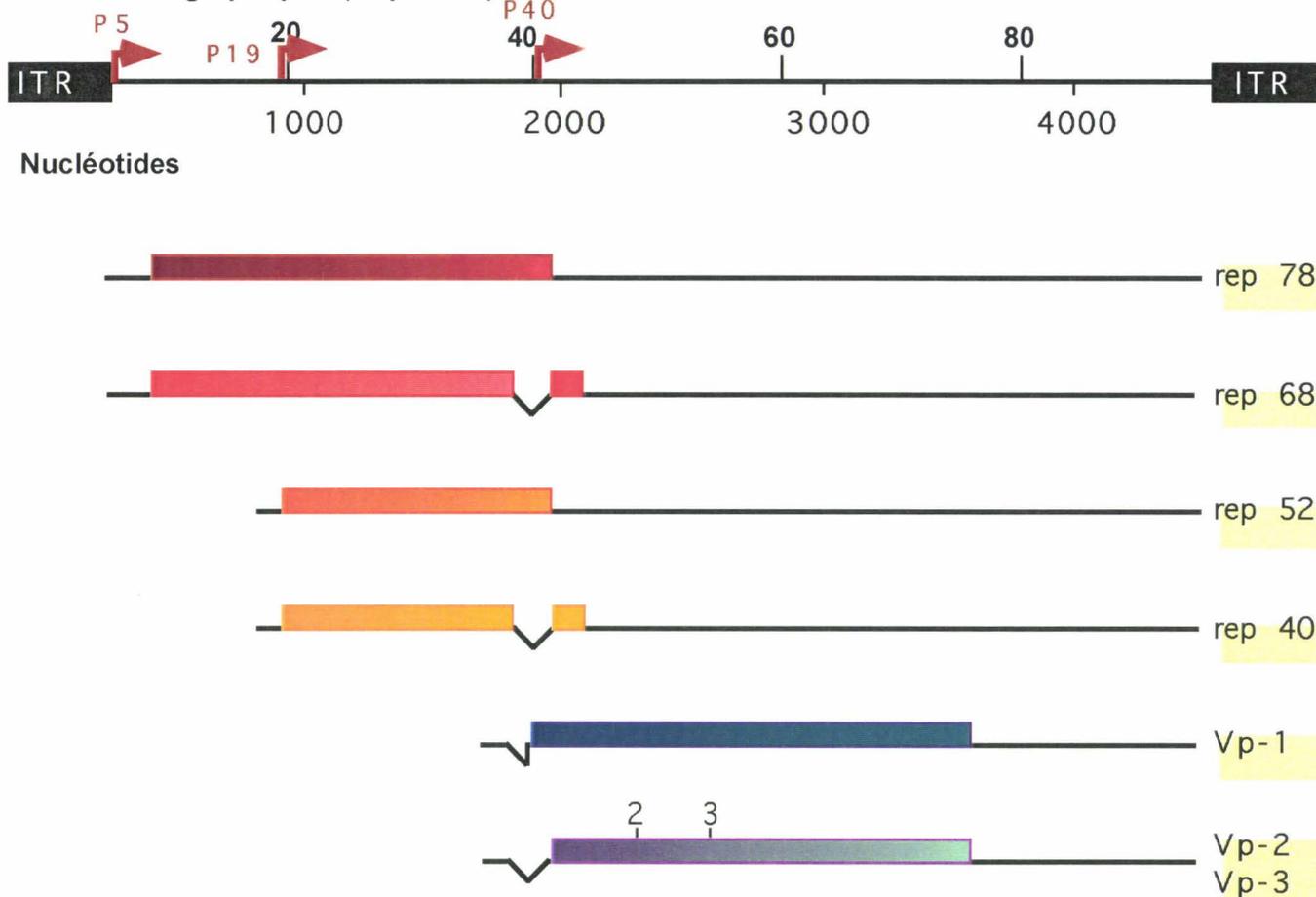
Il n'en reste pas moins que les travaux réalisés toutes thématiques confondues, montrent que souvent les mêmes virus semblent capables d'infecter *in vitro* presque tous les types cellulaires, comme *in vivo* un spectre large de mammifères, des hamsters à l'Homme. Il existe même des AAV aviaires (AAAV).

L'idée prévalait qu'il était même possible de faire « pousser » des AAV dans n'importe quel type cellulaire de mammifère pour peu qu'on ajoute le bon virus « aidant », spécifique de l'hôte concerné (Carter & Laughlin, 1984).

Les Dependovirus manifestent des propriétés oncosuppressives décrites depuis longtemps (pour revue, Rommelaere & Tattersall, 1990; Schlehofer, 1994). Ils sont capables d'interférer *in vitro* comme *in vivo* avec la

transformation cellulaire et le développement de tumeurs induites par des virus oncogènes, des carcinogènes chimiques, ou encore par rayonnements. Tout ces éléments seront développés au cours de cet écrit plus en détail.

## Unités cartographiques (Map Units)



### Fig. 2:

Organisation génomique d'AAV.

Le promoteur P5 initie un transcrit qui donne Rep 78 (sans épissage) et Rep 68 (avec)

Le promoteur P19 initie un transcrit qui donne Rep 52 (sans épissage) et Rep 40 (avec). Ces deux derniers produits sont en phase avec le précédent transcrit.

P40 initie un transcrit. VP-1 résulte d'un épissage alternatif, VP-2 utilise les mêmes sites d'épissage que les rep 68 et 40 et est initiée sur un ACG. VP-3 est initiée sur un AUG, tout en partageant les caractéristiques de VP-2.

D'après Linden et Berns, 1994 et Hermonat, 1997.

## II/ ORGANISATION GENOMIQUE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

### II.A ORGANISATION GÉNOMIQUE

La totalité des génomes des AAV de type 2, 3 et 4 a été séquencée. La séquence d'AAV-3 étant récente (Muramatsu *et al.*, 1996), celle d'AAV-4 très récente (Chiorini *et al.*, 1997), la plupart des travaux réalisés sur la génétique du virus reposent de façon très majoritaire sur AAV-2.

Le génome fait 4680 nucléotides (Srivastava *et al.*, 1983). Les particules virales apparaissent naturellement avec deux densités en CsCl: 1,45 et 1,41 g/cm<sup>3</sup>. La multiplication virale produit aussi des particules de 1,35 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>, défectives. Ces particules interfèrent avec la réplication des particules entières (Laughlin *et al.*, 1979).

La séquence d'AAV-2 (et des AAV en général) présente 2 phases ouvertes de lecture occupant chacune une moitié environ du génome (Figure 2).

Les extrémités de ce génome sont des structures palindromiques symétriques pourvues d'un arrangement spatial particulier qui prend la forme d'une structure en T. Cette conformation particulière que revêtent les ITR (pour Inverted Terminal Repeats) est capitale dans la réplication du virus, nous allons y revenir.

AAV encapside indifféremment le brin plus ou le brin moins. La purification d'ADN viral produit donc des homoduplex tout à fait semblables à n'importe quelle molécule double brin (Berns & Adler, 1972; Berns *et al.*, 1979; Berns & Rose, 1970; Mayor *et al.*, 1969; Rose *et al.*, 1969).

On place, par convention, l'extrémité 3' à gauche (on considère le brin moins).

La moitié droite (5') du génome contient la phase de lecture permettant la synthèse des protéines de structure du virus. Ces protéines ont été baptisées VP-1, VP-2, et VP-3. Les ARN correspondant à ces protéines sont transcrits à partir d'une séquence présentant des recouvrements. On retrouve donc ces recouvrements dans la séquence des acides aminés de VP-1/2/3 (voir le chapitre consacré aux protéines de capsid).

VP2-3 d'une part, et VP1 d'autre part, sont issues de deux ARN provenant du même transcrit, un épissage alternatif déterminant l'ARN codant.

Une initiation atypique, laquelle a lieu sur un codon ACG, (Becerra *et al.*, 1988; Cassinotti *et al.*, 1988; Muralidhar *et al.*, 1994; Trempe & Carter, 1988) permet la synthèse de VP-2. Le même ARN initié sur un AUG permet la synthèse de VP-3.

La partie gauche est responsable de la synthèse de quatre protéines non structurales, multi-fonctionnelles: Rep 78/68/52/40. Ces protéines tiennent leur nom à la fois de l'importance de leur rôle dans la réplication virale, et de leur masse en kiloDaltons. Ce sont les équivalents chez AAV des gènes « immédiats précoces », ce qui signifie qu'ils sont transcrits avant que l'ADN viral ne soit répliqué.

La synthèse de ces protéines est sous le contrôle de deux promoteurs P5 et P19, dont le nom provient de leur position sur le génome (respectivement 5 et 19 unités cartographiques). La synthèse de ces protéines est autorégulée grâce à la présence, entre autres, de séquences en *cis* qu'elles reconnaissent (étant elles-mêmes transactivatrices ou trans-régulatrices négatives, en fonctions de situations biologiques).

Nous détaillerons ces éléments dans les chapitres relatifs aux protéines virales, à la défektivité et à la réplication.

Nous allons maintenant nous arrêter un moment sur les ITR...



## II.B EXTREMITES OU ITR

Toutes les polymérasés connues nécessitent pour leur activité l'existence d'amorces quelles qu'elles soient. De plus les matrices de ces polymérasés sont des ADN double brins. L'entité biologique dont le génome est simple brin doit donc développer un système adapté.

Les ITR sont au cœur des fonctions virales (figure 3). Ils sont impliqués dans:

- la réplication pour laquelle ils sont requis en *cis* (Samulski *et al.*, 1983),
- l'intégration, (et donc, de tous les processus visant à user des AAV comme vecteurs pour le « transfert de gènes », pour revue, Berns & Giraud, 1996).
- la régulation de l'expression et des fonctions virales, car ils portent des motifs de reconnaissance des protéines se liant à l'ADN (dont les protéines Rep).

Ce chapitre est donc lié aux chapitres relatifs à la réplication, au transfert de gènes et à l'intégration.

Les ITR sont des structures symétriques palindromiques de 145 bases, dont 125 sont capables de se replier sur elles-mêmes en formant des structures secondaires très résistantes (voir figure 3). Ces extrémités sont composées de plusieurs séquences répétées et inversées (symétriques) nommées A(A'), B(B'), C(C').

Ces ITR ont la faculté de s'orienter selon deux configurations dénommées *flip* et *flop* (voir figure 3). Elles diffèrent par une inversion des 125 derniers nucléotides (Spear *et al.*, 1977), qui laissait supposer un rôle dans la réplication, selon la théorie développée par Cavalier-Smith

(Cavalier-Smith, 1974). C'est le processus répliatif qui est à l'origine de cette double configuration (voir répliation).

Lusby montre que ces orientations se présentent avec une égale distribution (Lusby *et al.*, 1980), et indépendamment l'une de l'autre (Lusby *et al.*, 1981).

L'étude de la répliation montre que l'une des extrémités est dispensable pour peu que l'autre soit intacte. Les virions qui en résultent voient alors leur extrémité manquante régénérée (Samulski *et al.*, 1983).

L'explication réside dans la façon dont s'opère la répliation virale (voir donc le chapitre concerné pour plus de précisions).

Les fonctions de ITR résident autant dans leur conformation que dans leur structure primaire.

Une délétion de 11 bases dans les extrémités obère toute répliation. Le remplacement de ces 11 bases par d'autres séquences symétriques (donc pouvant former un palindrome —ou plusieurs) restaure les fonctions répliatives (Bohenzky *et al.*, 1988; Lefebvre *et al.*, 1984).

La cinétique de l'apparition de formes répliatives d'un virus dont on a substitué les palindromes par d'autres séquences symétriques n'est pas distinguable de celle d'un AAV sauvage. Si les séquences de substitutions sont dissymétriques, il n'y a pas de répliation (Bohenzky *et al.*, 1988).

Certaines propriétés font beaucoup plus appel à la structure primaire, et forcément toutes celles qui mettent en jeu des reconnaissances de sites.

Certaines protéines, dont Rep 78 et 68 se lient aux palindromes, en reconnaissant aussi bien la structure secondaire que la structure primaire.

Les ITR contiennent plusieurs sites capitaux dans la biologie du virus:

- en 125 (en nucléotides), un site de résolution par les protéines Rep, appelé *trs* pour « terminal resolution site ». C'est sur ce site que les Rep, pourvues d'activité hélicase et endonucléase, clivent l'ADN sur un brin (nous traduirons arbitrairement le terme anglais « to nick » par « cliver ») séparant ainsi les différents génomes « fils » des duplex produits par le mécanisme répliatif;

- un trimère (GAGC)<sub>3</sub>, (ou (GCTC)<sub>3</sub> suivant le sens considéré) impliqué dans la liaison des protéine Rep 78 et Rep 68 avec l'ADN viral (McCarty *et al.*, 1994a; Ryan *et al.*, 1996). Ce site (Bishop *et al.*, 1996) est impliqué dans la réplication virale (voir chapitre sur la réplication) et est reconnu avec une forte affinité. Il est appelé RBS pour **R**ep **B**inding **S**ite ou RRS pour Rep Recognition Sequence ou encore RRE pour Rep Responsive Element (nous choisirons RBS). Il correspond au trimère GAGC, augmenté de 3 à 4 bases à gauche et à droite du site pour un maximum d'efficacité de la liaison (Chiorini *et al.*, 1994b);

- un autre site de moindre affinité, spécifiquement reconnu par les Rep, se trouve au sommet CTTTG du « T » (palindromes B et C) (Ryan *et al.*, 1996);

- une séquence appelée séquence D non impliquée dans la formation de structures secondaires (Lusby *et al.*, 1980). Cette séquence contient 20 nucléotides, dont 10 nécessaires (nucléotides 125 à 135) à la réplication et au passage d'une forme provirale intégrée et latente à une réplication efficace productrice de virions (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995). Elle n'est pas réparée en cas de mutation ou de délétion, comme le sont les ITR.

Toutefois, ces derniers auteurs notent en contradiction avec une partie des travaux précédents qu'en cas de délétion de la séquence D et des deux *trs*, il était encore possible d'obtenir une réactivation (pour « rescue ») efficace et une réplication. Ils suggèrent que cette séquence favoriserait les interactions protéines-protéines, au niveau du RBS, que requièrent certaines fonctions virales.

Récemment Xiao et ses collaborateurs ont montré qu'un seul ITR, flanqué des séquences RBS, *trs* et D était suffisant pour obtenir réplication, intégration, réactivation et production de virions infectieux, pour peu que soient apportés en *trans* les protéines virales (Xiao *et al.*, 1997). Ils définissent ainsi un « virus minimum » d'une taille de 165 bases.

L'idée d'un virus minimum dont on peut assurer en *trans* les fonctions, qui reste infectieux, encapsidable, capable de s'intégrer et réactivable est intéressante, et constitue un outil précieux pour le transfert de gènes.

Cette même idée, pensons-nous, mérite d'être étudiée à la lumière d'une autre propriété des ITR.

Sans empiéter plus que nécessaire sur le chapitre « oncosuppression-embryosuppression » auquel nous renvoyons le lecteur, l'injection d'un fragment de l'ADN d'AAV contenant un ITR et le promoteur P5 suffit à bloquer un embryon au stade morula (Botquin *et al.*, 1994).

C'est une notion que l'on doit considérer si l'on s'attend à faire du transfert de gènes avec un vecteur qui contient ces ITR, justement parce que les ITR garantissent la possible intégration du vecteur.

## II.C. PROTEINES DE CAPSIDE

On trouve en général la même organisation des protéines de structure chez les parvovirus autonomes ou pas. Il y a trois protéines de capsidie différentes appelées VP-1/2/3.

Chez AAV, ces protéines sont appelées A, B et C ou VP1/2/3, en fonction des auteurs.

Dans un souci de clarté, nous nous réfèrerons à ces protéines selon les appellations suivantes VP-1, VP-2 et VP-3.

Les gènes codant ces protéines sont sous contrôle du promoteur P40. Leur poids moléculaire est respectivement de 90, 72 et 60 kDa.

Toutes ces protéines proviennent d'une seule phase de lecture ouverte. Elles partagent donc un certain nombre de propriétés aussi bien antigéniques que biochimiques dûes au recouvrement des polypeptides (McPherson & Rose, 1983).

Une durée minimum de 11 heures est requise pour l'apparition de ces polypeptides dans le noyau de la cellule infectée (Johnson *et al.*, 1977).

La proportion des trois classes de protéines n'est pas équimolaire. La répartition en serait 20:1:1 (VP-3:VP-2:VP-1) (ou de 10:1:1, en fonction des auteurs), aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Becerra *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1971; Rose *et al.*, 1971).

La production des constituants et l'assemblage des capsides sont des événements qui sont indépendants de la réplication (Myers *et al.*, 1980). Les protéines synthétisées sont très vite assemblées en particules vides qui seront utilisées ensuite à la production de virions matures (résumé en figure 4).

La transcription puis la traduction s'effectue exclusivement à partir du brin de polarité négative (Rose *et al.*, 1971), les différentes protéines virales étant produites à partir de deux ARN messagers provenant d'un ARN primaire épissé alternativement (Marcus *et al.*, 1981).

Cet ARN originel est d'une taille de 2,6 kb. A lui seul, il ne permet qu'une faible synthèse des protéines virales de capsides (Becerra *et al.*, 1988). Par épissage sont produit deux ARN différents de 2,3 kb (les sites accepteurs d'épissage ne varient que de 27 nucléotides).

Ce qui est toutefois surprenant, c'est que chacun des ARN, épissé ou non, peut théoriquement spécifier les trois protéines (Janik *et al.*, 1984). En pratique, le 2,3 kb<sub>VP-1</sub> (ou le 2,6 kb) permet la synthèse de la protéine la plus grosse (90 kDa). Les deux autres proviennent de l'autre ARN, soit le 2,3 kb<sub>VP-2/3</sub>.

Pour ce dernier, une initiation différente, soit en 2615 sur un ACG (VP-2) soit sur un AUG en 2810 (VP-3; Becerra, 1985 #287), décide de la protéine synthétisée. Ceci constitue en soit une exception intéressante, car le nombre des initiations sur un codon ACG, quoique décrit ailleurs, reste rare (Hahn *et al.*, 1988; Peabody *et al.*, 1987).

L'initiation de VP-2 sur un codon ACG pourrait être responsable de la différence de répartition des protéines de capsides.

A l'appui de cette idée, l'expérience suivante: le remplacement de ce codon ACG par un codon AUG augmente la synthèse de la protéine VP-2 tout en abolissant celle de VP-3 (Muralidhar *et al.*, 1994).

L'autre raison est exposée ci-dessous et a trait à la théorie de « l'initiation par exploration ».

L'initiation des protéines de capsides semble présenter une confirmation intéressante de cette théorie dans les cellules eucaryotes: la sous-unité 40S ribosomale « explore » l'extrémité 5' de l'ARN messager à la recherche du premier AUG.

Le modèle prévoit que cette sous-unité ribosomale puisse très bien ignorer un AUG en position suboptimale, et initier la synthèse sur un autre codon en aval du premier (Kozak, 1989), ce à cause de la présence de cistrons en amont du premier AUG qui peuvent avoir un effet inhibiteur.

Le ribosome peut réinitier une synthèse après terminaison de l'initiation sur le premier AUG sur un autre cistron en aval. Or les transcrits des promoteurs P5 et P19 contiennent toute la séquence de P40, et

synthétisent (peu) les protéines VP-1, VP-2 et VP-3 (Wong & Sebring, données non publiées, cités dans Becerra, 1988).

Il reste que cette initiation est peu efficace (mais possible), comme est peu efficace du reste l'initiation à partir d'ARN produit sous la direction de P40, non épissé. Pas nulle, mais peu efficace. Les mêmes auteurs montrent que des délétions des cistrons proximaux de P40 (avec 6 AUG différents) augmentent considérablement, *in vitro*, la synthèse des protéines de capsid.

Pour confirmer et résumer ce qui est écrit plus haut, des deux ARN de 2,3 kb produits après épissage, l'un permet la synthèse de VP-2 et VP-3 (voir plus haut) et l'autre permet la synthèse de la protéine la plus grosse (VP-1) à partir d'une initiation au nucléotide 2203 (Becerra *et al.*, 1988). L'ARN non épissé de 2,6 kb ne permet la synthèse que d'une protéine de 10 kDa, ce qui est compatible avec le modèle évoqué ci-dessus.

Ces deux théories ne sont d'ailleurs pas forcément contradictoires. On peut avoir conjointement ignorance d'AUG bien placés pour cause de cistrons proches, initiation faible sur le codon ACG, et reprise immédiate en fin de traduction par la même sous unité ribosomale d'une nouvelle traduction sur l'AUG suivant le mieux placé, qui permet la synthèse de VP-3, et de façon bien plus efficace en l'occurrence.

Les trois espèces protéiques présentent comme on l'a dit des recouvrements de leur séquence d'acides et toutes se terminent sur un codon TAA en 4322 (Green & Roeder, 1980a).

Au début des années 90, les rôles et agencement des protéines de capsides commencent à se dessiner, quand Ruffing et ses collaborateurs réussissent à produire en cellules d'insectes les protéines virales par le biais de baculovirus. Ils obtiennent la formation de particules ressemblant aux particules virales en faisant exprimer soit VP1 et VP2, soit VP2 et VP3, soit les trois ensemble (Ruffing *et al.*, 1992).

Il semble que VP2 soit capitale pour l'assemblage. L'expression individuelle de chacune des protéines dans des cellules HeLa montre que VP1/2 sont transportées précocement dans le noyau puis dans le nucléole

(Ruffing *et al.*, 1992; Wistuba *et al.*, 1997) où elles sont alors co-localisées avec le site de réplication de l'ADN viral et les protéines Rep.

VP3 est distribuée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Sa petite taille peut laisser supposer qu'elle passe les pores nucléaires (Ruffing *et al.*, 1992).

La co-expression de ces protéines avec les protéines Rep montre une localisation nucléaire sous forme d'agrégats nucléoplasmiques, en présence de l'ADN d'AAV (Wistuba *et al.*, 1997).

Seules VP1/2 sont porteuses de signaux de localisation nucléaire. La « nucléarisation » de VP3 passe par la formation d'un complexe avec les deux autres protéines (Ruffing *et al.*, 1992).

Ceci confirme en partie les études plus anciennes sur l'assemblage des capsides.

Cet assemblage se passe en deux temps. D'abord les capsides vides sont formées —on considère généralement que la formation de capsides vides est un prérequis à l'encapsidation (Myers & Carter, 1981). Ensuite les ADN simple brin y sont « empaquetés » (Myers *et al.*, 1980) avec l'aide d'une protéine Rep, liée à l'ADN de façon covalente, qui est elle-même encapsidée (Kube *et al.*, 1997).

VP2 et VP3 sont suffisantes pour obtenir cette capside vide et empaqueter l'ADN proviral (Muralidhar *et al.*, 1994). Les protéines Rep (Rep52 et/ou Rep 40) sont aussi requises pour l'encapsidation (Chejanovsky & Carter, 1989). Le transport des capsides des agrégats nucléolaires vers le cytoplasme est dépendant de la présence des Rep78 et 68 selon un mécanisme non connu (Wistuba *et al.*, 1997). VP1 serait impliquée dans l'« aspect antigénique » de la capside, et dans la capacité d'infection des capsides (Smuda & Carter, 1991).

La capside contient en plus de l'ADN viral, une (ou des) protéine(s) Rep biologiquement active(s), plus probablement Rep 78 (Kube *et al.*, 1997). Cet élément n'est pas sans répercussion au niveau de l'entrée du virus dans la cellule (interaction avec la membrane cellulaire, pour l'intégration et l'effet régulateur des Rep, voir les chapitres concernés).

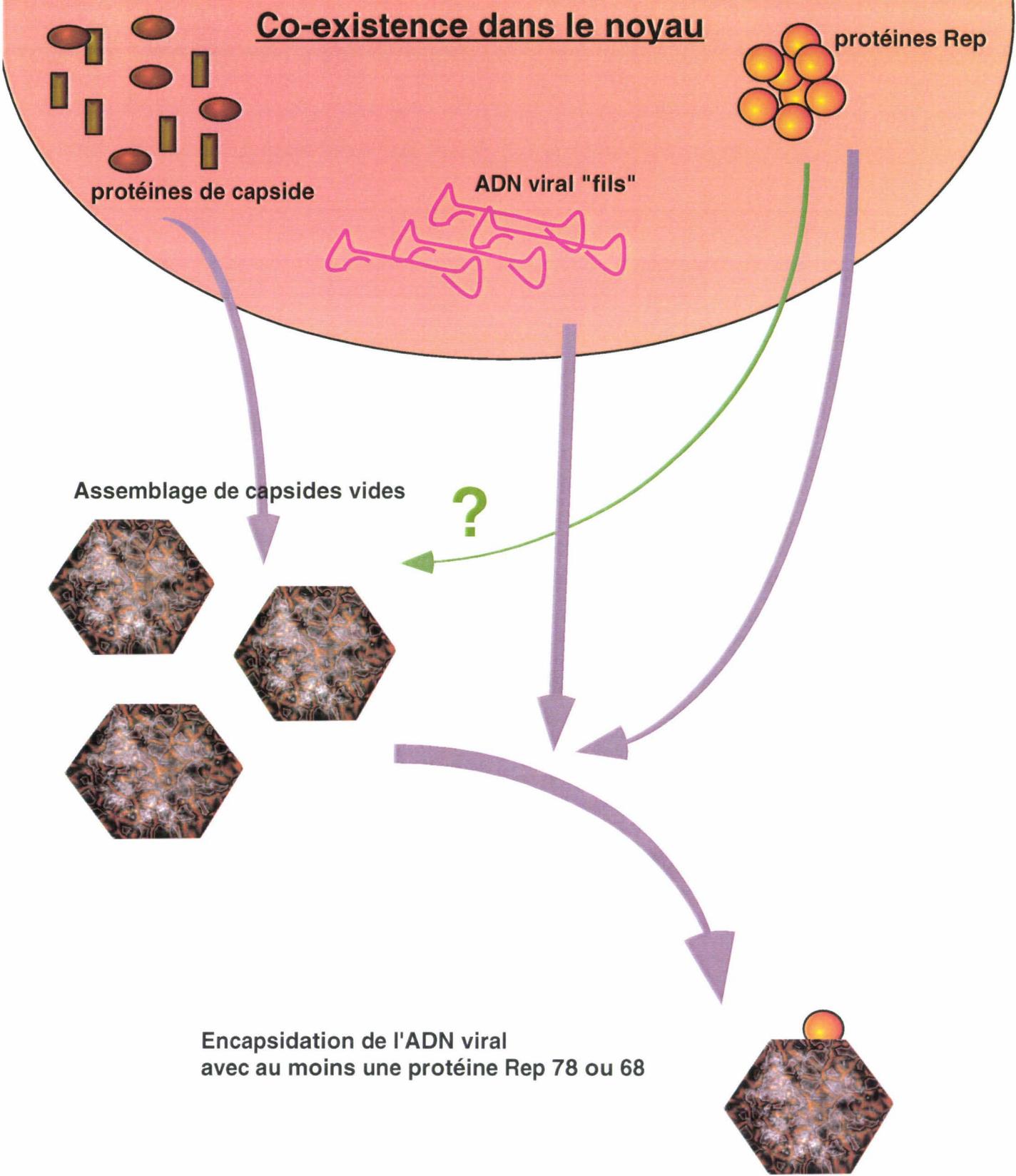


Fig. 4:  
Encapsidation de l'ADN viral et  
production de virions infectieux

Ces données sont résumées sur la figure 4.

La connaissance que nous avons des voies d'entrée du virus dans la cellule est encore fragmentaire.

Mizukami a identifié une protéine N-glycosylée de 150 kDa. Cette protéine reste à identifier, mais est régénérée à la surface cellulaire en cas de traitement par la trypsine. Son absence semble corrélée avec la non permissivité à l'infection (Mizukami *et al.*, 1996).

Summerford propose l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  et montre qu'une interaction existe, mais ne suffit pas à rendre compte de l'infection. Le même auteur fait état d'un rôle des héparanes-sulfate de la membrane cellulaire. Un traitement anti-héparine ou des mutants dépourvus d'héparanes-sulfate membranaires semblent n'être pas infectables (Summerford & Samulski, 1997).

Pour le moment, la connaissance que nous avons de ces interactions entre capsid et protéoglycanes membranaires reste très limitée.

Il est peut-être à regretter que les récents travaux sur l'utilisation d'AAV pour le transfert de gènes n'aient pas suscité plus de curiosité sur les voies d'entrée du virus, et les récepteurs impliqués.

## II.D PROTEINES NON STRUCTURALES Rep

### 1) GENERALITES

Nous allons nous pencher sur les propriétés des protéines Rep. Ces protéines sont autant des régulateurs d'expression, des enzymes de la réplication, que des acteurs de la latence du virus et de son intégration.

Elles sont ce qu'il y a de plus proche du produit d'un gène précoce chez AAV (Labow *et al.*, 1986; Trempe & Carter, 1988).

On identifie 4 protéines produites par la première phase ouverte de lecture (voir schéma de l'organisation génomique de AAV), dont les poids apparents sont respectivement 78, 68, 52 et 40 kDa (Mendelson *et al.*, 1986); le nom Rep provenant du rôle joué par ces protéines dans la réplication et est suivi de leur poids en kDa.

Ces protéines sont traduites à partir de quatre ARN de tailles respectives 4,2kb non épissé et 3,6 kb épissé (transcrits de P5), et 3,6 kb non épissé et 3,3 kb épissé (transcrit de P19) (Carter *et al.*, 1983; Green & Roeder, 1980a; Green & Roeder, 1980b; Laughlin *et al.*, 1979; Lusby & Berns, 1982; Marcus *et al.*, 1981; Mendelson *et al.*, 1986)

Rep 68 et Rep 40 ont donc des extrémité C-terminales différentes de leurs homologues Rep 78 et Rep 52, issues d'ARN non (Mendelson *et al.*, 1986; Trempe *et al.*, 1987)

Rep 78 et Rep 52 apparaissent concomitamment à la réplication et la présence de duplex, environ 10 à 12 heures après (Redemann *et al.*, 1989). Rep 68 et Rep 40, 2 heures plus tard. Rep 78 et Rep 52 sont plus abondantes. Leurs proportions respectent celles des différentes espèces d'ARN messagers qui les spécifient.

De très faibles niveaux de protéines Rep 78 sont détectables dès 4 heures post-infection. Ce fait est à rapprocher des propriétés régulatrices des dites protéines (voir dans ce chapitre).

Le pic de synthèse se trouve entre 14 et 24 heures, et les protéines sont stables pendant une quinzaine d'heures. Il existe enfin une autre forme de Rep 78 tardive dont la taille semble légèrement plus importante (Redemann *et al.*, 1989).

L'extraction et la purification des Rep montre que trois des quatre espèces (Rep 78/68/40) possèdent un « double », migrant légèrement moins en électrophorèse (Im & Muzyczka, 1992). Or, on a récemment montré que les quatre espèces de Rep sont phosphorylées sur le résidu sérine 225, sans que puissent être mises en évidence de phospho-thréonine ou de phospho-tyrosine (Collaco *et al.*, 1997).

Kleinschmidt avait déjà montré l'importance de ce résidu ser 225 dont la mutation (en gly) produisait un mutant incapable de synthèse d'ADN (Kleinschmidt *et al.*, 1995). La modification post-traductionnelle est un des modes courants de modification de l'action du produit d'un gène. Parmi ces modifications possibles, on trouve en meilleure place la phosphorylation. Il est probable que cette démonstration récente (Collaco *et al.*, 1997) se révélera porteuse en matière de « décryptage » de la régulation médiée par les Rep.

### Localisation

La localisation de ces protéines varie du cytoplasme au noyau, (Rep 78 et 68 dans le noyau, Rep 52 et 40 dans les compartiments cellulaires et nucléaires indifféremment) en fonction de l'espèce considérée.

Pendant la réplication, les Rep se situent dans le noyau (Leonard & Berns, 1994; Mendelson *et al.*, 1986). Ces protéines sont colocalisées dans un même compartiment intranucléaire sous la forme de foci de réplication (Hunter & Samulski, 1992). Ces foci sont localisés dans le nucléole. La coexpression des Rep et des protéines de capsid forme des agrégats nucléoplasmiques, en présence de l'ADN d'AAV (Wistuba *et al.*, 1997).

Très récemment, il vient d'être montré qu'une protéine Rep biologiquement active était encapsidée avec le génome viral (Kube *et al.*, 1997).

## 2) FONCTIONS

Sous ce vocable plutôt vague se cache de multiples rôles (Régulation des promoteurs homologues et hétérologues, réplication, résolution, intégration,...). Certaines fonctions impliquent une liaison à l'ADN, (et donc l'existence de sites de liaison raisonnablement spécifiques) ou des interactions protéine-protéine. Souvent les deux systèmes sont liés.

Les protéines Rep ne contiennent pas de régulateurs « classiques » de la transcription tels les « fermeture à leucine » ou « hélice-boucle-hélice » ou « hélice-coude-hélice ». Hörer a montré l'existence de domaines fixateurs de Zinc fonctionnels *in vitro*, semble-t-il non impliqués dans la régulation de promoteurs homologues (Hörer *et al.*, 1995). Nous ne savons pas en quoi ils sont utiles, s'ils le sont.

### Liaison à l'ADN

Seules les Rep 78/68 se lient de façon covalente aux extrémités du génome viral. Cette liaison est impliquée dans la résolution des extrémités, liées elles aussi de façon covalente pendant la réplication (Im & Muzyczka, 1990; Snyder *et al.*, 1990b). Elle est aussi engagée dans la régulation de l'expression de gènes et dans la maturation du virion.

Les sites de liaison sur l'ADN sont mieux connus et peuvent rendre compte au moins en partie des propriétés régulatrices, transactivatrices, trans-répressives, ou même de propriétés plus particulièrement liés à l'oncosuppression, l'induction de différenciation ou encore l'intégration observées (voir les chapitres concernés).

Il existe deux grandes « classes » de sites de liaison à l'ADN pour les Rep (voir fig. 3).

L'un, site de faible affinité, se trouve au niveau du sommet CTTTG (palindromes B et C) (Ryan *et al.*, 1996). Cette séquence, relativement linéaire, ne semble pas tolérer de mutation, et n'adopte pas de conformation secondaire (Chiorini *et al.*, 1994b). C'est néanmoins le sommet d'une « barre du T » formé par les ITR.

L'autre, site de forte affinité (le RBS) est constitué d'un trimère de GAGC, et des 3 à 4 bases à gauche et à droite du site pour un maximum d'efficacité de la liaison (Chiorini et al., 1994b; Ryan et al., 1996).

En contradiction avec d'autres auteurs, Chiorini montre que la structure secondaire en épingle à cheveux est dispensable, alors que Ryan avance son utilité comme site d'interaction secondaire Rep-ADN, permettant aux Rep de « savoir » qu'elles sont en présence d'un ADN en conformation « épingle à cheveux » et de cliver de façon préférentielle celui-ci (Chiorini et al., 1994b; Ryan et al., 1996).

Les protéines possèdent aussi un site fixateur de purine (ATPasique). Ce site est étroitement lié à la fonction endonucléasique site spécifique et brin spécifique des Rep.

Une mutation (convertissant la lysine 340 en histidine) aboutit à des effets plutôt intéressants: la synthèse des protéines Rep n'est plus régulée et ces dernières s'accumulent. Le mutant est incapable de se répliquer, et il inhibe en trans la réplication d'un virus sauvage (Chejanovsky & Carter, 1990).

L'étude de ces mutants montre que la Rep mutante se lie néanmoins aux ITR (nt 36-16) avec le coeur (GAGC)<sub>3</sub> de 33-22 et cette liaison n'engage pas l'extrémité C-terminale de la protéine (Hermonat *et al.*, 1984a; Owens *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1987; Tratschin *et al.*, 1984). Il semble bien que les protéines mutantes se lient aussi à l'origine de réplication d'AAV, sans manifester d'action (Owens *et al.*, 1991).

### Résolution

La résolution, (clivage de l'ADN sur un seul brin, par les protéines Rep) on l'a dit, est site-spécifique et brin-spécifique. Les protéines Rep 78/68 reconnaissent la polarité des brins engagés (Snyder *et al.*, 1993). Les ITR contiennent (voir le chapitre qui leur est consacré) un site de résolution appelé *trs* dont le motif est CCAA situé en 125. Ce site de reconnaissance implique une extension de 3 bases en 3' au delà du *trs*. De plus les protéines Rep reconnaissent aussi bien la structure secondaire que le site de liaison et le site de résolution.

La résolution requiert la présence de quelques composés d'origine cellulaire: l'ADN polymérase  $\delta$ , de l'ATP et des dNTPs. L'ajout de Rep 68 purifiée au cytosol extrait de HeLa suffit à la résolution.

Rep 68 est donc une endonucléase, et une hélicase (Im & Muzyczka, 1990; Im & Muzyczka, 1992; Snyder *et al.*, 1990b).

Les protéines se lient de façon covalente à l'ADN sur l'origine de réplication, en présence d'ATP (Ashktorab & Srivastava, 1989; Im & Muzyczka, 1989; Im & Muzyczka, 1990; Owens *et al.*, 1991). Cette liaison se fait sous la forme d'un hexamère de protéines (Smith *et al.*, 1997) qui effectue le clivage des intermédiaires de réplication (Im & Muzyczka, 1990; Snyder *et al.*, 1990b) *in vitro*.

L'introduction de défauts d'appariement à l'endroit du clivage montre que la résolution a néanmoins lieu, mais avec une efficacité amoindrie.

Un simple brin peut même être reconnu et résolu. Cette résolution ne requiert plus d'ATP pour avoir lieu, ce qui suggère que Rep 78/68 utilisent l'ATP pour la séparation des deux brins avant que de couper.

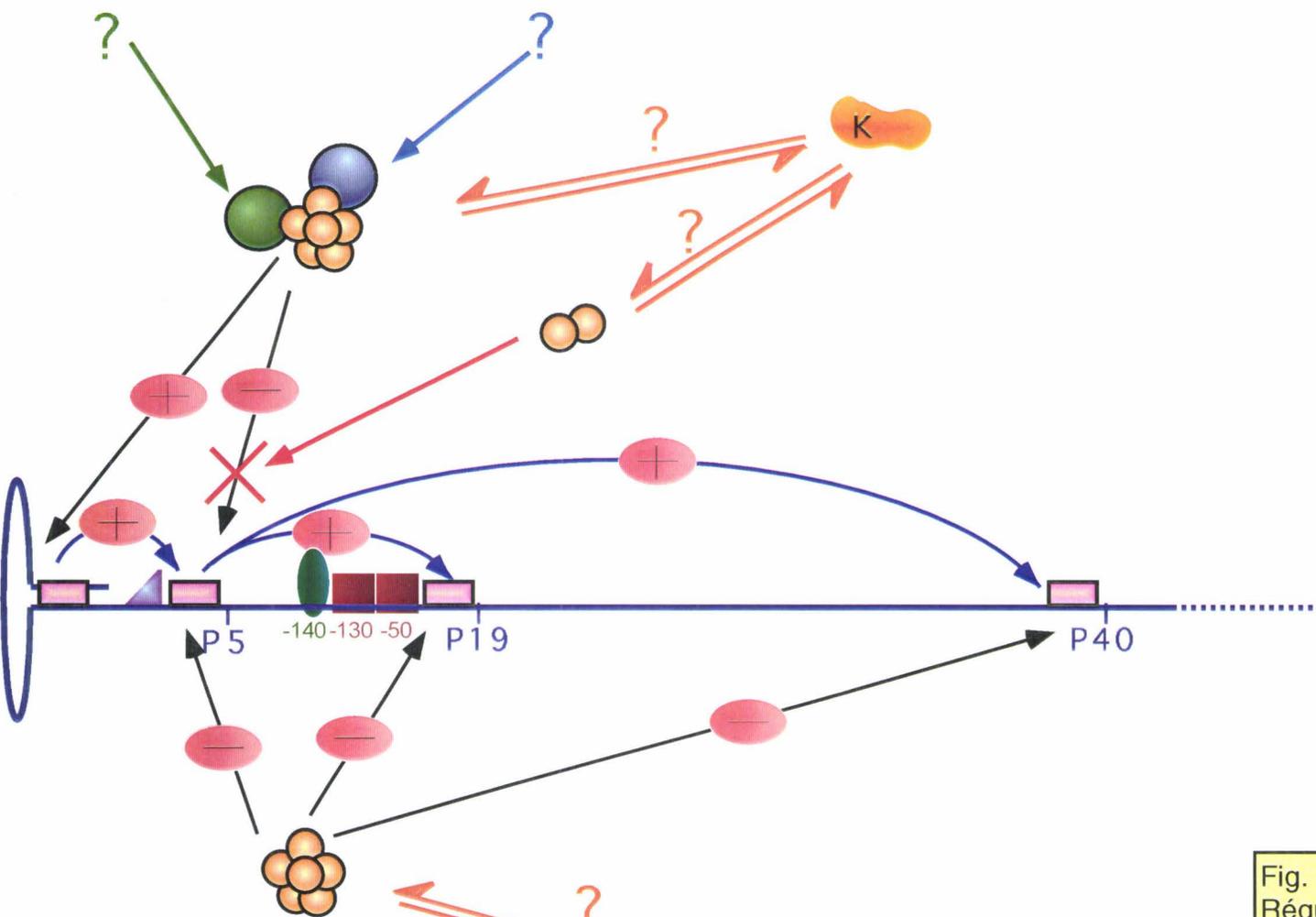
Après clivage, la protéine reste liée à l'ADN. Cette liaison engage un résidu tyrosine d'un côté et une thymidine de l'autre (Snyder *et al.*, 1990b). On sait depuis peu qu'elle est encapsidée et biologiquement active (Kube *et al.*, 1997).

On a récemment montré que les Rep interagissent directement avec les protéines HMG-1 (High Mobility Group type 1). Ces protéines stimulent l'activité endonucléasique des Rep (Costello *et al.*, 1997) et l'on subodore une facilitation de liaison avec l'ADN, une modification de la conformation de l'ADN, une modification allostérique, voire une promotion des multimères (un rôle de « chaperone »).

### Multimères

Rep semble nécessiter un complexe protéique d'un ordre élevé, c'est à dire un multimère, (Im & Muzyczka, 1989; Im & Muzyczka, 1990) pour agir. Ceci est notamment compatible avec l'existence de mutants transdominants négatifs (Owens *et al.*, 1991). Smith confirme cette hypothèse: les protéines Rep forment un hexamère en présence de séquences d'origine de

# Avec Virus Aidant



- RBS
- multimère de Rep 78/68/52/40
- Activateur viral (protéine, ARN...)
- Rep 52/40
- Protéine cellulaire (HMG1, sp1,?)
- Kinase
- élément SP-1
- Protéine inconnue de 34 kDa interagissant avec un élément CArG en position -140 à partir de P19.
- élément YY-1

# Sans Virus Aidant



Fig. 5: Régulation des promoteurs homologues par les protéines Rep. D'après Pereira et al., 1997.

réplication (Smith *et al.*, 1997). Seraient impliqués dans cette liaison les acides aminés 164 à 484.

### Régulation de promoteurs homologues

Ces protéines sont capables de réguler l'expression des autres promoteurs viraux:

- P40, qui dirige la synthèse des protéines de (Trempe & Carter, 1988),
- P5 et P19. Ils sont régulés positivement en présence de virus « aidant » et négativement en l'absence de ces derniers (Labow *et al.*, 1986).

Labow suppose que la cible de cette régulation négative se trouve dans les ITR car un hybride SV40/AAV, où le P5 est remplacé par les régions régulatrices et l'origine de répliation de SV-40 est, à sa grande surprise, indistinguable phénotypiquement d'AAV. Enlever les régions ITR libère la répliation de l'hybride (Labow *et al.*, 1986).

P5 est actif de façon constitutive dans des cellules HeLa, et les protéines Rep inhibent l'expression de P5 et P19, de façon dose-dépendante. En présence d'une infection adénovirale, l'activité des deux promoteurs n'est pas sensiblement modifiée. En présence de protéines Rep et d'adénovirus, l'expression est multipliée par 50. Les ITR pourraient contenir des « enhancers » (Beaton *et al.*, 1989).

De la même façon on peut quantifier l'inhibition exercée par les protéines Rep sur leurs promoteurs homologues. La production d'ARNm est augmentée d'un facteur 10 en présence de Rep 78/68 et d'un facteur 3 en présence de Rep 52/40 (Kyöstiö *et al.*, 1994).

Pereira et ses collaborateurs ont considérablement affiné l'explication mécanique de ces systèmes de régulation des promoteurs homologues. Ils montrent que ces régulations mettent en jeu des facteurs cellulaires comme SP1. Nous avons résumé leurs travaux sur la figure 5 (Pereira & Muzyczka, 1997b; Pereira & Muzyczka, 1997c).

La même protéine peut donc réguler positivement ou négativement l'activité d'un promoteur et l'expression d'un gène homologue, en fonction de la présence des produits d'un virus « aidant », ou de celle d'éléments cellulaires dont la nature et/ou la fonction restent encore incertaines.

### Régulation de promoteurs hétérologues

Les protéines Rep sont aussi capables de moduler l'activité de toute une gamme de promoteurs hétérologues.

On citera:

- les Long Terminal Repeat de HIV-1, virus dont sont régulés négativement tous les ARN, ainsi que la réplication (Antoni *et al.*, 1991; Batchu & Hermonat, 1995; Hörer *et al.*, 1995; Oelze *et al.*, 1994; Rittner *et al.*, 1992),

- la protéine 58K des adénovirus (et en général, les gènes de tous les virus " aidants ", supprimant la plupart du temps une partie de leurs fonctions. (Berns, 1990; Laughlin *et al.*, 1979; Ostrove *et al.*, 1981),

- les activateurs de SV-40 (Labow & Berns, 1988),

- l'URR (pour Upstream Regulatory Region) des HPV-16/18 (Hermonat, 1994b; Hörer *et al.*, 1995),

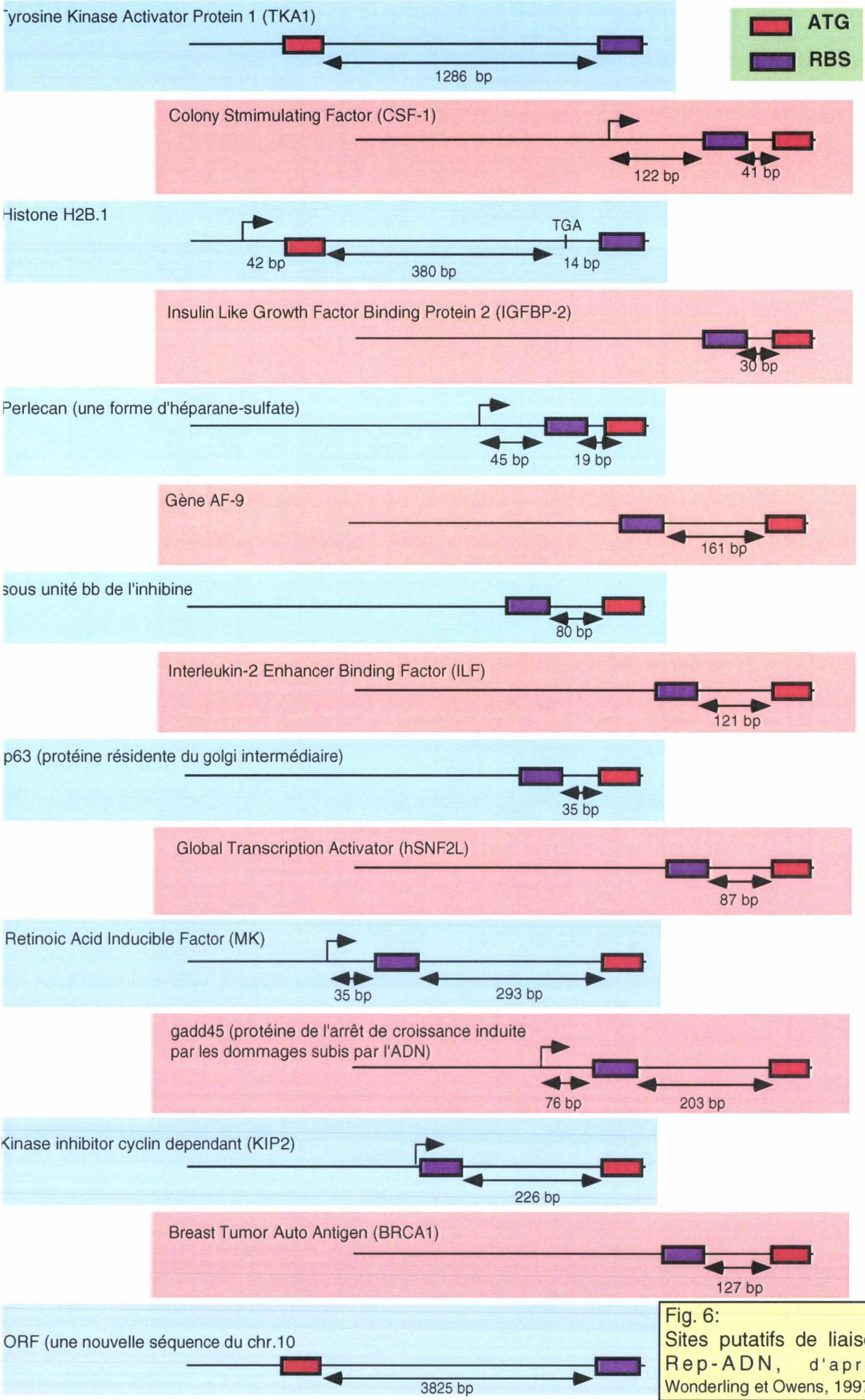
- l'expression des ARN que dirige le promoteur « major immediate early » d'HCMV, modulés positivement (Wonderling *et al.*, 1997b),

- certains gènes de la transduction du signal comme H-ras (par le biais de sites Sp1: (Hermonat, 1991), c-myc et c-myb, régulés négativement, c-fos, régulé positivement ou négativement en fonction des tests (Hermonat, 1994a; Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992) et enfin c-sis, régulé positivement (Wonderling & Owens, 1996).

Cette liste n'est certainement pas exhaustive... Mais on peut même supposer que ces nombreux phénomènes de régulation puissent être en jeu dans:

- l'inhibition de l'amplification génique (Bantel & zur, 1988; Bantel-Schaal & zur Hausen, 1988; Schlehofer *et al.*, 1986; Schlehofer *et al.*, 1983),

- l'inhibition de la tumorigénicité —un sujet sur lequel nous allons revenir—(Hermonat, 1989; Katz & Carter, 1986; Labow *et al.*, 1987).



**Fig. 6:**  
 Sites putatifs de liaison Rep-ADN, d'après Wonderling et Owens, 1997.

On retrouve un quasi-RBS dans le promoteur de c-H-ras ou il existe un dimère GAGC. Rep 78 et 68 sont capables de s'y lier, d'autant plus que ce promoteur présente à ce niveau une possible structure secondaire en épingle à cheveux (Batchu *et al.*, 1994).

Il existe un motif voisin dans les LTR de HIV qui pourrait rendre compte de l'inhibition de ce dernier virus par les protéines Rep. Ce motif, baptisé AHH<sub>H</sub>, (pour AAV-HIV Homology derived from HIV), est impliqué dans la régulation négative de l'expression basale du virus (Oelze *et al.*, 1994). On montre du reste que Rep 78 se lie aussi, en plus du AHH<sub>H</sub>, à un élément de la région TAR de HIV qui ne contient pas moins de 8 motifs GAGC (Batchu & Hermonat, 1995).

Wonderling et Owens ont récemment identifié un large éventail de promoteurs hétérologues putativement régulés par les protéines Rep sur la base de l'existence d'un RBS, d'une part, et d'autre part sur la vérification *in vitro* de l'existence de liaisons Rep-ADN (Wonderling & Owens, 1997a). Nous avons résumé leurs travaux sur la figure 6.

#### Motifs d'interaction avec les protéines sur l'ADN.

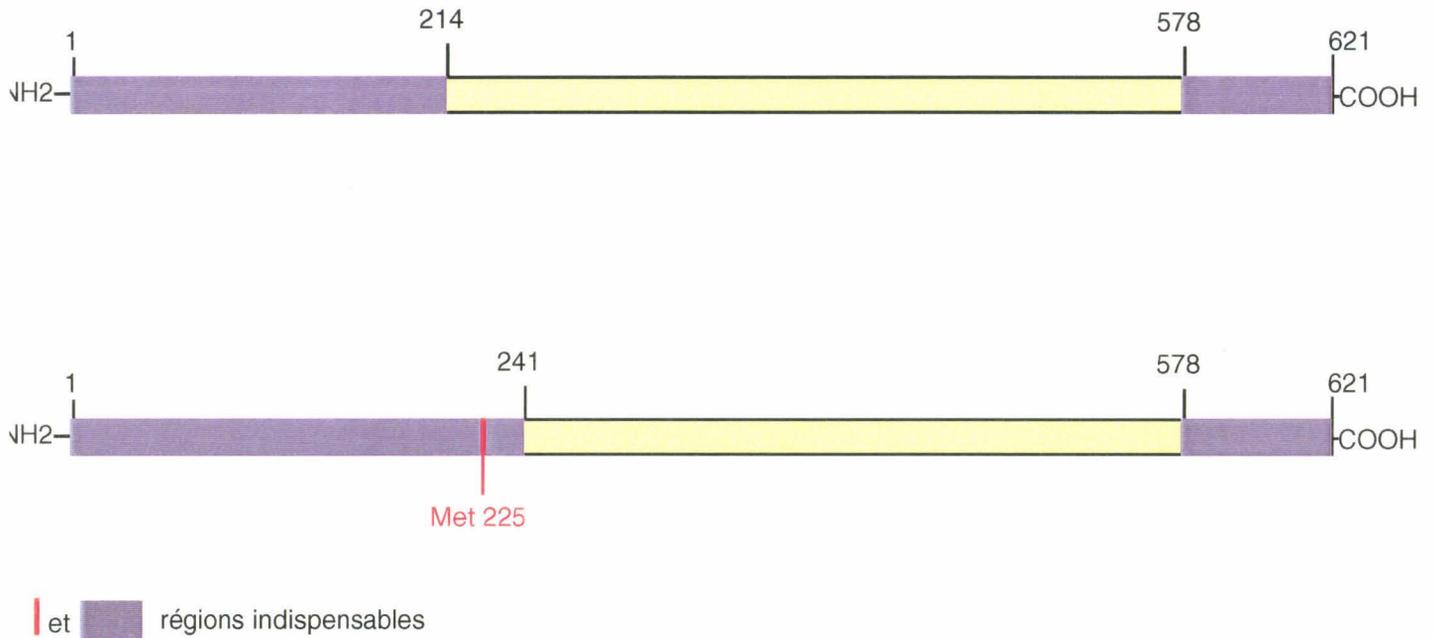
La délétion systématique 30 bases par 30 bases a permis à McCarthy de mettre en évidence plusieurs régions dont la présence semble nécessaire dans la régulation de l'expression des gènes contrôlés par P19 (McCarty *et al.*, 1991). La régulation en *trans* par les protéines Rep ne se fait pas si il y a délétion des nucléotides -33 à -4 (à partir de la boîte TATA du P40) mais aussi de -123 à -34.

De la même façon, aucune activité de P19 n'a pu être détectée en cas de délétion de la boîte TATA de -4 à -33 du promoteur P19. Il existe trois régions actives en *cis* associés à P19:

- 4 à -63, essentielles pour l'induction par les Rep de P19;
- 94 à -153, essentielle pour l'induction par les Rep de P19 et P40 (les 30 bases qui séparent ces deux régions non contigües sont dispensables);
- des séquences dans le P5 (nucléotides 191 à 320), nécessaires aussi à l'activation des P19 et P40 par les protéines Rep.

## REGIONS IMPLIQUÉES DANS LA LIAISON A L'ADN:

Sur tous les travaux publiés, ne figurent ici que les équipes ayant présentés des travaux d'où se dégagent un relatif consensus



## SITE ATPase

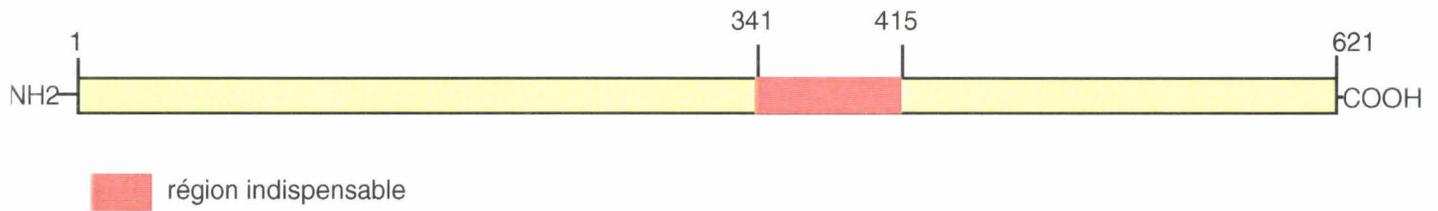


Fig. 7: Cartographie des fonctions des rep  
d'après McCarthy et al., 1992; Im et al., 1992; Owens et al., 1993

Le plus étonnant est que ces délétions peuvent être complétées en *trans* par un ajout d'IIR, ce qui laisse supposer que les RBS dans les IIR sont de grande affinité. Tous ces promoteurs sont interdépendants dans leur activité (McCarty *et al.*, 1991).

Il existe aussi un site de liaison pour les Rep dans P5, entre la séquence d'initiation YY1 et la boîte TATA. Ce site est composé de 4 monomères GAGC imparfaits (Kyöstiö *et al.*, 1995). La mutation de ce site réduit de 50% la capacité des Rep à inhiber la transcription à partir du P5.

On peut imaginer un mécanisme où les Rep pourraient se lier aussi bien aux protéines liant la boîte TATA (TBP) qu'au site YY1, changeant ainsi l'effet de la régulation (McCarty *et al.*, 1994a, 1994b).

La mutation dans la séquence du RBS d'une cytosine en guanine abolit la régulation négative (Kyöstiö *et al.*, 1995). D'après ce dernier auteur, YY1 et Rep interfèreraient l'un avec l'autre au niveau de P5.

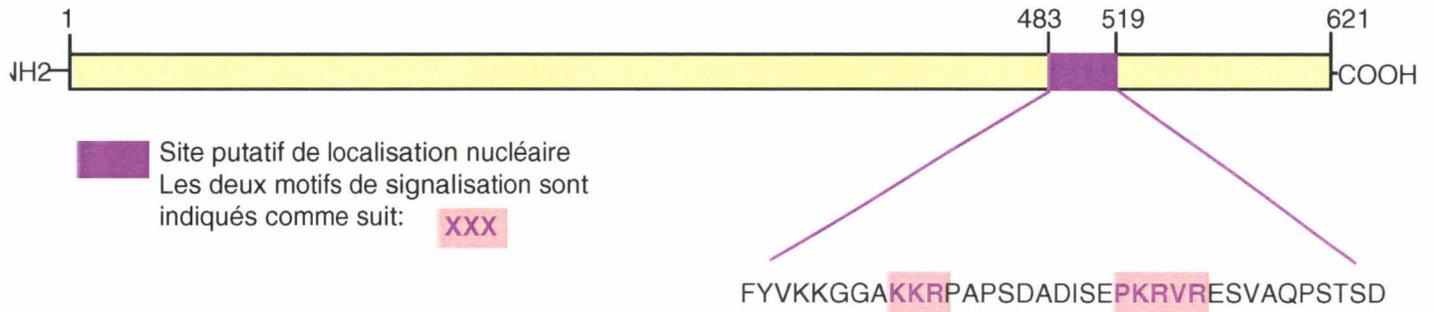
P19 possède aussi un site de liaison pour les protéines Rep, P40 en possède deux. Une découverte fortuite montre que pBR322 possède une séquence de 18 bases très homologue avec celle du palindrome A, suffisamment pour que Rep s'y lie (McCarty *et al.*, 1994b; McCarty *et al.*, 1994a).

L'auteur propose aussi un modèle selon lequel les Rep seraient liées en même temps par le biais d'un complexe protéique, à tous les sites à la fois (McCarty *et al.*, 1994a, 1994b), en effet, leurs travaux montrent que chaque monomère des multimères GAGC est un site de liaison pour une protéine Rep.

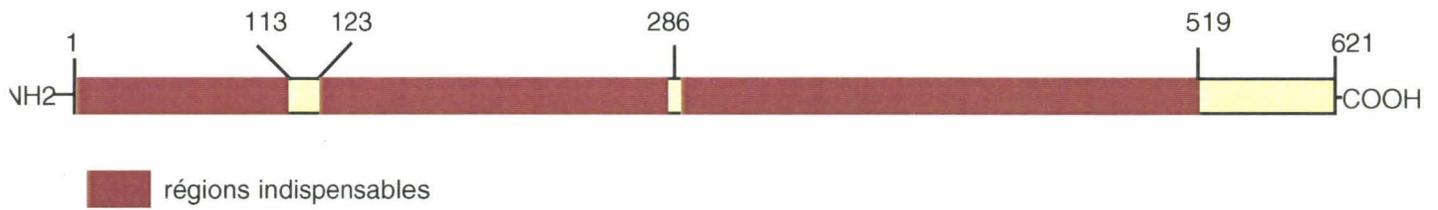
### Cartographie des fonctions des protéines

De nombreux travaux exposés ci-dessous ont tenté de « démonter » les Rep afin d'en tirer une cartographie des sites. Si certains sites semblent ne poser aucun problème (ATPase), les résultats sont controversés sur le site de liaison à l'ADN. La prudence est donc de mise. Nous avons résumé ce qui semble le plus « consensuel » sur la figure 7.

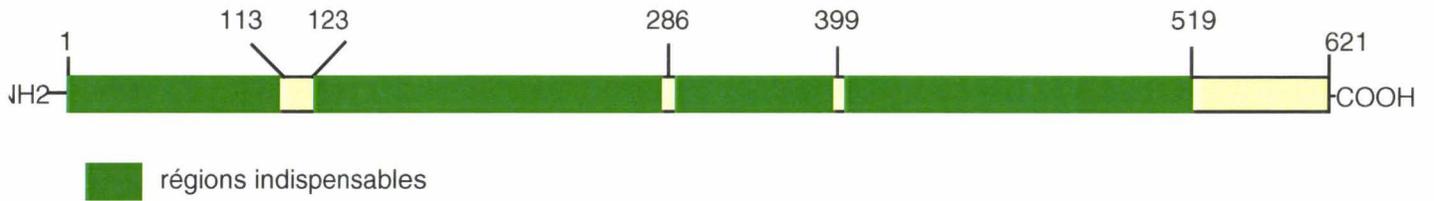
### LOCALISATION NUCLEAIRE:



### REGIONS IMPLIQUÉES DANS LA RÉPLICATION:



### REGIONS IMPLIQUÉES DANS LA TRANSACTIVATION DU P40:



### REGIONS IMPLIQUÉES DANS LA SUPPRESSION DE LA TRANSFORMATION PAR ras ET E1a:

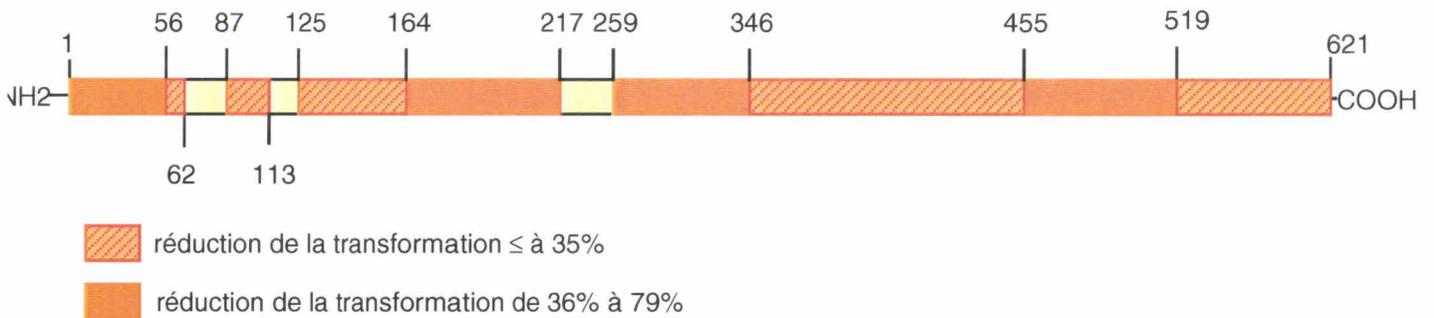


Fig. 8: Cartographie de s fonctions des rep  
D'après les travaux de Yang et al., 1992

On connaît un site fixateur de purines dont la mutation obère la réplication (Chejanovsky & Carter, 1990; McCarty *et al.*, 1992; Wonderling *et al.*, 1995).

Yang et ses collaborateurs réalisent une « dissection » des Rep par un ensemble de délétions, et étudient comment ces mutants se comportent pour la réplication, la transactivation de P40, la localisation nucléaire et la suppression de la transformation médiée par ras et E1a. Ils montrent qu'il suffit de modifications conformationnelles minimales pour inactiver la réplication et la transactivation de P40.

Enfin, les auteurs identifient un signal putatif de localisation nucléaire, voir la figure 8 (Yang *et al.*, 1992).

De façon simultanée, McCarthy et ses collaborateurs identifient par une méthode voisine les sites impliqués dans la liaison à l'ADN. Ils montrent qu'il existe deux sites non contigus (résidus 134 à 242 et 415 à 490) dont la mutation ne permet plus ni réplication ni transactivation. Ces fonctions disparaissent si le site putatif ATPase est muté (McCarty *et al.*, 1992). Ce site est fonctionnel avec d'autres nucléotides triphosphate, notamment avec le CTP, l'UTP et le GTP qui permettent aussi l'activité endonucléase au niveau du *trs* (Im & Muzyczka, 1992).

Une même « dissection » des Rep est réalisée par d'autres équipes avec des résultats différents, voir figure 7 et 8 (Im & Muzyczka, 1992; Owens *et al.*, 1993; Yang & Trempe, 1993).

Tous les auteurs s'accordaient sur le fait que deux ou plus Rep protéines étaient requises pour le clivage efficace de l'ADN proviral. On sait maintenant qu'il existe un hexamère de Rep (Smith *et al.*, 1997). Si l'un des éléments de ce complexe est incapable d'activité endonucléase, alors le complexe n'est pas fonctionnel, ce qui rend compte des nombreux mutants transdominants négatifs construits par de nombreux chercheurs (Owens *et al.*, 1993).

Kyöstiö montre que la suppression d'au moins 159 acides aminés de l'extrémité c-terminale, et/ou la suppression/mutation de la méthionine en 225 abolit la capacité des Rep à réguler négativement les promoteurs P5 et P19. Cette même mutation produit des mutants transdominants négatifs

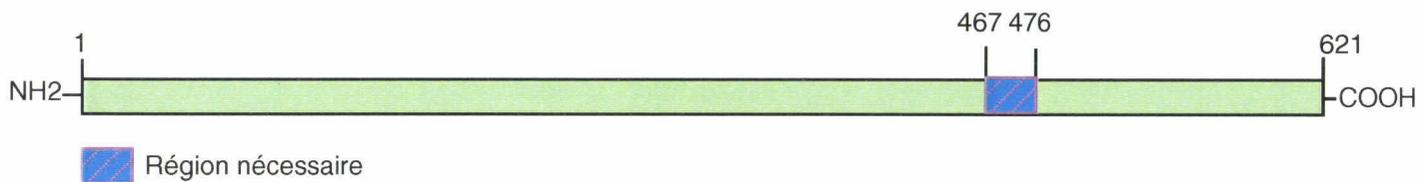


Fig. 9:  
region nécessaire à la résolution de l'ADN



Fig. 10a:  
RBS de la séquence AAVS1

**COMPARAISONS DE SEQUENCES RECONNUES PAR REP:**

CAGTGA	<b>CCGAGCGAGC</b>	GCGCAG	<b>Palindrome A</b>
CAGTGA	<b>CCGAGgaAGCC</b>	gaaga	<b>pBR322</b>
CcccGA	<b>GtGAGCaGGC</b>	agGgtc	<b>promoteur P5</b>
CAGc GA	<b>CCGAGCGAGC</b>	GcGc AG	<b>Chromosome 19</b>

Fig. 10b:  
Sequences présentant un "RBS-like"

dépourvus d'activité hélicase (Kyöstiö & Owens, 1996). Des mécanismes de régulation différents coexistent pour P5 et P19 (voir la figure 5, détaillant les mécanismes de la régulation des promoteurs homologues).

Weitzman identifie une région indispensable dans le clivage de l'ADN, (voir figure 9) quoique dispensable pour la liaison à l'ADN, entre les acides aminés 467 et 476 (Weitzman *et al.*, 1996)

### Intégration

Sans entrer dans les détails du mécanisme de l'intégration, qui seront développés dans un chapitre spécial, on trouve dans la séquence AAVS1, dans laquelle s'intègre le virus, trace du RBS. On trouve dans la séquence un trimère GAGC, flanqué d'un motif voisin (GCTC ou GCGC), motif du RBS (figure 10a et 10b, revoir aussi la figure 3, chapitre ITR).

Rep 68 et 78 sont capables d'interagir avec ce motif et de déclencher l'intégration dans un site se trouvant à 16 bases du motif de reconnaissance (Weitzman *et al.*, 1996). Ce système semble optimal, car le déplacement d'un des sites à 8 bases de l'autre en réduit considérablement l'efficacité (Snyder *et al.*, 1993). Pourtant, Batchu et Hermonat construisent en 1995 une protéine mutante de Rep78/68 qui ne se lie pas à l'ADN mais qui est capable de cliver à plusieurs endroits, en plus du *trs*, ce qui soudain laisse supposer qu'un autre système de reconnaissance est en jeu (Batchu & Hermonat, 1995).

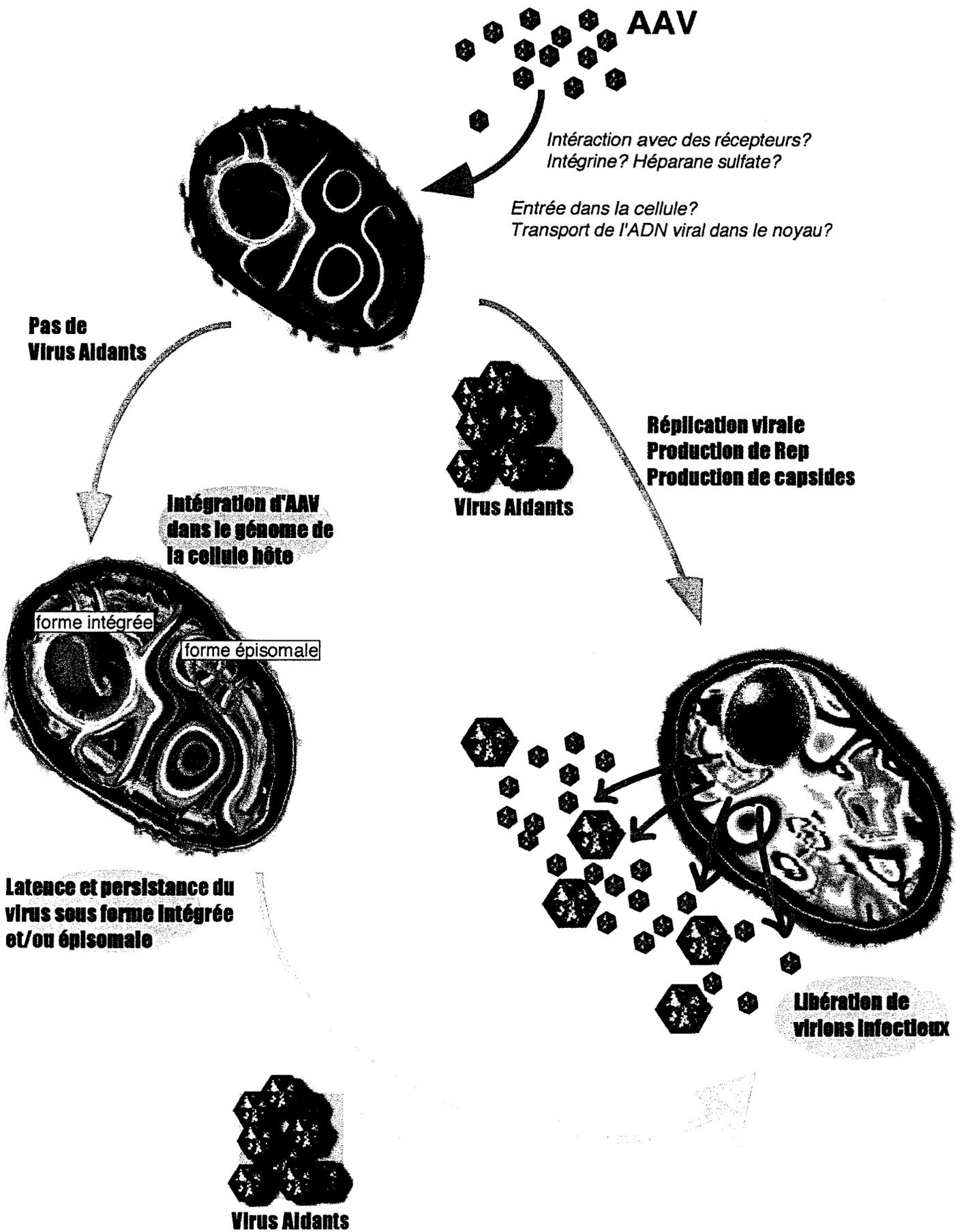


Fig. 11:  
Cycle viral d'AAV

## III BIOLOGIE

### III.A INTRODUCTION

Par biologie du virus, nous allons nous intéresser à quatre caractéristiques. Bien qu'étroitement liées, elles seront étudiées dans des chapitres séparés:

- *la réplication,*
- *la nature déficiente des AAVs et leurs relations avec les virus « aidants »,*
- *l'intégration (et l'excision) du virus dans le génome de la cellule hôte,*
- *l'oncosuppression et l'embryosuppression,*

Le cycle viral d'AAV est résumé sur la figure 11. Comme nous l'avons évoqué dans les premières pages, le spectre d'hôte des AAV, même s'ils sont connus pour infecter les humains (AAV-2/3/5) et les singes (AAV-1/4), est assez étendu. Les travaux entrepris pour étudier aussi bien la réplication, les fonctions des protéines virales,... montrent que l'on peut infecter une grande diversité d'animaux et de types cellulaires. A tel point qu'un auteur a émis l'hypothèse suivante: on peut infecter « n'importe quoi » pour peu que l'on dispose du bon virus « aidant » adapté à l'hôte concerné (Carter & Laughlin, 1984).

Les AAV sont donc considérés comme des virus défectifs. Pourquoi? Car ils sont incapables de se répliquer seuls. Il leur faut l'aide d'un autre virus baptisé pour l'occasion virus « aidant » pour assurer le coup de pouce qui met en branle le processus répliatif.

Ces virus peuvent être les adénovirus (Ad), les cytomégalovirus humains (HCMV), les herpes simplex (HSV), le virus de la vaccine, ainsi que le virus humain herpétique de type 6 (HHV-6) ou récemment le papillomavirus de type 16 (HPV-16).

Ces virus ont d'ailleurs des points communs: ce sont tous des virus à ADN, et ils induisent très tôt des dommages dans l'ADN de la cellule infectée (Schlehofer & zur Hausen, 1982; zur Hausen *et al.*, 1966). Cette caractéristique n'est pas sans conséquences pour AAV, comme on le verra dans le chapitre sur la defectivité.

Cependant, il a été montré que les AAV pouvaient tout à fait se répliquer seuls en cas de stress cellulaire important, ou en présence de génotoxiques. Nous reviendrons en détail sur les différents virus « aidants » dans ce chapitre. Nous étudierons cette capacité à « échapper à une defectivité supposée » et ses conséquences en fin d'introduction.

Hors de ces conditions particulières, l'infection reste latente (voire persistante).

Ces mots pouvant susciter une controverse sémantique, nous nous devons de préciser que tout au long de cet ouvrage, « latence » est pris au sens de présence inactive du génome viral dans la cellule hôte (une forme de dormance). « Persistence » est pris au sens de présence active et productrice de virions, dans la cellule hôte.

Certaines lignées cellulaires du commerce sont infectées de façon latente comme des lignées trophoblastiques humaines, (Dutheil *et al.*, 1997) ou des cellules de rein de singe vert (Hoggan *et al.*, 1972).

Une infection latente s'établit avec une multiplicité d'infection élevée sans ajout de virus « aidant ». Les clones de ces cellules positives après 40 passages, le restent généralement au delà de 150, mais au bout d'un nombre élevé de passages, on constate l'apparition de copies virales libres (Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986).

Des études initiales de Handa (Handa *et al.*, 1977) et de Cheung (1980) montrent que le virus est intégré dans le génome de la cellule hôte. Ces conclusions ont aujourd'hui été confirmées (Kotin & Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1992; Kotin *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1990; Samulski, 1993; Samulski *et al.*, 1991). Le site assez spécifique où se déroule la majorité des intégrations est, sur le chromosome 19 en q13.3-qter.

Même en l'absence de virus « aidant », nous avons vu que les protéines Rep sont exprimées et modulent l'activité des gènes viraux.

Il s'agit de faire émerger l'idée d'une régulation intrinsèque de AAV. Régulation non seulement de la réplication ou de l'expression des gènes mais surtout du cycle viral dans une situation « biologique ». C'est à dire, avec des infections plus proches d'une particule pour 1000 cellules que de 1000 particules par cellule, ou dans des cellules on l'on ne « déverse » pas des quantités importantes d'une autre entité biologique « aidante », pour en tirer ensuite le principe fondateur d'un mécanisme.

A ce titre AAV pourrait être un virus certes latent, mais aussi persistant, c'est à dire s'exprimant et produisant des particules virales, sans détruire son hôte. On trouve dans certains organes (syncytiotrophoblastes), présence de protéines virales (Tobiasch *et al.*, 1994). On peut aussi avoir présence de copies libres du génome virale dans une lignée établie, sans ajout de virus « aidant » (Cheung *et al.*, 1980).

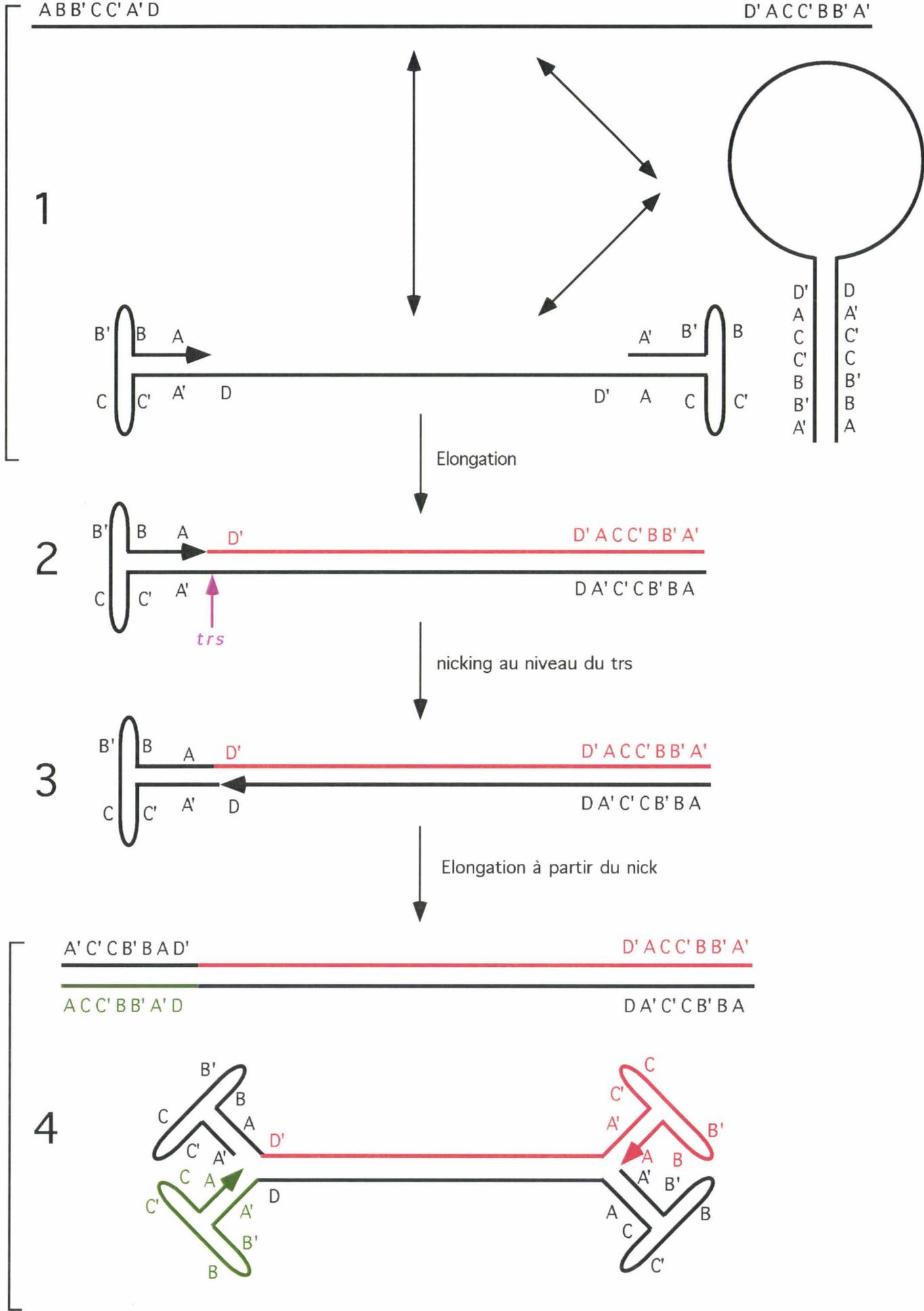


Fig. 12: Modèle réplcatif d'AAV d'après Berns et al., 1996

### III.B REPLICATION VIRALE

La réplication, tout petit virus que soit AAV, est un phénomène assez complexe qui fait entrer en jeu plusieurs acteurs. Certains d'entre eux ont déjà été évoqués (les protéines multi-fonctionnelles Rep qui en tirent leur patronyme, la conformation spatiale de l'ADN et de nombreux facteurs accidentels). Le modèle de réplication virale couramment accepté est exposé en figure 12.

La réplication virale est peu efficace. Chaque « production » virale donne naissance à une grande quantité de virus vides ou « vraiment » défectifs (de la Maza & Carter, 1980a; de la Maza & Carter, 1980b; Senapathy *et al.*, 1984). La plupart sont des virus ayant subi des délétions entre 12 et 63 unités cartographiques. Catherine Laughlin ajoute que ces particules « parasites » interfèrent avec la réplication des particules (Laughlin *et al.*, 1979). Les raisons en sont d'autant plus mystérieuses, qu'il est montré que ces molécules ne présentent aucun avantage répliatif (Ward & Berns, 1996).

En tant que virus simple brin, AAV possède quelques spécificités tout à fait originales.

#### 1) ITR

La première est l'existence des ITR sur lesquels nous nous sommes déjà étendus, qui sont en quelque sorte le premier pilier de la réplication. Ils offrent aux virus une façon de s'affranchir des problèmes soulevés par la structure même du génome (simple brin). Manifestement, les palindromes fonctionnent comme des amorces pour la (les) polymérase(s), et permettent le maintien de l'intégrité des extrémités, quand bien même l'une viendrait à manquer (Samulski *et al.*, 1983).

Des travaux montrent que la structure semble prévaloir sur la séquence et que le remplacement de la séquence des ITR par une autre séquence complémentaire n'invalide pas la réplication (Lefebvre *et al.*, 1984).

Comme on l'a évoqué dans le chapitre sur les ITR, ceux-ci contiennent divers éléments capitaux:

- leur structure secondaire sur laquelle s'appuie les polymérase pour initier la synthèse d'ADN,
- un *trs*, ou site de résolution situé en position 125 (en nucléotides) dont la séquence est CCAA. Ce site est l'objet du clivage site-spécifique/brin-spécifique opéré par les Rep sur les duplex réplicatifs (voir figure 3),
- un RBS qui contient un trimère GAGC bordé de plusieurs bases impliquées elles aussi dans la réplication. Des délétions de tout ou partie du motif modifient l'efficacité de la réplication, voire la supprime (Chiorini *et al.*, 1995; McCarty *et al.*, 1994a; Ryan *et al.*, 1996),
- un site de moindre affinité d'interaction Rep-ADN, au sommet d'une barre du « T », de séquence CTTTG,
- une séquence D, de 20 nucléotides (de 125 à 145), dont 10 nécessaires non impliqués dans la formation des structures secondaires (Lusby *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996), nécessaire pour le passage d'une forme provirale intégrée et latente au tandem réplication/production de virions, mais les résultats sont un peu controversés à ce sujet.

En cas de délétion des deux *trs* et des séquences D, il serait encore possible d'obtenir une réactivation efficace (c'est à dire passage d'une forme latente intégrée et/ou épisomale à une forme capable de se propager, Wang *et al.*, 1995) et une réplication, ce qui met en valeur encore une fois l'importance des structures secondaires en épingle à cheveux. Cette idée est parfaitement en accord avec d'autres travaux (Lefebvre *et al.*, 1984), mais est aussi en contradiction avec le rôle avéré des protéines Rep.

Ces dernières agissent de façon spécifique, reconnaissant aussi bien la structure secondaire, la structure primaire que le brin, interagissant aussi bien avec le RBS, la séquence D, le *trs* et le site mineur de fixation CTTG (voir la fig. 3 dans le chapitre sur les ITR).

## 2) Rep

Le second pilier supportant la réplication est constitué par les protéines multi-fonctionnelles Rep qui jouent un rôle important dans la réplication, notamment Rep 78 et Rep 68.

Ces protéines se lient de façon covalente à l'ADN sur l'origine de réplication, en présence d'ATP (Ashktorab & Srivastava, 1989; Im & Muzyczka, 1989; Im & Muzyczka, 1990; Owens *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1990a), effectuent le clivage des intermédiaires de réplication (Im & Muzyczka, 1990; Snyder *et al.*, 1990b) *in vitro*. Rep 68 agit comme une endonucléase site spécifique, au niveau du *trs* placé en 125, et dont la séquence reconnue est CCAA.

La présence du *trs* semble d'ailleurs nécessaire, mais celle des 55 dernières bases serait dispensable pour la réplication —mais pas pour l'excision (Hong *et al.*, 1992).

Le *trs* serait en fait l'origine de réplication du virus (Ward *et al.*, 1994). Des mutations dans la région se liant aux purines des Rep produit des mutants transdominants négatifs pour la réplication (Chejanovsky & Carter, 1989; Chejanovsky & Carter, 1990). On a vu que ce site était impliqué dans la séparation des deux brins avant résolution (Snyder *et al.*, 1993).

Il est possible d'obtenir la réplication d'un plasmide contenant le génome viral entier, et surtout d'obtenir une production (Samulski *et al.*, 1987).

Ce modèle a permis d'étudier quels gènes pouvaient être impliqués soit dans la réplication *stricto sensu*, soit dans la résolution des multimères réplicatifs. Les deux fonctions, qui appartiennent toutes deux aux protéines Rep, sont indissociables (Samulski *et al.*, 1987).

L'implication des Rep dans la réplication est multiple. D'après Hölscher, la seule présence de Rep 78 et 68 est nécessaire (Hölscher *et al.*, 1995). Mais les Rep sont aussi impliquées dans l'empaquetage des virions, et notamment les protéines Rep 52 et 40.

Apparemment, il existe un moment de la réplication virale où les protéines de capsides et les protéines Rep co-précipitent en un seul complexe (Wistuba *et al.*, 1997). Prasad montre qu'après formation du virion,

Rep 78 reste liée de façon covalente à l'ADN (Prasad & Trempe, 1995), et Kube ajoute qu'elle est encapsidée dans le virion (Kube *et al.*, 1997).

Une liaison covalente est formée entre le brin d'ADN et la *protéine in vitro* (Snyder *et al.*, 1990a). Cette liaison nécessite la présence d'ATP. Le clivage d'un site simple brin se fait sans ATP ce qui laisse supposer que le rôle de la fonction ATP dépendante est de permettre la dénaturation de l'ADN. Les autres protéines et les polymérases utilisées sont ancillaires, comme la polymérase  $\delta$ .

Ni la polymérase  $\alpha$ , ni l'ARN polymérase, ni les topoisomérases de type I et II ne semblent impliquées (Im & Muzyczka, 1990; Im & Muzyczka, 1992). Toutes ces enzymes cellulaires ont un rôle dans la réparation, ce qui apporterait un élément de réponse sur l'activité de régénération des termini après « clivage », laquelle évoque justement une réparation.

Mais pour tempérer l'enthousiasme ambiant, un auteur montre que la réplication peut se faire sans Rep: Yalkinoglu a montré en 1991 qu'il pouvait obtenir la réplication semi-conservative d'un plasmide contenant l'origine de réplication, ITR et promoteurs P5 et P19, sans les gènes nonstructuraux dont ils dirigent la transcription (Yalkinoglu *et al.*, 1991).

Si nous avons un modèle fonctionnel de la réplication dans lequel chacun des acteurs trouve une place essentielle, il semble souffrir trop facilement de nombreuses exceptions (sans palindromes, sans *trs*, sans séquence D, avec un RBS tronqué, sans protéines Rep...) pour être complètement crédible.

### 3) mécanique

La réplication fonctionne par déplacement d'éléments simple brin (Hauswirth & Berns, 1977; Samulski *et al.*, 1983; Senapathy *et al.*, 1984).

Deux possibilités:

- 1) Repliement du 3' sur le 5'
- 2) appariement des ITR.

La seconde possibilité permet l'hypothèse d'un duplex intermédiaire à partir duquel s'initierait les "tours" de réplication. La structure d'ailleurs

n'interdit ni ne requiert d'intermédiaires de réplication plus (Straus *et al.*, 1976). Il semble toutefois que même si un tel événement survient, l'appariement n'est pas parfait (Bohenzky & Berns, 1989; Bohenzky *et al.*, 1988).

Pourquoi? Car durant la réplication les séquences palindromiques sont interverties ce qui ne rend pas l'appariement parfait (qui nécessiterait une orientation flip-flip ou flop-flop, in (Srivastava *et al.*, 1983). Lors de la réplication, les deux orientations des extrémités sont produites avec une occurrence tout à fait similaire.

Srivastava montre en 1987 qu'il est possible d'obtenir la réplication de termini *in vitro* (Srivastava, 1987).

Hong caractérise des intermédiaires de réplication, qui sont des duplex dont l'une des extrémités est étendue. Ces intermédiaires comprennent aussi des dimères double brins tête-tête et queue-queue (Hong *et al.*, 1994).

D'après la relecture du modèle par Hong, sur un AAV simple brin, le 5' parental est d'abord copié puis le nouveau 3' « fils » se replie sur lui-même et copie d'abord le nouveau brin fils, puis le brin parental, ce qui mène à un duplex double brin linéaire dans lequel un brin plus la moitié d'un, sont nouvellement synthétisés.

Ce modèle prédit l'existence de dimères tête-tête et queue-queue, et proscrit les dimères en tandem. Ceci correspond aux observations de l'auteur (Hong *et al.*, 1994), mais pas à celles de nombreux des auteurs travaillant sur l'intégration qui ont identifié de telles formes tandem intégrée dans l'ADN de la cellule hôte (voir chapitre sur l'intégration).

La réplication d'AAV fait l'objet d'une régulation aussi bien positive que négative par les protéines virales *Rep* (voir chapitre sur les *Rep*). L'excision, par *Rep* 78 et 68 (Ward *et al.*, 1994) peut être concomitante à la réplication, mais se passerait de toute façon après initiation de la réplication sur l'origine, au niveau du *trs*, progressant vers le 3'.

On considère couramment qu'une cellule en culture est non permissive pour la réplication d'AAV en l'absence de virus « aidant ». Dans ces conditions, il y a un niveau basal de synthèse des protéines *Rep*, et ce

produit inhibe l'expression des gènes viraux, la réplication et même l'activité de promoteurs hétérologues (voir le chapitre correspondant).

L'étude de la réplication à partir d'un plasmide avec une origine de SV-40 montre qu'AAV est capable d'empêcher la réplication du Replicon SV-40 aussi bien que sa propre réplication dans des cellules cos (cellules contenant l'antigène grand T, nécessaire à la réplication de SV-40). De plus, ces constructions montrent une plus grande propension à l'intégration que le virus sauvage.

On peut, à la rigueur, considérer que cette caractéristique est un moyen pour le virus de stimuler son intégration, un mode de pérennisation plus efficace à long terme (rappelons que AAV est théoriquement incapable dans des conditions « normales » d'assurer seul ses fonctions réplcatives).

Nombre de travaux (pour n'en citer que quelques-uns: Buller *et al.*, 1981; Janik *et al.*, 1989; Mishra & Rose, 1990; Samulski & Shenk, 1988), montrent que la présence d'un virus « aidant » stimule clairement la réplication.

Lorsque les brins d'ADN fils sont produits, il faut des capsides pour les empaqueter. On a déjà décrit en détail les caractéristiques des protéines de capsides, et leur lien avec la réplication. Grossièrement et pour rappel, le complexe VP1/2/3 est amené au noyau car seules VP1/2 sont équipées de signaux de localisation nucléaire (Ruffing *et al.*, 1992).

Lors de la production des protéines de capsides, celles-ci sont très vite assemblées en capsides vides avec lesquelles le brin d'ADN réagit pour former le virion (Myers & Carter, 1981; Myers *et al.*, 1980). Un complexe ternaire ADN-Rep-Capsides localisé dans le nucléoplasme assure le mécanisme d'encapsidation. Le transport des capsides depuis les agrégats nucléolaires vers le cytoplasme est dépendant de la présence des Rep78 et 68 selon un mécanisme non connu (Wistuba *et al.*, 1997).

Un point bien clair: la réplication est indissociable de nombreux autres événements biologiques, comme l'intégration et la réactivation.

Il faut garder à l'esprit, malgré le découpage de cet écrit, que pour avoir une réplication, il faut que le provirus soit excisé de sa position intégrée (s'il y a lieu), que les protéines Rep jouent de nombreux rôles dans ces

phénomènes, que les extrémités ITR sont des éléments tout aussi capitaux, comme l'est la formation de capsides pour l'encapsulation du brin d'ADN, et la libération finale de virus « fils ».

La réplication comme un phénomène complexe: « rien n'est simple, tout se complique » (Sempé, 1989). Les tentatives d'en dissocier les différents éléments trouvent leurs limites, rendant parfois les faits (apparemment) contradictoires, et les explications nébuleuses.

### III.C DE LA « DEFECTIVITE », DES VIRUS « AIDANTS »

Le modèle biologique couramment accepté d'AAV en fait un virus défectif pour la réplication et la production virale. Ces dernières sont mises « sous condition » de la présence d'une autre entité virale: un virus « aidant ».

Ces propriétés ont été étudiées dès la découverte des AAV. Il existe des données sur les adénovirus (Ad, voir tableau I), les virus herpes simplex (HSV, voir tableau II pour ce virus et les suivants) et les herpes-virus humain de type 6 (HHV-6), les papillomavirus de type 16 et 18 (HPV-16/18), le virus de la vaccine, le cytomégalovirus humain (HCMV), il est donc à prévoir que d'autres virus, à identifier, puissent interagir avec AAV et faciliter son processus répliatif.

Nous étudierons les données existant sur cette dépendance. Toutefois, sous certaines conditions, la dépendance absolue de la présence d'un virus aidant peut être supprimée.

Nous renvoyons ensuite le lecteur en fin d'introduction, où nous verrons comment il arrive que cette dépendance soit contournée, et dans laquelle nous nous interrogerons sur le sens de la notion de virus défectif.

#### DES VIRUS AIDANTS

Que savons nous des effets de ces virus? Apparemment, rien ne permet de dire qu'ils facilitent l'entrée dans les cellules, ni qu'ils modifient l'intégration, et leurs polymérases spécifiques ne semblent jamais mises à contribution quand elles existent.

Les travaux réalisés, que nous exposons ci-après, concernent tous des interactions protéines-protéines, ou ADN-protéines et systématiquement des régulations (ou « dérégulation ») de machineries cellulaire.

Composés viraux	Rôle dans la biologie du virus aidant	Effet aidant
<p><b>Adénovirus (Ad)</b></p> <p><b>E1a</b> → 4 protéines</p> <p><b>E1b</b> → 2 protéines dont la 55K qui est impliquées dans le transport des ARNs vers le cytoplasme. Cette protéine interagit aussi avec E4.</p> <p><b>E2a</b> → Produit 2 protéines se liant à l'ADN dont une protéine de liaison à l'ADN simple brin (ssDBP). Cette protéine régule la stabilité des ARNs viraux.</p> <p><b>E2b</b> → Produit une ADN polymérase</p> <p><b>E4</b> → Produit de nombreux polypeptides dont deux (des ORF3 et 6) favorisent l'exportation des ARNs viraux vers le cytoplasme, tout en maintenant les ARNs cellulaires dans le noyau. Active le système de réparation de l'ADN.</p>		<p>P5 possède un élément inductible par E1a</p> <p>Cette protéine favoriserait aussi l'accumulation d'ARN d'AAV dans le cytoplasme</p> <p>ssDBP protégerait l'ADN viral</p> <p>Son absence réduit la production virale</p> <p>Favorise aussi l'exportation des ARNs viraux. L'activation du système de réparation pourrait être essentiel pour la réplication d'AAV</p>

Tableau I:  
Effets et propriétés des gènes putativement responsables des effets aidants.

## Adénovirus

### Tableau I.

Les fonctions qui nous intéressent résident dans les gènes précoces: E1a, E1b, E2 et E2b et E4.

La région E1a code par le biais de cinq ARN, cinq protéines d'un poids moléculaire compris entre 28 et 58 kDa. Le promoteur P5 possède un élément inductible par E1a, et un site de liaison pour le MLTF (Major Late Transcription Factor). Toutefois, même si on montre l'activité de ces éléments *in vitro*, leur signification biologique reste à élucider (Chang *et al.*, 1989).

La région E1b produit deux ARN spécifiant deux protéines de 58 kDa (appelée d'ailleurs 55K) et de 15 kDa (15K). La protéine 55K permettrait l'accumulation des ARN d'AAV dans le cytoplasme (Samulski & Shenk, 1988).

La région E2a code une protéine de 72 kDa (72K) et E2b une protéine de 87 kDa que l'on retrouve liées de façon covalente aux extrémités de Ad. E2b est aussi la polymérase spécifique de cette espèce virale. La région E2a code aussi une protéine de liaison à l'ADN simple brin (ssDBP, pour single strand DNA Binding Protein) de 529 acides aminés assez bien connue.

Elle est impliquée dans la régulation de la réplication et est capable de se lier à l'ARN, dont elle régule aussi plusieurs aspects de « cette vie terrestre » comme la stabilité, le métabolisme, la transcription et peut-être l'épissage (McPherson *et al.*, 1982).

Les auteurs supposent que la ssDBP protégerait le brin d'ADN viral d'AAV. Paradoxalement, Carter montre à l'aide d'un mutant de cette protéine que la fonction de la ssDBP est dispensable pour la croissance d'AAV, même si son absence en réduit l'efficacité (Carter *et al.*, 1992).

E4 est composée de deux produits issus des ORF3 et ORF6. Ces protéines facilitent l'exportation des ARN viraux tout en ralentissant l'exportation d'ARN cellulaires dans le cytoplasme (Leppard, 1997). Cette fonction nécessite entre autre l'association avec la protéine 55K. Le produit de l'ORF6 est aussi impliqué dans la conversion du génome viral en forme double brin (Samulski & Shenk, 1988).

Les mutants adénoviraux dépourvus d'E4 deviennent défectifs pour la réplication. On pense que cette protéine active aussi le système de synthèse d'ADN et surtout, le système de réparation de l'ADN.

Leppard suggère que la défektivité des adénovirus privés d'E4 d'une part, et celle d'AAV, d'autre part, pourraient être très liées. L'auteur suppose que cette protéine concourt à la modification de l'environnement cellulaire en activant le système de réparation, un effet que l'on obtient aussi en soumettant une cellule à un stress génotoxique.

E4 modifie aussi la distribution des composants nucléaires. Cette protéine rendrait ainsi plus accessible des éléments requis par les adénovirus aussi bien qu'AAV (Leppard, 1997).

En plus de E1a et b, E2a et E4, il semble que l'ARN VAI soit aussi impliqué (Janik et al., 1989; McPherson et al., 1982). Cet ARN sert à bloquer la voie cellulaire de régulation négative de la traduction, de façon à permettre la traduction des ARN viraux tardifs (Schenk, 1996).

L'utilisation de mutants thermolabiles a permis de montrer que, à une température permissive, E2b permet de stimuler la réplication aussi bien que le virus sauvage à température non permissive. En revanche, un mutant E2a thermolabile ne permet pas la réplication à température non permissive (100 fois moins de particules virales) (Janik *et al.*, 1981; Myers et al., 1980).

De la même façon, des Ad-5 mutants ont été utilisés pour montrer l'importance des régions E1a/b (Janik et al., 1981; Laughlin *et al.*, 1982; Ostrove & Berns, 1980). On obtient aussi la synthèse de protéines de capsides par l'injection d'ARN d'Ad avant une infection par AAV (Richardson & Westphal, 1981), le résultat pouvant être obtenu avec micro-injection des seuls ARN de E1a/b, de E2, ou de E4.

En même temps, AAV empêche clairement l'effet lytique d'Ad, en séquestrant certains produits adénoviraux, les rendant inaccessibles, (Carter *et al.*, 1979; Laughlin *et al.*, 1979; Myers et al., 1980).

Richardson en 1981 propose une théorie de la cascade des événements débouchant sur l'effet « aidant »  $E1 \rightarrow E2a \rightarrow E4$ .

Composés viraux	Role dans la biologie du virus aidant	Effet aidant
Herpes Simplex 1/2  UL 5, 8, 9, 29, 30	→ 5 protéines impliquée dans la réplication des HSV-1/2	Rôle positif dans la réplication et la production virale
HCMV  ICP4  MIEP	→ Gène précoce impliqué dans la réplication du virus  → ?	Rôle positif mais non connu  ?
HHV-6  "Rep-like"	→ ?	Rôle positif mais non connu
HPV-16  E1/E2	→ E1 et E2 sont capable de transactiver l'expression de E6 et E7. Ce protéines sont aussi impliquées dans la réplication (E1) et dans l'amplification génique (E2).	Rôle positif mais non élucidé

Tableau II:  
Effets et propriétés des gènes putativement responsables des effets aidants.

Malheureusement, ces observations restent incompatibles avec l'état des connaissances de la régulation des adénovirus, où l'expression de E4 précède les autres gènes considérés ici et où l'expression de E2a destabilise la région E4 et en empêche l'expression (Richardson & Westphal, 1981). On peut supposer que la durée de vie des protéines E4 n'empêche pas la formation ultérieure de complexes protéiques, même si E2a en empêche la synthèse.

De plus, E4 est (théoriquement) un ensemble de 7 polypeptides issu de 7 phases de lecture ouverte et de 18 ARN messagers différents (Leppard, 1997). Chacun de ces polypeptides possède une (des) fonction(s) différente(s). Il est donc difficile d'en mesurer toutes les interactions possibles.

### Herpes Virus (HSV-1/2, HCMV, HHV-6)

#### Tableau II.

La taille énorme du génome viral et les mécanismes complexes de régulation afférents font que l'étude en est malaisée. Les herpes simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et 2) ainsi que le cytomégalovirus humain (HCMV) peuvent assurer efficacement le rôle de virus « aidant », (Buller et al., 1981; McPherson *et al.*, 1985). Comme dans le cas des Ad, AAV réduit la tumorigénicité liée à l'infection par ces virus. Les gènes impliqués demeurent mal connus.

Des cotransfections incluant un clone moléculaire infectieux de AAV et des fragments du génome d'HSV permettent de montrer que les gènes UL 5, 8, 9, 29, 30, 42 et 52 (qui sont des gènes impliqués dans la réplication de HSV: Weindler et al., 1991), ainsi que le gène précoce ICP 4 (IE 175) d'HCMV seraient impliqués dans l'effet « aidant » (Mishra & Rose, 1990).

Les Rep 78 et 68 activeraient le promoteur des gènes majeurs immédiats précoces (MIEP) et stimuleraient la synthèse d'ARN. Les protéines Rep ne semblent pas se lier pourtant à un élément régulateur de ce promoteur, ce qui suppose des interactions avec d'autres éléments cellulaires et/ou viraux (Wonderling *et al.*, 1997b).

HHV-6 est doué lui d'une particularité exceptionnelle: il a acquis d'une façon restant inconnue, une partie du gène de Rep 78/68 (Thomson *et al.*,

1991) —où du moins avec lequel il y a près de 80% d'homologie de séquence.

Les auteurs font l'hypothèse que HHV-6 serait un virus « aidant » naturel de AAV dont il aurait acquis lors d'une coinfection une partie du génome. En effet, HHV-6 se révèle effectivement virus « aidant ». Il peut de plus suppléer les fonctions d'un mutant de AAV déficient pour les protéines Rep (Thomson *et al.*, 1994), toutefois, les mécanismes de cette acquisition restent sujets à spéculation.

### Papillomavirus

#### Tableau II.

Récemment, les papillomavirus (HPV) et AAV ont pu être co-localisés dans des tissus de la sphère génitale humaine (Malhomme *et al.*, 1997b; Walz *et al.*, 1997a). Cette fois ci, le travail a été pris dans l'autre sens, puisqu'à partir de ces résultats, on a cherché *in vitro* si les HPV pouvaient agir en virus « aidants » d'AAV.

Walz et ses collaborateurs ont montré que HPV-16 assumait ce rôle, et d'autres travaux récents semblent avoir identifié dans les gènes E1 et E2 des candidats pour l'effet « aidant » (Ogston *et al.*, 1997). Ces gènes sont impliqués dans la réplication (E1) et l'amplification génique et de nombreux phénomènes de régulation, notamment le maintien de l'état épisomal (E2) (Howley, 1996).

Les HPV sont bien connus pour leur implication dans diverses formes de cancer, notamment les cancers du col utérin (zur Hausen, 1991), ou les tumeurs anales (Morten-Friesch *et al.*, 1997) qui donne à ces cancers une composante sexuellement transmissible.

Il est tentant de spéculer sur la présence dans un même tissu d'un virus oncogène et d'un virus oncosuppresseur.

Il existe un différentiel de prévalence pour AAV entre des populations « saines » comparée à des populations touchées par certains cancers. Ces études de prévalence ont été réalisées avec des méthodes séro-épidémiologique (34% dans les contrôles contre 15% dans les cas de cancer pour AAV-3: Sprecher-Goldberger *et al.*, 1971; Titres élevés d'AAV-5 dans

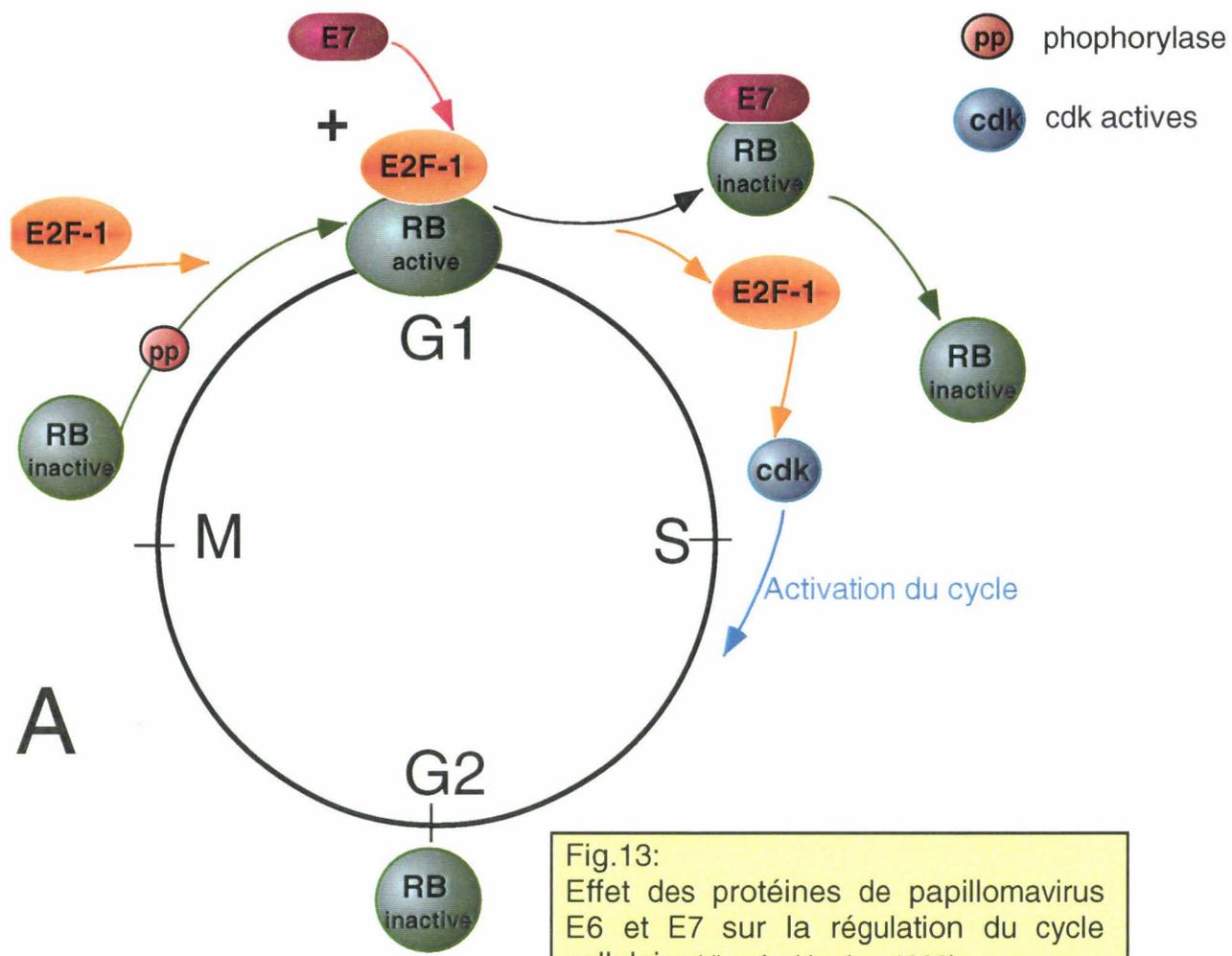
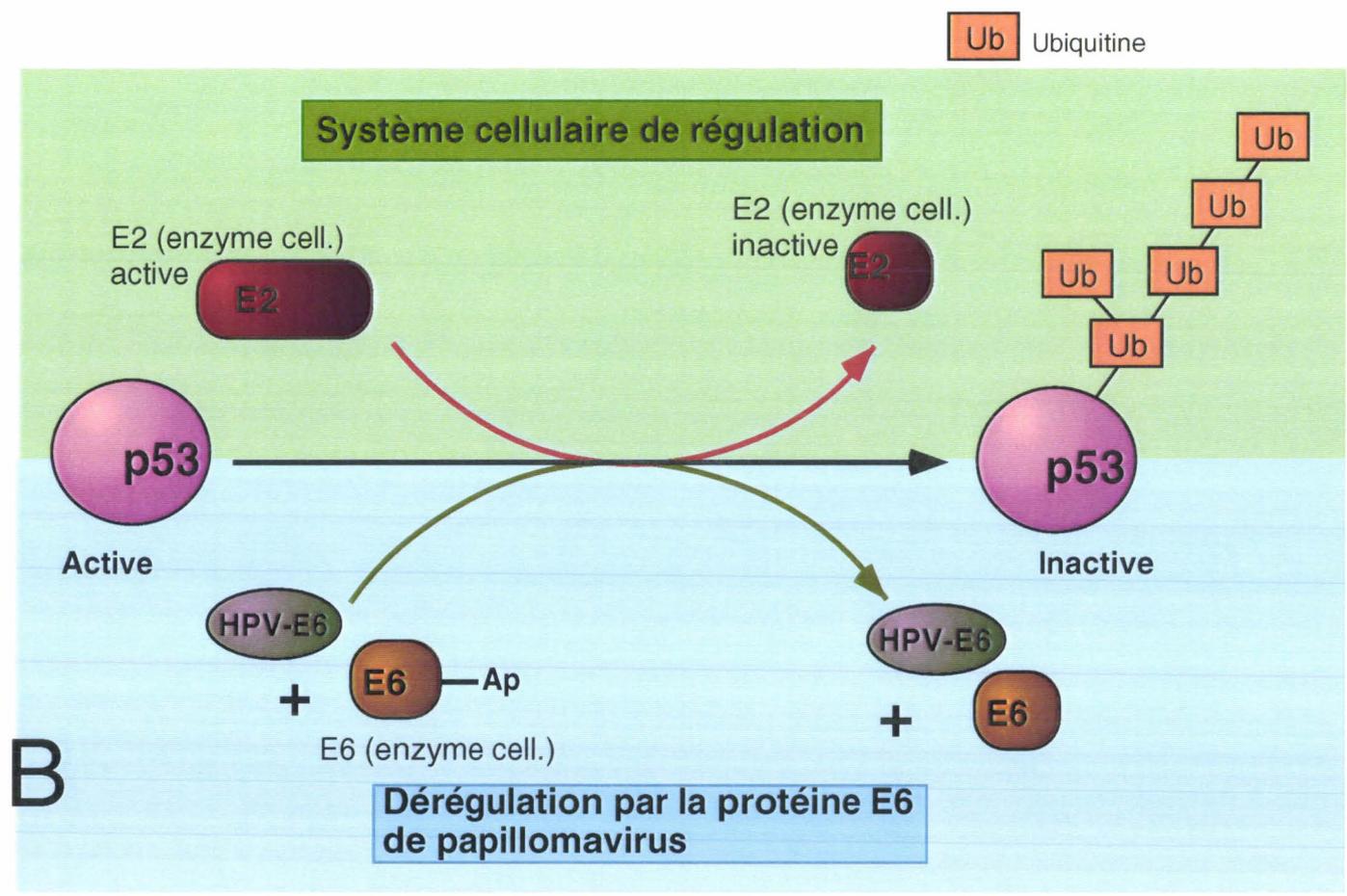


Fig.13:  
 Effet des protéines de papillomavirus E6 et E7 sur la régulation du cycle cellulaire (d'après Howley, 1996)



les contrôles et titre bas dans les cas de cancer: Georg-Fries *et al.*, 1984; 80% de séropositivité pour AAV-2 dans les contrôles et 14% dans les cas de cancer: Mayor *et al.*, 1976) aussi bien que par PCR (89% dans les contrôles et 34% dans les cas de cancer: Malhomme, données non publiées).

Il est tout aussi tentant de formuler des hypothèses rendant compte de ce différentiel et s'appuyant sur les effets oncosuppresseurs d'AAV. On peut par exemple envisager l'idée d'une « surveillance » parvovirale des cellules où AAV existe (par surveillance nous entendons: toute transformation cellulaire ou présence d'oncogène viral -par exemple- réactiverait AAV). Surveillance conduisant à la mort cellulaire si un virus oncogène comme HPV vient modifier les propriétés cellulaires.

On sait qu'AAV exerce une régulation négative sur l'« Upstream Regulatory Region » d'HPV (chez HPV-16/18 Hermonat, 1994b; Hörer *et al.*, 1995).

On aussi sait qu'AAV peut supprimer le pouvoir transformant de *ras* et HPV-16 dans des kératinocytes humains transformés (Hermonat, 1994b).

Certains des produits des gènes des papillomavirus modifient le cours du cycle cellulaire par leur capacité à se lier à des éléments régulateurs du cycle cellulaire (voir figure 13).

La protéine E7 se lie à l'antioncogène Rb (protéines du rétinoblastome) et la protéine E6 se lie à l'antioncogène p53.

Dans chacun des cas, ces interactions visent à dé-réguler le cycle cellulaire, et à le détourner vers la voie de la division cellulaire.

Si l'expression de E6 ou de E7 ne suffit pas à transformer une cellule, elle suffit à l'immortaliser (Howley, 1996), rendant cette même cellule particulièrement sensible à tout facteur transformant supplémentaire. Hors, on sait que AAV peut réguler négativement l'expression de E6 et E7.

Enfin, les indices d'une possible co-infection par AAV et HPV n'ont pu être mis en évidence que dans des cellules non transformées du col utérin (Walz *et al.*, 1997a).

Il existe des cas où AAV est capable de se répliquer sans l'apport d'un virus « aidant ». Ces cas interrogent et nombre d'autres données sur

lesquelles nous allons nous pencher interrogent sur le sens du concept de défectivité. Nous discuterons ce concept en fin d'introduction.

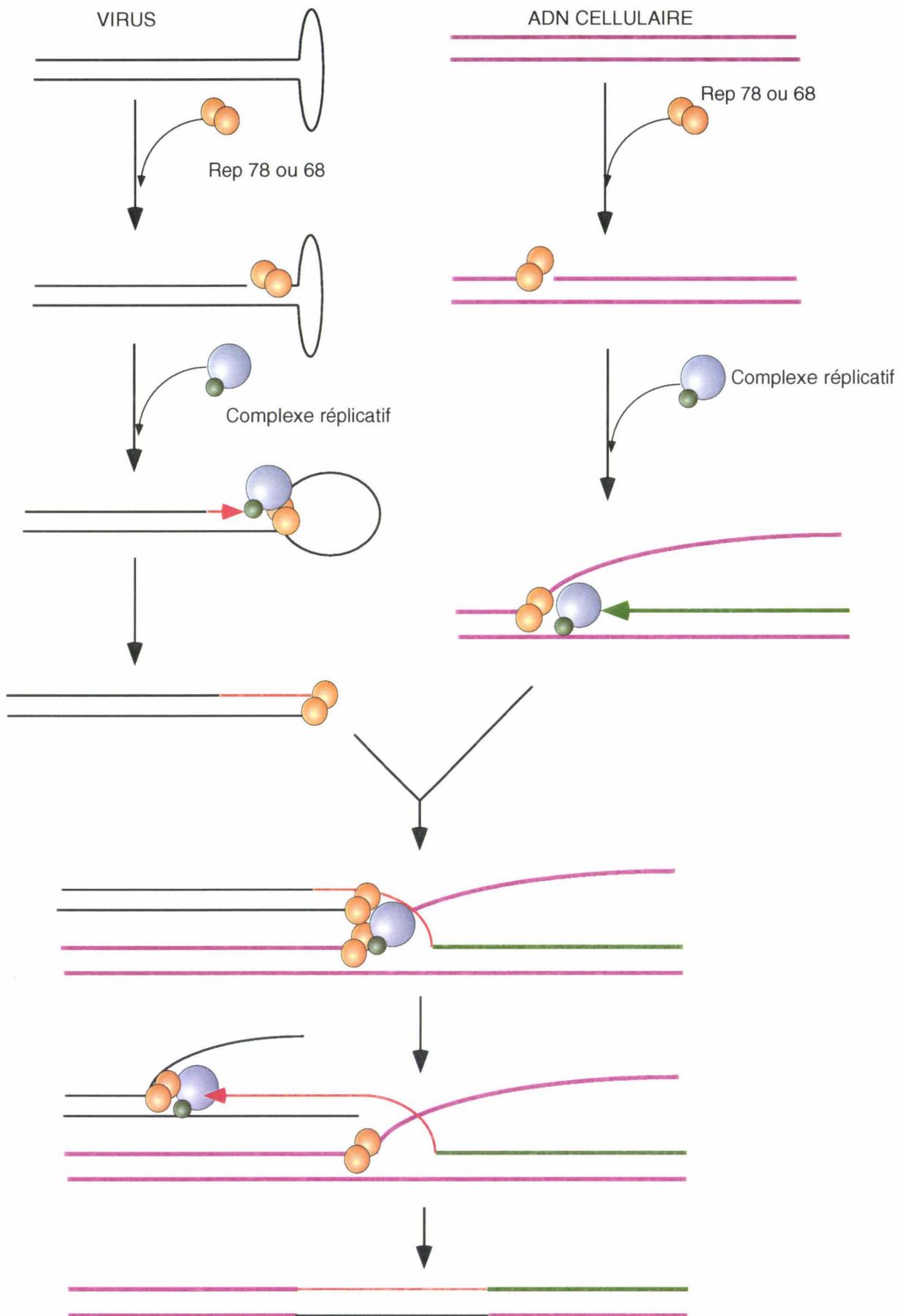


Fig. 14  
 Modèle de l'intégration d'AAV par recombinaison médiée par la réplication  
 D'après Chiorini et al., 1996

*Notre logique est née des solides... Elle porte l'empreinte des solides et ne se sent à l'aise que parmi eux. Nous réclamons de ce fait des données concrètes, palpables, statiques.*

*Bergson*

### III.D INTEGRATION ET EXCISION D'AAV

AAV reste jusque là le seul virus d'eucaryote à s'intégrer de façon spécifique dans un site donné. Cette caractéristique constitue une originalité exploitée pour le transfert de gènes (Kotin & Berns, 1989; Kotin *et al.*, 1992; Kotin *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1990; Samulski, 1993; Samulski *et al.*, 1991). D'un point de vue biologique déterministe, cette stratégie d'intégration doit permettre au virus une permanence génétique efficace en attendant des conditions cellulaires propices à la réactivation. On doit toutefois garder à l'esprit que ces intégrations n'apparaissent peut-être spécifiques que parce qu'elles seraient les seules stables, et/ou non létales.

L'essentiel des données reste relatif à l'*in vitro*. Le modèle de l'intégration le plus couramment accepté est présenté figure 14.

#### A) IN VIVO

Il existe peu de données relatives à l'intégration *in vivo*. Si certaines publications font état d'une présence virale réactivable (ex: des cellules primaires de singe vert ou des cellules embryonnaires humaines de rein: (Hoggan *et al.*, 1972), il n'était pas à l'époque question d'intégration, mais d'infection cryptique.

Les données sur l'infection naturelle (voir le chapitre qui y est consacré), n'offrent aucune certitude qu'il y ait intégration (plutôt que persistance sous une forme épisomale, par exemple).

Les travaux sur l'intégration sont dépendants des techniques courantes de clonage. Ces techniques s'avèrent très délicates et peu adaptées aux échantillons dissemblables contenant peu de matériel génétique que sont des prélèvements humains, bref, à l'opposé du matériel issu d'une culture cellulaire.

Parmi les rares résultats, on doit citer:

- Klein-Bauernschmitt qui a récemment mis en évidence par PCR mais aussi par Southern blot classique, la présence d'AAV intégré dans des biopsies de cœur (Klein-Bauernschmitt & Bauernschmitt, 1997), ce qui laisse supposer d'ailleurs la présence d'une grande quantité de virus.

- Walz et ses collaborateurs, en montrant pour la première fois la coexistence d'AAV et d'HPV dans des biopsies de col de l'utérus, ont aussi montré l'existence d'AAV intégré (Walz *et al.*, 1997a).

- Tobiasch et ses collaborateurs, en montrant la présence d'AAV dans des échantillons provenant d'avortements du premier trimestre, a aussi montré que l'on pouvait trouver de l'AAV intégré (Tobiasch *et al.*, 1994).

## B) IN VITRO

Dans un premier temps il s'agit aussi de travaux sur la latence du virus. Sur la base de digestions enzymatiques (SmaI) et de Southern blot, Cheung et ses collaborateurs montrent que AAV est intégré sous une forme provirale et passe par des réarrangements quelquefois conséquents et s'intègre souvent sous une forme de tandem (Cheung *et al.*, 1980).

On détecte plus tard des formes tête-bêche et queue-queue (Kotin & Berns, 1989), mais les arrangements tandem restent les plus fréquents.

La présence de tandems avec peu de copies suggère un mécanisme spécifique et invalide l'idée de soudures « terminaisons par terminaisons ». Elle suggère par contre l'existence d'un épisode répliatif précédent l'intégration (Samulski, 1993).

Ces arrangements semblent d'ailleurs devenir de plus en plus importants au fur et à mesure des passages, et l'on détecte du virus libre après de nombreux passages (Cheung *et al.*, 1980).

## AAVS1

Les régions flanquantes du virus ont été clonées et un site d'intégration spécifique a été mis en évidence (Kotin *et al.*, 1990). Il existe une séquence

publiée de 4 kb constituant la partie 5' des 8,2 kb du fragment appelé AAVS1 (pour premier site d'intégration d'AAV, (Kotin *et al.*, 1992).

En utilisant cette région comme sonde, il semble qu'elle n'existe qu'en un exemplaire. On obtient néanmoins quelques hybridations avec des séquences extrachromosomiques (Kotin postule que ces séquences proviennent de désordres causés dans le génome de la cellule hôte, par AAV au moment de l'intégration: (Kotin *et al.*, 1990).

Ce site a été cartographié (Kotin *et al.*, 1991; Samulski *et al.*, 1991) et identifié comme étant placé sur le chromosome 19, en 19 q13.3-qter, à partir d'hybride souris-homme.

Il existe d'autres publications qui décrivent l'intégration sur le chromosome 17 (Bantel-Schaal, 1995; Walz & Schlehofer, 1992a), mais des travaux récents montrent que dans ce cas particulier, l'intégration a lieu néanmoins dans AAVS1 (Dutheil *et al.*, 1997), cette séquence ayant été déplacée par translocation.

Les sites de jonction hôte-virus varient de plusieurs centaines de nucléotides dans la région d'intégration (Giraud *et al.*, 1995; Goodman *et al.*, 1994; Kotin *et al.*, 1992; Samulski *et al.*, 1991).

La structure primaire commande cette intégration spécifique en 19 q13.3-qter (Giraud *et al.*, 1994; 1995). La séquence AAVS1 (celle de 4kb) isolée d'une banque de fibroblastes embryonnaires de poumons nous montre quelques particularités tout à fait intéressantes:

- Cette région est très riche en GC. Le GC% (de 65%) atteint 85% sur les 900 premières paires de bases;
- il y a une phase de lecture ouverte transcrite à bas niveau dans plusieurs type de tissus, mais dont on ne sait s'il existe une protéine associée;
- un îlot CpG (sans boîte TATA) en amont de cette phase de lecture;
- une région de répétition d'un minisatellite de 35 nucléotides présent au moins à 10 exemplaires, minisatellites n'existant qu'à 60 localisations dans le génome humain, et toutes sur le bras q du chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1992).

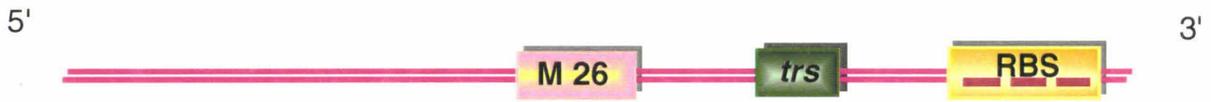


Fig. 15:  
Éléments régulateurs présents dans les 510 paires de base de AAVS1 essentielles à l'intégration.

- une séquence répétée 21 fois de 11 nucléotides DRS (pour Short Direct Repeat) dans les 1500 premiers nucléotides et entre 2801 et 3600.

La séquence d'intégration minimale est de 510 paires de nucléotides, et placée en 5'. Cette séquence contient un certain nombre d'éléments de reconnaissance et d'éléments régulateurs (voir figure 15).

- un motif M26. C'est un heptamère décrit chez les bactériophages et la levure, entre autre (Schuchert *et al.*, 1991) dont on sait qu'il stimule la recombinaison à haute fréquence. Toutefois M26 est dispensable pour l'intégration,

- un *trs* (Snyder *et al.*, 1993) reconnu par les Rep et fonctionnel (Urcelay *et al.*, 1995),

- un Rep Binding Site (Weitzman *et al.*, 1994),

Tous ces éléments sont concentrés dans une région de petite taille.

L'espacement entre RBS et *trs* est le même que celui des ITR d'AAV, fait important car l'espacement entre les deux sites est critique pour l'efficacité du clivage (Snyder *et al.*, 1993).

Un sous-fragment de cette séquence peut *in vitro* se répliquer (assymétriquement) s'il contient le RBS et le *trs* (Urcelay *et al.*, 1995).

On notera que jusque là, les jonctions avec le matériel cellulaire n'ont été séquencées que du côté 3' de la séquence AAVS1, qui contient ces 510 nucléotides si avantageux.

### Mécanisme

Nous avons résumé l'état des connaissances sur la figure 14.

Catherine Giraud a étudié la répartition et la composition des recombinants à l'aide d'un vecteur navette construit à partir de l'Epstein Barr Virus (EBV) et contenant AAVS1. Ce vecteur permet de simuler l'intégration dans le génome de la cellule hôte et d'étudier les intégrations ayant lieu. On retrouve la séquence d'AAV complète dans 20% des cas.

Une expression des polypeptides a même été détectée après transfection de ces séquences recombinantes clonées dans des lignées cellulaires infectées par adénovirus (Giraud *et al.*, 1995).

Au moins un ITR semble requis « du côté viral ». 25 nucléotides sont ajoutés, de façon complémentaire aux nucléotides 126-145 d'un ITR normal.

La conformation prise par le tout est alors modifiée, ce qui ressemble aussi à ce qui est retrouvé au niveau des jonctions en tandem de virus.

La partie 5' du génome viral semble souffrir beaucoup du mécanisme d'intégration. La plupart du temps, l'extrémité 5' est incomplète. On peut supposer que ces délétions ne sont pas systématiquement préjudiciables pour le virus puisqu'il peut donner une progéniture de virus normaux même si le génome « père » ne contient qu'un ITR (Samulski *et al.*, 1983). Mais le virus ne doit pas être entamé au delà de l'ITR.

Les délétions sont associées à une intégration en tandem "tête-queue" si elles incluent la région proche du promoteur P5 ou P5 lui-même, ce qui est à rapprocher des intégrations chromosomiques (Cheung *et al.*, 1980; Laughlin *et al.*, 1986).

Pour moitié environ, les intégrations se font à partir de l'ITR, et pour l'autre moitié, au niveau de P5 (les recombinants du système EBV présentent aussi une organisation différente, on trouve un mélange de séquences de la partie droite et de la partie gauche du génome).

L'intégration est une des caractéristiques le plus en vogue des AAV, mais le phénomène pose encore beaucoup de questions.

Kotin montre que l'intégration produit des réarrangements « expulsant » en situations épisomales certaines séquences cellulaires. Les extrémités du virus sont elles-mêmes riche en G et C, ces zones sont donc instables. Des motifs comme le motif M26 sont aussi associés à une instabilité génétique élevée (Schuchert *et al.*, 1991).

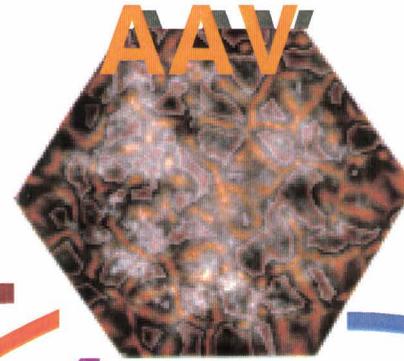
On considère néanmoins dans tous les travaux exposés ci-dessus qu'il y a intégration site-spécifique. On peut toutefois envisager qu'il existe des intégrations autres, et létales et donc non conservées.

L'intégration site-spécifique fait des vecteurs basés sur AAV, des candidats majeurs pour le transfert de gènes. Mais qu'en est-il de l'intégration dans les conditions d'emploi de ces protocoles de transfert?

Il a été montré récemment que les vecteurs à base d'AAV s'intègrent moins (voire pas du tout) spécifiquement (Kearns *et al.*, 1996; Rutledge & Russell, 1997; Surosky *et al.*, 1997).

Il peut donc paraître judicieux de se montrer prudent quant à l'idée d'une intégration spécifique dans des conditions voulues « thérapeutiques ».

Figure 16:  
Résumé des effets oncosuppresseurs et embryosuppresseurs d'AAV



Désactive les  
mécanismes  
d'amplification  
génique de diverses  
origines

Interfère avec la  
tumorigénicité de nombreux  
virus (adénovirus,  
herpesviridae, etc.  
Allonge le temps de latence  
des cellules transformées

Peut activer des voies de  
différenciation, modifie la  
biologie cellulaire, arrête le  
cycle cellulaire, arrête la  
croissance, modifie  
l'adhésion

Régule négativement  
de nombreux  
promoteurs  
hétérologues

Abortif chez la souris.  
Déclenche des avortements ou  
tue l'embryon

sensibilise les cellules  
transformées aux drogues  
chimiothérapeutiques et aux  
rayonnements

## IV ONCOSUPPRESSION ET EMBRYOSUPPRESSION

L'intérêt éveillé par les parvovirus tint d'abord à leurs propriétés oncosuppressives (capacités à interférer *in vivo* avec le développement de tumeurs) avant que celles ci soient « détronées » par le transfert de gènes.

Ces propriétés mises en évidence chez les parvovirus autonomes, (pour revue voir (Rommeleare & Tattersall, 1990), ont aussi été démontrées chez les AAV (pour revue: Schlehofer, 1994).

Si nous avons choisi de faire figurer ensemble oncosuppression et embryosuppression (terme utilisé par analogie avec le précédent), c'est que nous pensons qu'il existe une forme de parenté entre ces deux « avatars » d'AAV (ces propriétés sont résumées sur la figure 16).

Nous avons longuement évoqué la modulation de l'expression de gènes (transformant ou pas) par action sur leur promoteur dans des cellules infectées par AAV par les protéines Rep. Tout en gardant ces éléments à l'esprit, nous parlerons en plus ici de sensibilisation aux drogues antitumorales, de levée de résistance à ces drogues...

Et puis, même si les publications sont rares, nous nous arrêterons sur les interactions avec l'embryogénèse. Nous allons développer ces faits en faisant une sorte de tour de table des effets rencontrés.

### IV.A HISTORIQUEMENT...

AAV est associé avec les adénovirus. L'essentiel des premiers travaux se sont fait *in vitro* avec des cellules de hamsters, ou *in vivo* avec des hamsters. Ces travaux sont résumés sur le tableau III.

Il y apparait qu'AAV peut empêcher l'apparition, chez l'animal, de tumeurs (Cukor *et al.*, 1975; Kirschstein *et al.*, 1968; Mayor *et al.*, 1973), déclenchées par l'infection avec des virus transformants comme les adénovirus de type 1, 12 ou 31, HSV-2 et des virus simiens (SV-7, 11, et 15).

**Tableau III: Premières observations de l'effet oncosuppresseur des AAV**

ELEMENT TRANSFORMANT	EFFET DE LA PRESENCE D'AAV	REFERENCE
L'infection de hamsters par Ad-12	19% des individus developpent des tumeurs contre 60% sans AAV	Kirschtein et al., 1968
cellules de hamster infetées par Ad-1; cellules de singes infectées par les virus simiens de type 11 et 15	attenuation de la formation de plaque de 60%, de 35 et de 60% pour les trois virus respectivement	Casto et al., 1972
cellules embryonnaires de hamster, avec les virus oncogènes SV-7, SV-11, et Ad-12	foyers de transformation réduits à respectivement 59%, 36% et 34% des foyers observés dans les contrôles.	Casto et al., 1972
Infection de hamster par Ad-31	Pas de tumeurs chez les animaux infectés par AAV	Mayor et al., 1973
hamsters auxquels on injecte des cellules embryonnaires de hamster (333-8-9) transformées par HSV-2	Latence des tumeurs multipliée par 2. la survie moyenne des animaux passe de 82 à 122 jours	Cukor et al., 1975
cellules de hamster transformées par Ad-5	diminution du nombre de tumeurs de 65%, temps de latence des tumeurs allongé	

Mayor montre que cette " protection " n'est pas efficace pour n'importe quel virus oncogène. En effet, si elle obtient une réduction quasi totale du nombre d'animaux présentant des tumeurs quand ils sont infectés par AAV-1 et Ad-31, comparaison faite avec les témoins infectés par Ad-31 seul, aucun effet antitumoral n'est constaté pour des animaux infectés par SV-40 (Mayor *et al.*, 1973).

#### IV. B COMMENT RENDRE COMPTE DE L'ONCOSUPPRESSION ?

##### 1) Effet sur les protéines virales des virus aidant

Ces résultats très prometteurs appellent assez vite un grand nombre de questions sur la *mécanique* d'un tel effet.

Ostrove recherche des marqueurs susceptibles d'établir une différence. Dans des cellules infectées par Ad-5, et surinfectée par AAV, la protéine 58K (voir chapitre sur les virus aidants) devient indétectable, alors que le génome viral d'Ad-5 est toujours là (Ostrove *et al.*, 1981). Il postule une inhibition de l'expression des gènes d'Ad-5 par AAV.

Enfin, le premier, il détecte des transcrits d'AAV dans des cellules transformées par ce qui devenait un « virus aidant » (Ostrove *et al.*, 1981). Il confirme aussi les travaux de Berns qui fait l'hypothèse de l'implication de 58K dans la réactivation d'AAV (un mutant d'Ad-5 ne fabriquant pas de 58K est incapable de réactiver AAV, Berns *et al.*, 1980).

De la Maza vient brouiller les cartes et contredit l'idée acquise qu'un AAV infectieux était requis pour médier l'effet oncosuppresseur (Gilden *et al.*, 1968).

Selon lui, non seulement AAV-2 interfère avec le développement et la croissance de tumeurs chez des animaux infectés par Ad-12, mais il montre qu'il existe autre chose que ces transcrits d'AAV détectés par Cukor. En effet, les particules virales d'AAV-2 très incomplètes (de la Maza & Carter, 1980a; Senapathy *et al.*, 1984) ayant subi d'importantes délétions, et très enrichies en ITR interfèrent de façon encore plus efficace avec la croissance et le développement des tumeurs que les AAV sauvages (de la Maza & Carter, 1981). Ces résultats suggèrent un rôle pour les ITR.

On sait aussi (voir chapitre sur les protéines Rep) comment de nombreuses régulations négatives des fonctions virales hétérologues sont médiées par les protéines Rep. On sait aussi qu'une protéine Rep est encapsidée dans le virion. On peut considérer que de nombreux phénomènes attribués aux ITR pourraient ici trouver une autre explication.

## 2) Amplification génique

Si AAV se montre incapable d'empêcher l'apparition de tumeurs induites par SV-40, le virus peut agir sur l'une des caractéristiques de cette transformation: l'amplification génique.

Ce mécanisme est un élément du processus de transformation cellulaire. L'amplification génique a notamment été mise en évidence avec des carcinogènes chimiques et physiques (Lavi, 1981) et par HSV (Schlehofer *et al.*, 1983) et reste un bon moyen de mesurer le degré de stress génotoxique subi par un système cellulaire.

AAV-5 (alors nouvellement isolé, (Bantel-Schaal & zur Hausen, 1984)) se révèle capable d'inhiber l'amplification génique dans des cellules transformées par SV-40, et infectées par HSV. Cette inhibition s'accompagne de répllication virale même en l'absence de HSV (bien que de façon bien moins efficace), et d'apparition d'antigènes spécifiques d'AAV-5, mis en évidence par immunofluorescence. Ces travaux seront confirmés avec plusieurs autres virus oncogènes (vaccine) et carcinogènes chimiques (MNNG) (Bantel & zur, 1988; Bantel-Schaal & zur Hausen, 1988; Schlehofer *et al.*, 1986) et avec AAV-2/3 en plus d'AAV-5.

Pour ces raisons et d'autres exposées plus haut, l'auteur est amené à faire l'hypothèse, comme de la Maza, du rôle que les ITR pourraient jouer dans ces interférences avec l'oncogénèse (Schlehofer *et al.*, 1983).

Ces données vont même plus loin après examen de l'effet d'un traitement simultané par un carcinogène chimique à dose sublétales, et d'une infection par AAV-5.

Des cellules de hamster chinois transformées par SV-40 (CO631) sont traitées par le DMBA (carcinogène chimique) à une dose ne présentant pas d'effet létales. L'infection concomitante par AAV-5 induit une mort cellulaire

qui n'a pas lieu avec un seul des éléments. Les auteurs démontrent un effet synergique du virus et d'une drogue (Heilbronn *et al.*, 1984).

L'amplification génique est un des mécanismes invoqués pour expliquer comment une cellule transformée peut survivre aux carcinogènes, et acquérir le phénotype de résistance à une (ou des) drogue(s).

Ce phénomène est souvent retrouvé dans les tumeurs. AAV semble empêcher ce phénomène, et ne pas permettre la survie cellulaire (Heilbronn *et al.*, 1984).

### 3) Modifications biologiques

AAV n'affecte pas la transformation de NIH3T3 (transformées par *ras*), quelque soit la dose et le moment de l'infection, mais la capacité de clonage de ces cellules (réduite de 50%), leur densité de saturation (réduite de 33%), leur temps de latence et leur tumorigénicité *in vivo* sont considérablement affectés (Katz & Carter, 1986).

Les protéines non structurales sont capables d'inhiber l'expression de promoteurs hétérologues (Labow *et al.*, 1986) au niveau de l'initiation de la transcription.

Labow montre qu'il y a une inhibition du plasmide pSV2cat dans des tests de transfections transitoires. Il montre la dépendance de cet effet à la présence des produits synthétisés sous la direction des promoteurs P5 et P19 (soient les protéines Rep), et d'une région *rep* intacte. Il démontre que ces protéines semblent réguler négativement l'expression des gènes contrôlés par le promoteur précoce de SV-40, le promoteur tk de HSV, et un promoteur murin responsable de l'expression d'une métallothionéine (Labow *et al.*, 1986).

Hermonat montre en 1989 que Rep 78 est capable d'inhiber un autre virus oncogène de façon spectaculaire (une réduction de 98% des foci de transformation), le Bovine Papillomavirus (BPV), sans qu'il y ait nécessairement répllication virale (Hermonat, 1989).

Rep 78 semble requise, aussi bien pour la répression de l'expression que l'inhibition de la transformation de cellules par SV-40/ras/E1a (Khleif *et al.*, 1991).

Ces résultats sont confirmés par Hermonat, qui note aussi l'importance de Rep 78, dans un modèle transformé par H-ras. Il précise que des séquences présentes dans les régions de régulation de H-ras seraient impliquées, notamment les motifs Sp1 (Hermonat, 1991), voir aussi le chapitre sur les protéines Rep), ce qui l'amène à proposer le gène codant Rep 78 comme antioncogène.

Hermonat a confirmé récemment la capacité oncosuppressive des AAV dans la transformation de kératinocytes humains transformés par *ras* et HPV-16 (dans le but d'approcher mieux la réalité avec ce modèle (Hermonat *et al.*, 1997b)

Ces auteurs concluent du fait à un effet plutôt général non imputable à une forme de cytotoxicité, mais bien à une régulation d'expression (Labow *et al.*, 1987), les Rep 78 et 68 inhibant même l'expression du promoteur homologue P40 dans les cellules 293 (Trempe & Carter, 1988).

Toutefois, d'après Heilbronn (Heilbronn *et al.*, 1990), la suppression de l'amplification génique, due aux protéines Rep, peut être indépendante d'une quelconque toxicité, et aucun phénomène de répression de l'expression n'est impliqué dans la suppression de l'amplification génique. Il faut donc supposer l'existence d'une interférence, voire, d'un mécanisme indépendant et adapté.

Yang montre qu'AAV inhibe la réplication de SV-40 sans que les gènes précoces du second ne cessent de s'exprimer, mais on note un arrêt de prolifération de la cellule hôte (voire un arrêt en phase S: Yang *et al.*, 1994) ce qui suppose une inhibition directe de la synthèse d'ADN ou encore, un blocage dans la mécanique de régulation du cycle cellulaire (Yang *et al.*, 1995).

Les questions soulevées et les travaux réalisés mettent en lumière une inhibition de l'amplification génique, une capacité à affecter l'expression de

promoteurs hétérologue et homologues, une cytotoxicité potentielle qui serait dose-dépendante.

Depuis 1990, de nombreux auteurs se sont attachés à défricher les relations AAV-cellules tumorales, l'interaction avec des drogues chimiothérapeutiques, voire avec des virus oncogènes (comme les HPV).

L'infection, par AAV-2 ou AAV-5, de cellules en provenance de tumeurs fraîchement excisées, inhibe la prolifération cellulaire. L'arrêt de croissance est effectif un jour après l'infection, et on note une réduction du nombre de cellules, aussi bien dans des cellules de carcinomes, que des cellules de mélanomes (Bantel-Schaal, 1990).

Il semble que les fibroblastes puissent passer outre cet arrêt de croissance, s'ils sont recultivés, ce qui n'est pas le cas des deux autres types cellulaires évoqués. Les auteurs ont aussi testé des cellules épithéliales provenant d'un carcinome vaginal, et notent le même arrêt après infection, et la décroissance du nombre de cellules.

Cet arrêt s'accompagne d'un changement de morphologie. Les cellules apparaissent plus grandes avec des noyaux plus volumineux. Aucun des changements observés n'a de rapport avec une réplication virale, aucun phénomène de réplication dans les cellules testées n'ayant eu lieu sans ajout de "virus aidant". Au contraire, après plusieurs passages, on note une constante diminution de la quantité d'ADN viral présent dans la culture (Bantel-Schaal, 1990).

Ces modifications, comme l'arrêt de croissance, sont indépendants d'un processus réplcatif. La réponse au stress de cellules infectées peut être un arrêt global de croissance et la mort (Bantel-Schaal, 1991). Le même auteur montre aussi que des cellules normales voient une partie de leurs caractéristiques modifiées par une infection par AAV. Elle note un arrêt de prolifération, et un blocage transitoire en G0/G1 voire peut être à la limite G1/S. Transitoire, car l'action de la trypsine et le passage des cellules leur fait reprendre leur activité mitotique normale. L'ajout de facteurs de croissance n'a aucun effet. L'auteur en conclut que les caractéristiques cellulaires d'adhérence des cellules sont modifiées par l'infection (Bantel-Schaal & Stöhr, 1992).

#### 4) Sensibilisation aux drogues

Les AAV pourraient agir aussi en amont du processus de tumorigenèse. L'infection par AAV d'une population de cellules soumise à des mutagènes viraux (HSV partiellement inactivé) ou chimique (4-NQO) montre que l'on revient à un taux de mutation normal ou proche des témoins (Schlehofer & Heilbronn, 1990). Les auteurs offrent là une autre hypothèse de travail sur l'effet oncosuppresseur, toutefois le mécanisme en reste inconnu.

Quant aux relations résistance aux drogues/AAV, AAV inhibe la résistance à l'adriamycine et au methotrexate induite par le carcinogène MNNG (Yalkinoglu *et al.*, 1990). AAV permet aussi d'allonger le temps de sensibilité au cis-platine d'une population de cellules transformées (avant que celles-ci « échappent » à l'effet de cette drogue chimiothérapeutique: (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1996).

Il reste à savoir si AAV en l'occurrence déclenche la mort des cellules résistantes, et sélectionne par ce biais celles qui restent sensibles aux drogues, si le virus agit sur l'acquisition du phénotype « résistance aux drogues » ou encore si il s'agit d'une réversion de phénotype.

Les auteurs font le lien avec l'inhibition de l'amplification génique que nous avons évoqué plus haut, mais notent que cela ne peut être une explication *per se*.

Si les cellules infectées sont sensibilisées à l'action de drogues chimiothérapeutiques, elles le sont aussi aux traitements par rayons gamma. Les cellules HeLa voient leur capacité de clonage fort réduite, et ces mêmes cellules placées en souris immuno-déprimées montrent un taux de croissance tumorale diminué (Walz *et al.*, 1992b).

#### 5) Différenciation

Le travail de P. Klein-Bauernschmitt et de ses collaborateurs (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992) suscite de nouvelles hypothèses sur les propriétés oncosuppressives. En effet, les auteurs montrent que dans des lignées cellulaires, l'infection par AAV déclenche la synthèse de marqueurs de la différenciation cellulaire (CD 67 dans la lignée HL 60 provenant de

leucémie humaine, et l'involucrine et la cytokératine 10 dans des cellules HaCat et HPK1a, des kératinocytes immortalisés).

En même temps on observe que l'expression de c-myc et c-myb diminue alors que celle de c-fos augmente (Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992). Le plus étonnant est qu'il semble que ces effets soient médiés tout aussi bien par des capsides passées aux U.V. (Nathalie Dutheil, communication personnelle), ce qui laisse supposer qu'il s'agit de l'activation d'une des voies de transduction du signal, ou de l'existence de Rep 78 à l'intérieur de la capside, avec son cortège de propriétés régulatrices (Kube *et al.*, 1997). Les deux ne sont pas exclusifs, comme en témoigne Kube.

Bantel-Schaal montre que des lignées de mélanomes infectées par AAV font montre à la fois des propriétés décrites plus haut (arrêt de croissance, modification de morphologie,...) et à la fois de caractères de différenciation terminale, comme la synthèse de mélanine, des cellules grandes à nucléole large, avec des extensions dendritiques (Bantel-Schaal, 1995).

L'expression inductible des Rep dans une lignée cellulaire montre que les cellules ne sont pas forcément tuées. Leurs propriétés sont considérablement affectées, comme il est décrit par les auteurs précédents, et qu'elles sont capables de reprendre le cours de leur activité. Mais la proportion de cellules arrêtées en phase S est beaucoup plus grande, ce qui suggère une interférence avec le processus de réplication cellulaire (Yang *et al.*, 1994).

Si l'on se penche sur les interactions avec des oncogènes viraux connus et tristement célèbres pour leurs implications dans nombre de cancers, on constate que AAV, en culture cellulaire, inhibe l'expression de HPV-16 (Hermonat, 1994b).

Une donnée importante puisqu'on sait que les deux virus coexistent au niveau de la sphère génitale humaine, et que HPV peut se comporter en virus aidant de AAV (Han *et al.*, 1996; Malhomme *et al.*, 1997b; Walz *et al.*, 1997a).

L'effet protecteur d'AAV ne semble plus à démontrer. Walz et ses collaborateurs montrent que les cellules HeLa sont plus sensibles à l'effet de U.V. si elles ont été infectées par AAV. *In vivo*, la latence des tumeurs est

allongée et les tumeurs sont plus petites (Walz *et al.*, 1992b). La formation de tumeurs dans des souris par injection de cellules SiHa est abaissée en cas d'infection par AAV, et la taille des tumeurs est aussi réduite de 87% en moyenne, par comparaison avec les témoins non infectés (Su & Wu, 1996).

Pour mémoire, on reviendra sur la qualité de transactivateur ou de trans-represseur des protéines Rep que l'on a décrit dans le chapitre qui leur est consacré. Le (déjà) très large éventail des gènes dont l'expression est affecté par les Rep interroge quant aux conséquences *in vivo* de ces actions modulatrices.

Ces interactions mettent en jeu notamment de nombreux facteurs de transcription ou gènes de la transduction du signal comme H-ras (par le biais de sites Sp1: (Hermonat, 1991), c-myc et c-myb, régulés négativement, c-fos, régulé positivement ou négativement en fonction des tests (Hermonat, 1994a; Klein-Bauernschmitt *et al.*, 1992) et enfin c-sis, régulé positivement (Wonderling & Owens, 1996).

c-sis notamment est un gène qui code le polypeptide B du « facteur de croissance dérivé des plaquettes » ou PDGF, dont le rôle implique parmi d'autres (les auteurs suggérant la possibilité d'un rôle dans les pathologies figurant dans cette liste) la régénération des tissus, la fibrose, l'ostéogénèse, l'arthérosclérose, les néoplasies et le développement embryonnaire (Wonderling & Owens, 1996).

## 6) Embryosuppression

Nous avons évoqué dans le titre l'idée d'embryosuppression. Malgré le peu de travaux publiés, il apparaît que l'infection par AAV bloque le développement d'œufs fertilisés de souris au stade deux cellules.

Cet effet est reproductible par la seule microinjection d'ADN (complet ou ne contenant qu'un ITR et la région du P5) qui bloque le développement au stade morula (Botquin *et al.*, 1994).

Bien sûr, rien ne permet de savoir si de tels résultats sont transposables chez l'homme. On sait qu'AAV est parfois trouvé dans le liquide amniotique, (Burguete *et al.*, 1997) et souvent dans le placenta (Tobiasch *et al.*, 1994).

L'infection par AAV de souris gravide conduit à un avortement et une momification de l'embryon (Botquin et al., 1994). Les auteurs soulignent que les protéines Rep ne semblent pas impliquées. Mais il existe 80% d'homologie entre les ITR et une région des éléments répondant à l'acide rétinoïque murin (Matsubara *et al.*, 1990).

En conclusion, nous sommes en présence d'un virus qui dispose de propriétés rares, mais aussi de moyens redondants et parallèles de parvenir à une modification de propriétés cellulaires.

Ces moyens semblent tirer parti:

- des protéines Rep et de leur capacité à modifier l'expression d'un nombre important et non catalogué de gènes,
- de capacités des protéines de capsides (peuvent-elles se lier à un récepteur membranaire et déclencher une cascade d'évènements?),
- des structures primaire et secondaire de l'ADN.

*Là ou il y a continuité, habitudes [...] il y a toujours esclavage, friction, douleur. L'habitude est une chose morte à qui nous donnons la vie*

*Krishnamurti*

## V TRANSFERT DE GENES

### V.A GENERALITES

Toutes ces capacités délicieuses que sont l'intégration site-spécifique ou l'absence de pathogénicité ont débouché sur des tentatives de transfert de gènes à partir de vecteurs basés sur des AAV (entre autres, il y a aussi d'autres vecteurs: principalement des rétrovirus et des adénovirus), mieux connu sous le vocable « thérapie génique ».

Nous ne ferons pas le détail de toutes les expérimentations en cours. Nous évoquerons en revanche quelques applications avérées. Pour la seule année 1995, on dénombre plus de dix revues. C'est la première fois (je crois!) que l'on met en évidence un cas où AAV favorise à tel point la prolifération!

Par thérapie génique, nous entendons correction(s) permanente(s) ou à long terme d'un (ou plusieurs) gène(s) non fonctionnel(s), ou plus généralement dysfonctionnel(s), sans conséquences graves pour l'organisme.

Cette correction serait apportée par un gène normal ou artificiel, délivré par différents moyens physiques (liposomes, molécules conjuguées), ou biologiques (disons même viraux).

Puisque de thérapie il est question, et donc que guérison est sous-tendu, puisque l'inocuité —sinon l'efficacité— à long terme de tels systèmes de « délivrance » restent à démontrer, puisqu'enfin la permanence de la correction échappe aujourd'hui aux techniques mises en œuvre, il nous semble que le concept de thérapie génique est dans l'état actuel des choses un peu prématuré, sinon excessif.

Nous nous tiendrons à l'expression « transfert de gène », voire exceptionnellement à l'expression « correction génique ».

Les techniques existantes mettent en jeu plusieurs modes de transfert.

Virus	Type	Insert (kb)	état	stabilité	virus aidant	Toxicité
Retrovirus	ARNsb	10	intégré	+	-	-
Adenovirus	ADNdb	>8	libre	±	-	±
AAV	ADNsb	4-5	intégré	+	(+)	-
Herpes amplicon recombinant	ADNdb	~10	libre	±	+	±
		~30	épissomal	+	-	±

Tableau IV:  
Avantages comparés des différents virus utilisés  
pour le transfert de gènes (d'après Smith et al., 1995)

Parmi les vecteurs viraux les plus travaillés actuellement, on trouve:

- les herpes-virus
- les adénovirus
- les rétrovirus
- les AAV

Une comparaison rapide (voir tableau IV) entre les différents systèmes nous permet d'approcher les différents avantages et inconvénients de ces principaux systèmes de « délivrance ». Il existe aussi des technologies hybrides telle celle de Conway qui associe un AAV recombinant (AAVr) et un amplicon HSV-1 (Conway *et al.*, 1997).

Un vecteur doit présenter plusieurs critères pour être « utilisable » pour le transfert de gènes:

- Il doit maintenir une expression stable du gène d'intérêt;
- le gène transduit doit avoir la même spécificité cellulaire et la même régulation que l'endogène;
- le vecteur doit infecter et transduire efficacement la population ciblée;
- le produit du gène transduit doit être biologiquement actif;
- la population cellulaire transduite doit acquérir le phénotype correspondant à l'expression de ce gène.

A cela, nous pouvons ajouter que:

- les AAV peuvent infecter presque tout type cellulaire;
- les AAV de type sauvage s'intègrent en un site spécifique;
- les AAVr (les AAV recombinants, ou vecteurs, comprennent les éléments nécessaires à l'intégration et de AAV et un ou des gènes d'intérêt) peuvent transduire des gènes dans des cellules ne se divisant pas (Podsakoff *et al.*, 1994) comme des épithélia respiratoires (Flotte *et al.*, 1994), des neurones (Kaplitt *et al.*, 1994), tout en restant plus efficaces dans des cellules en division (Russell *et al.*, 1994).

Mais l'obtention de titres élevés de virus recombinants est difficile, et beaucoup de virus (voir réplication) subissent des délétions sévères et ne sont ni infectieux ni fonctionnels.

En cas de réussite, il est possible que la protéine synthétisée déclenche une réaction immunitaire (Herzog *et al.*, 1997), ce qui complique singulièrement les choses.

Une réaction immunitaire est attendue aussi contre la capsid virale. Une très large majorité de la population (>80%) est séropositive pour AAV (Blacklow *et al.*, 1968; Grossman *et al.*, 1992; Parks *et al.*, 1970, Malhomme données non publiées, voir chapitre infection naturelle). Une première infection par des AAVr conduira nécessairement à une production d'anticorps neutralisant. Si la technique nécessite une seconde infection (voir plus), quid de leur efficacité? D'autant plus que la recombinaison est possible, en tout cas *in vitro*, entre des virus incomplets et d'autres virus ou même des plasmides (Senapathy *et al.*, 1984). Bien sûr, dans la majorité des cas, les protocoles se passent *in vitro*, ou, si *in vivo* il y a, avec des modèles animaux.

Enfin de nouvelles techniques hybrides font leur apparition, comme celle développée par Wu, utilisant un vecteur adéno-associé « empaqueté » dans un virus de Sendai (Wu *et al.*, 1996) pour délivrer le neuropeptide murin Y efficacement dans les neurones d'un rat, ou celle développée par Conway et son système AAVr- amplicon HSV-1 (Conway *et al.*, 1997).

## V.B QUELQUES APPLICATIONS

### 1) Transfert dans les cellules hématopoïétiques

L'utilisation des AAVr a cinq ans de retard sur les travaux réalisés avec les rétrovirus.

Pour ces derniers le transfert de gène est utilisé en routine depuis près de 10 ans, et des tentatives de corrections ont déjà été réalisées avec efficacité notamment chez des nouveau-nés atteints d'immunodéficience sévère

combinée (Kohn, données non publiées, citées dans (Cohen & Downey, 1996).

Toutefois, ces transductions doivent être réalisées *ex vivo*, et impliquent une division cellulaire ou une stimulation par des cytokines, ou des drogues. L'efficacité de transduction de cellules non manipulées reste à démontrer. Enfin l'efficacité plutôt bonne dans le cas d'enfants reste de l'ordre de 1% chez les adultes avec des vecteurs rétroviraux.

D'après Ponnazhagan, l'infection par AAVr de progéniteurs hématopoïétiques souffrirait de résultats mitigés car il semble que la distribution des récepteurs soit très inégale dans la population (Ponnazhagan *et al.*, 1997b).

L'intégration d'AAVr n'est pas clairement établie, même si elle est probable. Les cellules transduites contiennent environ 1 à 2 copies par génome du gène d'intérêt. Chatterjee et ses collaborateurs montrent que les cellules souches hématopoïétique peuvent être transduites efficacement, le transgène étant retrouvé dans les organes hématopoïétiques et le sang au bout de six mois (Chatterjee & Wong, 1996).

### B) Transfert dans les cellules neuronales

Dans les maladies neurologiques héréditaires, le transfert de gènes est délicat car:

- les cellules sont post-mitotiques. La stratégie culture/infection *ex vivo*/retransplantation est impossible;
- leur localisation parfois disséminée;
- la barrière hématoencéphalique peut bloquer le passage du vecteur.

Seuls les HSV, les AAV et les Ad peuvent permettre la transduction de cellules quiescentes.

Kaplitt ou Du montrent avec succès une transduction de cette population (Du *et al.*, 1996; Kaplitt *et al.*, 1994). Kaplitt obtient même une correction phénotypique partielle de la maladie de Parkinson en modèle animal (rats). D'après Cown, une persistance d'expression du gène transduit

est encore détectable 3 mois plus tard dans un cerveau de rat (Cown *et al.*, 1996).

Ici encore, les vecteurs AAVr accusent un retard certain sur les vecteurs adénoviraux (Kahn *et al.*, 1995). Toutefois, à l'image des vecteurs dérivés des herpes virus, les vecteurs adénoassociés peuvent être cytotoxiques (Slack & Miller, 1996).

### C) Transfert dans les cellules épithéliales (mucoviscidose)

Historiquement (déjà!), les tentatives de correction des gènes de transport membranaire impliqués dans cette maladie sont parmi les premières (Flotte *et al.*, 1993a). Elles arrivaient toutefois 3 ans après les travaux de deux équipes indépendantes qui travaillent avec les rétrovirus.

Cette maladie est due à la déficience du gène CFTR (pour Cystic Fibrosis Conductance Regulator) responsable d'un défaut de transport des ions Cl<sup>-</sup>. La « Food and Drug Administration » recensait déjà en 1993, 46 protocoles de correction génique (Johnson, 1995). Ce type de maladie requière une infection *in vivo* par les vecteurs d'intérêt. AAV est donc bien placé.

Toutefois Kern montre que les recombinants AAVr-CFTR ne s'intègrent pas de façon site spécifique (Kearns *et al.*, 1996) dans des lignées épithéliales immortalisées.

### D) Et puis

Les tentatives les plus diverses sont faites. Pour exemple, hémoglobinopathies, troubles de l'audition, délivrance d'interferon, antisens contre les LTR de HIV,...

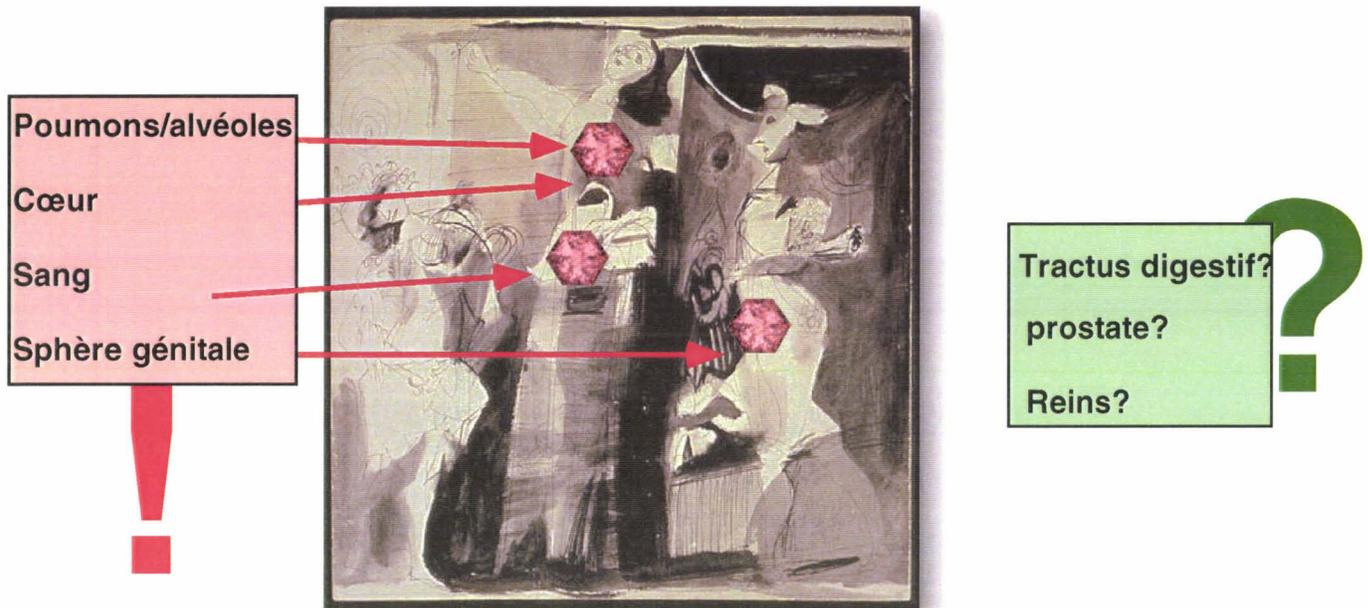


Fig. 17:  
Site avérés et sites possibles d'infection naturelle par AAV.  
Dessin "les trois danseurs" d'origine non établie, mais pourrait être Picasso

## VI AAV, COMPAGNON DE ROUTE (INFECTION NATURELLE)

Nous savons qu'AAV possède des propriétés singulières telles que l'oncosuppression, l'absence de pathogénicité associée, sa capacité à modifier la régulation de gènes hôtes, à modifier par ce biais, la biologie de la cellule. Après un chapitre sur les perspectives de soin apporté par correction de gènes déficients ou non fonctionnels (transfert de gènes), il est légitime de s'interroger, sur la prévalence d'AAV, l'éventuelle localisation du virus chez l'être humain. Et même, pourquoi pas, sur une recombinaison possible entre un hypothétique virus sauvage et un vecteur contenant un gène « thérapeutique ».

Bref, quid du virus chez l'homme?

On calmera ainsi l'inquiétude déterministe qui a dû se dessiner: comment un virus qui a besoin de virus « aidant » pourrait-il creuser son sillon dans le monde?

Poser ce type de question revient à considérer deux axes...

1) la recherche d'organes dans lesquels on trouverait *naturellement* des AAV (pas après des infections à 1000 particules par cellule);

2) les voies d'entrée, dans l'organisme, dans les organes, les voies de dissémination, les voies d'entrée dans les cellules. La très écrasante majorité des travaux réalisés jusqu'alors ne s'est intéressée (nous les premiers, *mea culpa*) qu'à la première thématique. Les données existantes sur ce sujet sont résumées sur la figure 17.

Une fois de plus, je vais privilégier une approche grossièrement chronologique pour exposer ce qui a été fait...

VI. A 1ERE EPOQUE: LA SEROEPIDEMIOLOGIE

Dans un premier temps, les données sont de nature séroépidémiologiques, du fait des premiers travaux publiés (Blacklow *et al.*, 1967).

Jusque là, les AAV n'avaient jamais été autre chose que des contaminants de stocks d'adénovirus (Hoggan *et al.*, 1966). Personne n'avait jamais isolé de virus à partir de sources « naturelles ». Atchinson en 1965 avait toutefois montré, en plus de belles photographies de microscopie électronique, qu'il y avait une réaction immunologique qui s'établissait lorsqu'étaient mis en contact sera humains et stock d'AAV (mais étaient-ils dépourvus d'adénovirus?).

La voie était donc ouverte et Blacklow et ses collaborateurs mettent en évidence des séroconversions dans une population de jeunes militaires et de pensionnaires d'une maison de correction. Ils trouvent dans 52 sera plus de 70% de séroconversions indépendamment du type (AAV-1 à 4), beaucoup d'individus d'ailleurs ayant des séropositivités multiples (Blacklow *et al.*, 1967b).

Cette étude porte ensuite sur une population d'enfants admis en hôpital, et montre pour la première fois que plus de 70% des enfants sont séropositifs, tous AAV confondus, dès la tranche d'âge de 5-10 ans. On ne trouve d'ailleurs quasiment pas d'AAV-4. Si la destinée du virus était totalement inconnue, il n'en reste pas moins que l'on sait alors qu'un virus ayant les mêmes propriétés qu'AAV infecte l'être humain, ce dès le plus jeune âge (Blacklow *et al.*, 1967).

Il récidive en 1968, et montre qu'il peut isoler 23 cas d'infection par AAV (en majorité de type 2) parmi 101 enfants montrant aussi des infections par différents adénovirus dont il précise que le type n'a aucune importance (95% des prélèvements positifs pour AAV contiennent des adénovirus, et la proportion est plus importante pour les enfants ayant des infections récurrentes à adénovirus).

Enfin l'auteur souligne qu'aucune pathologie ne peut être associée à la présence d'AAV. Cette affirmation devient le point de départ du paradigme

de l'inocuité d'AAV qui fera en partie le cheval de bataille des artisans de la thérapie génique (Blacklow *et al.*, 1968).

Le même, décidemment infatigable, Neil blacklow isole des particules virales de prélèvements anaux et laryngés chez des enfants ayant manifesté une séroconversion pour AAV-2, majoritairement et 3, accessoirement. Tous ces enfants manifestaient des infections aiguës par des adénovirus de type divers (Ad-1/2/3/7/9/26) (Blacklow *et al.*, 1971).

En marge de ces travaux qui concernent les humains, Blacklow, qui n'en démord pas, note l'incidence élevée d'AAV-1 chez les singes captifs (contaminés par l'Homme?) (Blacklow *et al.*, 1967b) ainsi que l'efficacité de la multiplication d'AAV-1 dans les lignées cellulaires simiennes co-infectées par le virus simien SV-15 (Atchison *et al.*, 1965).

Très tôt, s'est dessinée l'idée que l'on tenait là LE modèle idéal d'étude d'infection expérimentale *in utero*.

Une laparotomie exécutée sur des singes femelles gravides, et une injection dans le fœtus, 70-90 jours après conception, à travers la paroi utérine de différents cocktails viraux, a donné les résultats suivants:

- aucun des deux fœtus injecté n'a montré de signe clinique d'infection (pathologie et/ou anticorps dirigés contre AAV-1);
- aucun des animaux ne présentait non plus d'anticorps dirigés contre SV-15.
- les animaux infectés par SV-15 sont morts;
- AAV-1 a été retrouvé dans les frottis rectaux et laryngés des mères injectées avec AAV et le virus « aidant »;
- l'injection d'AAV-1/SV-15/Ac anti AAV-1 conduit à la mort du fœtus (avortement à 6 mois). On retrouve AAV-1 aussi bien dans le tissu placentaire que foetal.

D'autres auteurs confirment les résultats exposés sur la prévalence chez l'homme. Ils apportent des nuances: seulement 21% des enfants entre 2 et 3 ans sont séropositifs pour AAV, alors que le taux est de 80% à la naissance,

et va en déclinant, au fur et à mesure que décline la protection maternelle pour ensuite remonter à son maximum vers 8 ans (Parks et al., 1970). Toutefois les auteurs ne réussissent pas à isoler de virus de prélèvement anaux et laryngés.

Il est désormais clair qu'AAV infecte l'Homme, ce dès le plus jeune âge avec un pic d'anticorps neutralisant vers 8 ans. Aucune pathologie n'est associée avec cette infection.

Par contre dès 1971, on sait qu'il existe une corrélation inverse entre cancer et prévalence pour AAV, avec une prévalence pour AAV-3 qui passe de 34% dans une population témoin à 15,5% chez des sujets atteints de tumeurs (Sprecher-Goldberger *et al.*, 1971). Ces études sont confirmées dans d'autres circonstances expérimentales par Mayor en 1976 (Mayor *et al.*, 1976).

Chez un groupe témoin, la prévalence AAV-2/3 est de 75% pour passer à 30% dans une population de personnes avec différentes néoplasies. AAV-5 présente les mêmes propriétés où les titres d'anticorps sont environ trois fois supérieurs dans le groupe témoin, comparé aux résultats d'un groupe de personnes cancéreuses (Georg-Fries *et al.*, 1984). Dans ces deux derniers exemples, les tumeurs touchent la sphère génitale.

## VI.B SECONDE EPOQUE

Les travaux exposés jusqu'ici laissent supposer que l'on pourrait tester le tractus digestif avec succès pour AAV. Pour des raisons étonnantes, personne n'a jusque là étudié le propos. En revanche, on a documenté de façon assez précise la présence du virus dans d'autres organes.

AAV-5 est trouvé dans des lésions condylomateuses du pénis. Le virus est cultivable en cellules KB et nécessite la présence d'un virus aidant. Il semble très semblable à AAV-2, malgré une carte de digestion enzymatique différente. La réactivité croisée avec AAV1/4 est très faible (Bantel-Schaal & zur Hausen, 1984). Une étude du virus montre qu'il est aidé par les mêmes virus aidants (HSV, HCMV, VZV, Ad), qu'il infecte l'humain dont la séropositivité est de 60% chez l'adulte, et dont les plus haut titres sont

atteints entre 15 et 20 ans. Enfin il possède trois protéines de structure très voisines de VP1/2/3 d'AAV-2 et 3 (Georg-Fries *et al.*, 1984).

Il existe des indices quant à la distribution du virus dans l'organisme. AAV-2 est connu pour se trouver dans les cellules périphériques du sang, détecté par PCR (pour la première fois, on passe d'une détection immunologique à un test PCR) dans environ 4% des échantillons (Grossman *et al.*, 1992) ou dans 8,3% des cas (notre travail).

Grossman et ses collaborateurs ont isolé des lymphocytes et montré la présence d'AAV dans ces derniers, tout en montrant que, par test ELISA (pour Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), on pouvait confirmer dans cette même population une séropositivité d'environ 82%. De plus elle a montré que AAV pouvait se répliquer *in vitro* dans des lymphocytes échantillons (Grossman *et al.*, 1992).

Ces résultats font du sang un bon candidat à la dissémination d'une possible virémie, avec en marge une infection résiduelle d'une petite partie de la population lymphocytaire. Malheureusement le type lymphocytaire reste à déterminer, même si Anderson a montré l'infection des cellules myéloïdes (Anderson *et al.*, 1997).

Les voies d'entrée du virus restent floues. Si l'on sait qu'AAV-1 (prétendument virus simien, mais trouvé chez l'homme) infecte la souris, et en passe la barrière placentaire pour infecter l'embryon au niveau des poumons et des reins (Lipps & Mayor, 1980), il est difficile d'en tirer une quelconque information quant à une possible infection d'êtres humains avec des virus théoriquement humains...

Toutefois, AAV-2 a été détecté dans les échantillons provenant d'avortements répétés du premier trimestre (Tobiasch *et al.*, 1994) ainsi que récemment dans le liquide amniotique humain (Burguete *et al.*, 1997). AAV est même trouvé plus précisément dans les cellules trophoblastiques. Ces résultats nous ont permis de démontrer l'existence d'AAV à l'état latent quoique modifié dans des lignées de cellules établies telles que JAr, JEG-3 et BeWo (Dutheil *et al.*, 1997).

Il n'est pas possible encore de prétendre qu'il pourrait y avoir un lien entre une infection virale et une quelconque pathologie, toutefois, AAV est aussi connu pour déclencher des avortements chez la souris (Botquin *et al.*, 1994). Il est donc judicieux de continuer à chercher sa présence dans la sphère génitale.

Une détection en série par PCR sur un grand nombre d'échantillons de biopsies de col, montre que l'on retrouve les résultats des études séroépidémiologiques citées plus haut. 89% des échantillons provenant de femmes sans pathologies contiennent AAV (Malhomme, données non publiées).

Le nombre de personnes positives en PCR pour AAV diminue avec la progression de la gravité des lésions du col de l'utérus (pré-cancéreuses et cancéreuses). Il est de 34% dans le cas de personnes atteintes de carcinomes (nos travaux). Les tissus testés dans la sphère génitale se composent essentiellement de biopsies de col.

Dans les frottis cervicaux, on trouve aussi AAV dans 26% des échantillons (Burguete *et al.*, 1997). Des auteurs font état de résultats encore plus élevés (près de 50%), ce qui les a incité à formuler la possibilité d'une transmission sexuelle du virus (Han *et al.*, 1996). Possibilité que nous nous permettons de tempérer par l'évidence d'une présence d'AAV dans de nombreux (72%) lavages broncho-alvéolaires (Malhomme *et al.*, 1997a).

Il est même possible d'isoler des particules virales infectieuses à partir d'échantillons (Walz *et al.*, 1997c).

Les AAV coexistent d'ailleurs avec les papillomavirus, transmis en partie par voie sexuelle, dans les mêmes tissus (Malhomme *et al.*, 1997b; Walz *et al.*, 1997a). Ces derniers sont connus pour être impliqué dans la majorité des cancers des voies génitales chez les femmes notamment (zur Hausen, 1991). Il a été de plus montré qu'*in vitro*, les papillomavirus (HPV-16) se comportaient avec succès en virus aidant de AAV-2 et en permettant la réplication (Walz *et al.*, 1997a).

Des données très récentes situent aussi AAV dans le tissu cardiaque de façon significative, sans que l'on puisse attribuer ces résultats à la présence

de virus dans le sang. Les résultats suggèrent que le virus est présent en grande quantité (Klein-Bauernschmitt & Bauernschmitt, 1997).

AAV semble bien être à l'issue de cet exposé un virus relativement ubiquiste. Rien ne permet effectivement jusque là de conclure à une possible pathogénicité, ce qui valide *par défaut* l'inocuité du virus, avec les réserves qui s'imposent.

Nous sommes, pour conclure cette introduction, en présence d'un virus capable de modifier de façon importante les propriétés de cellules, au niveau moléculaire comme au niveau cellulaire. Il dispose pour cela de moyens divers:

- les protéines Rep (régulation de l'activité de nombreux promoteurs),
- les protéines de capsides (interaction possible avec des récepteurs membranaires),
- les ITR (intervenant directement par des mécanismes restant à établir).

Ces modifications cellulaires peuvent interrompre des voies de transformation, activer des voies de différenciation, moduler le déroulement du cycle cellulaire.

AAV est un virus:

- dont le génome viral s'intègre dans celui de la cellule hôte, mais pas exclusivement (il y a des formes épisomales), avec de nombreux réarrangements, car l'ADN cellulaire comme l'ADN viral sont localement très instables. Il n'est pas possible pour le moment d'exclure la possibilité que l'intégration dans le chromosome 19 soit la seule qui ne soit pas létale, et/ou la seule suffisamment stable pour être caractérisée;
- dont la réplication est possible sans apport extérieur tout en étant nettement stimulée par des agents extérieurs dont la liste reste à établir;
- dont la production virale est lytique (en présence de virus aidant) et non établie en l'absence de ces derniers;
- dont l'entrée dans l'organisme est aussi discrète que son cycle de vie;

- dont l'existence dans l'organisme, bien qu'attestée, reste peu connue, de même que les effets qu'elle peut y avoir.

Parmi cette masse d'interrogations, nos travaux ont porté jusque là sur la recherche d'organes cibles de l'infection virale.

Nous avons testé de nombreux prélèvements et biopsies de la sphère génitale et avons pu mettre en évidence la coinfection d'un tissu avec HPV et AAV (première publication).

E. Tobiasch et ses collaborateurs avaient montré l'existence d'AAV dans le syncytiotrophoblaste et les tissus d'avortements à répétition (Tobiasch *et al.*, 1994). C'est assez naturellement que nous avons commencé à travailler sur les lignées trophoblastiques Jar, JeG-3 et Bewo, pour découvrir à notre surprise que ces lignées contenaient des séquences d'AAV (voir seconde publication).

Le troisième article, en préparation, concerne notre récente découverte de l'existence de séquence d'AAV dans les poumons, AAV qui coexistent là avec des adénovirus, des herpes virus (HCMV) et des HPV.

*(Même au dessus de la pierre, trois ans)**proverbe japonais*

*Dans le chapitre sur les virus « aidant », nous avons détaillé le contenu du concept, sans le remettre en question. Dans cette dernière partie, nous voudrions prendre quelque distance avec l'idée qu'un virus « aidant » soit requis pour la réplication et la production virale.*

*Nous exposerons ci-dessous les arguments que nous voudrions faire valoir.*

## VII DE LA DEFECTIVITE

Peut-être AAV a-t-il fait le rêve de Carazan (relaté dans la Bible: Carazan est un homme très riche et d'une extrême avarice. Une nuit Dieu lui envoie le rêve suivant: A sa mort, il est condamné à la solitude pour l'éternité. A son réveil, profondément marqué, il distribue ses biens et change son mode de vie). Alors la défektivité ne serait qu'une astuce pour rester pauvre et entouré?

Toujours est-il que la distinction autonomes/dépendovirus peut souffrir de frontières floues. Le poids de raisons historiques justifie en lui-même le nom de dépendovirus, mais qu'en est-il réellement?

Ut sonnant, virus aidant signifierait un virus... qui aide! les fonctions d'AAV. Un glissement sémantique s'est opéré de sorte que cette expression est maintenant synonyme de virus absolument requis pour la production virale.

### A) AAV PEUT SE REPLIQUER SANS VIRUS « AIDANT »

Il existe nombre de situations où AAV peut se répliquer en l'absence de virus aidant (voir plus loin), par là même devenir « autonome ».

Des lignées cellulaires infectées de façon latente par AAV montrent, au delà d'un nombre élevé de passage, qu'AAV subit de plus en plus de réarrangements, et l'on peut détecter des copies libres du virus (Cheung *et al.*, 1980)

Il a été montré que certaines lignées cellulaires étaient permissives pour la réplication, dans des conditions d'irradiation par les U.Vs, et/ou en cas stress génotoxique (Yakobson *et al.*, 1987; Yalkinoglu *et al.*, 1988). Yakobson montre même que l'on peut obtenir des virions infectieux.

Leppard suggère à ce sujet que —comme les adénovirus— AAV semble nécessiter un environnement où l'appareil de réparation de l'ADN est actif (Leppard, 1997). Cette condition peut être remplie avec la machinerie cellulaire seule. Les virus aidant ayant la capacité, en large majorité, d'induire très tôt après infection des dégâts variés, notamment des cassures, sur l'ADN de la cellule hôte (Schlehofer & zur Hausen, 1982; zur Hausen, 1991).

De tels dégâts peuvent rendre compte à eux seul de l'activation du système de réparation. Les protéines virales « aidante » pourraient très bien être toutes protéines induisant des dégâts sur l'ADN. On peut être tenté de formuler une théorie « unificatrice » visant à dire que AAV est poussé à la multiplication par tout stress suffisamment important (pour déclencher le système de réparation) et localisé (touchant l'ADN).

### B) UNE MACHINERIE COMPLETE?

En echo des expériences citées ci-dessus:

Un plasmide contenant les ITR, l'origine de réplication et les promoteurs P5 et P19 (sans gènes) se réplique dans des cellules traitées par le carcinogène génotoxique MNNG, de façon semi-conservative.

L'examen en microscopie électronique montre des complexes protéiques cellulaires au niveau de l'origine de réplication d'AAV (Yalkinoglu *et al.*, 1991). Ceci laisse supposer qu'ensemble, la machinerie cellulaire et les virus disposent déjà de tous les éléments nécessaires à la réplication.

### C) LA DISTINCTION PARVOVIRUS AUTONOMES/DEPENDOVIRUS EST FLOUE

On vient de citer plusieurs cas où AAV est productif sans coinfection « aidante ». A l'inverse, le parvovirus autonome H-1 ne peut se répliquer dans des cellules ne se divisant pas. Si on infecte une culture pré-senescente de cellules embryonnaires humaines de poumon avec H-1, on n'obtient de réplication que si ces dernières sont coinfectées par un adénovirus de type 12 (Ledinko *et al.*, 1969) à l'exemple d'AAV. De plus cet effet s'accompagne comme chez les AAV, d'une inhibition de la réplication et de l'expression du virus aidant.

Rappelons que les parvovirus autonomes restent relativement dépendants de l'étape du cycle cellulaire de leur hôte, et notamment du passage de la cellule en phase S.

### D) CERTAINS CONCEPTS NE SONT PAS AISEMENT TRANSPOSABLES IN VIVO

Prenons un exemple: nos travaux ont montré que l'on trouvait de façon très fréquente de l'AAV (probablement AAV-2) dans les lavages broncho-alvéolaires.

AAV est-il un virus défectif dans un organe justement soumis, entre pollution, tabac, infections virales et autres avatars de la vie, à toutes sortes de stress génotoxiques? Quel est le sens de l'expression « stress génotoxique » dans une telle situation?

Certaines données *in vitro* souffrent d'être sans réalité *in vivo*. Par exemple, les deux expériences qui suivent:

- si on utilise des extraits cellulaires auxquels on ajoute des protéines Rep pour répliquer *in vitro* le virus, le taux de réplication est augmenté d'un facteur 50 si ces cellules ont été préalablement infectées par Ad (Ward & Berns, 1996);

- Myers montre qu'avec des adénovirus présentant une protéine E2 mutante, il obtient 100 fois moins de virus (Myers *et al.*, 1980).

Une réplication 50 fois moins importante, ou une production virale 100 fois moins importante ne signifient pas « pas de réplication » ou « pas de production ».

Si l'infection est possible, voire la production virale, quelle est la signification biologique « 100 fois plus ou moins » de virus lors de l'infection?

La question reste posée: La virémie est-elle possible *in vivo* en l'absence de virus « aidant »?

Nous nous trouvons en face de données apparemment contradictoires. Blacklow est le seul à mettre en rapport virémie à AAV et virémie adénovirale (Blacklow *et al.*, 1967; Blacklow *et al.*, 1971). La totalité des autres travaux suggérant une dépendance à un virus « aidant » se réfèrent à *in vitro*, même les données les plus récentes sur l'effet aidant d'HPV-16 sont des travaux *in vitro*.

#### E) AAV REPRIME SA REPLICATION

Un certain nombre de travaux plaident en faveur d'une répression active de la réplication (Berns *et al.*, 1988). Les protéines Rep (on l'a vu dans les chapitres précédents) sont capables de réguler négativement ou positivement en fonction de conditions cellulaires, l'activité des promoteurs homologues.

Toujours en 1988, Labow et ses collaborateurs montrent que l'on peut réaliser un hybride de SV-40 et de AAV. Ils remplacent le P5 ainsi que les éléments en amont jusqu'à la limite des ITR, par les éléments de régulation de SV-40 (promoteur, activateurs et origine de réplication), dans une orientation correcte (Labow & Berns, 1988).

De façon inattendue, l'hybride se comporte exactement comme AAV. Aucune transcription n'a pu être détectée sans coinfection par virus aidant.

La coinfection par adénovirus permet et la réplication de l'hybride, et la production de virions infectieux.

L'orientation des éléments de SV-40 fait que ces derniers se comportent exactement (de façon indistinguable) comme P5 (Labow & Berns, 1988).

Peut-être doit on alors chercher ailleurs l'explication de comportements si particuliers. On peut imaginer un rôle de la configuration toute particulière des régions entourant le promoteur, ou un rôle des protéines virales .

Tous ces éléments nous poussent à poser la question de la défektivité des AAVs. Il est irréfutable que nombre de virus permettent une production plus massive de virions, comme nous l'avons exposé dans la première partie de ce chapitre.

L'action des protéines de certains virus (ex: adénovirus Ward & Berns, 1996) nous amène à formuler l'hypothèse que des interactions moléculaires peuvent forcer la réplication en supprimant les voies d'auto-régulation négatives exercées par les protéines Rep.

On peut également considérer ces infections comme des formes de stress toxiques pour la cellule. Stress dont on sait qu'il peut permettre la production de virions.

Comme on l'a évoqué plus haut, tous les virus « aidants » sont des virus induisant très tôt des dommages dans l'ADN de la cellule hôte. La modification de l'environnement cellulaire peut forcer, ou amener, le virus (car son « hôte » semble en danger) à déclencher sa multiplication. Hors de ces situations, la latence est peut-être une situation normale.

Il faut aussi considérer que ce concept de virus « aidant » est une expression issue du travail de laboratoire. Si AAV est un virus naturellement « relâché », et n'est produit qu'au fur et à mesure de la division (et/ou des passages tardifs), voire de la présénescence des cellules, le virus devient difficile à étudier.

La garantie d'une « télécommande » permettant une production virale quand elle est nécessaire est un outil capital pour l'étude.

Si on ne l'obtient que par ce coup de pouce biologique, cela ne signifie pour autant pas qu'outil scientifique se confonde avec réalité biologique. La défektivité pourrait donc être aussi un artéfact de laboratoire.

On a évoqué ce fait: AAV est un candidat pour le transfert de gènes.

L'utilisation d'un vecteur pour le transfert de gènes impliquent un certain nombre de prérequis: une capacité à s'exprimer de façon stable et durable, à modifier le phénotype de la cible, et le fait de conserver une régulation similaire à celle de l'endogène.

Dans le cas d'un vecteur basé sur un virus distribué largement dans l'espèce humaine, il apparaît légitime sinon nécessaire de préciser quels sont les organes de nature à « accueillir » le virus dans des conditions naturelles d'infection; population dont il faut rappeler la séropositivité élevée.

Il faut rappeler aussi qu'AAV est doté de solides et nombreux moyens de modifier la balance d'expression de très nombreux gènes. Le virus est aussi capable de modifier la position d'une cellule donnée sur ses voies de différenciation.

Les travaux que nous avons alors réalisés ont permis —on les a déjà évoqué dans le chapitre sur l'infection naturelle— de préciser plusieurs de ces sites d'infection.

Le chapitre qui suit, exposant les publications illustre donc le choix que nous avons fait d'identifier des sites d'infection naturelle par AAV.

**Des tissus génitaux contenant l'ADN  
d'AAV ne contiennent pas d'ADN des virus  
aidant adénovirus, cytomégalovirus et  
herpes simplex, mais contiennent  
fréquemment de l'ADN de papillomavirus  
humains.**

A) Résumé

Le parvovirus défectifs adéno-associé de type 2 (AAV-2) est détecté dans des biopsies de matériels provenant d'avortements du premier trimestre, et de biopsie d'utérus. Ce fait soulève l'interrogation suivante: peut-on détecter, dans les même échantillons, des séquences des virus aidants connus pour AAV, ce en dépit de l'absence d'indications histologiques de leur présence?

Des analyses par PCR ont été faites. Aucun des virus suivant: HCMV, Ad et HSV n'a été trouvé. En revanche, on a mis en évidence la présence d'HPV (dont il a été récemment montré qu'ils pouvaient agir *in vitro* en virus aidant, (Walz *et al.*, 1997a) dans environ 60% des biopsies de col, ainsi que dans quelques biopsies fraîchement prélevées de lésions du col utérin et dans 70% des échantillons d'avortement du premier trimestre.

## 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 Tumorstudiologie, 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

**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.

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<sub>2</sub> 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

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 TCC TGC TT	
	Probe*	TTG CAA GAC CGG ATG TTC AAA TTT	
HCMV	Primer 1	171756† GAC CCG CTG TTT CCA GAG TTG GCC GAA G	Buffone <i>et al.</i> (1990)
	Primer 2	17249† GGA GCA CTG AGG CAA GTT CTG CAA TGC CGC	
	Probe*	GCC ATC CAC ATC TCC CGC TTA TCC TCA GG	
HSV-1	Primer 1	93536‡ ACG ACG ACG TCC GAC GGC GA	Fuchhammer-Stöckl <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 (general)¶	CP-I	TTA TCA WAT GCC CAY TGT ACC AT	Baay <i>et al.</i> (1996)
	CP-IIg	ATG TTA ATW SAG CCW 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	
	GP1	TGG TAC AAT GGG ATA TGA T	
	GP2	AAT GGC TTT TGG AAT TTA CA	
HPV (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	GSA ATA CAT GCG CCA TGT GG	
	HPV-11.2	CSA 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 probes	HPV-6*	CAT TAA CGC AGG GGC GCC TGA AAT TGT GCC	Walboomers <i>et al.</i> (1992)
	HPV-11*	CGC CTC CAC CAA ATG GTA CAC TGG AGG ATA	
	HPV-16*	GCA AAC CAC CTA TAG GGG AAC ACT GGG GCA	
	HPV-18*	TGG TTC AGG CTG GAT TGC 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)

	Tested for Ad*		Tested for HCMV†	Tested for HSV-1‡ (HSV-1/2)§	Tested for HPV   generic primers			HPV types specific anti- contamination primers	Tested for all viruses	
	n	AAV			n	n	-			+
Early miscarriage	26	+	24	26	25 (16)	26	8	18	HPV-16 6 HPV-18 2 HPV-16/18 2 HPV-11 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 2 HPV-11 1	2
Uterus mucosa	9	+	9	9	9 (7)	9	6	3	HPV-16 1 HPV-18 1 HPV-16/18 1 HPV-11 1	9
Cervix uteri (normal/metaplasia)	6	+	6	6	6 (5)	6	1	5	HPV-16 1 HPV-18 2 HPV-11 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 1 HPV-16/18 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

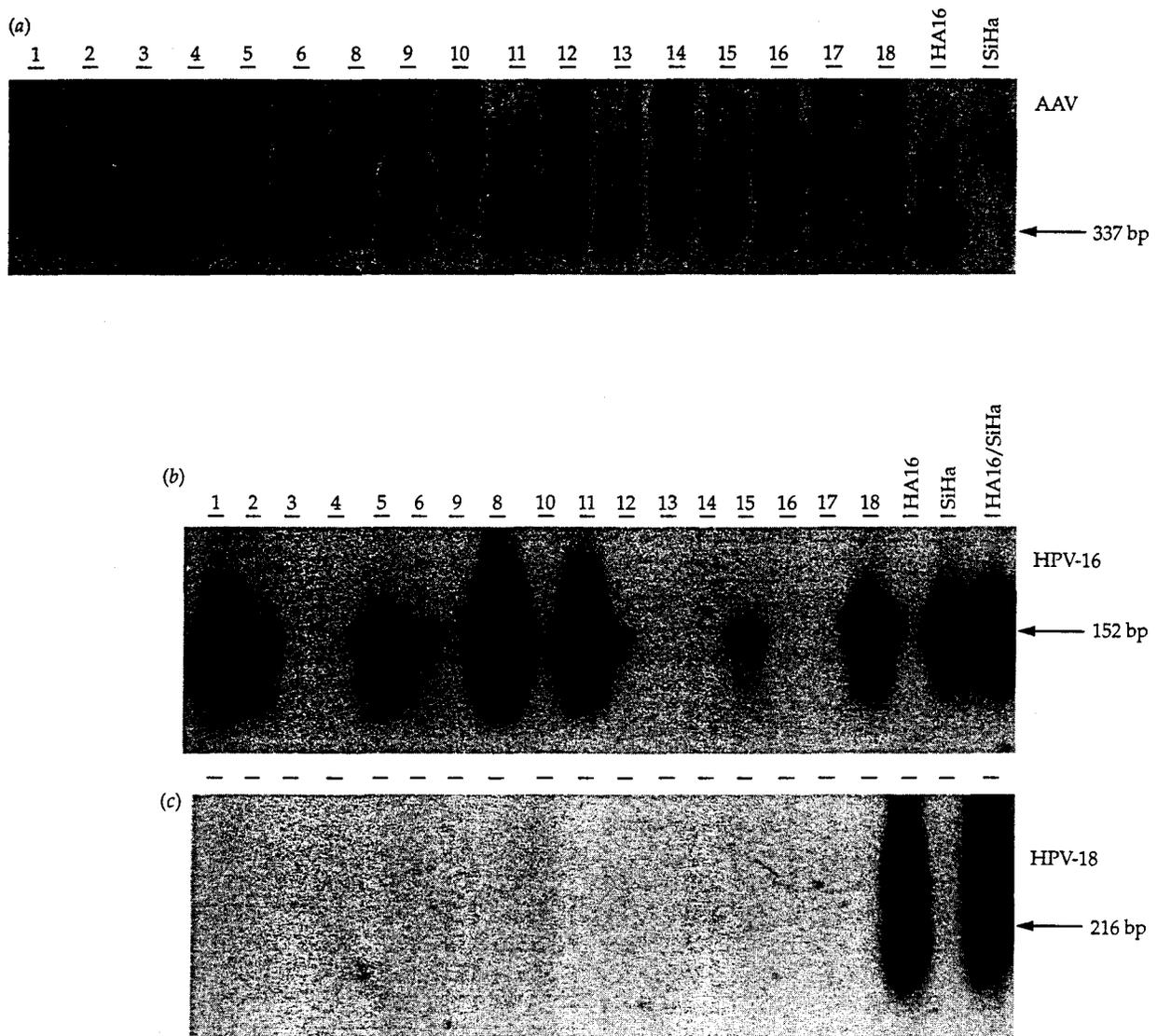


Fig. 1. Analysis by PCR for the presence of AAV-2, HPV-16 and HPV-18 DNA sequences in fresh cervical biopsies (CIN lesions). (a) Southern blot of PCR-amplified AAV-2 sequences probed with a  $\gamma$ - $^{32}$ P-labelled oligonucleotide as described in Tobiasch *et al.* (1994). Controls are HA16 cells 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.
- Armbruster-Moraes, E., Ioshimoto, L. M., Leao, E. & Zugaib, M. (1994). Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecologic Oncology* **54**, 152-158.
- 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., Geletneky, 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., Helmerhorst, 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., Melkert, 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.
- Walz, 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.
- Walz, 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

## B) Discussion

Nous avons étudié de nombreux spécimens de biopsie de col et de corps utérin, ainsi que d'avortements du premier trimestre, dont environ 89% contiennent des séquences d'ADN d'AAV.

Parmi ceux ci, nous en avons choisi une partie, tous positifs pour AAV, dans laquelle nous avons cherché des virus aidant putatifs.

Environ 60 % des échantillons contenaient différents types d'HPV parmi les six types recherchés (6, 11, 16, 18, 31 et 33), et 70 % dans le cas d'avortements du premier trimestre. Souvent plusieurs types coexistent dans un même échantillon.

Ce travail nous a permis de mettre en valeur la présence dans un même tissu d'AAV et d'HPV. Ce travail est à mettre en parallèle avec celui de Walz et de ses collaborateurs, qui ont montré que HPV-16 était capable *in vitro* de stimuler la réplication d'AAV (Walz *et al.*, 1997a). Il est possible qu'AAV assume ce rôle *in vivo*.

L'un (HPV) est un virus oncogène, l'autre (AAV) est un virus oncosuppresseur. Il est tentant de chercher à approfondir les relations unissant ces deux espèces si ils coexistent dans une même cellule. Nous pensons établir le modèle suivant:

- AAV est semble être intégré dans les cellules des organes où il est naturellement présent (Dutheil *et al* 1997).

- HPV peut renforcer l'expression et la production des produits parvoviraux (Walz *et al.*, 1997a).

- Ces produits, en retour, régulent négativement l'expression des protéines E6 et E7 d'HPV (Hermonat, 1994b; Hörer *et al.*, 1995).

- La cellule est « poussée » vers une voie de différenciation. HPV nécessite, pour sa multiplication, l'existence d'un degré de différenciation de la cellule. De ce fait, HPV est « poussé » vers une voie de multiplication virale au dépend de la voie de latence, plus propice à la transformation, et au détriment de l'expression des oncogènes.

Nous nous attendrions, en vertu de ce modèle, à voir co-habiter virémie AAV et virémie HPV. Nous nous attendons aussi à voir apparaître plus facilement, dans les tissus sièges d'une double infection, des lésions virales que des dysplasies voire des néoplasies.

## Présence d'ADN de séquences d'AAV-2 intégrées dans quatre lignées cellulaires d'origine embryonnaire

### A) Résumé:

Le parvovirus adéno-associé AAV a été trouvé dans des tissus génitaux humains tels que des avortements du premier trimestre. Dans ce cas, l'ADN et des protéines virales d'AAV ont été détectées principalement dans la couche cellulaires trophoblastique.

Dans cette publication, nous montrons que l'ADN d'AAV est aussi présent dans des lignées trophoblastiques établies (JEG-3, Jar et BeWo), ainsi que dans une lignée amniotique

Dans ces lignées cellulaires, AAV a pu être détecté aussi bien par PCR que par Southern blot. Une analyse par enzymes de restriction a permis d'établir qu'AAV était intégré.

Ces cellules permettent une réplication d'AAV-2 si elles sont co-infectées par AAV-2 et Ad-2. La seule infection par Ad-2 ne permet pas de réactivation de la réplication virale à partir de sa position intégrée. Le génome d'AAV a subi des réarrangements et/ou des délétions, que nous avons détecté.

La présence d'AAV dans des cellules dérivées de tissus embryonnaires humains corrobore l'hypothèse que le tissu embryonnaire pourrait être l'une des cibles de l'infection naturelle par AAV.

- 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.
- Malhomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., Armbruster-Moraes, E., Schlehofer, 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 JAr 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.
- Schlehofer, 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. & 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.
- Walz, 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.
- Walz, 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.

---

Received 9 July 1997; Accepted 24 July 1997

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; Walz & 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-1 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-Lantzsch for Tera-1 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.

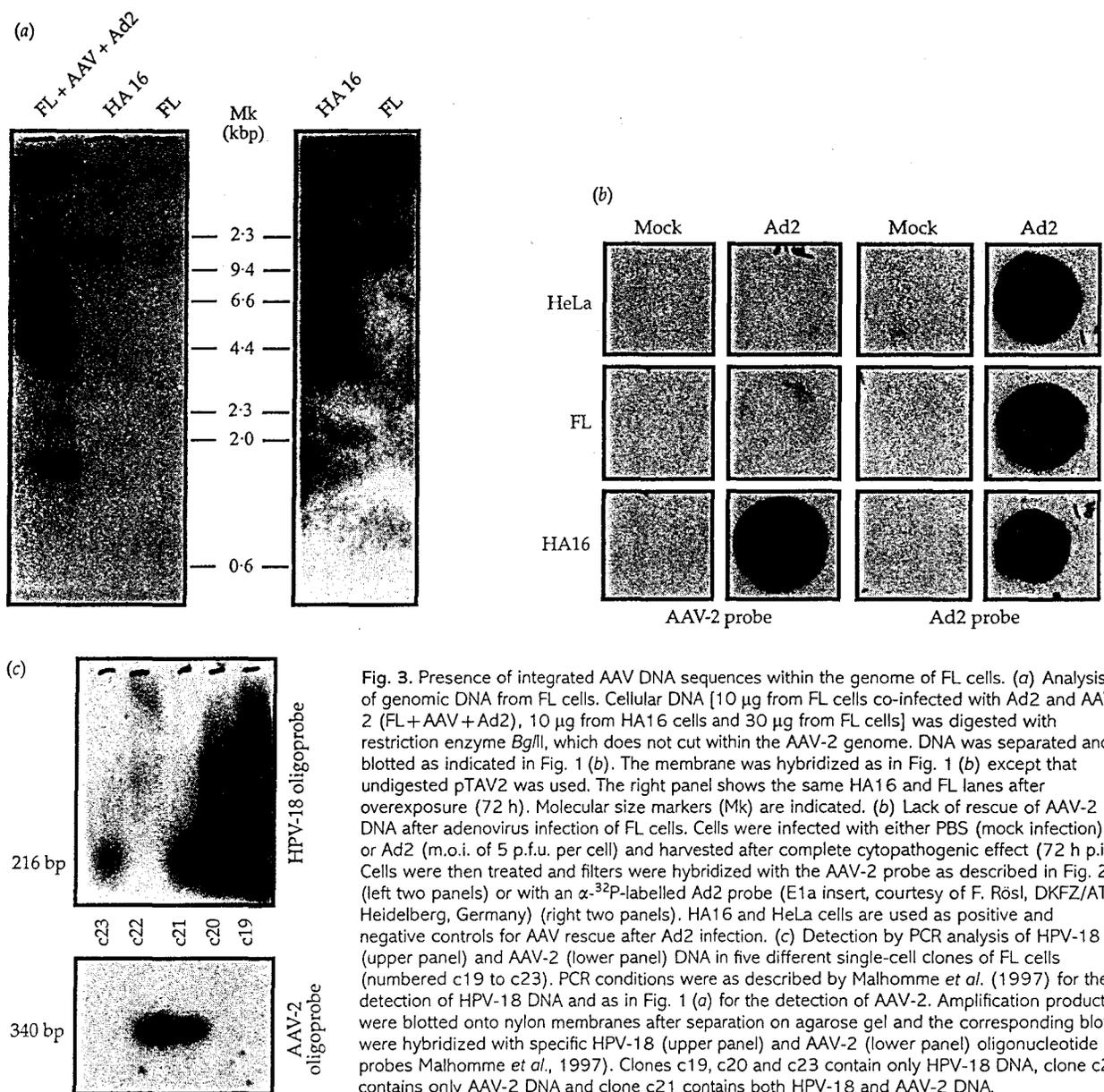


Fig. 3. Presence of integrated AAV DNA sequences within the genome of FL cells. (a) Analysis of genomic DNA from FL cells. Cellular DNA [10  $\mu$ g from FL cells co-infected with Ad2 and AAV-2 (FL+AAV+Ad2), 10  $\mu$ g from HA16 cells and 30  $\mu$ g from FL cells] was digested with restriction enzyme *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  $\alpha$ - $^{32}$ 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

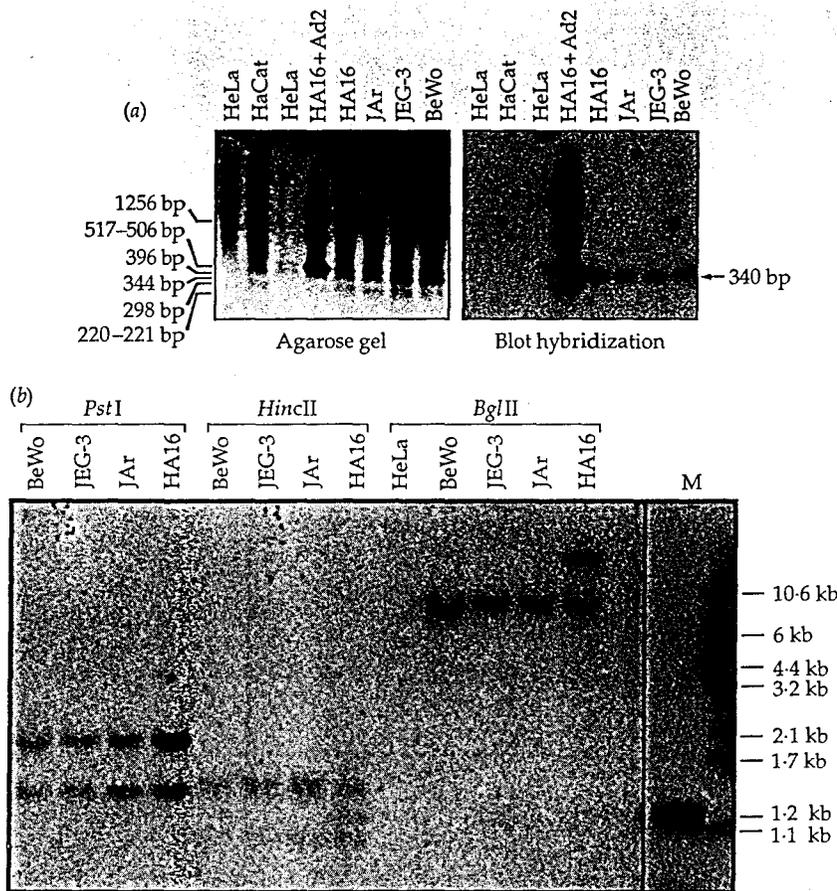


Fig. 1. Characterization of AAV-2 DNA sequences integrated in the genomic DNA of BeWo, JAr and JEG-3 cells. (a) Detection by PCR analysis of AAV-2 DNA in BeWo, JAr and JEG-3 cells. Left panel: ethidium bromide staining of an agarose gel of the amplification products obtained after PCR (as described by 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  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -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  $\mu\text{g}$ ) was digested with *HincII* or *PstI*, which cut within the AAV-2 genome, or *BglIII*, a non-cutting enzyme, as indicated. DNA was separated by agarose gel electrophoresis, blotted onto a nylon membrane, and hybridized with a  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -radiolabelled AAV-2 probe obtained after restriction of the pTAV2 plasmid (Heilbronn *et al.*, 1990) with *NcoI* (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.

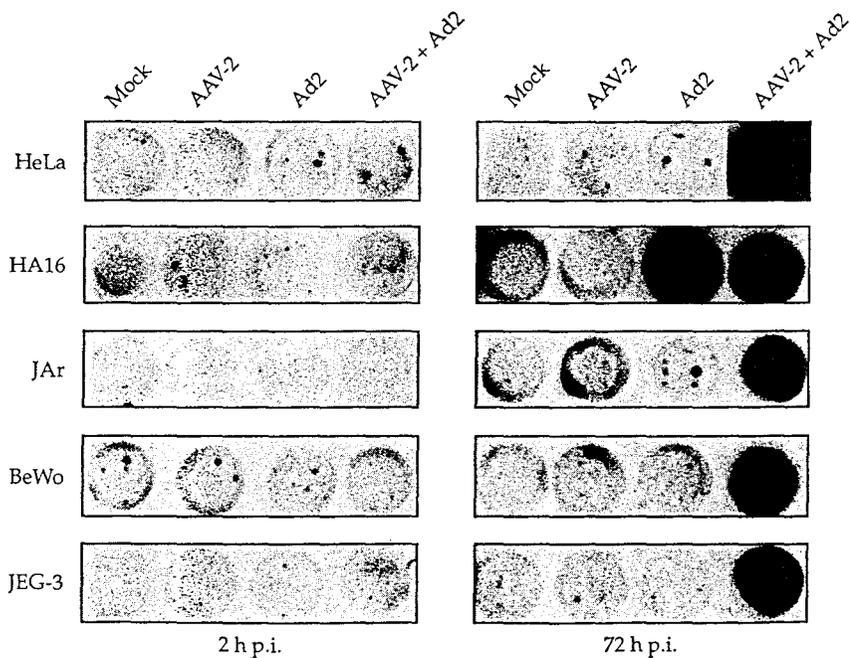


Fig. 2. Replication of AAV-2 DNA after adenovirus infection of BeWo, JAr and JEG-3 cells. Cells were infected with PBS (mock infection), Ad2 (m.o.i. of 5 p.f.u. per cell), AAV-2 (m.o.i. of 10 p.f.u. per cell) or Ad2 + AAV-2 (m.o.i. of 5 and 10, respectively), and harvested at 2 h post-infection (p.i.) 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  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -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-

## 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 Tumorstudiologie, 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

## B) Discussion

L'identification d'AAV dans la sphère génitale dans des prélèvements provenant d'avortement du premier trimestre (Han *et al.*, 1996; Malhomme *et al.*, 1997b; Tobiasch *et al.*, 1994) et la confirmation de ces résultats par l'identification d'AAV dans un organe d'origine embryonnaire nous ont poussé à étudier les lignées de choriocarcinomes BeWo, JEG-3 et JAr.

Ces lignées présentent de nombreuses caractéristiques de trophoblastes, et nous ont semblé de bon modèles pour l'étude *in vitro* de l'influence d'AAV.

A notre surprise, ces lignées se sont révélées déjà contenir des séquences d'AAV. L'intégration naturelle d'AAV dans une lignée cellulaire n'avait jamais été démontrée auparavant, hors condition d'infection expérimentale. Il est donc raisonnable d'envisager que le tissu embryonnaire puisse être une cible naturelle de l'infection par AAV.

Le virus toutefois ne peut être réactivé. Il semble qu'il ait subi de nombreux réarrangements/délétions le privant d'une partie de son génome. Ceci n'exclut pas les mutations (AAV dans la lignée JEG-3 est muté sur la paire de bases 499, un mutation invalidante pour les Rep).

Nous ne savons pas comment AAV peut être présent dans une cellule transformée (choriocarcinome) sans que la biologie de cette dernière n'en soit modifiée. Il est en revanche tentant de faire l'hypothèse que cette coexistence n'est possible que parce qu'AAV est incomplet.

Cet état d'AAV est à rapprocher des réarrangements subis par le virus lors de l'intégration, et au fil des passages cellulaires. Une différence doit être notée: on peut en général en obtenir une production virale par réactivation.

Ces lignées possèdent une autre caractéristique non négligeable: à l'inverse de ce qui est généralement observé dans des conditions d'intégration artificielle (Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991), les fragments d'ADN génomique où est intégré AAV sont tous de la même taille.

L'existence d'un même phénomène dans des lignées différentes, isolées dans des laboratoires différents interroge.

Ce phénomène n'est pas tout à fait neuf car —dans des conditions d'intégration artificielle, il est vrai— Shelling et ses collaborateurs ont obtenu une intégration avec un AAV recombinant Rep78/68-Néomycine (Shelling & Smith, 1994), avec le même type d'intégration (les fragments génomiques où le vecteur est intégré ont tous la même taille).

Nos tentatives de caractérisation du site d'intégration des séquences virales basées sur un protocole établi n'ont pas permis de retrouver des sites jusque là déjà caractérisés (Samulski *et al.*, 1991). D'autres sites d'intégration au long de la séquence AAVS1 ont depuis été décrits. Il est possible que ce soit le cas ici. Le travail permettant la caractérisation des sites d'intégration reste à faire.

Quoi qu'il en soit, la répétitivité du profil d'intégration décrit ici suggère que l'infection naturelle par AAV conduit à une intégration provirale plus simple que celle rencontrée jusqu'alors dans les situations expérimentales (ayant impliqué d'ailleurs essentiellement des cellules possédant des marqueurs HeLa). Ce travail nous permet de confirmer que les trophoblastes sont une cible naturelle de l'infection par AAV. La présence de ces virus pourrait avoir un effet sur le devenir des cellules à l'interface mère-enfant.

# Les lavages broncho-alvéolaires contiennent des séquences d'ADN d'AAV ainsi que des séquences des virus aidant adénovirus, cytomégalovirus humain et papillomavirus

## A) Résumé

Les AAV, considérés d'une totale inocuité, sont le sujet de beaucoup d'espoirs pour leur usage en thérapie génique. Des rapports font état de la présence de ces virus dans des organes humains ou des lignées établies, parfois de façon intégrée, et la séropositivité de la population avoisine 80%.

Dans le but de préciser d'autres cibles de l'infection virale naturelle que celle déjà mentionnées, telles que le col et le corps utérins et le placenta (Tobiasch *et al.*, 1994; Malhomme *et al.*, 1997; Walz *et al.*, 1997a), nous avons testés des lavages broncho-alvéolaires pour la présence d'AAV.

Dans ce travail nous rapportons avoir trouvé des séquences d'ADN de AAV par PCR, avec un prévalence élevée (72% de 79 échantillons).

Les séquences de virus aidant putatifs infectant les voies respiratoires ont été recherchées et les prévalence trouvée sont de 43% pour HCMV, 52% pour Ad et 77% pour HPV.

Des tentatives de détection par Southern blot se sont révélées infructueuses, suggérant la présence d'une petite quantité de virus.

Aucun lien évident avec les pathologies liées aux échantillons, ni aucune interaction évidente AAV-virus aidant ne peut être tirée de ce travail. Toutefois, plus de 80% des échantillons sont positifs pour au moins deux virus, et plus de 60% des échantillons contiennent au moins AAV et un ou plusieurs HPV. Seuls 5 échantillons positifs pour AAV sur 57 ne contiennent aucun virus aidant.

**Human broncho-alveolar lavages contain sequences of Adeno-associated viruses as well as sequences of helper viruses, i.e. Papillomaviruses, Human Cytomegalovirus and Adenoviruses.**

**Olivier Malhomme,  
Alexias Deprez,  
Philippe Gosset,  
Jörg Schlehofer  
and Thierry Dupressoir.**

**CNRS UMR 319, Mécanismes du Développement et de la Cancérisation, Institut Pasteur de Lille, Lille - France (O.Malhomme, MSc., A. Deprez, BSc., T. Dupressoir, PhD.).**

**INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, Lille - France. (P. Gosset, MD.)  
Andewandte Tumorstudiologie, DKFZ, Heidelberg - Germany (Pr. J.R. Schlehofer, MD., PhD.).**

**Correspondence to : Dr. T. Dupressoir, UMR 319 CNRS, Institut Pasteur de Lille  
1, rue du Pr. Calmette, F-59019 Lille Cedex - France.**

**Phone:(33) 320 87 72 09 Fax:(33) 320 87 79 08 E-mail:tdupress@infobiogen.fr**

## Summary

**Background** Adeno-associated parvoviruses (AAV), which need helper functions to replicate, are considered to be innocuous to humans and hold great promise for their use as virion vectors in gene therapy. However, they were repeatedly found to be present, sometimes as latent integrated proviruses, in various human tissues, including genital tissues which led one to propose sexual intercourse as a route for virus transmission between individuals. The overall seropositivity of the population reaches 80% in adults and seems to develop early in the childhood. With intent to precise possible primary targets and possible routes of AAV infections in humans, we checked broncho-alveolar lavages for the presence of AAV and helper viruses DNA sequences.

**Methods** We performed PCR amplification assays to detect viral DNA sequences of AAV, human papillomavirus (HPV), human cytomegalovirus (HCMV) and human adenoviruses (Ad) in 79 broncho-alveolar lavages (BAL) indicated for various diagnostic or corroborative purposes. The presence of viral DNA in the samples was assessed by electrophoretic separation and (when indicated) molecular hybridization of the amplified products.

**Findings** Out of 79 BAL samples tested for all viruses, 57 and 61 were positive for AAV (72%) and HPV (77%) respectively. Forty-four samples were positive for, at least, both AAV and HPV DNA sequences. HCMV and Ad sequences were found in 33 (43%) and 41 (52%) samples respectively. Twenty-four samples were positive for both AAV and HCMV. Thirty-one samples were positive for both AAV and Ad. Five samples were positive for AAV alone and 52 samples were found positive for at least AAV and one potential helper virus (i.e. 9% and 91% of the AAV positive population, respectively). Eleven samples (14%) were found positive for the presence of DNA sequences of both the four viruses tested so far.

Among 61 HPV positive samples, 47 presented with at least 2 different types of HPV.

Arbitrary grouping of patients according to identified pathologies did not reveal a clear relationship between the pathology and the presence of one (or more) virus species. The « cough » group showed the highest prevalence of both AAV (14/17) and HPV (14/17), 11 samples being positive for, at least, both viruses. The « interstitial disease » group, more precisely the « sarcoidosis » group, showed a comparable repartition with 9/11 AAV positive samples and 10/11 HPV positive samples, 9 samples being positive for the 2 viruses. « Bronchial hyper-reactivity » group also presented with a high incidence of both AAV (9/12) and HPV (9/12). Other groups were too small to draw any significant conclusion.

Results were also matched against the smoking status of the patients. This comparison revealed a higher amount of HPV positive samples among BAL obtained

from smokers (20/23 vs. 25/36 among non-smokers). The prevalence of the other viruses seems not to be significantly affected in the smokers vs. non smoker population.

**Interpretation** Checking broncho-alveolar lavages for the presence of parvovirus AAV revealed that 72% of the tested samples were positive by PCR. In an attempt to find possible helper viruses for AAV, the same BAL samples were also checked for the presence of HPV, HCMV and Ad. In no case, the presence of helpers DNA sequences in a BAL sample seems to favor the prevalence of AAV DNA sequences in the same sample. Neither does AAV prevalence seem to influence the presence of DNA sequences from the helper viruses in the samples. This argues against HPV-, HCMV- or Ad-helped replication of AAV in lung alveoli. However, the concomitant presence of AAV and HPV DNA sequences in a number of samples and the low number of samples where AAV is not accompanied with at least one possible helper, led us not to exclude the possibility of an interaction between one, or more, transforming viruses (i.e. HPV, HCMV and Ad) and the oncosuppressive adeno-associated virus.

No clear relationship can be drawn out of the prevalence of AAV DNA and the diagnostic of a disease. With the exception of disease of bacterial etiology, AAV DNA can be found in more than 50% of the tested BAL samples. Considering the « cough » group of patients, the less severely diseased (i.e. the much closer to a « control » group), the prevalence of AAV (paralleled with that of HPV) is higher in this group than in any other.

One additional finding needs to be noted: matching the prevalence of viruses DNA in BAL samples against smoking habits revealed that HPV DNA is found pretty much often in BAL from smokers than in BAL from non-smokers. The prevalence of other tested viruses is seemingly not affected by this criterion.

Altogether, our results favor the idea that the lung is a route for environmental, ubiquitous AAV to enter the human body, as it is the case for other viruses, at least HPV.

### **Introduction**

Recently, the human helper-virus-dependent parvoviruses, AAV, have been found to persistently infect human genital tissues <sup>1-5</sup>.

These DNA viruses are thought to be non pathogenic and even to exhibit tumorsuppressive properties <sup>6</sup>. Seroepidemiological studies have shown that about 80% of the population has antibodies to AAV and that infection occurs early in childhood <sup>7</sup>. Usually, AAV requires coinfection with helper viruses for their replication . In addition to Adenovirus and Herpesgroup viruses <sup>8, 9</sup>, vacciniavirus <sup>10</sup> and more recently Human papillomaviruses <sup>3, 4</sup> have been shown to provide helper functions for AAV replication. In the absence of helper, AAV integration may occur into the host's cell genome, at least in cell culture. In the light of these interesting features, vectors for genetic therapy

based on AAV are hopeful. Promising results have already been obtained with these vectors <sup>11</sup>.

In addition to the genital area, AAV or AAV DNA sequences have been found in a penile flat condylomatous lesion (AAV-5) <sup>12</sup>, blood <sup>13</sup> and bone marrow progenitors <sup>14</sup>. However, naturally occurring infections have not been fully documented except when associated with adenovirus infections <sup>15, 16</sup>.

Altogether, these data address the question of the possible routes of AAV infection in humans. Recently, some authors suspected AAV to be sexually transmitted <sup>2</sup>. Here, we report that AAV seems to be present in respiratory tissues as well. We detected DNA of these viruses in 57 out of 79 broncho-alveolar lavages (BAL), using Polymerase chain reaction (PCR). We also checked BAL for the presence of DNA sequences of viruses known to be helpers for AAV replication, i.e. Adenovirus (Ad), Human Cytomegalovirus (HCMV) and Human Papillomavirus (HPV).

### **Patients and Methods**

We studied 79 samples of broncho-alveolar lavages from patients aged between 21 and 71 (median age: 51), 63 men and 16 women who received indications of BAL for different reasons. These patients were suffering, or suspected to suffer, pathologies which have been arbitrarily grouped as indicated in Table I. « Bronchial Hyper-reactivity » group contained both Asthma and repetitive bronchitis, « Interstitial diseases » included, in addition to sarcoïdosis as indicated, 4 cases of fibrosis, 4 cases of silicosis, and samples from 2 patients presenting localized anomalies. None of the patients belonging to the « infectious diseases » group presented with viral etiology. BAL being somewhat traumatizing, seventeen patients presenting only mild and persisting cough (rarely accompanied with spitting of blood) and for which no etiology nor anomaly can be found, constituted the « cough » group which can, possibly, be taken as a « control » group.

BAL were collected aseptically by using disposable endoscopes and according to standard protocols.

Cells contained in BAL were sedimented by centrifugation and total DNA was extracted and purified using already described methods <sup>17</sup>.

Blank washings were performed and the subsequent fluids, as well as the collection medium, underwent the same processes as true BAL in order to provide negative controls for PCR.

Fifty-eight blood samples from unrelated origin were also checked by PCR for the detection of AAV sequences.

PCR experiments were performed on purified DNA resuspended in water.

Samples were checked for the presence of AAV type 2/3 and 5 (which are types infecting humans) as described previously <sup>4</sup>.

Three different pairs of general primers were used to assess the presence of HPV DNA sequences. HPV positive samples were typed (type 6, 11, 16 and 18) using anti-contamination primers <sup>4</sup>.

HCMV PCR were performed using 3 different protocols. DNA sequences in the immediate early genes region of HCMV were amplified as described <sup>18, 19</sup>. An additional pair of primers was used <sup>19</sup> in order to amplify a fragment from the HCMV late genes region.

Ad PCR <sup>20</sup> was able to amplify sequences from Adenovirus type 2, 5 and 7 .

Amplification products were analysed on 2% agarose gel, then blotted and hybridised with a gdATP<sup>32</sup> oligo probe according to standard protocols <sup>4</sup>. with the exception of HPV general primers PCR for which no probe is available.

In 3 cases, PCR fragments were cloned using a TA cloning kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, San Diego, CA, USA). DNA sequence was determined using a Dye Terminator Cycle Sequencing kit, running on a 377 DNA sequencing machine (both from Perkin-Elmer, USA) according to the manufacturer protocols.

## Results

The proportion of BAL samples which is positive for the presence of AAV DNA sequence is 72% (Table I). Five samples presented with AAV sequences alone. Fifteen samples contained both AAV DNA and sequences of one other virus, prominently HPV (8/15) then Ad (4/15) and HCMV (3/15). In 11 samples, the four viruses tested for were present and AAV was also found in combination with HPV+Ad (16); HPV+HCMV (9) or HCMV+Ad (1) (Table I, columns 6-10). AAV was found in the same proportion of sarcoïdosed patients (9/11) and coughing ones (14/17), mostly associated with HPV.

It remains quite impossible, for ethical reasons, to obtain BAL from control healthy individuals. We have thus grouped in the same category, samples from patients presenting with cough, persistent or not, with suspicions of asbestos exposition, with pre-operative check-ups. Considering this group as a real « control » one, argues against any implication of AAV in the recensed diseases. On the other hand, one could consider this group as containing mostly, mildly diseased patients. In that case, AAV, or AAV plus an helper, might be causative agents of persisting coughs, mild blood spitting, mucosal irritability... An other possibility could be that the « normal » situation is to

find a balance between viruses in the lung of healthy individuals, the inbalancing of this equilibrium being possibly a cause, or co-factor, for the development of certain diseases. It could be the case for instance, when oncogenic papillomaviruses and oncosuppressive adeno-associated parvoviruses co-exist within the same host cell. Further case studies are needed to verify this hypothesis.

When comparing the prevalence of potential helper viruses between AAV positive and AAV negative samples (Table II), it appears that the prevalence of AAV does not influence the prevalence of the other viruses. The same goes for the influence of HPV, HCMV and Ad on AAV prevalence which is apparently unaffected. The latter seem to alleviate the former data which suggested a preferential association between AAV and HPV. however, we cannot exclude such a possibility since Table II refers to sample populations whereas Table I rather mentions data on samples individually co-infected with the two viruses. Moreover, we have shown recently that HPV is a possible natural helper for AAV in the genital area<sup>3</sup>.

HPV DNA sequences are even more prominent than AAV DNA sequences in the BAL samples (77%) and the repartition of HPV positive samples among the classified diseases does not show any clear relationship between the presence of the virus and the onset or development of a disease. Even when present in BAL samples from patients suffering neoplasia, HPV is highly associated with the presence of AAV. It could appear, when looking at table II, that HPV positivity favors the HCMV and Ad presence. This interpretation is not significant given the poor number of HPV negative samples, in general. However, it seems that, besides AAV, HCMV positivity is associated with an increased number of HPV positive samples. The same goes for the number of Ad positive samples which is slightly enhanced when the samples are also positive for the presence of HPV sequences. Altogether, this would suggest that « misfortunes never come singly » and that the presence of an infectious agent with transforming capacities is necessarily accompanied with infections by other viruses with the same capacities. PCR detection of viral DNA sequences in clinical samples (BAL, swabs, biopsies, ...) seems to be a powerful tool for the determination of lung diseases etiology . However, attempts at

Each HPV positive sample was submitted to additional PCR analyses in order to precise the HPV types represented in BAL. HPV 6 positivity was found in 26 out of 61 HPV positive samples (43%), HPV11 was found in 34/61 samples (56%), HPV16 in only 13/61 samples (21%, 5 samples belong to the « neoplasia » group) and HPV 18 in 30 out of 61 BAL samples (49%). Thirteen samples which were positive for HPV by PCR performed with general, were not typed as type 6, 11, 16 or 18. Two-third of the typed samples contain at least two different types of HPV.

Despite the small number of cases for which the smoking status of the patients was known, it remains true that HPV DNA sequences are found more often in BAL

collected from smokers. The prevalence of the other tested viruses seems not to be modified depending on the smoking habits of the patients.

HCMV and Ad DNA positives BAL samples represent 43% and 52% of the samples, respectively. They are not particularly represented in the case of a precise disease (Table I), nor they are particularly associated with the presence of another virus (Table II and cf. comment above).

Altogether, the lung alveoli contain frequently viruses among which is found representatives of the sub-genera adeno-associated virus. In some cases PCR amplification products were sequenced and the resulting structure was found to match perfectly the primary structure of the DNA of the species AAV type 2 (AAV-2).

The frequency of AAV positivity in broncho-alveolar lavages cannot be explained by a blood contamination of the lung since either the data from the litterature <sup>13</sup> and our own data establish that blood is positive for AAV in only 2 to 8% of the cases. However, these data have not been obtained by checking for AAV DNA sequence, blood samples from patients having received a broncho-alveolar lavage.

We were unable to confirm the PCR results by Southern blot (data not shown), strongly suggesting AAV is not present in high enough amounts in the BAL samples.

This is in agreement with the data showing that AAV is not massively replicated in the presence of numerous potential helper viruses. Different possible explanations can be viewed: i) The viruses do not necessarily infect the cells from the alveoli and might be trapped in the mucus. To answer this question, we have performed a separation of suspended cells from some BAL (data not shown). We have thus acquired evidences that the virus is cell-associated with the fraction of adhering cells, i.e. probably macrophages, at least.

ii) AAV and the potential helpers do not infect the same cells. Further studies are on the way to answer the question by *in situ* hybridisation.

iii) AAV replication occurs cryptically, even in the presence of helper viruses, and the amount of replication products remains under the detection threshold. Experiment are being done to isolate infectious viruses from BAL samples and test them for their replicative capacities.

Given the extreme interest raised by AAV parvoviruses as vectors for genic therapy, it seems to us of real importance to accumulate basic knowledge about the fate of these viruses in the human environment.

Aknowledgments . We thank the staff in charge of the BAL for their cooperation.

This work was funded by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), which also granted O.M..

## References

1. Tobiasch, E, Rabreau, M, Geletneky, K, *et al.* Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol*, 1994; **44**:215-222.
2. Han, L, Parmley, TH, Keith, S, *et al.* High prevalence of adeno-associated virus (AAV) type 2 rep DNA in cervical materials: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes*, 1996; **12**:47-52.
3. Walz, C, Deprez, A, Dupressoir, T, *et al.* Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J. Gen. Virol.*, 1997; **78**:1441-1452.
4. Malhomme, O, Dutheil, N, Rabreau, M, *et al.* 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. *J Gen Virol*, 1997; :1957-62.
5. Friedman-Einat, M, Grossman, Z, Mileguir, F, *et al.* Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; **35**:71-78.
6. Schlehofer, JR. The tumor suppressive properties of Adeno-Associated viruses. *Mutat Res*, 1994; **305**:303-313.
7. Blacklow, NR, Hoggan, MD, Sereno, MS, *et al.* A seroepidemiologic study of adeno-associated virus infection in infants and children. *Am.J.Epidemiol.*, 1971; **94**:359-366.
8. Salo, RJ and Mayor, HD. Adenovirus-associated virus polypeptides synthesized in cells coinfecting with either adenovirus or herpesvirus. *Virology*, 1979; **93**:237-45.
9. McPherson, RA, Rosenthal, LJ, and Rose, JA. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology*, 1985; **147**:217-22.
10. Schlehofer, JR, Ehrbar, M, and zur, HH. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology*, 1986; **152**:110-7.
11. Hallek, M and Wendtner, CM. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors for somatic gene therapy: recent advances and potential clinical applications. *Cytokines Mol Ther*, 1996; **2**:69-79.
12. Bantel-Schaal, U and zur Hausen, H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology*, 1984; **134**:52-63.
13. Grossman, Z, Mendelson, E, Broksimoni, F, *et al.* Detection of Adeno-Associated Virus Type-2 in Human Peripheral Blood Cells. *J Gen Virol*, 1992; **73**:961-966.
14. Anderson, RJ, Galatowicz, G, Macdonald, ID, *et al.* Detection of adeno-associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells. *Exp Hematol*, 1997; **25**:256-62.

15. Blacklow, NR, Hoggan, MD, and Rowe, WP. Isolation of adeno-associated viruses from man. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1967; **58**:1410-1415.
16. Blacklow, NR, Hoggan, MD, Kapikian, AZ, *et al.* Epidemiology of adeno-associated virus infection in a nursery population. *Am.J.Epidemiol.*, 1968; **8**:368-378.
17. Sambrook, J, Fritsch, EF, and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
18. Buffone, GJ, Hine, E, and Demmler, GJ. Detection of mRNA from the immediate early gene of human cytomegalovirus in infected cells by in vitro amplification. *Mol. Cell. Probes*, 1990; **4**:143-151.
19. Shibata, D, Martin, WJ, Appleman, MD, *et al.* Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 1988; **158**:1185-92.
20. Zhang, WW, Fang, X, Branch, CD, *et al.* Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome mediated transfection and PCR analysis. *Biofeedback*, 1993; **15**:868-872.

## Legends to Tables

### Table I

Pathologies appended to the indication of broncho-alveolar lavages were arbitrarily grouped (Column one) on a certified diagnosis basis (see text). Column 2 indicates the number of broncho-alveolar lavages tested for both AAV, HPV, HCMV and Ad, in each group. Other columns score the number of (multi-) positive results obtained for samples belonging to the same group after polymerase chain reaction amplification of DNA sequences from AAV (A), HPV (H), HCMV (C) and Ad (d). The last column shows the distribution of BAL samples in which no viral sequence has been found.

### Table II

Results of PCR amplification of viral DNA sequences, namely prevalence of the tested virus, were matched to each other and also to the smoking status of the patients whose BAL were collected (when indicated). Results are expressed in both number of positive-negative samples and percents.

<b>VIRUSES PATHOLOGIES</b>	<b>n</b>	<b>AHCd</b>	<b>AHC</b>	<b>AHd</b>	<b>ACd</b>	<b>HCd</b>	<b>AH</b>	<b>AC</b>	<b>Ad</b>	<b>HC</b>	<b>Hd</b>	<b>Cd</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>C</b>	<b>d</b>	<b>no</b>
Cough	17	4	1	4	0	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Interstitial diseases	21	2	5	4	0	1	1	1	0	2	0	1	2	0	0	1	1
Of which sarcoïdosis	11	1	4	3	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cirrhosis	6	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0
Bronchial Hyper-Reactivity	12	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Neoplasia	8	1	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0
Infectious diseases	3	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Miscellaneous	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Unidentified pathologies	6	3	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Auto-Immune diseases	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

Malhomme et al., Table I

	AAV positive	HPV positive	HCMV positive	Ad positive
<b>AAV positive</b>				
among 57	57	44	24	32
	100%	77%	42%	56%
<b>AAV negative</b>				
among 22	0	17	9	9
	0%	77%	41%	41%

<b>HPV positive</b>				
among 61	44	61	28	34
	72%	100%	46%	56%
<b>HPV negative</b>				
among 18	13	0	5	7
	72%	0%	28%	39%

<b>HCMV positive</b>				
among 33	24	28	33	17
	73%	85%	100%	51%
<b>HCMV negative</b>				
among 46	33	33	0	24
	72%	72%	0%	52%

<b>Ad positive</b>				
among 41	32	34	17	41
	78%	83%	41%	100%
<b>Ad negative</b>				
among 39	25	27	16	0
	66%	71%	42%	0%

<b>Smokers</b>				
among 23	16	20	9	13
	70%	87%	39%	57%
<b>Non Smokers</b>				
among 36	27	25	15	18
	75%	69%	42%	50%

Malhomme et al., Table II

## B) Discussion

Dans le but toujours d'identifier des organes naturellement infectés par AAV, nous avons recherché le virus dans des lavages broncho-alvéolaires. Ces lavages nous permettent d'avoir accès à une variété de types cellulaires (alvéolaires, épithéliales, macrophages, lymphocytes).

Ce travail prend sa source dans des résultats déjà anciens que nous avons exposé dans l'introduction, qui montrent qu'AAV a déjà été isolé dans des prélèvements de gorge. Ces résultats avaient été associés à une autre espèce virale des voies respiratoires: les adénovirus.

Les échantillons que nous avons testé se répartissent en différents groupes, établis sur la base des pathologies rencontrées (un lavage broncho-alvéolaire n'est pas un examen anodin).

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence l'infection du poumon par AAV dans 72 % des cas étudiés. Sans égaler la prévalence d'AAV dans la sphère génitale féminine, ces résultats s'obtiennent par contre tous sexes et âges confondus (dans une certaine mesure: la moyenne d'âge est néanmoins de 51 ans), ce qui pose clairement le poumon comme un autre organe cible de l'infection naturelle. Cela pose aussi AAV comme virus de l'environnement, et suggère une infection par les voies respiratoires.

La prévalence pour AAV connaît de légères variations dans certains cas pathologiques. Ils sont plus élevés dans le cas de sarcoïdoses (maladie à l'étiologie mal connue) et pour les toux persistantes. Mais globalement, aucun lien statistiquement fiable ne peut être établi entre présence d'AAV et une quelconque pathologie, notamment du fait de la petite taille des sous-groupes.

Nous avons pu montrer que 76% des échantillons étaient positifs pour HPV et souvent pour plusieurs types, à l'image de ce que nous obtenons pour les échantillons de col.

Les prévalences dans cette population des adénovirus et des HCMV sont respectivement de 52% et 43%.

Aucune interaction claire AAV-virus aidant ne s'est dégagée de ce travail. Il ne semble pas que l'infection par l'une des ces trois famille de virus affecte la prévalence pour AAV. Ces résultats ne permettent donc pas d'attribuer à aucun des virus aidants la responsabilité de la présence d'AAV.

Il faut noter en revanche qu'on ne trouve que rarement AAV sans aucun virus aidant (5 cas), et que les échantillons contenant au moins et AAV et HPV représentent 60% du total. Enfin plus de 80% des échantillons contiennent au moins deux virus.

L'impossibilité à mettre en évidence AAV par Southern blot, comme il est possible de le faire avec des biopsies provenant de la sphère génitale (Walz et *al.*, 1997; Tobiasch et *al.*, 1994) ou du cœur (Klein-Bauernschmitt & Bauernschmitt, 1997) suggère l'absence de réplication virale, ou tout du moins une réplication cryptique.

Il convient néanmoins de garder à l'esprit que nos résultats, s'il mettent en évidence la coinfection d'un organe, ne permettent pas de statuer sur l'éventuelle coexistence dans une même cellule de ces virus. Des travaux d'hybridation *in situ* sont en cours pour tenter de répondre à cette question.

Le poumon reste pourtant un « hôte privilégié » de nombre d'infections virales.

On peut aussi bien faire l'hypothèse de l'existence d'un autre virus « aidant » fonctionnel dans le poumon, que celle de l'inexistence *in vivo* d'un tel virus aidant (au sens où les travaux *in vitro* l'établissent).

On a aussi évoqué les chocs génotoxiques permettant la réplication « autonome » des AAV, nous avons donc vérifié si la prévalence pour AAV était modifiée chez les fumeurs. La condition « fumeurs » ne suffit pas non plus à modifier la prévalence pour AAV, mais elle modifie la prévalence pour HPV.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Replaçons ces travaux dans un contexte plus large. Nous nous sommes efforcé au cours de ce travail, d'apporter quelque lumière sur l'infection naturelle par AAV, en utilisant des outils moléculaire.

Nos travaux nous amènent directement ou indirectement à formuler les conclusions suivantes:

1) La mise en évidence récurrente de virus dans la sphère uro-génitale et dans les poumons. Ces travaux suggèrent que le virus est ubiquitaire dans la mesure où il semble être distribué i) dans des organes très divers (sphère uro-génitale, cœur, poumons,...), et ii) indépendamment des pathologies que présentent les patients dont sont issus les échantillons (particulièrement dans le poumon).

2) L'association « AAV/virus incapable de se répliquer seul » nous semble ne pas refléter exactement la réalité. Nous avons évoqué un certain nombre d'arguments qui nous paraissent aller dans le sens de conclusions plus « prudentes » quant à la dépendance d'AAV.

Nous formulons ici une explication qui nous paraît rendre compte des phénomènes observés. AAV se répliquerait en fait dès que son hôte cellulaire est en danger. Cette condition serait remplie par tout agent génotoxique: U.V., génotoxiques chimiques, protéines virales précoces des virus répertoriés comme « virus aidants » (adénoviridæ, herpes viridæ, papillomaviridæ). Un tel comportement est classique en parasitologie. Ce concept nous paraît pouvoir s'adapter à AAV.

3) On a déjà insisté sur l'usage de vecteur viraux pour le transfert de gène basés sur une structure liée à un AAV (un virus « minimum » contenant une extrémité ITR complète de 165 bases est nécessaire et suffisant pour obtenir infection, réplication et production d'un virion recombinant, pour peu que l'on apporte en trans les fonctions des gènes *rep* et *cap*).

On sait que ces structures palindromiques sont liées à de nombreux phénomènes de régulation de l'expression de gènes. Ces propriétés sont imputables aux structures primaires et secondaires mêmes des ITR et/ou aux interactions avec des protéines (notamment les protéines non structurales Rep, facteurs de transcription (parmi d'autres fonctions) qui sont des activateurs ou des répresseurs de l'activité de nombreux promoteurs homologues et hétérologues).

Il est établi —nous avons contribué à le faire— qu'AAV est largement répandu dans le corps humain.

La présence du virus associé au fait qu'*in vitro*, les risques de recombinaison non homologue sont loin d'être nuls rendent les risques potentiellement non nuls.

Nous pensons alors qu'il convient de rester prudent quant à l'usage de ce virus pour des protocoles de transfert de gènes à visée thérapeutique.

## BIBIOGRAPHIE

Anderson, R. J., Galatowicz, G., Macdonald, I. D., Lowdell, M. W., Corbett, T. J. & 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. & Carter, B. J. (1991). Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type-1 production in human cells. *J. Virol.* 65(1), 396-404.

Ashktorab, H. & Srivastava, A. (1989). Identification of nuclear proteins that specifically interact with adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeat hairpin DNA. *J. Virol.* 63(7), 3034-3039.

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

Bantel, S. U. & zur, H. H. (1988). Dissociation of carcinogen-induced SV40 DNA-amplification and amplification of AAV DNA in a Chinese hamster cell line. *Virology* 166(1), 113-22.

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. (1995). Growth properties of a human melanoma cell line are altered by adeno-associated parvovirus type 2. *Int. J. Cancer* 60(2), 269-274.

Bantel-Schaal, U. & Stöhr, M. (1992). Influence of adeno-associated virus on adherence and growth properties of normal cells. *J. Virol.* 66, 773-779.

Bantel-Schaal, U. & zur Hausen, H. (1984). Characterisation of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virol.* 134, 52-63.

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.

Batchu, R. B. & 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.

Batchu, R. B., Kotin, R. M. & Hermonat, P. L. (1994). The regulatory Rep protein of adeno-associated virus binds to sequences within the *c-H-ras* promoter. *Cancer Lett.* 86(1), 23-31.

Beaton, A., Palumbo, P. & 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(10), 4450-4454.

Becerra, S. P., Koczot, F., Fabisch, P. & 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(8), 2745-2754.

Berns, K. (1990). *Parvoviridae and their replication*. Virology (P., F. B. K. D. H., Ed.), Lipincott-Raven, New-York.

Berns, K. I. & Adler, S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J. Virol.* ? (5), 693-699 (?).

Berns, K. I. & Giraud, C. (1996). *Adeno-Associated virus vectors in gene therapy* (Berns, K. I. & Giraud, C., Eds.), Springer Verlag, heidelberg/New-york/Berlin.

Berns, K. I., Hauswirth, W. W., Fife, K. H. & Lusby, E. (1979). Adeno-associated virus DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2(781), 781-7.

Berns, K. I., Kotin, R. M. & Labow, M. A. (1988). Regulation of adeno-associated virus DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 951(2-3), 425-9.

Berns, K. I. & Rose, J. A. (1970). Evidence for a single-stranded adeno-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands. *J. Virol.* 5 (?), 693-699 (?).

Bishop, B. M., Santin, A. D., Quirk, J. G. & Hermonat, P. L. (1996). Role of the terminal repeat GAGC trimer, the major Rep78 binding site, in adeno-associated virus DNA replication. *Febs letters* 397, 97-100.

Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Kapikian, A. Z., Austin, J. B. & Rowe, W. P. (1968). Epidemiology of adeno-associated virus infection in a nursery population. *Am. J. Epidemiol.* 8, 368-378.

Blacklow, N. R., Hoggan, M. D. & Rowe, W. P. (1967). Isolation of adeno-associated viruses from man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1410-1415.

Blacklow, N. R., Hoggan, M. D. & Rowe, W. P. (1967b). Serological evidence for human infection with adeno-associated viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 40, 319-327.

Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., Sereno, M. S., Brandt, C. D., Kim, H. W., Parrot, R. H. & Chanock, R. M. (1971). A seroepidemiologic study of adeno-associated virus infection in infants and children. *Am. J. Epidemiol.* 94, 359-366.

Bohenzky, R. A. & Berns, K. I. (1989). Interactions between the termini of adeno-associated virus DNA. *J Mol Biol* 206(1), 91-100.

Bohenzky, R. A., LeFebvre, R. B. & Berns, K. I. (1988). Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* 166(2), 316-327.

Botquin, V., Cidarregui, A. & Schlehofer, J. R. (1994). Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos. *J. Gen. Virol.* 75( Part 10), 2655-2662.

Brauniger, S., Fischer, I. & Peters, J. (1994). 1994 On the heat resistance of bovine parvovirus. *Zbl Hyg Umweltmed* 196, 270-278.

Buller, R. M. L., Janik, J. E., Sebring, E. D. & 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. & Schlehofer, J. R. (1997). *VIIth international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Carter, B. J., Antoni, B. A. & 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.

Carter, B. J. & Laughlin, c. (1984). the parvoviruses. In *the viruses* (Berns, K., ed.), pp. 67-128. Plenum Press, New-York.

Carter, B. J., Laughlin, C. A., de, I. M. L. & Myers, M. (1979). Adeno-associated virus autointerference. *Virology* 92(2), 449-62.

Carter, B. J., Marcus, S. C., Laughlin, C. A. & Ketner, G. (1983). Properties of an adenovirus type 2 mutant, Ad2dl807, having a deletion near the right-hand genome terminus: failure to help AAV replication. *Virology* 126(2), 505-16.

Cassinotti, P., Weitz, M. & 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(1), 176-184.

Cavalier-Smith, T. (1974). Palindromic base sequences and replication of eukaryotic chromosome ends. *Nature* 250, 467.

Chang, L. S., Shi, Y. & 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(8), 3479-3488.

Chatterjee, S. & Wong, K. K. (1996). Adeno-associated virus vectors for gene transfert in the hematopoietic system. In *Adenoassociated virus vectors in gene therapy* (Berns, K. I. & Giraud, C., eds.): Springer verlag, Heidelberg/new York.

Chejanovsky, N. & 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.

Chejanovsky, N. & Carter, B. J. (1990). Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus *rep* gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *J. Virol.* 64(4), 1764-1770.

Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W. & Berns, K. I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* 33(2), 739-748.

Chiorini, J. A., Wiener, S. M., Owens, R. A., Kyöstiö, S. R. M., Kotin, R. M. & 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(11), 7448-7457.

Chiorini, J. A., Yang, L., Safer, B. & Kotin, R. M. (1995). Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J. Virol.* **69**(11), 7334-7338.

Chiorini, J. A., Yang, L., Safer, B. & Kotin, R. M. (1997). Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J. Virol.* **71**, 6823-6833.

Cohen, M. V. & Downey, M. D. (1996). Myocardial preconditioning promises to be a novel approach to the treatment of ischemic heart disease. *Annu. Rev. Med.* **47**, 21-29.

Collaco, R., Prasad, K. M. R. & Trempe, J. P. (1997). Phosphorylation of the adeno-associated virus replication proteins. *Virology* **232**, 332-336.

Conway, J. E., Zolotkhin, S., Muzyczka, N., Hayward, G. S. & Byrne, B. J. (1997). Recombinant adeno-associated virus type replication and packaging is supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing Rep and Cap. *J. Virol.* **71**(11), 8780-8789.

Costello, E., Saudan, P., Winocour, E., Pizer, L. & Beard, P. (1997). High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *EMBO J.* **16**, 5943-5954.

Cukor, G., Blacklow, N. R., Kibrick, S. & Swan, I. C. (1975). Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpesvirus-transformed hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 957-959.

de la Maza, L. & Carter, B. J. (1980a). Heavy and light particles of adeno-associated virus. *J. Virol* **33**(3), 1129-37.

de la Maza, L. M. & Carter, B. J. (1980b). Molecular structure of adeno-associated virus variant DNA. *J. Biol. Chem.* **255**, 3194-3203.

de la Maza, L. M. & Carter, B. J. (1981). Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J. Natl. Cancer. Inst.* **67**(6), 1323-1326.

Du, B., Wu, P., Boldt-Houle, D. M. & Terwilliger, E. F. (1996). Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther.* **3**(3), 254-261.

Dutheil, N., Malhomme, O., Provost, N., Becquart, P., Burguete, T., Schlehofer, J. R. & 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**.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Solow, R., Drumm, M. L., Markakis, D., Guggino, W. B., Zeitlin, P. L. & Carter, B. J. (1993a). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**(5), 3781-3790.

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

Gilden, R. V., Kern, J., Beddow, T. G. & Huebner, R. (1968). Oncogenicity of mixtures of adeno-associated virus and adenovirus type 12. *Nature* **219**(80).

Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. (1994). Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(21), 10039-10043.

Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. (1995). Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J. Virol.* 69(11), 6917-6924.

Goodman, S., Xiao, X., Donahue, R. E., Moulton, A., Miller, J., Walsh, C., Young, N. S., Samulski, R. J. & Nienhuis, A. W. (1994). Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells. *Blood* 84(5), 1492-1500.

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

Green, M. R. & 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. & Ramot, B. (1992). Detection of adeno-associated virus type-2 in human peripheral blood cells. *J. Gen. Virol.* 73(APR), 961-966.

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 material: AAV may be sexually transmitted. *Virus Genes* 12, 47-52.

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

Hauswirth, W. W. & Berns, K. I. (1977). Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78, 488-499.

Heilbronn, R., Burkle, A., Stephan, S. & zur, H. H. (1990). The adeno-associated virus *rep* gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol* 64(6), 3012-8.

Heilbronn, R., Schlehofer, J. R. & zur, H. H. (1984). Selective killing of carcinogen-treated SV40-transformed Chinese hamster cells by a defective parvovirus. *Virology* 136(2), 439-41.

Hermonat, P. L. (1989). The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* 172(1), 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. (1994a). Down-regulation of the human *c-fos* and *c-myc* proto-oncogene promoters by adeno-associated virus Rep78. *Cancer Lett* 81(2), 129-136.

Hermonat, P. L. (1994b). Adeno-associated virus inhibits human papillomavirus type 16 - a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Res.* 54(8), 2278-2281.

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

Hermonat, P. L., Santini, A. D. & 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.

Herzog, R. W., Hagstrom, J. N., Kung, S. H., Tai, S. J., Wilson, J. M., Fisher, K. J. & High, K. A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *PNAS* 94(11), 5804-5809.

Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. & 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. & Johnson, F. B. (1972). *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Lepetit Colloquium, Cocoyac, Mexico. North Holland.*

Hölscher, C., Kleinschmidt, J. & Bürkle, A. (1995). High level expression of adeno-associated virus Rep 78 or Rep 68 protein is sufficient for infectious particle formation by a rep-negative mutant. *J. Virol.* 69, 6880-6885.

Hong, G., Ward, P. & Berns, K. I. (1992). *In vitro* replication of adeno-associated virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4673-4677.

Hong, G., Ward, P. & Berns, K. I. (1994). Intermediates of Adeno-Associated virus DNA replication *in vitro*. *J. Virol* 68(3), 2011-2015.

Hörer, M., Weger, S., Butz, K., Hoppeseyler, F., Geisen, C. & Kleinschmidt, J. A. (1995). Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters. *J. Virol.* 69(9), 5485-5496.

Howley, P. (1996). The viruses and their replication. In *Virology* (Fields, B., Knipe, D. & Howley, P., eds.), Vol. 2. 2 vols. Lippincott-Raven, New-York.

Hunter, L. A. & Samulski, R. J. (1992). Colocalization of adeno-associated virus rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* 66, 317-324.

Im, D. S. & Muzyczka, N. (1989). Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* 63(7), 3095-3104.

Im, D. S. & Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61(3), 447-457.

Im, D. S. & Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* 66(2), 1119-1128.

Janik, J. E., Huston, M. M., Cho, K. & Rose, J. A. (1989). Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* 168(2), 320-9.

Janik, J. E., Huston, M. M. & Rose, J. A. (1981). Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(3), 1925-9.

Janik, J. E., Huston, M. M. & Rose, J. A. (1984). Adeno-associated virus proteins: origin of the capsid components. *J. Virol.* 52(2), 591-597.

Johnson, F. B., Ozer, H. L. & Hoggan, M. D. (1971). Structural proteins of adeno-associated virus type 3. *J. Virol.* 8, 860-863.

Johnson, F. B., Thomson, T. A., Taylor, P. A. & Vlazny, D. A. (1977). Molecular similarities among the adenovirus-associated virus polypeptides and evidence for a precursor protein. *Virology* 82, 1-13.

Kahn, A., Haase, G., Akli, S. & Guidotti, J.-E. (1995).

Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., Omalley, K. L. & During, M. J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat. Genet.* 8(2), 148-154.

Katz, E. & 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(6), 3023-3026.

Kearns, W. G., Afione, S. A., Fulmer, S. B., Pang, M. G., Erikson, D., Egan, M., Landrum, M. J., Flotte, T. R. & Cutting, G. R. (1996). Recombinant adeno-associated virus (AAV\_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. & Trempe, J. P. (1991). Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus *rep* gene. *Virology* 181, 738-741.

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

Klein-Bauernschmitt, P. & Bauernschmitt, R. (1997). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Klein-Bauernschmitt, P., Von Knebel, M., Ehrbar, M., Geletneky, K., Kleinschmitt, J. & 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., zur Hausen, H. & Schlehofer, J. R. (1992). Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type-2. *J. Virol.* 66(7), 4191-4200.

Kleinschmidt, J. A., Mohler, M., Weindler, F. W. & Heilbronn, R. (1995). Sequence elements of the adeno-associated virus *rep* gene required for suppression of herpes-simplex-virus-induced DNA amplification. *Virology* 206(1), 254-262.

Kotin, R. M. & Berns, K. I. (1989). Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170(2), 460-467.

Kotin, R. M., Linden, R. M. & 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., Menninger, J. C., Ward, D. C. & 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., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(6), 2211-2215.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol* 108(2), 229-241.

Kube, D. M., S., P. & Srivastava, A. (1997). Encapsidation of AAV-2 Rep proteins in wild-type and recombinant progeny virions: Rep-mediated growth inhibition of primary human cells. *J. Virol.* 71(10), 7361-7371.

Kyöstiö, S. R. M. & 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.

Kyöstiö, S. R. M., Owens, R. A., Weitzman, M. D., Antoni, B. A., Chejanovsky, N. & 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(5), 2947-2957.

Kyöstiö, S. R. M., Wonderling, R. S. & 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(11), 6787-6796.

Labow, M. A. & Berns, K. I. (1988). The adeno-associated virus gene expression inhibits replication of an adeno-associated virus/simian virus 40 hybrid genome in cos-7 cells. *J. Virol.* 62, 1705-1712.

Labow, M. A., Graf, L. J. & Berns, K. I. (1987). Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol. Cell. Biol.* 7(4), 1320-1325.

Labow, M. A., Hermonat, P. L. & Berns, K. I. (1986). Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* 60(1), 251-258.

Laughlin, C. A., Cardellichio, C. B. & Coon, H. C. (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J. Virol.* 60(2), 515-524.

Laughlin, C. A., Jones, N. & 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., Myers, M. W., Risin, D. L. & Carter, B. J. (1979). Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus. *Virology* 94, 162-174.

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.

LeFebvre, R. B., Riva, S. & Berns, K. I. (1984). Conformation takes precedence over sequence in adeno-associated virus DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1416-1419.

Leonard, C. J. & Berns, K. I. (1994). Cloning, expression, and partial purification of rep78 - an Adeno-Associated virus replication protein. *Virology* 200(2), 566-573.

Leppard, K. (1997). E4 gene function in adenovirus, adnovirus vector and adeno-associated virus infections. *J. Gen. Virol.* **78**, 2131-2138.

Lipps, B. V. & Mayor, H. D. (1980). Transplacental infection with adeno-associated virus type 1 in mice. *Intervirology* **14**(2), 118-23.

Lund, B., Jensen, V. F., Have, P. & Ahring, B. (1996). Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. *Anton Leeuwenhoek Int J Gen M* **69**, 25-31.

Lusby, E., Bohenzky, R. & 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**(3), 1083-1086.

Lusby, E., Fife, K. H. & Berns, K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **34**(2), 402-409.

Lusby, E. W. & 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**(2), 518-526.

Malhomme, O., Deprez, A., Boitelle, A., Gosset, P., Schlehofer, J. R. & Dupressoir, T. (1997a). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Malhomme, O., Dutheil, N., Rabreau, M., E., A.-M., Schlehofer, J. & Dupressoir, T. (1997b). 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.

Marcus, C. J., Laughlin, C. A. & Carter, B. J. (1981). Adeno-associated virus RNA transcription in vivo. *Eur J Biochem* **121**(1), 147-54.

Mayor, H. D., Drake, S., Stahmann, J. & 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.

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

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

McCarty, D. M., Christensen, M. & Muzyczka, N. (1991). Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus P19 and P40 promoters by Rep proteins. *J. Virol.* **65**(6), 2936-2945.

McCarty, D. M., Ni, T. H. & Muzyczka, N. (1992). Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **66**(7), 4050-4057.

McCarty, D. M., Pereira, D. J., Zolotukhin, I., Zhou, X. H., Ryan, J. H. & Muzyczka, N. (1994b). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **68**(8), 4988-4997.

McCarty, D. M., Ryan, J. H., Zolotukhin, S., Zhou, X. H. & 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**(8), 4998-5006.

McPherson, R. A., Ginsberg, H. S. & Rose, J. A. (1982). Adeno-associated virus helper activity of adenovirus DNA binding protein. *J. Virol.* **44**(2), 666-73.

McPherson, R. A. & Rose, J. A. (1983). Structural proteins adeno-associated virus: subspecies and their relatedness. *J. Virol.* **46**, 523-529.

McPherson, R. A., Rosenthal, L. J. & Rose, J. A. (1985). Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**(1), 217-222.

Melnick, J. L., Mayor, H. D., Smith, K. O. & Rapp, F. (1965). Association of 20 millimicron particles with adenoviruses. *J. Bacteriol.* **90**, 271-274.

Mendelson, E., Trempe, J. P. & Carter, B. J. (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J. Virol.* **60**(3), 823-832.

Mishra, L. & 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. & Brown, K. E. (1996). Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* **217**, 124-130.

Morten-Friesch & al., e. (1997). Sexually Transmitted Infection as a Cause of Anal Cancer. *New England Journal of Medicine* **337**, 1350-1358.

Muralidhar, S., Becerra, S. P. & 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**(1), 170-176.

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. & Carter, B. J. (1981). Adeno-associated virus replication. The effect of L-canavanine or a helper virus mutation on accumulation of viral capsids and progeny single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **256**(2), 567-70.

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. *J. Virol.* **35**(1), 65-75.

Oelze, I., Rittner, K. & 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**(2), 1229-1233.

Ogston, K. R., Raj, K., Saudan, P., Hirt, B. & Beard, P. (1997). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop*.

Ostrove, J. M. & Berns, K. I. (1980). Adenovirus early region 1b gene function required for rescue of latent adeno-associated virus. *Virology* **104**(2), 502-5.

Ostrove, J. M., Duckworth, D. H. & Berns, K. I. (1981). Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology* 113(2), 521-533.

Owens, R. A., Trempe, J. P., Chejanowsky, N. & Carter, B. J. (1991). Adeno-associated virus rep proteins produced in insect and mammalian expression systems: wild-type and dominant-negative mutant proteins bind to the viral replication origin. *Virology* 184, 14-22.

Owens, R. A., Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M. & Carter, B. J. (1993). Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J. Virol.* 67(2), 997-1005.

Parks, W. P., Boucher, D. W., Melnick, J. L., Taber, L. H. & Yow, M. D. (1970). Seroepidemiological and ecological studies of the adeno-associated satellite viruses. *Infect. Immun.* 2, 716-722.

Pereira, D. J. & 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. & Muzyczka, N. (1997c). The adeno-associated virus type2 p40 promoter requires a proximal Sp1 interaction and a p19 CA<sub>1</sub>G-like element to facilitate Rep transactivation. *J. Virol.* 71, 4300-4309.

Podsakoff, G., Wong, K. K. & Chatterjee, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J. Virol.* 68(9), 5656-5666.

Ponnazhagan, S., Mukherjee, P., Wang, X. S., Qing, K. Y., Kube, D. M., Kurpad, C., Yoder, M. C., Srour, E. F. & Srivastava, A. (1997b). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Prasad, K. M. R. & Trempe, J. P. (1995). The adeno-associated virus rep78 protein is covalently linked to viral DNA in a preformed virion. *Virology* 214(2), 360-370.

Redemann, B. E., Mendelson, E. & Carter, B. J. (1989). Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection. *J. Virol.* 63(2), 873-82.

Richardson, W. D. & Westphal, H. (1981). A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus. *Cell* 27, 133-141.

Rittner, K., Heilbronn, R., Kleinschmidt, J. A. & 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. & Tattersall, P. (1990). Oncosuppression by parvoviruses. In *Handbook of parvoviruses* (Tijssen, I. P., ed.), Vol. II, pp. 41-57. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Rommeleare, J. & Tattersall, P. (1990). Oncosuppression by parvovirus. In *Handbook of parvoviruses* (Tijssen, P., ed.), Vol. II, pp. 41-57. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Rose, J. A., Berns, K. I., Hoggan, M. D. & 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, 863-869.

Rose, J. A., Maizel, J. V. J., Inman, J. K. & Shatkin, A. J. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* **8**, 766-770.

Ruffing, M., Zentgraf, H. & Kleinschmidt, J. A. (1992). Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* **66**, 6922-6930.

Russell, D. W., Miller, A. D. & Alexander, I. E. (1994). Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(19), 8915-8919.

Rutledge, E. A. & Russell, D. W. (1997). Adeno-associated virus vector integration junctions. *J. Virol.* **71**(11), 8429-8436.

Ryan, J. H., Zolotukhin, S. & Muzyczka, N. (1996). Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **70**, 1542-1553.

Samulski, R. J. (1993). Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 74-80.

Samulski, R. J., Chang, L. S. & Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J. Virol.* **61**(10), 3096-101.

Samulski, R. J. & Shenk, T. (1988). Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J. Virol.* **62**(1), 206-210.

Samulski, R. J., Srivastava, A., Berns, K. I. & Muzyczka, N. (1983). Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* **33**(1), 135-143.

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 J.* **10**, 3941-3950.

Schenk, T. (1996). The viruses and their replication. In *Virology* (Fields, B., Knipe, D. & Howley, P., eds.), Vol. 2. 2 vols. Lippincott-Raven, New-York.

Schlehofer, J. R. (1994). The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat. Res.* **305**(2), 303-313.

Schlehofer, J. R., Ehrbar, M. & 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. & Heilbronn, R. (1990). Infection with adeno-associated virus type 5 inhibits mutagenicity of herpes simplex virus type 1 or 4-nitroquinoline-1-oxide. *Mutat Res* **244**(4), 317-20.

Schlehofer, J. R., Heilbronn, R., Georg-Fries, B. & 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**(5), 591-5.

Schlehofer, J. R. & zur Hausen, H. (1982). Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated herpes simplex virus type 1. *Virology* **122**, 471-475.

Schuchert, P., Langsford, M., Käslin, E. & 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.

Senapathy, P., Tratschin, J. D. & 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), 1-20.

Shelling, A. N. & Smith, M. G. (1994). Targeted integration of transfected and infected adenoassociated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Therapy* **1**(3), 165-169.

Siegl, G. (1984). Biology and pathogenicity of autonomous parvovirus. In *the Parvoviruses* (Berns, K. I., ed.). Plenum Press, New York.

Slack, R. S. & Miller, F. D. (1996). Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Cur. Opin. Neurobiol.* **6**(5), 576-573.

Smith, R. H., Spano, A. J. & 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. & 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. & 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**(12), 6204-6213.

Snyder, R. O., Im, D. S., Ni, T. H., Xiao, X., Samulski, R. J. & Muzyczka, N. (1993). Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral rep protein. *J. Virol.* **67**(10), 6096-6104.

Snyder, R. O., Samulski, R. J. & Muzyczka, N. (1990b). In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. *Cell* **60**(1), 105-113.

Spear, I. S., Fife, K. H., Hauswirth, W. W., Jones, C. J. & Berns, K. I. (1977). Evidence for two nucleotide sequence orientations within the terminal repetition of adeno-associated virus DNA. *J Virol* **24**(2), 627-34.

Sprecher-Goldberger, S., Thiry, L., Lefèbre, N., Dekegel, D. & 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.

Srivastava, A. (1987). Replication of the adeno-associated virus DNA termini in vitro. *Intervirology* **27**(3), 138-47.

Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**(2), 555-564.

Straus, S. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3), 742-6.

Su, P. F. & Wu, F. Y. (1996). Differential suppression of the tumorigenicity of HeLa and SiHa cells by infection of adeno-associated viruses. *Br. J. Cancer* 73(12), 1533-1537.

Summerford, C. & Samulski, R. J. (1997). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Surosky, R. T., Urabe, M., Godwin, S. G., McQuiston, S. A., Kurtzman, G. J., Ozawa, K. & Natsoulis, G. (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J. Virol.* 71(10), 7951-7959.

Thomson, B. J., Efstathiou, S. & Honess, R. W. (1991). Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 *rep* gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 351, 78-80.

Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V. & 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(1), 304-311.

Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Laruecharlus, S., Severin, F., Becker, N. & Schlehofer, J. R. (1994). Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J. Med. Virol.* 44(2), 215-222.

Tratschin, J. D., Müller, I. L. & 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(3), 611-619.

Trempe, J. P. & Carter, B. J. (1988). Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J. Virol.* 62(9), 3356-3363.

Trempe, J. P., Mendelson, E. & 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(1), 18-28.

Urcelay, E., Ward, P., Wiener, S. M., Safer, B. & Kotin, R. M. (1995). Asymmetric replication *in vitro* from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* 69(4), 2038-2046.

Walz, C., Anisi, T. R., Schlehofer, J. R., Gissman, L. & Müller, M. (1997c). *VII<sup>th</sup> international parvovirus workshop, Heidelberg, Germany.*

Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Dürst, M., Rabreau, M. & 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. & Schlehofer, J. R. (1992a). Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome-17. *J. Virol.* 66(5), 2990-3002.

Walz, C., Schlehofer, J. R., Flentje, M., Rudat, V. & zur Hausen, H. (1992b). Adeno-associated virus sensitizes HeLa cell tumors to gamma-rays. *J. Virol.* **66**(9), 5651-5657.

Wang, X.-S., Qing, K., Ponnazhagan, S. & 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**, 3077-3082.

Wang, X. S., Ponnazhagan, S. & Srivastava, A. (1995). Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Mol. Biol.* **250**(5), 573-580.

Wang, X. S., Ponnazhagan, S. & 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.

Ward, P. & Berns, K. I. (1996). *In vitro* replication of adeno-associated virus DNA: enhancement by extracts from adenovirus-infected HeLa cells. *J. Virol.* **70**, 4495-4501.

Ward, P., Urcelay, E., Kotin, R., Safer, B. & Berns, K. I. (1994). Adeno-associated virus DNA replication *in vitro*: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein. *J. Virol.* **68**(9), 6029-6037.

Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M., Carter, B. J. & 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.

Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R. M., Kotin, R. M. & 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**(13), 5808-5812.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. & Kleinschmitt, J. A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J. Virol.* **71**, 1341-1352.

Wonderling, R. M. & 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., Kyöstiö, S. R. M. & Owens, R. A. (1995). A maltose binding protein adeno-associated virus Rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J. Virol.* **69**(6), 3542-3548.

Wonderling, R. S., Kyöstiö, S. R. M., Walker, S. L. & 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.

Wonderling, R. S. & Owens, R. A. (1997a). Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J. Virol.* **71**, 2528-2534.

Wu, P., de Fiebre, G. M., Millard, W. J., King, M. A., Wang, S., Bryant, S. O., Gao, Y. P., Martin, E. J. & Meyer, E. M. (1996). An AAV promoter-driven neuropeptide Y gene delivery system using Sendai virosomes for neuron rat brain. *Gen. Ther.* **3**(3), 246-253.

Xiao, X., Xiao, W., Li, J. & Samulski, J. (1997). A novel 165 base-pair terminal repeat is the sole *cis* requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J. Virol.* **71**(2), 941-948.

Yakobson, B., Koch, T. & Winocour, E. (1987). Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J. Virol.* **61**(4), 972-981.

Yalkinoglu, A. O., Heilbronn, R., Burkle, A., Schlehofer, J. R. & zur Hausen, H. (1988). DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* **48**(11), 3123-3129.

Yalkinoglu, A. O., Schlehofer, J. R. & zur, H. H. (1990). Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced methotrexate and adriamycin resistance in CHO cells by adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer* **45**(6), 1195-203.

Yalkinoglu, A. Ö., Zentgraf, H. & Hübscher, U. (1991). Origin of adeno-associated virus DNA replication is a target of carcinogen-inducible DNA amplification. *J. Virol.* **65**, 3175-3184.

Yang, Q., Kadam, A. & Trempe, J. P. (1992). Mutational analysis of the adeno-associated virus *rep* gene. *J. Virol.* **66**(10), 6058-6069.

Yang, Q. C., Chen, F., Ross, J. & Trempe, J. P. (1995). Inhibition of cellular and SV40 DNA replication by the adeno-associated virus *rep* proteins. *Virology* **207**(1), 246-250.

Yang, Q. C., Chen, F. & Trempe, J. P. (1994). Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus *Rep* proteins. *J. Virol.* **68**(8), 4847-4856.

Yang, Q. C. & Trempe, J. P. (1993). Analysis of the terminal repeat binding abilities of mutant Adeno-Associated virus replication proteins. *J Virol* **67**(7), 4442-4447.

zur Hausen, H. (1991). The role of papillomaviruses in anogenital cancer. *Virol.* **184**, 9-13.

zur Hausen, H., Lanz, E. & Stürmer, E. (1966). Chromosomale aberrationen nach latenter infektion eines klonierten L-Zellstammes mit vaccinia-viren. *Med. Mikrobiol. Immunol.* **152**, 66-72.

