



DOCTORAT

Présenté à l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Mention Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Cancer du col de l'utérus : Etude de l'oncoprotéine E6 du
papillomavirus humain de type 16 et adressage de vecteurs
adénoviraux**



Charlotte BOULADE-LADAME

Soutenu publiquement le 7 septembre 2009

Jury

Dr. Pierre Coursaget, Rapporteur Externe, Université de Tours

Pr. Claude Kédinger, Rapporteur Interne, Université de Strasbourg

Pr. Chistiane Mougin, Rapporteur Externe, Université de Franche-Comté, Besançon

Dr. François Deryckère, Directeur de thèse, Université de Strasbourg

A mes deux amours Franck et Victor

A mes parents et Mamie

« Expérimenter, c'est imaginer »

Friedrich Nietzsche

Ce doctorat a été réalisé avec le soutien du Ministère de la Recherche et de l'Université de Strasbourg au sein de l'équipe Oncoprotéines (IREBS FRE-3211) codirigée par le Dr. Georges Orfanoudakis et le Dr. Gilles Travé.

J'exprime ma reconnaissance à tous les membres de mon jury de thèse d'avoir bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail : le **Dr. Pierre Coursaget**, le **Pr. Claude Kédinger** et le **Pr. Christiane Mougin**.

Je remercie particulièrement le **Pr. Claude Kédinger** de m'avoir accueilli au sein de l'IREBS FRE-3211 mais aussi de l'intérêt qu'il a porté à mon travail depuis mon DEA.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, le **Dr. François Deryckère** pour son encadrement depuis ce fameux 1 septembre 2004. Merci de m'avoir accordé ta confiance pendant ces cinq années. Merci aussi pour ta bonne humeur et tes petites blagues. Merci à ta petite famille pour les barbecues-piscine et les sorties ski-canoë.

Je remercie le **Dr. Gilles Travé** et le **Dr. Katia Zanier** pour leurs conseils, leur enthousiasme et leur disponibilité. Merci pour votre confiance sur le projet E6. Merci à toi Gilles pour les bonnes profiteroles de Noël.

Je remercie le **Dr. Murielle Masson** « la plus gentille et la plus jolie ! ». Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton réconfort dans les périodes de doute, ainsi que pour tes corrections et conseils. Merci également au **Dr. Yves Nominé** et au **Dr. Georges Orfanoudakis**, pour les discussions enrichissantes que nous avons eues pendant toute la durée de ma thèse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Oncoprotéines, les présents comme ceux qui sont partis, pour leur contribution à la bonne ambiance qui règne ici : **Abdellahi** (le roi de la frite et du ski, merci pour ta collaboration sur le projet E6 et rappelle-toi les sandwichs ne sont pas des spécialités grecques ;o)), **Anaëlle** (merci pour ton aide précieuse avec *Word 2007*, quelle horreur ce programme !!! et bon courage à toi qui a repris le flambeau), **Anissa** (courage plus que quelques mois..., reste la même avec ton petit

caractère bien trempé), **Anne** (merci pour ton sens de l'organisation et pour tes conseils de maman), **Denise, Isa, Katja, Khaled, Laurent** (le Nounou, « j'espère que nos discussions sont plus scientifiques qu'au début ;o) » merci pour tout, ton soutien, tes encouragements et surtout ton calme à tout épreuve. Je pense que tu as du bouillir intérieurement avec mes tonnes de questions...), **Magali** (Magoue pour les intimes, merci à toi de m'avoir transmis le flambeau et de m'avoir initié aux joies de manipuler ces petits virus) **Phiphi** (merci pour tes blagues « *so british* ! »), **Sadek** (le petit mignon ou Bernardo au choix, merci pour ton soutien ces derniers mois, la montée du « *Λυκαβηττός* » à Athènes par 38°C et les salades grecques resteront des souvenirs mémorables, continue bien tes petites enquêtes...), **le Seb** (merci pour ton soutien et les « *barbecue parties* » de l'été), **Rachel, Tutik** (merci à toi pour ta bonne humeur communicative et ton sourire permanent), **Xavier** (merci à toi pour tes conversations dirons nous non conventionnelles ;o)).

Je remercie également nos voisins : les membres de l'équipe Immunobiotechnologie, le **Pr. Etienne Weiss** et ses blagues connues de tous, le **Dr. Annie-Paule Sibler** (merci pour ta gentillesse et ta grande disponibilité), le **Dr. Dominique Desplancq, Anne-Sophie** (merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et pour ta maîtrise des formules mathématiques et des ordinateurs), **Audrey** (plus qu'une collègue, une amie merci d'avoir été là, merci pour tes chocolats et cookies, tu connais mon côté gourmande ;o) et surtout pour l'aquarelle de Victor), **Ysia, Jérôme** et sa petite famille, (Le breton ! Ventre à pattes, tu as fini bon nombre de mes assiettes de frites) et aussi les membres de l'équipe transcription, les **Dr. Bruno Chatton, Dr. Mariel Donzeau, Dr. Marc Vigneron, Adonis, Charlotte Hauss, Jessica, Kambiz**, et surtout **Barbara** (l'amie et la confidente, merci pour tout, heureusement que tu es revenue pour cette dernière année ;o), le labo était bien vide pendant ton absence...Merci également pour tes desserts, ils sont si bons ;o))

Je remercie également mes collègues et surtout amis de l'IGBMC et de l'escalade, le **Dr. Nicolas Charlet-Berguerand**, (merci pour ton humour et aussi de m'avoir fait confiance pour la collaboration sur la production des adénovirus, merci surtout pour nos soirées à l'escalade qui étaient un vrai moment de détente parfois plus que de sport ;o)), le **Dr Natacha Dreumont** (merci pour les soirées et les sorties escalades avec ta petite famille, tu as su être là...), **Charlotte** (qui me suit depuis Limoges, merci coloco' de choc d'être venue

dans cette région depuis ton Tours natal, tu as apporté un bout de chez moi avec toi et surtout ta bonne humeur et tes petits plats).

Je n'oublierais pas **Alain** (Sop'Lanig, merci pour les soirées bretonnes et les vacances en Martinique), la **famille Dreumont-Schuller** les deux miss et le papa (merci pour tout), mes anciennes collègues et amies de Paris, **Ludivine et Aude** (finalement je l'ai faite cette thèse ;o)), **M** (merci d'être encore là depuis le temps et ce malgré la distance), **Milou** (merci pour ton soutien, les conversations entre filles et les virées en ville pendant mon congé). Merci aussi à **Mamie Ange** et **Gérard** d'avoir gardé le petit Victor

Je souhaite remercier tout particulièrement **mes parents** qui m'ont toujours soutenu même à distance, je vous aime fort.

Et enfin, merci à mes deux rayons de soleil **Franck** et **Victor**. Les sourires sont gratuits mais les leurs n'ont pas de prix.

Merci à tous

Deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme, les carcinomes du col utérin sont associés dans 99 % des cas à une infection par un virus à ADN : le virus du papillome humain (HPV de type 16 et 18 essentiellement). L'effet oncogène des HPV est principalement provoqué par l'intégration des gènes codant deux oncoprotéines virales, E6 et E7, dans le génome de la cellule infectée. L'inhibition spécifique de l'oncoprotéine E6 constitue un enjeu thérapeutique majeur. En effet, elle doit provoquer la restauration de la voie dépendante de p53 et permettre l'orientation des cellules cancéreuses vers l'apoptose. Cependant, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite une bonne compréhension des mécanismes de carcinogenèse, la découverte de molécules biologiques actives mais aussi l'optimisation de leur vectorisation. C'est dans ce contexte scientifique que s'est inscrit mon projet de thèse. Celui-ci est articulé autour de trois axes de recherche dont le but est : (i) déterminer l'activité biologique de mutants de l'oncoprotéine E6 d'HPV de type 16 (16E6) afin d'établir les relations entre structure et fonctions au niveau cellulaire, (ii) développer des ligands biologiques (scFvs) capables d'inhiber 16E6 dans un contexte cellulaire (iii) générer des vecteurs recombinants ciblant de manière préférentielle les cellules cancéreuses transformées par HPV.

Au cours de ce travail nous avons, par des études fonctionnelles, montré que l'auto-association du domaine N-terminal de 16E6 n'est pas nécessaire à la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules C33A. De plus, cette dégradation peut se faire de manière indépendante de l'ubiquitine ligase E6AP. Nous avons également montré que des fragments d'anticorps (scFvs) interagissant avec l'extrémité N-terminale de 16E6 bloquent la dégradation de p53 *in vitro* et induisent une mort cellulaire spécifique des cellules HPV positives. Parallèlement à ce projet, nous avons produit des vecteurs adénoviraux pseudotypés ciblant de manière préférentielle les cellules HPV positives.

Mon travail de thèse a donc permis (i) une meilleure compréhension de la relation entre auto-association de 16E6, liaison à E6AP et dégradation de p53 (ii) l'étude d'une technique d'immunisation intracellulaire basée sur l'expression de scFvs anti-16E6 et enfin (iii) la construction d'adénovirus ciblant de manière préférentielle les cellules HPV positives.

Le développement de mutants de 16E6 inhibant les activités de l'oncoprotéine ainsi que de scFvs anti-16E6 pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de détruire de manière ciblée les cellules tumorales du col de l'utérus.

Mots clés : Papillomavirus, cancer du col de l'utérus, adénovirus, scFvs, oncoprotéine E6, thérapie génique, ciblage cellulaire

16Ex: Oncoprotéine 16 d'HPV de type x

5(6) FAM: 5(6)-Carboxyfluoresceine

A.

AAV: *Adeno-Associated Virus*

Adx : Adénovirus de type x

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP: *Adenoviral Death Protein*

ADP: Adénosine DiPhosphate

Amp: Ampicilline

AP1: *Activating Protein 1*

Apaf: *Aplysia activating factor*

ARF: *Alternative Reading Frame*

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adénosine TriPhosphate

B.

Bak : *Bcl2-homologous antagonis killer*

Bax: *Bcl2-activated X*

Bcl2: *B-cell lymphoma leukemia type 2*

BET : Bromure d'Ethidium

C.

CA : Protéine de capsid

CAS: *Crk-associated substrat*

CBP: *CREB Binding Protein*

ccdB: *control of cell death B*

cdk : *Cyclin dependent kinase*

CIN x: Néoplasie Cervicale Intraépithéliale de type x

CIP: *cdk-interacting protein*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV: CytoMégaloVirus

CR: *Conserved Region*

CRM1: *Chromosome Maintenance Region1*

D.

DAPI: 4', 6' Di Amidino-2-Phényl Indole

DBP: *single stranded DNA Binding Protein*

DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*

DMEM: Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

dNTP: desoxyriboNucleotideTriPhosphate

DPPC: DiPalmitoyle PhosphatidylCholine

E.

E6AP: *E6 Associated Protein*

E6-BP: *E6 Binding Protein*

E6TP: *E6 Terminal Protein*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

ERC 55: *Expressed in Renal Carcinoma protein 55*

ESBS: Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

Ex: *Early Region X*

F.

FADD: *Fas associated death domain*

G.

Gps2: *G-protein Pathway Suppressor 2*

GST: Glutathion S-transférase.

GTPase: Guanosine TriPhosphate

H.

hDlg: *human homologue of the Drosophila discs*

hMCM-7: *human MiniChromosome Maintenance*

HPVX: *Human PapillomaVirus de type X*

HRP: *Horseradish peroxidase*

hScrib: *human homologue of Drosophila neoplastic tumor suppressor*

HSGAG: Héparane Sulfate
GlycosAminoGlycane

HSPG: Héparane Sulfate ProtéoGlycane

HSV-I: Herpès Simplex Virus de type I

hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*

I.

IAP : Inhibiteur des Protéines Apoptotiques

IBMP : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg

IN: intégrase

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

ITR: *Inverted Terminal Repeat region*

K.

Kan: Kanamycine

LB: Luria Bertani

LCR: *Long Control Region*

Lx: *Late Region X*

M.

MA : protéine de la matrice

MAGI: *Membrane-Associated Guanylate Kinase*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MBP: *Maltose Binding Protein*

MCS (ou TCS) : Multi-site de clonage

mdm-2 : *mouse double minute 2*

MEM Zn²⁺: Milieu d'Eagle Modifié par Richter

MGMT : O(6)-méthylguanine-DNA-méthyl transférase

MLP: *Major Late Promoter*

MOI: *Multiplicity Of Infection*

MTOC: *MicroTubule-Organizing Center*

MTT: 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MUPP: *Multi-PDZ domain Protein*

N.

NC : protéine de la nucléocapside

NIH: *National Institutes of Health*

O.

OMS: Organisation mondiale de la santé

ORF: *Open Reading Frame*

P.

PA: site de polyadénylation

PATJ: *Protein Associated with Tight Junction*

pb: paire de bases

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDZ: PSD-95, Dlg, ZO1

PEG : PolyÉthylène Glycol

PEI : PolyÉthylénimine

PI 3: Phosphatidylinositol 3

PKA: Protéine Kinase dépendant de l'AMPc

PKN: Protéine Kinase N

PML: *ProMyelocytic Leukemia*

PR : Protéase Rétrovirale

pRb : protéine du rétinoblastome

PTPN: *Protein tyrosine phosphatase gene*

R.

RCA : *Replication-Competent Adenovirus*

RGD : arginine-glycine-aspartate

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RPA : *Replication Protein A*

RT : Reverse Transcriptase

S.

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

SDS-PAGE: *Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis*

shRNA: *small hairpin RNA*

SU : composant de surface

SV-40 : Virus simien 40

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T.

TBE: Tris-Borate-EDTA

TBS: *Tris Buffered Saline*

TE : Tris-EDTA

TENS : Tris-EDTA-NaOH-SDS

TK: Thymidine Kinase

TPL: *TriPartite Leader*

TLR: *Toll Like Receptor*

TM: composants transmembranaires

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TP: *Terminal Protein*

TRADD: *TNFR-associated death domain*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

U.

Ub: Ubiquitine

V.

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

X.Y.Z.

XRCC1: *x-ray repair cross-complementing group 1*

YAC: *Yeast Artificial Chromosome*

ZD: *Zinc Domain*

Introduction Générale

A.	Cancer du col de l'utérus et papillomavirus humains	1
1.	Généralités sur le cancer du col de l'utérus	1
2.	Dépistage, Prévention et Traitements.....	2
3.	Vaccination prophylactique et thérapeutique	5
B.	Les papillomavirus humains.....	6
1.	Biodiversité et pathologies associées.....	6
2.	Structure et organisation génomique	7
3.	Cycle viral	9
a.	Infection primaire de l'épithélium : récepteurs cellulaires, attachement et endocytose	
	10
b.	Phase de maintenance.....	11
c.	Phase de prolifération.....	12
d.	Phase d'amplification.....	13
e.	Phase d'assemblage.....	14
f.	Intégration et carcinogénèse	14
4.	E6 et E7 les acteurs clés.....	15
a.	L'oncoprotéine E7	15
i.	Structure	15
ii.	Activités biologiques	17
	• Dégradation de pRb et induction de la transcription dépendante de E2F	
	17
	• E7 et p53.....	19
	• Autres fonctions principales de E7	19

E7 et système immunitaire	19
E7 et instabilité génomique	19
E7 et métabolisme cellulaire.....	19
E7 et hyperprolifération.....	20
b. L'oncoprotéine E6.....	20
i. Structure	20
ii. Activités biologiques connues	22
• Inactivation de p53.....	22
• E6 et apoptose.....	24
• Activation des télomérases	27
• Modulation des signaux issus des protéines G	28
• Modulation de la réponse immunitaire	28
• Stabilisation des chromosomes.....	28
• Perturbation de la structure épithéliale et de la différenciation	29
• Interaction avec les protéines à domaine PDZ.....	30
iii. Les motifs de liaison.....	32
c. Les propriétés transformantes de E6 et E7	33
d. Inhibition de l'oncoprotéine E6	34
C. Les adénovirus	36
1. Classification	36
2. Structure de la particule	38
3. Génome viral.....	40
4. Les acteurs de l'infection	41
a. Les protéines virales importantes.....	41
i. La fibre (polypeptide IV)	41

ii.	Le penton-base	43
b.	Récepteurs d'attachement impliqués.....	44
i.	CAR.....	44
ii.	Les héparanes sulfates glycosaminoglycanes.....	45
iii.	CD46.....	46
iv.	CD80 et 86.....	46
v.	Les acides sialiques	47
vi.	Intégrines $\alpha M\beta 2$ et $\alpha L\beta 2$	47
vii.	Récepteurs protéiques et non protéiques.....	47
c.	Les intégrines, comme récepteur d'entrée cellulaire.....	48
5.	Cycle viral.....	49
a.	Reconnaissance cellulaire et internalisation	49
b.	L'entrée.....	50
c.	Sortie dans le cytosol.....	50
d.	Translocation nucléaire.....	51
e.	Réplication et assemblage de particules virales.....	52
i.	Phase précoce du cycle viral	52
ii.	Transition vers la phase tardive.....	54
iii.	Phase tardive.....	54
f.	Assemblage et libération des particules.....	55
g.	Endocytose via la voie des clathrines	55
D.	Thérapie génique et adénovirus.....	55
1.	Le concept de thérapie génique	55
2.	Thérapie génique et cancer du col de l'utérus.....	56

3. Les méthodes de transfert de gènes	59
a. Vecteurs viraux	59
i. Les adéno-associated virus (AAV)	61
ii. Les rétrovirus	61
• Les oncorétrovirus	63
iii. Les poxvirus ou virus de la vaccine	63
iv. Le virus de l'herpès simplex (HSV)	64
b. Méthodes non virales	65
4. Les adénovirus en thérapie génique.....	66
a. Méthodes de construction d'adénovirus recombinants	66
i. Par ligation <i>in vitro</i>	66
ii. Recombinaison homologue chez les mammifères	67
iii. Recombinaison homologue chez les bactéries.....	68
iv. Utilisation de la technique « gateway ».....	69
v. Autres méthodes.....	71
b. Vecteurs de première génération.....	72
c. Vecteurs de seconde génération	73
d. Vecteurs de troisième génération ou vecteur « gutted »	74
e. Avantages et inconvénients des vecteurs adénoviraux	74
E. Introduction du projet de recherche	75
1. Etude fonctionnelle de l'oncoprotéine 16E6.....	75
2. Exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques.....	76
a. Immunisation intracellulaire.....	76
b. Ciblage de vecteurs adénoviraux aux cellules transformées par HPV.	76

Matériel et Méthodes

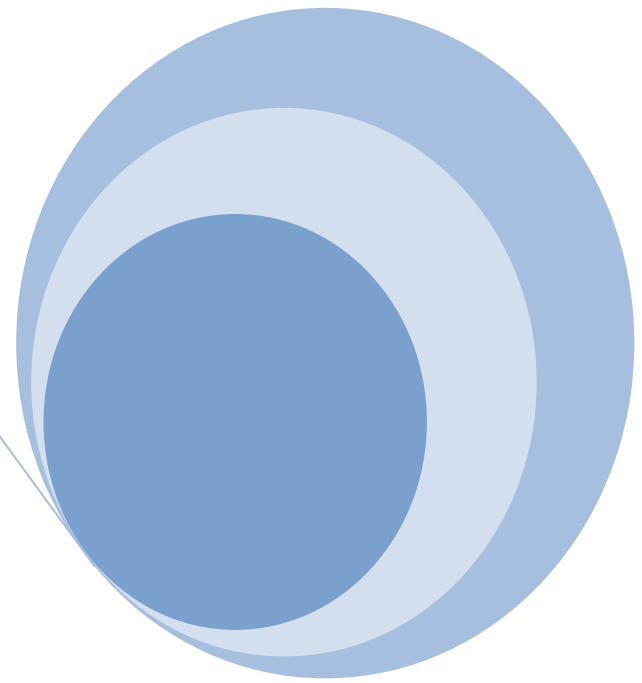
A.	Matériel.....	79
1.	Lignées cellulaires	79
2.	Plasmides	80
3.	Adénovirus.....	81
4.	Souches Bactériennes.....	81
5.	Anticorps.....	82
B.	Méthodes.....	82
1.	Manipulation des acides nucléiques et clonage.....	82
a.	Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	82
b.	Electrophorèse sur gel d'agarose et purification d'ADN	83
c.	Digestion enzymatique et ligation	83
d.	Transformation de bactéries compétentes.....	84
e.	Extraction et purification des ADN plasmidiques	84
f.	Séquençage.....	85
2.	Manipulation des protéines.....	85
a.	Transfection de cellules eucaryotes	85
b.	Test de survie cellulaire ou test MTT.....	85
c.	Migration sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western Blot	85
d.	Préparation de protéines fusionnées à la GST	86
e.	Synthèse <i>in vitro</i> de protéines	86
f.	Dégradation <i>in vitro</i> de p53.....	86
g.	Test de liaison <i>in vitro</i> à E6-AP ou E6-AP peptide (<i>GST-Pull down</i>)	87
h.	Visualisation indirecte des protéines par immunofluorescence.....	87

3. Production virale et amplification	87
a. Production d'adénovirus pseudotypés.....	87
b. Production d'adénovirus recombinants.....	89
c. Purification des virus et titration	89
d. Préparation d'ADN viral à partir de particules	90
4. Manipulation des adénovirus	90
a. Conjugaison de fluorophores à la capsid virale	90
b. Test de trimérisation de la fibre et évaluation du pourcentage d'intégration	91
c. Internalisation et fixation des virus fluorescents.....	91

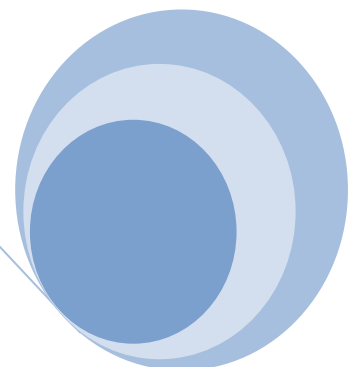
Résultats

A. Etude fonctionnelle de l'oncoprotéine 16E6.....	92
1. Contexte scientifique	92
2. Résultats	94
a. Phénomène d'auto-association et dégradation de la protéine p53	94
b. Interface de liaison à E6-AP et dégradation de p53	97
c. Dégradation de p53 et effet dominant négatif	101
3. Conclusion-Discussion	103
B. Exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques.....	106
1. Immunisation intracellulaire par l'utilisation de scFvs anti-16E6.....	106
a. Introduction générale	106
i. Structure des scFvs	106
ii. Ingénierie des anticorps recombinants : Production et sélection.....	108
iii. Neutralisation intracellulaire et autres utilisations	109
iv. Applications thérapeutiques.....	110

v. Limitations et stratégies d'amélioration.....	110
b. Contexte scientifique	113
c. Discussion.....	117
2. Transduction préférentielle des cellules HPV positives par des adénovirus de type 5.....	
.....	119
a. Introduction générale	119
i. Ciblage transcriptionnel.....	119
ii. Ciblage transductionnel	121
Modification génétique de la fibre	122
Délétion complète de la fibre	122
Délétion du bouton terminal de la fibre	122
Insertion de ligands spécifiques au niveau de la fibre	123
Modification des protéines de la capside	124
Ablation du tropisme naturel.....	125
Pseudotypage sérotypique	125
Pseudotypage xénotypique.....	126
Utilisation de molécules adaptatrices.....	127
Double ciblage.....	127
iii. Ciblage de la réplication et utilisation d'adénovirus réplcatifs conditionnels	
.....	128
b. Contexte scientifique	129
c. Discussion.....	133
d. Résultats complémentaires	133
e. Perspectives	141
Conclusion Générale	146
Bibliographie	149



Introduction Générale



A. Cancer du col de l'utérus et papillomavirus humains

1. Généralités sur le cancer du col de l'utérus

Deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme, le cancer du col de l'utérus représente environ 10 % de la totalité des cancers dans le monde. Classé au huitième rang des cancers en France, il constitue un réel problème de santé publique. En effet, 273 000 décès sont enregistrés chaque année et environ 500 000 cancers invasifs étaient dénombrés en 2002 (<http://www-dep.iarc.fr/>). Près de 83 % des cas et trois quarts des décès sont concentrés dans les pays en développement. De manière générale, une corrélation existe entre l'incidence et la mortalité ; ainsi certaines régions ont un taux de mortalité anormalement élevé. Par exemple, moins de 5 % des femmes des pays en développement survivent après 5 ans, alors que dans les pays développés ce taux passe à 66 % [Parkin et al., 2005]. L'agent étiologique majeur du cancer du col de l'utérus est l'infection par les papillomavirus humains (HPV) dits de haut risque. En effet, dans 99,7 % des biopsies, leur ADN est retrouvé [Walboomers et al., 1999]. C'est en 1972, que les premières expériences initiées par le prix Nobel de médecine et de physiologie 2008, le Pr. zur Hausen, ont permis d'établir une relation directe entre le cancer du col de l'utérus et l'infection par les HPV. Ce lien fut finalement reconnu en 1996 par l'organisation mondiale de la santé (OMS) et le NIH (*National Institutes of Health*) [Cohen and Enserink, 2008].

Le papillomavirus humain de type 16 (HPV16) est le plus fréquemment associé aux tumeurs du col de l'utérus (54,6 %), viennent ensuite les types 18 (15,8 %), 45 (3,7 %), 33 (4,4 %) et 31 (3,5 %) (**Figure 1**). La transmission virale s'effectue le plus souvent par contact direct de la peau et des muqueuses. HPV étant le virus le plus sexuellement transmis, la multiparité, la précocité des rapports et le nombre de partenaires représentent donc des facteurs augmentant le risque d'infection [Castellsague and Munoz, 2003; Franco et al., 1999]. Dans la majorité des cas cette infection par les HPV est transitoire et s'élimine en quelques mois. Les anomalies cytologiques générées régressent alors spontanément. Néanmoins, l'infection persiste parfois et des lésions précancéreuses peuvent apparaître. Cependant, moins de 1 % des femmes infectées par HPV16 vont développer un cancer du col de l'utérus [Munoz et al., 2006]. Un facteur serait nécessaire à la formation des cancers du col de l'utérus : la persistance de l'infection [Dalstein et al., 2003; Schlecht et al., 2001]. En

revanche, l'infection multiple par plusieurs types d'HPV de haut risque reste un facteur encore controversé.

L'infection par les HPV de haut risque s'avère donc nécessaire mais non suffisante au développement du phénotype malin. Des cofacteurs répartis selon trois catégories vont également jouer un rôle important : (i) les facteurs environnementaux ou exogènes regroupant les contraceptifs oraux, le nombre de grossesses, la fumée de cigarette, la nutrition, la co-infection avec d'autres agents sexuellement transmissibles (exemples : virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus de l'herpès), (ii) les facteurs endogènes regroupant des facteurs génétiques et (iii) les facteurs relatifs à la réponse immunitaire (pour revue [Franco and Harper, 2005]).

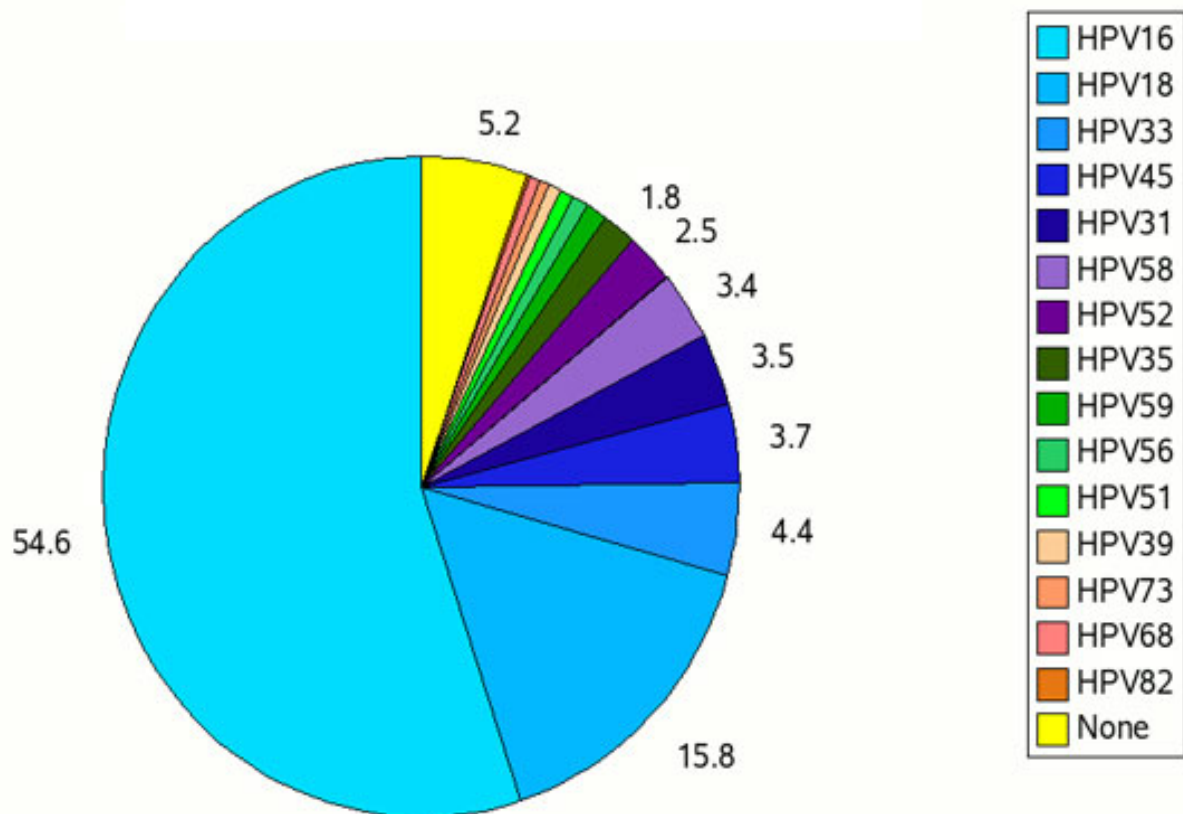


Figure 1 : Répartition mondiale des cancers du col de l'utérus en fonction des types d'HPV. A eux seuls, les HPV de type 16 et 18 sont responsables de plus de 70 % des cancers du col de l'utérus (adaptée de [Munoz et al., 2006]).

2. Dépistage, Prévention et Traitements

Le développement du cancer du col de l'utérus est un processus lent et continu qui débute suite à l'infection des épithélia par des HPV de haut risque. Dans un premier temps, des néoplasies cervicales intra-épithéliales bénignes (CIN1) se développent. Elles peuvent

ensuite progresser graduellement vers des degrés plus sévères de néoplasies et des lésions micro-invasives (CIN2 et CIN3) pour aboutir au cancer invasif (**Figure 2**).

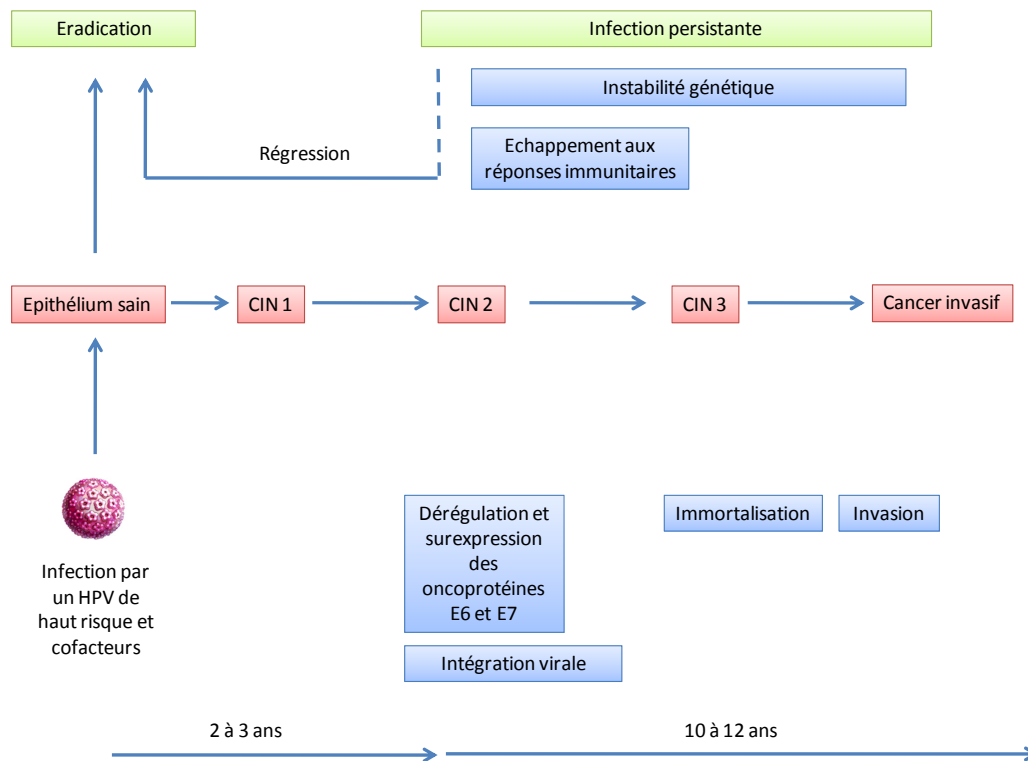


Figure 2 : Développement des cancers du col utérin. L'infection par le papillomavirus humains de haut risque est nécessaire à l'apparition des lésions pré-cancéreuses du col de l'utérus, mais d'autres cofacteurs sont également impliqués (multiparité, tabagisme, infection avec d'autres virus...). CIN : néoplasie cervicale intra-épithéliale.

La prévention du cancer du col de l'utérus passe évidemment par un dépistage précoce et systématique des lésions pré-cancéreuses. Les analyses cytologiques et colposcopiques furent les premières méthodes utilisées pour ce dépistage. Décrite pour la première fois par Papanicolaou [Papanicolaou, 1949], la procédure a largement évolué depuis et une harmonisation de la terminologie a été réalisée [Jordan and Monaghan, 2004]. Les prélèvements effectués au niveau du col de l'utérus sont interprétés après coloration afin de déterminer le type d'anomalie et son degré. Cependant le risque de faux négatifs reste important. En effet, seulement 51 % des CIN et des cancers seraient diagnostiqués par cette méthode [Nanda et al., 2000]. Afin de préciser le diagnostic, une colposcopie (examen du col de l'utérus au moyen d'un appareil optique grossissant et d'un éclairage puissant) peut être réalisée. Récemment des outils de biologie moléculaire ont été introduits afin de détecter la présence de séquences d'ADN ou d'ARN messagers provenant des HPV dans les

prélèvements. Ces tests ont l'avantage d'être plus sensibles et reproductibles. Seule l'analyse histopathologique d'une biopsie cervicale permet d'établir le diagnostic définitif et de définir le mode de traitement.

Le traitement du cancer du col de l'utérus va dépendre du stade d'évolution de la maladie, de la taille de la tumeur, de l'âge de la patiente et de son état de santé générale. L'examen histopathologique va permettre de classer la lésion suivant la classification de FIGO (<http://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php?lang=2>, **Tableau 1**) et de déterminer son caractère invasif. A l'heure actuelle la radiothérapie et la chimiothérapie associées constituent les principaux moyens de traitements.

Stade I	strictement lié au col utérin	A	cancer invasif identifié par examen microscopique
		A1	l'invasion mesurée dans le stroma ne dépasse pas 3 mm en profondeur et 7 mm en largeur
		A2	l'invasion mesurée dans le stroma est comprise entre 3 et 5 mm en profondeur et ne dépasse pas 7 mm de largeur
		B	soit les lésions cliniques sont limitées au col, soit les lésions infracliniques sont plus importantes que dans le stade IA2. Toute lésion macroscopiquement visible même avec une invasion superficielle est classée cancer de stade IB
		B1	lésions cliniques de taille ne dépassant pas 4 cm
		B2	lésions cliniques de taille supérieure à 4 cm
Stade II	s'étend au-delà du col sans atteindre les parois pelviennes affecte le vagin	IA	pas d'atteinte paramétriale évidente. L'invasion touche les deux tiers supérieurs du vagin
		AB	atteinte paramétriale évidente mais la paroi pelvienne n'est pas touchée
Stade III	étendu à la paroi pelvienne	IIA	pas d'extension à la paroi pelvienne, mais atteinte du tiers inférieur du vagin
		IIB	extension à la paroi pelvienne, hydronéphrose ou rein muet
Stade IV	étendu au-delà du petit bassin envahi la muqueuse de la vessie et le rectum	VA	extension de la tumeur aux organes pelviens adjacents
		VB	extension aux organes distants

Tableau 1 : Classification FIGO des carcinomes du col de l'utérus, source TNM, L. Sobin and Ch Wittekind UICC et International Union against Cancer, Geneva, Switzerland pp115-157; 6th ed 2002

3. Vaccination prophylactique et thérapeutique

L'étiologie du cancer du col de l'utérus étant étroitement lié à une infection par les HPV [Walboomers et al., 1999], des vaccins de types prophylactiques ont été développés. Leur principe va être d'administrer une molécule ou autre capable de déclencher une réponse immunitaire. La mémorisation de cette réponse par le système immunitaire permet alors lors d'une infection ultérieure une mobilisation plus rapide des acteurs du système immunitaire tumoral. Ainsi, il a été montré que des anticorps spécifiques de la capsid virale L1 ou L2 sont capables de prévenir une nouvelle infection par HPV [Bousarghin 2003]. La surexpression des protéines L1 conduit à leur auto-assemblage et à la formation de pseudo-particules virales (**Figure 3**). Ces pseudo-virus dépourvus de matériel génétique, sont capables après vaccination de l'hôte de déclencher de fortes réponses immunitaires. Malgré tout, le risque de multiplication ou de virulence est totalement écarté. C'est grâce à ce procédé que deux vaccins prophylactiques ont été mis au point : (i) le Gardasil®, commercialisé par la société Sanofi-Pasteur, est un vaccin dirigé contre quatre types d'HPV : les HPV16, HPV18, HPV6 et HPV11. Il prévient les lésions pré-cancéreuses du col de l'utérus et de la vulve ainsi que des verrues génitales, et (ii) le Cervarix®, commercialisé par la société GlaxoSmithKline, est un vaccin bivalent offrant une protection contre les HPV de haut risque 16 et 18.

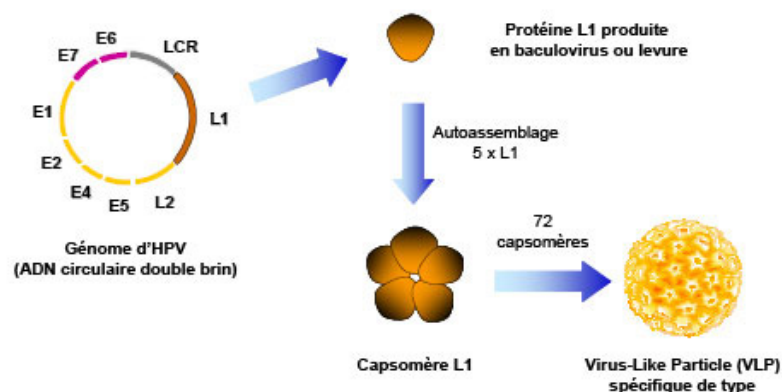


Figure 3 : Production pseudo-particules d'HPV

Parallèlement à cette avancée, d'autres laboratoires travaillent au développement de vaccins thérapeutiques qui ciblent de manière générale les deux oncoprotéines E6 et E7 des HPV. En effet, des études ont montré que ces deux oncoprotéines contiennent des épitopes pris en charge et présentés en association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) [Kadish et al., 1997]. Actuellement huit vaccins font l'objet d'études cliniques de phase II [Brinkman et al., 2007].

B. Les papillomavirus humains

1. Biodiversité et pathologies associées

Les papillomavirus (du latin papilla, diminutif de papula signifiant bouton et du suffixe grec -ome désignant le caractère tumoral) sont responsables chez l'homme, d'une grande variété de lésions cutanées et des muqueuses rassemblées sous le nom de papillomes viraux (verruques cutanées et anogénitales, papillomes oraux et laryngés, épidermodysplasies verruciformes). Au cours de leur vie, 80 % des femmes sexuellement actives ont été ou sont infectées par un papillomavirus humains [Baseman and Koutsky, 2005]. Ainsi, un épithélium cervical peut être infecté par plus de quarante types d'HPV.

Du fait de leur implication au niveau médical, les papillomavirus humains ont été très étudiés et plus de cent types ont pu être identifiés et séquencés à ce jour [Bernard, 2005]. Approximativement 90 % des HPV caractérisés appartiennent aux genres alpha ou bêta **(Figure 4)**.

Les papillomavirus bêta provoquent chez l'homme des infections cutanées discrètes [Harwood and Proby, 2002]. Les papillomavirus alpha sont les plus répandus et regroupent les virus cutanés et génitaux-muqueux. Au sein de ce groupe, deux catégories de virus ont pu être identifiées : (i) les virus dits de haut risque, tels que les HPV16 et HPV18, associés au développement de cancers anogénitaux incluant le cancer du col de l'utérus (ii) les virus dits de bas risque, tels que HPV6 et HPV11, responsables de verrues génitales. Les infections par des HPV de haut risque ne se limitent cependant pas aux tissus génitaux. En effet, environ 20 % des cancers de l'oropharynx contiennent de l'ADN de ces HPV [Herrero et al., 2003]. Cette biodiversité résulte probablement de l'évolution du virus au sein des différents épithélia humains.

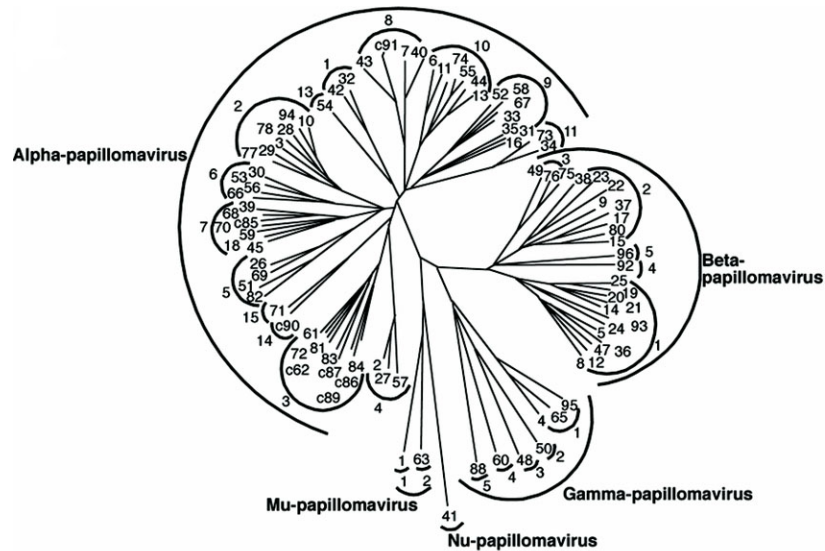


Figure 4 : Arbre phylogénétique des papillomavirus humains (d'après [Doorbar, 2006]). Les HPV sont classés en cinq groupes. Les HPV pouvant infecter le col de l'utérus appartient au groupe alpha qui comprend soixante membres. Les HPV de type bêta, gamma, Mu et Nu sont retrouvés principalement dans les infections cutanées.

2. Structure et organisation génomique

Les papillomavirus sont des virus non enveloppés de la famille des *papillomaviridae*. Leur capsidie icosaédrique d'un diamètre d'environ 55 nm est composée de soixante douze capsomères (**Figure 5**). Chaque capsomère est en fait un pentamère de la protéine majeure de capsidie L1.

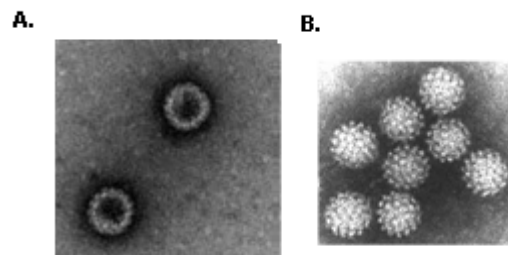


Figure 5 : Particule virale d'HPV. A. Pseudo-virions d'HPV {Bousarghin, 2009} B. Microscopie électronique de particule de BPV (papillomavirus Bovin) (<http://virology-online.com/viruses/papilloma.gif>, Linda Stannard)

Le génome des HPV est constitué d'un ADN double brin circulaire d'environ 7900 pb (**Figure 6**). L'analyse comparée des séquences nucléotidiques des papillomavirus de différentes espèces a révélé une organisation génétique commune en huit à dix cadres de lecture ouverts (ORF, *Open Reading Frame*) codant pour les protéines de type précoces ou

tardives. Les gènes viraux sont transcrits sous la forme d'un messenger polycistronique, qui par des épissages alternatifs donne l'ensemble des protéines précoces et tardives.

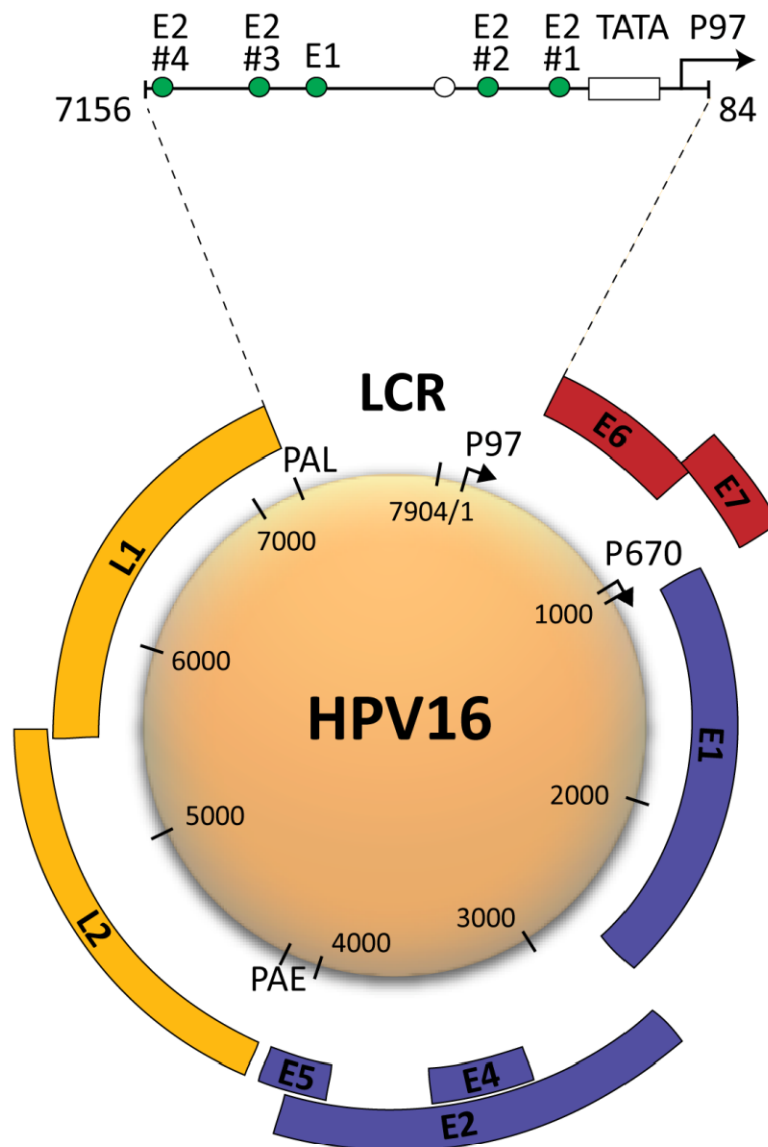


Figure 6 : Organisation du génome d'HPV de type 16 (adaptée de [Burk, 1999]). Le génome d'HPV est une molécule d'ADN circulaire double brin de 7 906 pb. Il contient une région de régulation (LCR, *Long Control Region*) qui contient les éléments de contrôle de la transcription et de la réplication et les cadres ouverts de lecture des gènes précoces (E) et tardifs (L). La région LCR est volontairement agrandie afin de faire apparaître les sites de fixations d'E2, E1 et Sp1 ainsi que le motif TATA du promoteur p97. (PAE : *PolyAdenylation Early*, PAL : *PolyAdenylation Late*)

Trois régions peuvent être individualisées au sein du génome : (i) une région précoce E (*Early*) qui contient les séquences codantes des protéines virales précoces (E1 à E7). Ces protéines vont jouer un rôle important dans la réplication et la transcription de l'ADN, (ii) une région tardive L (*Late*) qui code les protéines structurales L1 et L2. Et enfin (iii) une

région non codante ou LCR (*Long Control Region*) qui comprend 400 à 1000 nucléotides. Elle contient l'origine de réplication virale, les séquences nécessaires à l'encapsidation, des séquences de régulation de la réplication et de la transcription (élément cis) ainsi que les promoteurs des gènes précoces (p97 pour HPV16 et p105 pour HPV18) et tardifs (p670 pour les HPV16 et HPV18). Le promoteur des gènes précoces va être actif constitutivement tandis que celui des gènes tardifs est activé selon le degré de différenciation de la cellule hôte. D'autres promoteurs secondaires ont pu être identifiés dans cette zone et joueraient un rôle dans le cycle viral [Ozbun and Meyers, 1998].

3. Cycle viral

Le cycle viral des HPV va être lié au programme de différenciation des cellules infectées ce qui implique une coordination entre l'expression des différents produits des gènes viraux et la progression des cellules infectées vers la surface de l'épithélium. L'ensemble des événements du cycle viral peut être divisé en cinq étapes (**Figure 7**).

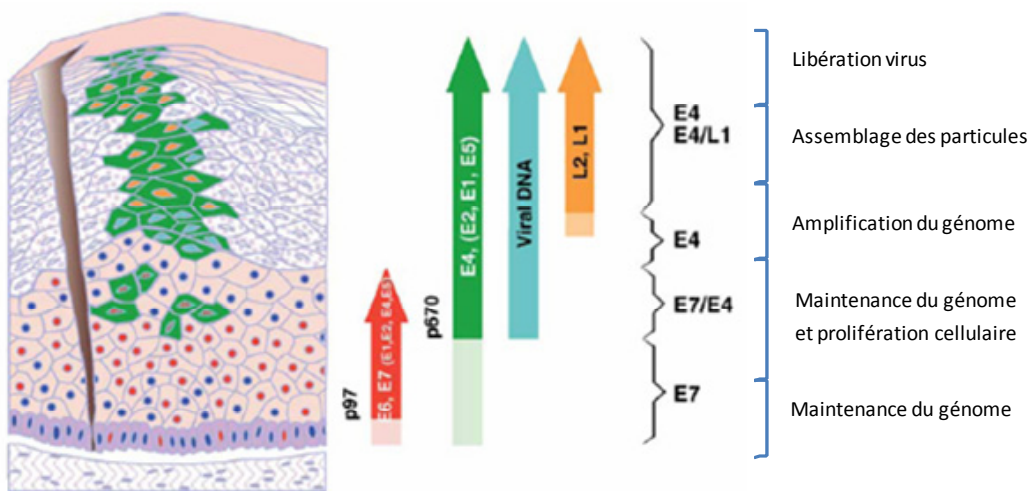


Figure 7 : Cycle infectieux de l'HPV (d'après [Doorbar, 2006]). Les cellules présentant des noyaux rouges sont les cellules infectées au sein desquelles les protéines virales sont exprimées. La morphologie des cellules dépend de l'expression des protéines virales en particulier d'E6 et E7. Leur expression va être nécessaire à la réplication du génome. Les protéines de capsid L1 et L2 vont être exprimées au sein des cellules contenant l'ADN amplifié au niveau des couches supérieures.

a. Infection primaire de l'épithélium : récepteurs cellulaires, attachement et endocytose

Pour que l'infection ait lieu, les particules virales doivent avoir accès aux cellules de la couche basale de l'épithélium (pour revue [Sapp and Day, 2009]). En effet, ces cellules s'avèrent peu différenciées et mitotiquement très actives (**Figure 8**).

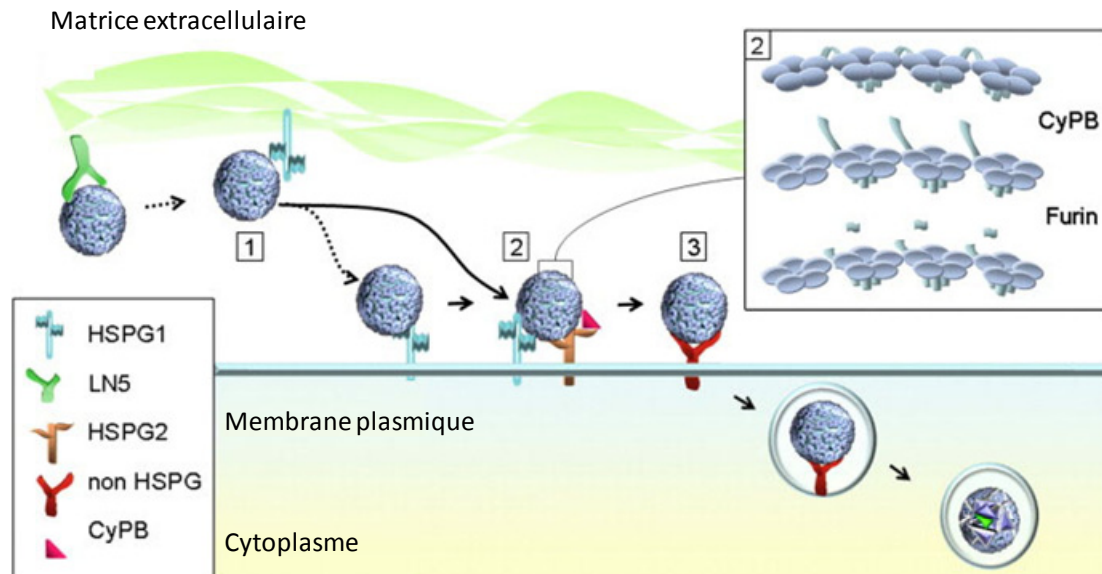


Figure 8 : Modèle du mécanisme infectieux utilisé par l'HPV16 (d'après [Sapp and Day, 2009]). **1.** La particule virale se lie à son récepteur primaire d'attachement : les héparanes sulfates protéoglycanes de type 1 (HSPG1), présent au niveau de la matrice extracellulaire ou à la surface de la cellule. **2.** La capsid virale est transférée à un second site de liaison aux HSPG2 présent à la surface de la cellule. Le changement conformationnel induit conduit à l'exposition de la partie N-terminale de la protéine L2 et au clivage de la furine. La cyclophiline B va favoriser cette étape. **3.** Ces événements semblent induire d'autres changements conformationnels qui conduisent à une perte d'affinité pour les HSPG et conduisent à l'endocytose.

Actuellement, la nature précise des récepteurs impliqués dans ce mécanisme reste inconnue. Cependant, les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) joueraient un rôle dans l'attachement à la cellule hôte et dans l'internalisation virale [Johnson et al., 2009; Joyce et al., 1999; Patterson et al., 2005]. Deux familles d'HSPG de surface existent : les syndécanes et les glypicanes. Des pseudo-particules virales d'HPV16 ne semblent cependant pas montrer de préférence pour l'une ou l'autre forme [Shafti-Keramat et al., 2003]. Du fait de la prédominance des syndécanes dans les tissus épithéliaux et donc de leur haut niveau d'expression au niveau de la cellule cible, ils pourraient servir de récepteur primaire [Elenius et al., 1991] (**Figure 8, étape 1**). De plus, il a été montré *in vitro*, que les papillomavirus lient

également des composés de la matrice extracellulaire sécrétés par les kératinocytes. Comme pour d'autres virus, un récepteur secondaire serait requis et ce rôle serait tenu par l'intégrine $\alpha 6$ [Culp et al., 2007] (**Figure 8, étape 2**).

Les particules de papillomavirus sont internalisées lentement et ce par un mécanisme dépendant de l'endocytose par la voie des clathrines pour HPV16 [Culp and Christensen, 2004; Day et al., 2003] (**Figure 8, étape 3**). Cependant, ce mode d'entrée ne semble pas être conservé entre les différents types d'HPV [Sapp and Day, 2009]. Le transfert de l'ADN viral au noyau est alors facilité par la protéine mineure de la capsid L2 et par le démantèlement des ponts disulfures intra-capsomérique dans l'environnement réducteur de la cellule [Li et al., 1998b].

b. Phase de maintenance

Suite à l'endocytose des particules virales au sein des épithélia, le génome viral est maintenu sous forme épisomique dans les cellules basales (de 10 à 200 copies extra-chromosomiques). Deux protéines virales précoces vont jouer un rôle clé dans ce processus : les protéines E1 et E2 [Wilson et al., 2002]. En se liant à l'origine de réplication virale, elles vont permettre le recrutement de la machinerie répliquative cellulaire de l'hôte et leur expression va faciliter la ségrégation des génomes au cours de la division cellulaire.

La protéine E1 est une hélicase ATP-dépendante dont l'activité est essentielle à la réplication du génome virale. Son recrutement au niveau de l'origine virale va être dépendant de la liaison préalable de la protéine E2. Suite à cette interaction, E1 va lier les protéines cellulaires nécessaires à la réplication, incluant la RPA (*Replication Protein A*), l'ADN polymérase α primase [Han et al., 1999; Loo and Melendy, 2004].

La protéine E2 joue plusieurs rôles durant la production virale. Ainsi, dans les cellules basales, son expression est requise pour initier la réplication virale et la ségrégation des chromosomes. E2 est une protéine de liaison à l'ADN qui reconnaît les motifs palindromiques (AACCg(N)4cGGTT) présents dans la LCR du génome [Dell et al., 2003]. L'ADN de HPV16 contient quatre motifs de liaison à E2 au niveau de sa région LCR. Deux de ces motifs bordent l'origine de réplication virale et servent au recrutement de la protéine E1. E2 intervient également dans l'ancrage du génome viral au chromosome mitotique et dans la ségrégation des chromosomes viraux [Wu and Chiang, 2007]. De plus, en tant que facteur

de transcription, elle régule l'expression des protéines E6 et E7 en modulant l'activité de leur promoteur. A forte concentration, E2 agit comme un répresseur en empêchant la fixation d'autres facteurs de transcription [Bouvard et al., 1994]. E2 interagit également avec les deux oncoprotéines E6 et E7 [Gammoh et al., 2009].

Exprimées à partir du promoteur précoce, les protéines E1 et E2 participent ainsi au contrôle du nombre de copies du génome viral dans les cellules différenciées.

c. Phase de prolifération

L'entrée du papillomavirus dans la cellule hôte est suivie d'une période d'hyperprolifération des cellules de l'épithélium supra-basal. Les oncogènes E6 et E7 seraient responsables de cette croissance. Ainsi, au cours de l'infection, l'activité de ces gènes permet à quelques cellules de la couche basale de se diviser afin de former une couche de cellules entretenant le virus sous forme épisomique.

Dans les épithélia sains, les cellules de la couche basale migrent vers les couches supra-basales. Elles quittent alors le cycle cellulaire et débutent un processus de différenciation terminal afin de produire une barrière de protection. Au sein des kératinocytes infectés par HPV, ce processus de différenciation n'a pas lieu et le cycle cellulaire est maintenu [Sherman et al., 1997]. Le mécanisme par lequel les papillomavirus stimulent la progression du cycle cellulaire est très bien connu et est similaire à d'autres virus tumorigènes. Il implique les deux oncoprotéines E6 et E7.

La liaison de E7 à la protéine pRb et la dégradation de sa forme hypophosphorylée induit une libération du facteur de transcription E2F, qui peut alors transactiver les protéines cellulaires requises pour la réplication virale et cellulaire telles que les cyclines A et E (paragraphe A.4.a.ii). E7 s'associe également à d'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, telles que les histones dé-acétylases, les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines p21 et p27 et le complexe de transcription AP1 (*Activating Protein 1*). Durant le processus naturel d'infection, la propriété d'E7 à induire la prolifération cellulaire est cependant inhibée dans de nombreuses cellules, de manière dépendante du taux de p27 et p21. En effet, un haut niveau d'expression de ces protéines dans les kératinocytes différenciés conduit à la formation d'un complexe E7-cycline E inactif [Funk et al., 1997].

Les fonctions d'E6 (paragraphe A.4.b.ii) sont complémentaires à celles d'E7 au sein des HPV de haut risque [Stacey et al., 2000]. La principale fonction d'E6 est de lier la protéine suppresseur de tumeur p53 et d'induire sa dégradation par le système du protéasome empêchant ainsi l'entrée des cellules en apoptose. Ce rôle anti-apoptotique est renforcé par son interaction avec les protéines Bak (*Bcl2-homologous Antagonist Killer*) ou Bax (*Bcl2-activated X*) [Thomas and Banks, 1998]. E6 possède également un rôle dans l'hyperprolifération indépendamment d'E7. Cette activité est portée par son extrémité C-terminale qui constitue un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ (PSD-95, Dlg, ZO1). La liaison d'E6 à certaines protéines à domaine PDZ va entraîner une prolifération des cellules supra-basales ce qui contribue au développement des tumeurs métastatiques par perturbation de l'adhérence cellulaire [Nguyen et al., 2003].

d. Phase d'amplification

Les évènements qui vont déclencher l'amplification du génome viral sont peu connus mais ils semblent dépendre de changements dans l'environnement cellulaire lors de la migration des cellules vers la surface des épithélia. L'activation des promoteurs dépendants de la différenciation conduit à une expression accrue des protéines virales nécessaires à la réplication, c'est-à-dire E1 à E5. En effet, bien que les protéines E1 et E2 jouent un rôle essentiel, les protéines E4 et E5 sont également importantes.

E5, protéine transmembranaire, s'associe aux pompes à protons ATPases et retarde le processus d'acidification endosomal [Hwang et al., 1995]. Cela va affecter le recyclage des récepteurs aux facteurs de croissance et induire une augmentation de la voie de signalisation issue des récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), contribuant ainsi au maintien des conditions favorables à la réplication.

E4 s'accumule dans la cellule au moment de l'amplification virale mais son rôle n'est pas encore défini. Une partie des effets connus d'E4 serait liée à sa capacité d'association au complexe cycline B-cdk2 (*cyclin dependent kinase 2*) ce qui induit un arrêt du cycle à la transition G2/M [Davy et al., 2006; Davy et al., 2005]. Elle agirait donc comme un antagoniste d'E7. Ainsi il a été suggéré que l'expression continue d'E7 dans une cellule exprimant fortement E4 entraîne le maintien de la phase S et l'accumulation de génomes viraux.

e. Phase d'assemblage

La dernière phase du cycle virale va consister en l'assemblage de particules virales et à leur libération à la surface de l'épithélium. Les deux protéines de structure L1 et L2 sont exprimées uniquement dans les cellules exprimant E4 et dans des tissus où la phase d'amplification virale est terminée [Doorbar et al., 1997]. Les événements liant l'amplification à l'assemblage des particules ne sont pas encore connus mais dépendent de changements dans l'épissage des ARN messagers. Le génome viral doit être inclus dans une capsidie icosaédrique contenant 360 copies de L1 et 12 copies de L2 [Modis et al., 2002].

Dès son expression, la protéine L2 s'accumule avec E2 au niveau de structures nucléaires : les PML (*ProMyelocytic Leukemia*) [Florin et al., 2002]. L'assemblage des particules virales va avoir lieu lorsque les capsomères de L1 vont pénétrer dans le noyau et être recrutés par L2 au sein des PML. L'accumulation de protéines de capsidie à leur niveau faciliterait ainsi l'assemblage des particules. Bien que des particules virales puissent être assemblées en l'absence de L2, sa présence augmente l'efficacité d'encapsidation [Stauffer et al., 1998; Zhou et al., 1993]. Du fait de la nature non lytique du papillomavirus, la libération des particules virales ne survient que lorsque les cellules infectées atteignent la surface de l'épithélium. Cette rétention des particules virales limite la détection des particules virales par le système immunitaire [Ashrafi et al., 2002].

f. Intégration et carcinogénèse

L'un des événements majeurs conduisant au développement tumoral est l'intégration du génome viral au sein du chromosome de la cellule hôte. Dans les cellules infectées, le génome viral peut être retrouvé soit sous forme épisomique, soit sous forme intégrée, plus stable ou un mélange des deux [Doorbar, 2006].

L'intégration virale se fait généralement au niveau des régions E1 ou E2 en aval d'E6 et E7 et conduit à une linéarisation du génome. Dans ce cas, la perte de l'expression d'E2 induit une perte du contrôle négatif qu'elle exerce sur le promoteur précoce. Les oncoprotéines E6 et E7 voient alors leur stabilité et leur expression augmentées. Les sites d'intégration sont distribués au hasard dans le génome de la cellule hôte [Ziegert et al., 2003], avec malgré tout une certaine préférence pour des régions dites fragiles [Thorland et

al., 2000; Wentzensen et al., 2004]. Ainsi, par exemple, l'intégration peut survenir sur le chromosome 8q4 (région FRA8C) proche du locus du proto-oncogène c-myc.

Le mécanisme moléculaire conduisant à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire reste peu exploré. En effet, il ne s'agit pas d'une conséquence du cycle viral mais elle est détectable dans 90 % des cancers cervicaux. Il a été montré que les kératinocytes cervicaux contenant des formes intégrées de HPV apparaissent après une diminution de l'expression d'E2. La perte de l'expression épisomale d'E2 est associée à l'activation endogène de l'antigène viral et est accélérée par l'interféron β exogène. Elle conduit à une surexpression des deux oncogènes E6 et E7 dans les cellules contenant la forme intégrée du génome [Thorland et al., 2000]. De plus, l'expression dérégulée des deux oncoprotéines peut induire une instabilité chromosomique en terme de nombre ou de structure. Cela augmente potentiellement l'accumulation de changements génétiques cellulaires ou épigénétiques. Ces altérations conduisent à l'activation des oncogènes et à la répression de gènes suppresseurs de tumeur. La population cellulaire acquiert alors la capacité de proliférer et d'être immortalisée ce qui favorise sa progression vers un phénotype malin. *In vitro*, l'expression d'E6 et E7 d'HPV de haut risque est capable d'induire l'immortalisation de kératinocytes primaires [Munger et al., 1989]. Cependant, ces cellules sont incapables de provoquer des tumeurs chez la souris immunodéprimée.

4. E6 et E7 les acteurs clés.

Les oncoprotéines E7 et E6, malgré leur petite taille, induisent de nombreux changements au sein de la cellule hôte. Protéines multifonctionnelles majeures des HPV de haut risque, elles suscitent un grand intérêt en matière de recherche du fait des applications thérapeutiques qui pourraient en découler.

a. L'oncoprotéine E7

i. Structure

Petite protéine d'environ cent résidus (98 résidus pour HPV16), E7 présente des homologies de structures avec d'autres protéines virales transformantes telles que E1A de

l'adénovirus ou l'antigène T du virus SV-40 (pour revue [McLaughlin-Drubin and Munger, 2009]) (**Figure 9**). Comme E1A de l'adénovirus, elle présente trois régions conservées les CR1, CR2 et CR3. Ces régions vont contribuer aux activités transformantes des HPV de haut risque ([Edmonds and Vousden, 1989]. Un motif Leu-x-Cys-x-Glu (LxCxE) au niveau de la région CR2 est nécessaire et suffisant pour son association avec la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblaste pRb [Munger et al., 1989]. De nombreuses études ont montré que le domaine C-terminal d'E7 contiendrait un autre site de liaison à pRb de plus faible affinité [Liu et al., 2006; Patrick et al., 1994]. De plus, des mutants 16E7 ne présentant pas de CR2 sont incapables de lier les membres de la famille pRb [McLaughlin-Drubin and Munger, 2009]. Ainsi, son extrémité C-terminale contient un domaine de liaison au zinc composé de deux motifs Cys-x-x-Cys [Barbosa et al., 1989] qui fonctionne comme un motif de dimérisation, *in vitro* [Clemens et al., 1995]. La présence de ces dimères n'a pu être démontrée *in vivo* et leurs rôles potentiels dans l'activation des fonctions protéiques restent inconnus.

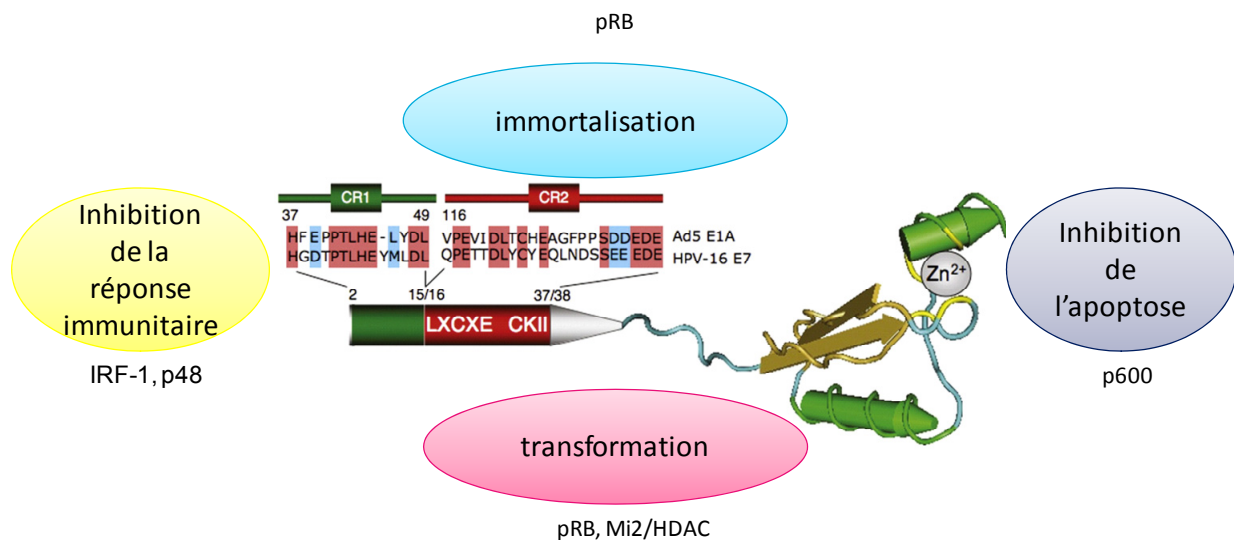


Figure 9 : Représentation schématique de 16E7 et de ses principales activités (adaptée de [McLaughlin-Drubin and Munger, 2009]). L'extrémité amino-terminale non structurée de 37 acides aminés présente une homologie de séquence avec la région CR1 (en vert) et CR2 (en rouge) de la protéine E1A de l'adénovirus. Les résidus identiques ou proches sont indiqués par des boîtes rouge et bleu respectivement. La séquence CR1 est nécessaire aux activités de transformation cellulaire et de dégradation de pRb mais ne contribue pas directement à la liaison avec pRb. Le site de liaison à pRb, LXCXE est localisé à côté d'un site de phosphorylation par la caseine kinase II (CKII). Le domaine carboxy terminal représenté ici est celui de l'oncoprotéine E7 d'HPV45 [Ohlenschlager et al., 2006].

La structure tridimensionnelle d'E7 a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) [Liu et al., 2006] et par cristallographie aux rayons X [Ohlenschlager et al.,

2006] (**Figure 10**). Ces études ont montré que le domaine N-terminal est non replié alors que le domaine C-terminal forme un domaine unique de liaison au zinc. Au niveau cellulaire, E7 est localisée de manière préférentielle dans le cytoplasme [Huh et al., 2005] mais existe également au niveau nucléaire, de même qu'au sein des nucléoles. E7 est dégradée par un mécanisme protéosomal impliquant l'ubiquitine [Reinstein et al., 2000]. Cependant elle ne présente pas d'activité enzymatique ni de capacité de liaison à l'ADN. Son activité biologique est liée à sa capacité à s'associer à des régulateurs cellulaires afin de former des complexes.

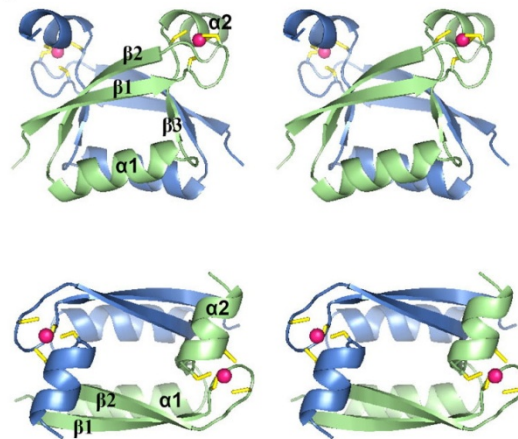


Figure 10 : Structure schématique du dimère d'E7 du génotype 1A (d'après [Liu et al., 2006] . Chaque protomère est représenté en vert ou en bleu. L'atome de zinc et les cystéines sont représentés par des ronds roses et des traits jaunes respectivement

ii. Activités biologiques

• Dégradation de pRb et induction de la transcription dépendante de E2F

E7 s'associe avec la protéine suppresseur du rétinoblastome, pRb et avec les protéines de la même famille p107 et p130 par son motif LxCxE présent au niveau de son domaine CR2 [Dyson et al., 1992; Munger et al., 1989]. La fonction la plus étudiée de ces protéines est leur capacité à réguler la transition de phase G1/S et la progression du cycle cellulaire en modulant l'activité du facteur de transcription E2F. E2F est un régulateur de nombreux processus cellulaires incluant la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'instabilité génomique et la transition G1/S. Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, le complexe pRb/E2F agit comme un répresseur de la transcription. Dans des cellules saines, la libération de E2F est induite par les cdk 4/6 et la cdk2 qui phosphorylent pRb en G1. Comme dans le cas de l'infection par SV-40, E7 va lier préférentiellement pRb lorsqu'il est lié à E2F et induire de ce fait une perte du contrôle du cycle cellulaire. En revanche à la différence de l'antigène T de

SV40, E2F va être libéré non pas suite à la phosphorylation de pRb mais suite à sa dégradation par le système du protéasome [Boyer et al., 1996]. Ce mécanisme ferait intervenir comme ubiquitine ligase, la culline-2 pour l'HPV16 [Huh et al., 2007]. Ceci à pour effet de réduire la demi-vie de pRb de neuf heures dans les cellules saines à trois heures dans les cellules exprimant E7 [Gonzalez et al., 2001]. Les E7 d'HPV de haut risque et de bas risque vont être capables de lier pRb mais l'affinité sera beaucoup plus faible dans le cas des HPV de bas risques (**Figure 11**).

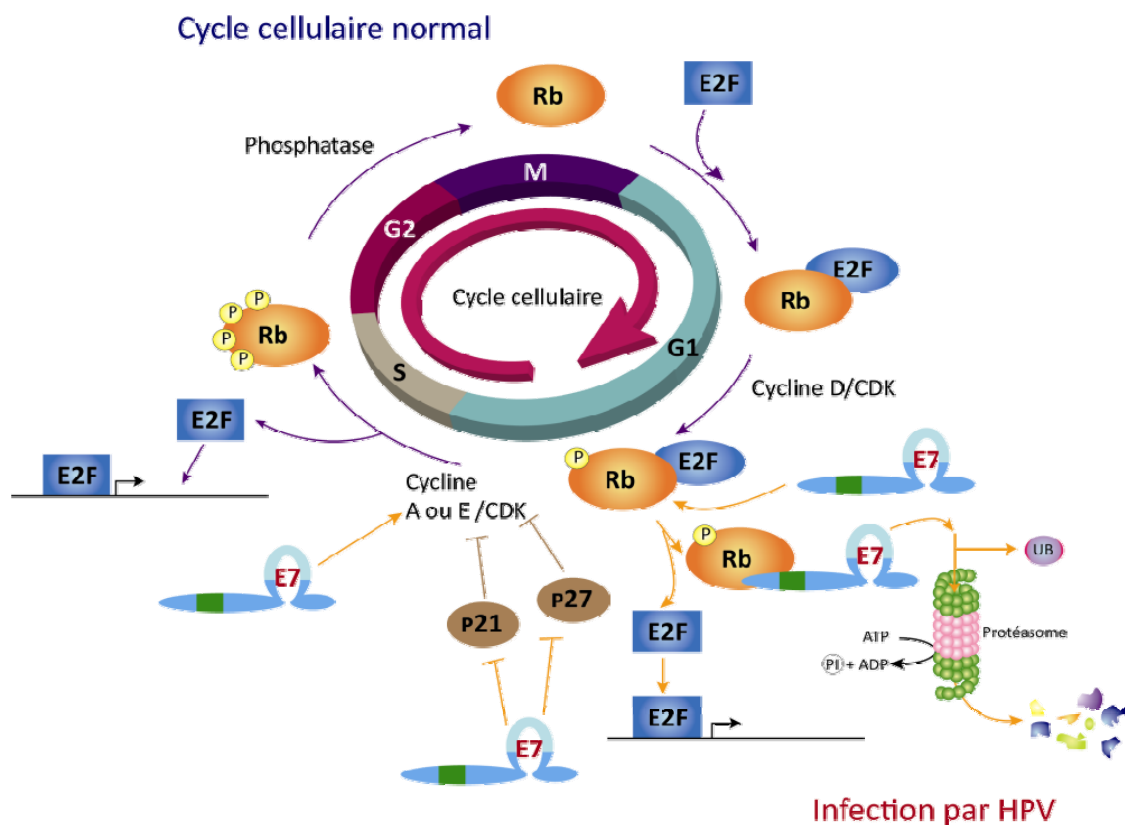


Figure 11 : E7 et cycle cellulaire. Au sein des cellules saines, la progression du cycle cellulaire est régulée par la protéine pRb sous sa forme hypophosphorylée qui est capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F. Lors de la phase G1, la protéine Rb est progressivement phosphorylée par les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Une fois hyperphosphorylée, pRb ne peut plus lier E2F. Le facteur de transcription ainsi libéré eut activer la transcription des gènes impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire. Au sein des cellules infectées par HPV, E7 interagit avec pRb sous forme hypophosphorylée et empêche la liaison à E2F. E2F est active de manière constitutive et le cycle cellulaire n'est plus soumis à un contrôle. Cette activation est de plus renforcée par la stabilisation des complexes cyclines A et E/ CDK et par l'inhibition de CDK p21 et p27.

En plus du motif de liaison de la région CR2, des séquences contenues dans la région CR1 est nécessaire à la dégradation de pRb [Jones et al., 1997]. La capacité des HPV de haut risque à déstabiliser pRb serait nécessaire mais non suffisante à la transformation cellulaire

[Banks et al., 1990a; Banks et al., 1990b]. En effet, en plus de son effet sur pRb, les E7 d'HPV de haut risque interagissent avec de nombreux partenaires cellulaires entraînant une dérégulation du cycle cellulaire.

- **E7 et p53**

Il a été montré que dans des cellules exprimant E7, l'expression de p53 est accrue et que sa demi-vie est augmentée [Demers et al., 1994]. Bien que le mécanisme de stabilisation de p53 par E7 soit encore inconnu, il est indépendant de p14-ARF (*Alternative Reading Frame*), un inhibiteur de la dégradation de p53 induite par mdm2 (*mouse double minute 2*) [Bates et al., 1998]. Cependant malgré un haut niveau de p53 au sein des cellules, sa transcription n'est pas activée et il a même été montré qu'E7 inhibe cette transcription [Eichten et al., 2002].

- **Autres fonctions principales de E7**

E7 et système immunitaire

E7 peut influencer la réponse immunitaire inflammatoire en s'associant avec l'interféron α via IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor*) [Park et al., 2000]. Elle va également bloquer la transduction du signal aux interférons par son interaction avec p48 [Barnard and McMillan, 1999].

E7 et instabilité génomique

Les cellules exprimant l'oncoprotéine E7 vont présenter un nombre de centrosomes aberrant ainsi que des trétrasomie [Duensing et al., 2000]. Cette instabilité génomique induite par l'expression de E7 semble être indépendante de l'inhibition de la protéine pRb et fait également intervenir E6 [Duensing and Munger, 2003]

E7 et métabolisme cellulaire

E7 jouerait un rôle important dans l'altération des voies métaboliques fondamentales. Ainsi, par exemple, E7 lie l'activate- β -glucosidase, enzyme régulant le catabolisme du glycogène [Zwerschke et al., 2000], réduisant ainsi les stocks de glycogène au sein des cellules. Il a également été montré que son expression serait la cause d'alcalinisation intracellulaire due à l'augmentation de l'activité de la protéine échangeuse d'ions Na^+/H^+ .

E7 et hyperprolifération

De manière indépendante de la liaison aux protéines de la famille pRb, E7 peut également influencer la transcription des gènes induits par le facteur E2F. Ainsi, il a été montré que E7 interagit avec les déacétylases d'histone de classe 1 (HDAC) [Brehm et al., 1999]. Cette interaction se fait par l'intermédiaire de la protéine Mi2 β , qui est capable de se lier à des séquences situées dans le domaine en doigt de zinc d'E7.

L'hyperprolifération cellulaire induite par E7 va être accentuée par l'interaction de son domaine en doigt de zinc avec les facteurs de transcription AP-1 (c-jun, c-fos...)[Antinore et al., 1996].

b. L'oncoprotéine E6

i. Structure

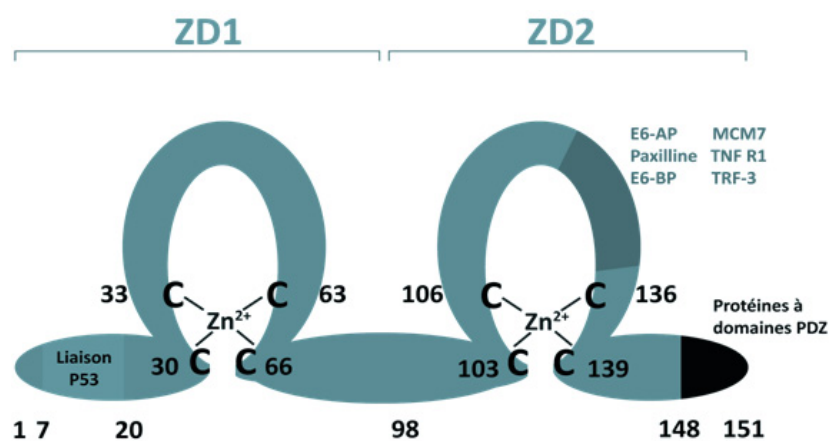


Figure 12 : Représentation schématique de 16E6 (d'après [Chakrabarti and Krishna, 2003]). Les zones d'interaction avec les principales cibles de 16E6 sont indiquées. La partie N-terminale a été décrite comme interagissant avec p53. L'extrémité C-terminale contient quant à elle un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ. Une région contenue dans le domaine ZD2 interviendrait dans la liaison de protéines riches en leucine.

L'oncoprotéine E6 de HPV16 est constituée de 151 ou 158 résidus aminoacides en fonction du codon ATG employé pour initier la traduction protéique. D'une masse moléculaire d'environ 19 kDa, elle comporte quatre motifs CxxC qui vont s'associer par paire pour former deux domaines de liaison au zinc : ZD1 et ZD2 [Barbosa et al., 1989; Grossman and Laimins, 1989; Nomine et al., 2006] (**Figure 12**). Elle peut être phosphorylée par la PKA 47 (Protéine Kinase dépendant de l'AMPC) [Kuhne et al., 2000] et la PKN 48 (Protéine Kinase N) [Gao et al., 2000]. Au niveau cellulaire, cette protéine est essentiellement nucléaire, et se

trouve plus particulièrement en périphérie de la chromatine condensée [Masson et al., 2003].

Les HPV de haut risque, tel que l'HPV16, produisent aussi des formes tronquées d'E6 qui vont résulter d'un épissage alternatif de l'ARN messenger. Quatre ORF, provenant d'un épissage alternatif, ont pu être identifiés et nommés E6* I à E6 IV pour l'HPV16. [Doorbar et al., 1990; Sherman and Alloul, 1992; Smotkin et al., 1989]. Cependant l'oncoprotéine codée par l'ORF E6 I, appelé E6* a pu être identifiée comme modulant l'activité transcriptionnelle du promoteur p97. [Schneider-Gadicke et al., 1988; Shirasawa et al., 1994].

Dès les années 1980, les premières séquences de l'oncoprotéine E6 furent disponibles. Cependant, malgré sa petite taille, pendant de nombreuses années, aucune donnée structurale concernant E6 n'était disponible. En effet, il était impossible d'isoler une forme native soluble. En 1997, [Daniels et al., 1997] ont produit une protéine E6 recombinante capable de former des homodimères stables dans les cellules bactériennes et humaines. Cependant le protocole d'expression et de purification n'a pas été publié et aucune donnée sur la stabilité de cette protéine n'était disponible. Il faudra attendre 2006 pour que les premières données structurales soient publiées [Nomine et al., 2006].

16E6 contient quatorze cystéines, dont huit lient le zinc et six autres sont non conservées et exposées à la surface, générant une agrégation de la protéine par formation de ponts disulfures intramoléculaires [Ristriani et al., 2000]. Notre équipe a substitué ces six cystéines non conservées en sérine et a obtenu un mutant nommé 16E6 6C6S replié et monomérique à faible concentration [Nomine et al., 2003; Nomine et al., 2001]. Au-delà d'une concentration de 20 μ M des structures en forme de fibre peuvent être observées (communication personnelle K.Zanier), ne permettant pas d'analyse structurale. Cependant, les deux domaines de l'oncoprotéine E6 : E6C et E6N sont capables indépendamment de se replier [Nomine et al., 2003]. Ainsi, le domaine C-terminal, nommé 4C4S, s'est avéré parfaitement soluble et a été purifié avec succès permettant la résolution de sa structure par RMN [Nomine et al., 2006]. Sur la base des homologies entre les deux domaines, un modèle de l'oncoprotéine entière a pu être établi (**Figure 13**).

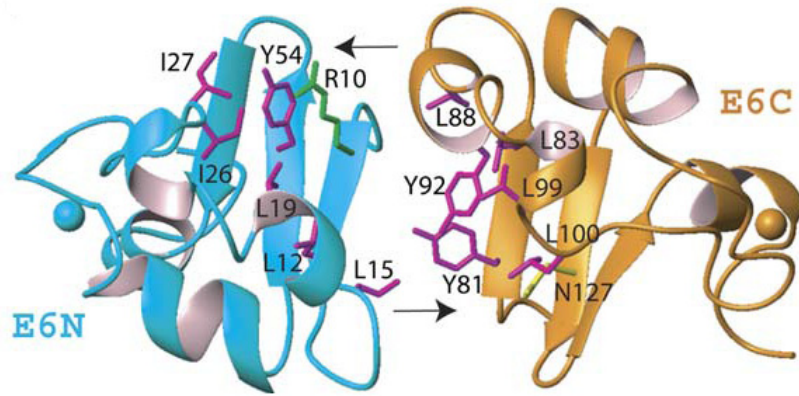


Figure 13 : Modèle hypothétique de 16E6 (d'après [Nomine et al., 2006]).

ii. Activités biologiques connues

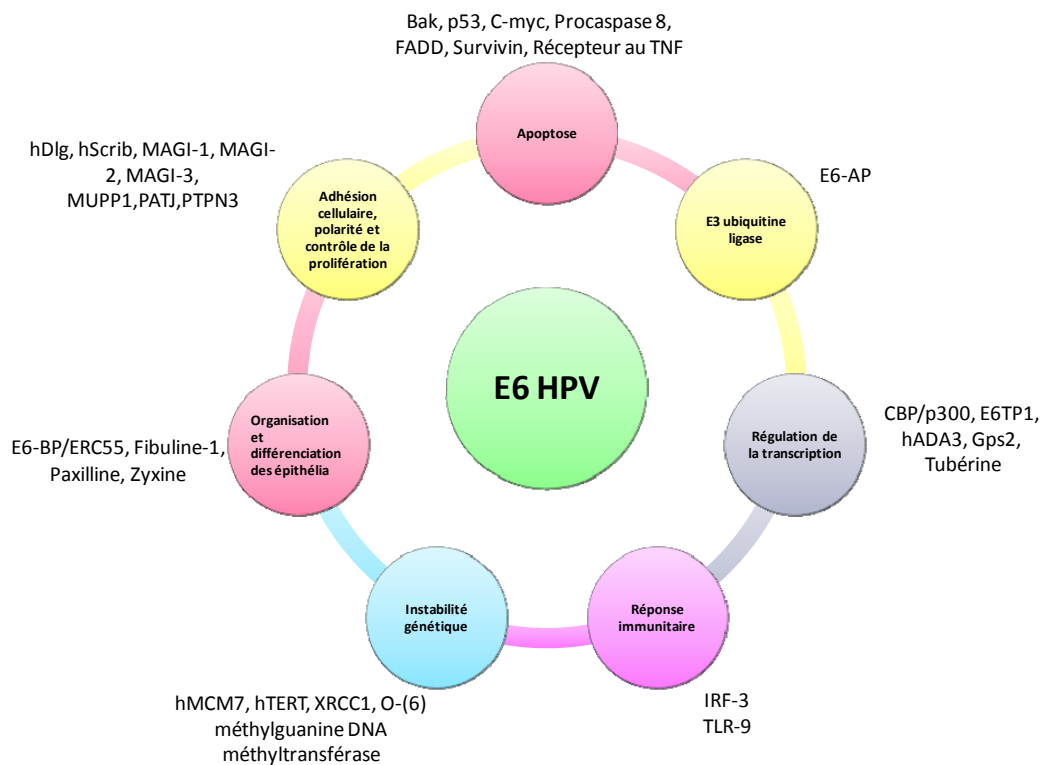


Figure 14 : Les partenaires cellulaires d'E6 des HPV de haut risque.

- **Inactivation de p53**

L'activité la plus étudiée d'E6 est sa capacité à provoquer la dégradation de la protéine suppresseur de tumeur p53 [Scheffner et al., 1990]. A la différence de nombreux types de cancer, dans le cas du cancer du col utérin, le gène de p53 est rarement muté [Hainaut et al., 1998]. Le principal mécanisme par lequel les HPV de haut risque inactive p53 consiste en sa dégradation par le système du protéasome (**Figure 15**) [Scheffner et al., 1990].

Normalement, le taux de p53 est régulé au sein de la cellule principalement par l'E3-ubiquitine ligase : mdm2 [Honda et al., 1997]. Cependant, en cas d'infection par HPV, cette dégradation se retrouve inhibée. E6 induit la dégradation de p53 en formant un complexe avec une autre ubiquitine ligase, E6AP [Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1993]. Cependant E6AP seul n'est pas capable de lier p53 et de le dégrader.

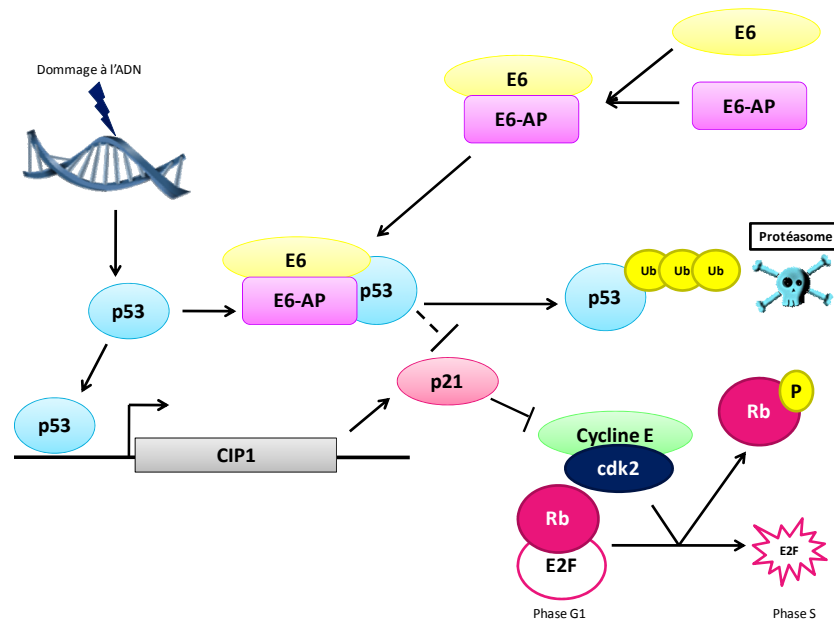


Figure 15 : E6 et cycle cellulaire. L'interaction entre le complexe E6-E6AP et p53 conduit à la dégradation de cette dernière par le système du protéasome 26S. La réponse physiologique aux dommages à l'ADN est donc inhibée et la transcription de CIP1 n'est pas activée. Le facteur de transcription E2-F est libéré ce qui conduit au passage en phase S.

De manière intéressante les E6 de bas et de haut risque sont capables de lier la protéine p53 cependant les domaines avec lesquels elles interagissent sont différents. Alors que les deux types d'E6 peuvent lier l'extrémité C-terminale de p53, seuls les E6 de haut risque sont capables de lier la région cœur (ou *core domain*) de p53. Cette interaction va être nécessaire à la dégradation [Crook et al., 1991]. L'ensemble de la protéine p53 au sein d'une cellule exprimant E6 de haut risque n'est cependant pas dégradée [Cooper et al., 2003b]. En effet, plusieurs équipes ont montré que l'expression d'E6 de haut et de bas risque abolit l'activité transcriptionnelle de p53 [Crook et al., 1994; Giampieri and Storey, 2004; Lechner et al., 1992]. E6 peut induire ses effets suivant différents mécanismes, incluant une inhibition de la liaison de p53, une localisation aberrante ou des modifications post-traductionnelles.

L'interaction d'E6 avec p53 empêche la liaison de p53 au niveau de séquences spécifiques de l'ADN. Le niveau d'inhibition va être corrélé à l'affinité de chaque type E6 pour p53. Ainsi, 16E6 présente un fort taux d'inhibition, 31E6 et 18E6 présentent des niveaux intermédiaires et 1E6 un niveau bas [Lechner and Laimins, 1994]. Cette interaction induit un changement conformationnel de p53 ce qui conduit à une inhibition de sa liaison à l'ADN ou à une dissociation des complexes ADN-p53 déjà formés [Thomas et al., 1995]. Le second mécanisme par lequel E6 inhibe la voie de signalisation dépendante de p53 est sa séquestration au sein du cytoplasme. Celle-ci résulterait d'un masquage des signaux de localisation nucléaire au niveau C-terminal de p53 ou à l'activation de son export [Mantovani and Banks, 2001]. Le troisième mécanisme employé par E6 pour inhiber l'activité de p53 est un arrêt de la transactivation induite par p53 grâce à une interaction avec CBP/p300 [Patel et al., 1999] ou hADA3 [Kumar et al., 2002] histone acetyltransferase. Suite à un dommage à l'ADN, p300 est connu pour acétyler p53 et de ce fait promouvoir son habilité à lier l'ADN [Barlev et al., 2001]. Les protéines E6 lient p300 et ce qui a pour conséquence d'inhiber l'acétylation de p53 [Patel et al., 1999]. Les deux types d'E6 vont lier p300 bien que les E6 de haut risque semblent se lier avec plus d'affinité. Des études *in vivo*, ont montré que seulement les E6 de haut risque préviennent la transactivation de p53 par p300. Cependant lors d'études *in vitro*, 11E6 a été capable d'inhiber cette transactivation [Thomas and Chiang, 2005]. De manière similaire, les E6 de haut risque sont également capables d'inhiber l'activation de p53 en interagissant avec le facteur de transcription hADA3 [Kumar et al., 2002].

Enfin, E6 inhiberait également l'activation de p53 en bloquant la voie de p14/ARF [Shamanin et al., 2008]. 16E6 inhibe l'activation de p53 dépendante de p14/ARF sans inhiber la réponse aux dommages de l'ADN et d'une manière qui n'est pas dépendante de la dégradation de p53 par E6 [Shamanin and Androphy, 2004]. De manière intéressante, ce mécanisme serait facilité par la dégradation de hADA3 [Shamanin et al., 2008].

- **E6 et apoptose**

Une des premières conséquences de la dégradation de p53 par E6 est l'inhibition de l'apoptose qui permettrait d'éliminer les cellules infectées. Cependant un mécanisme d'apoptose indépendant de p53 peut également être employé afin d'éliminer les cellules anormales. Mais E6 peut bloquer l'apoptose en l'absence de p53 [Pan and Griep, 1995].

Deux mécanismes d'apoptose peuvent être utilisés par la cellule : un mécanisme intrinsèque passant par la mitochondrie et un mécanisme extrinsèque. De manière intéressante, E6 perturbe les deux mécanismes afin de créer un environnement cytoprotecteur et de prévenir la mort des cellules (**Figure 16**).

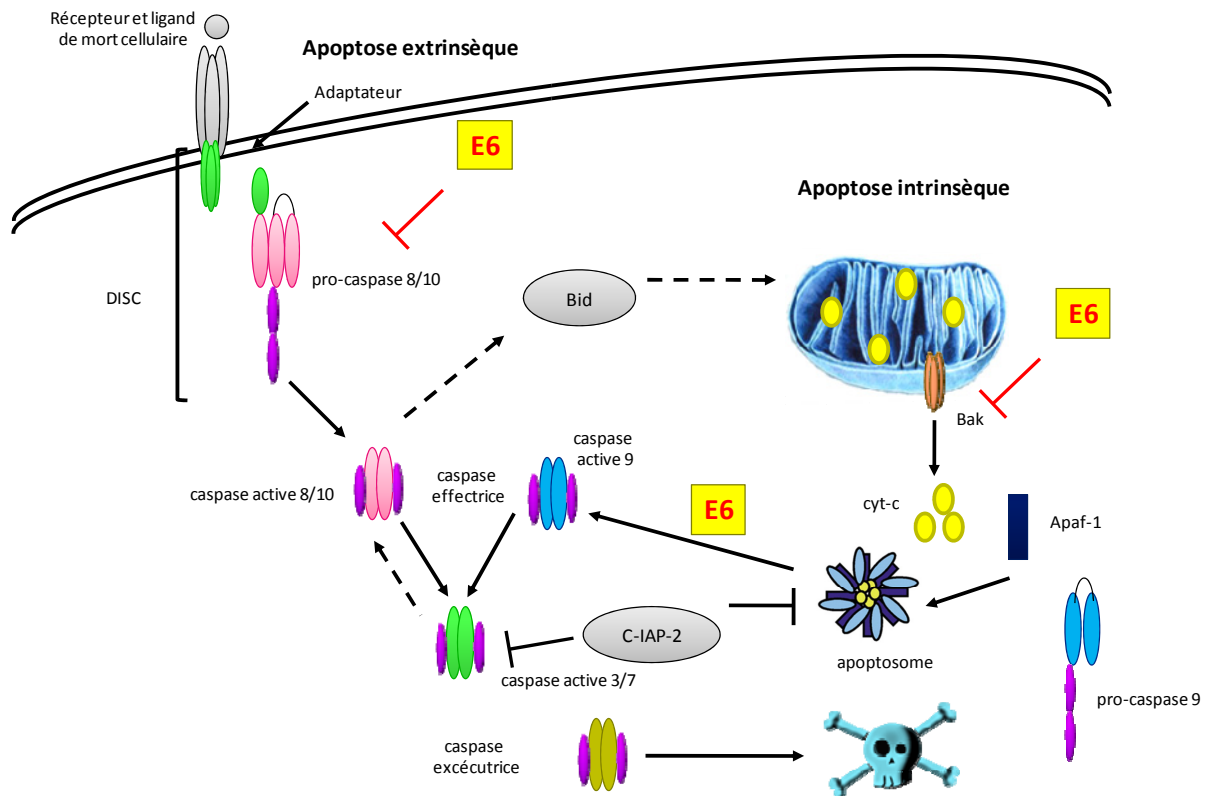


Figure 16 : Les voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque (adaptée de [Howie et al., 2009]). La voie d'apoptose extrinsèque est activée par les récepteurs de mort cellulaire. Suite à leur trimérisation, les molécules adaptatrices et la pro-caspase 8 sont activées ce qui permet à la formation du complexe DISC. Le clivage des caspases exécutrices suivantes, 3 et 7, est alors possible et la mort cellulaire est induite. L'activation de la voie intrinsèque repose quant à elle sur un stress intracellulaire qui conduit à la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale et à une libération de cytochrome-c dans le cytoplasme : l'apoptosome est alors formé.

L'apoptose extrinsèque est induite par des signaux extérieurs qui vont conduire à l'activation des récepteurs de mort au niveau de la surface cellulaire. Ces récepteurs sont des membres de la famille du récepteur au TNF (*Tumor Necrosis Factor*) incluant TNF-R1, Fas/CD95 et les récepteurs TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Après liaison du ligand, les récepteurs sous forme de trimère, recrutent des molécules adaptatrices comme FADD (*Fas associated death domain*), TRADD (*TNFR-associated death domain*) et les

caspases initiatrices 8 et 10. L'ensemble forme alors le complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). E6 a été montré comme inhibant cette apoptose extrinsèque à des stades précoces en interagissant avec TNF-R1, FADD et la caspase-8. Ainsi, 16E6 a été montré comme liant directement le TNF-R1 ce qui inhibe son association avec TRADD et le signal apoptotique résultant [Filippova et al., 2002]. 16E6 est également capable d'inhiber l'apoptose stimulée par les voies de Fas et TRAIL. Cette inhibition est induite par la liaison et la dégradation par E6 de la protéine adaptatrice de FADD et de la caspase 8 [Filippova et al., 2004; Garnett et al., 2006]. Il est important de noter que l'ensemble de ces observations est basée sur l'utilisation de 16E6 de haut risque. Le comportement des E6 de bas risque n'est en effet pas connu. Comme la liaison au FADD n'est pas dépendante du motif de liaison aux protéines à domaine PDZ conservés des E6 de haut risque, il est possible que d'autres E6 bloquent également cette voie apoptotique [Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008]. La voie intrinsèque implique un signal cellulaire tel qu'un dommage à l'ADN ou un stress oxydatif. Ces stress de manière général activent un certain nombre de voies de signalisation qui convergent vers la mitochondrie. Une balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques est alors réalisée. En cas de stress, les protéines BH3 pro-apoptotiques sont activées ce qui induit la formation de pore au sein de la membrane mitochondriale et conduit à la libération de cytochrome c dans le cytoplasme et à la formation de l'apoptosome. Les oncoprotéines E6 de bas et de haut risque sont capables d'inhiber cette voie d'apoptose en liant la protéine Bak et en induisant sa dégradation par le système du protéasome [Jackson et al., 2000]. Cependant ce mécanisme ne serait pas universel car E6AP jouerait un rôle dans la dégradation de Bak [Simmonds and Storey, 2008]. Une étude récente a montré que cette dégradation ne serait pas constitutive mais serait la conséquence d'un signal apoptotique. De plus, un changement conformationnel de Bak ou sa dissociation d'avec MCL-1, son partenaire cellulaire, serait nécessaire à la liaison d'E6 [Jackson et al., 2000]. D'autres équipes ont cependant montré un niveau bas de Bak dans les cellules exprimant E6 [Du et al., 2004; Thomas and Banks, 1998; Thomas and Banks, 1999]. Les effets d'E6 au niveau de cette voie intrinsèque restent donc très controversés.

De manière importante au niveau cellulaire, ces deux voies ne sont pas séparées. En effet, la caspase-8 est capable d'activer la voie intrinsèque en utilisant les caspases 3 et 7. Les interactions avec E6 ont donc deux effets complémentaires : elles protègent les cellules de multiples stimuli apoptotiques mais elles préviennent aussi les relations entre ces deux

voies. 16E6 est aussi capable d'augmenter l'expression de deux inhibiteurs de protéines apoptotiques (IAP) : c-IAP2 et la survivine [Borbely et al., 2006; James et al., 2006].

16E6 a également été rapportée comme liant et dégradant l'oncogène c-Myc de manière dépendante d'E6AP et en utilisant la voie protéosomique [Gross-Mesilaty et al., 1998]. Cependant d'autres études ont montré soit aucun changement du niveau de c-myc [Gewin and Galloway, 2001] ou soit une augmentation dans les cellules exprimant E6 [McMurray and McCance, 2003]. De ce fait le rôle de c-myc dans la cytoprotection d'E6 reste incertain.

- **Activation des télomérases**

L'expression des E6 et E7 de haut risque permet l'immortalisation des cellules épithéliales en culture [Munger et al., 1989] et l'une des cibles cellulaires impliquée dans ce phénomène est la télomérase [Kiyono et al., 1998]. La télomérase va être responsable du maintien des télomères à l'extrémité des chromosomes. Elle est active au sein des cellules saines uniquement au cours du développement embryonnaire ou au sein des cellules souches alors qu'elle est activée dans 90 % des cellules cancéreuses [Kim et al., 1994]. Son activité va être dépendante de la sous-unité catalytique hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*). En absence d'activation, une érosion progressive des télomères est observée ce qui conduit à la mort des cellules par sénescence [Liu et al., 1999]. Ainsi, le raccourcissement des télomères assure la régulation du cycle de vie des cellules saines. En effet, à partir d'un seuil critique de taille des télomères et en l'absence d'expression de la hTERT, la sénescence répliquative est initiée par des signaux de dommages à l'ADN. L'expression continue de l'hTERT au sein des cellules cancéreuses va conduire à une prolifération continue encore appelée immortalisation répliquative, étape clé du développement tumoral.

En 1996, il a été montré qu'E6 de haut risque peut activer la télomérase dans les cellules épithéliales [Klingelutz et al., 1996]. De plus, E6AP jouerait un rôle essentiel dans cette régulation de l'activité hTERT [Gewin et al., 2004]. L'activation de la hTERT se fait par le biais d'interaction entre E6, E6AP, le facteur de transcription c-myc et son cofacteur Max [Veldman et al., 2003].

De plus, E6 est capable d'induire la dégradation d'un represser du promoteur de l'hTERT : NFX1-91b [Gewin et al., 2004].

- **Modulation des signaux issus des protéines G**

Par des expériences de double-hybride chez la levure, il a été montré qu'E6 était capable de moduler la transcription des gènes codant les protéines G. E6 interagit avec trois protéines G différentes : l'E6-TP1 (*E6 terminal protein 1*) qui est liée et dégradée de manière indépendante de E6AP par les HPV de haut risque, la tubérine et enfin Gps2 (*G-protein Pathway Suppressor 2*).

- **Modulation de la réponse immunitaire**

E6 a également été montrée comme modulant la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse immune innée. Ainsi, E6 de haut risque interagit avec deux protéines qui sont des partenaires de la réponse innée à une infection virale : l'IRF3 (*Interferon Regulatory Factor*) [Ronco et al., 1998] et le TLR-9 (*Toll Like Receptor*) [Hansan, 2007]. L'interaction de 16E6 avec l'IRF3 inhibe ses capacités de transactivation et empêche l'induction de l'IFN- β . De même, l'expression exogène de 16E6 et 16E7, inhibe la transcription de TLR9 ce qui conduit à une perte de la voie de signalisation [Hansan, 2007].

- **Stabilisation des chromosomes**

En plus, de l'augmentation de l'expression de la hTERT, E6 interagit également avec d'autres protéines impliquées dans le maintien de la stabilité chromosomique. Premièrement, les E6 de bas et de haut risque interagissent avec le facteur de réplication hMCM7 (*human Mini-Chromosome Maintenance 7*), bien que cette liaison soit plus forte dans le cas des HPV de haut risque [Kukimoto et al., 1998]. 18E6 est capable d'induire sa dégradation via E6AP et le système protéosomal. Comme hMCM7 est impliquée dans la réplication de l'ADN, l'interaction d'E6 peut induire des anomalies chromosomiques dans les cellules infectées par HPV.

E6 interagit également avec deux autres protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN : XRCC1 (*x-ray repair cross-complementing group 1*) et O(6)-méthylguanine-DNA-méthyl transférase (MGMT) [Iftner et al., 2002]. XRCC1 lie les oncoprotéines E6 des types 1, 8 et 16 et cette interaction a pour conséquence, de diminuer sa capacité à réparer les dommages à l'ADN induits [Iftner et al., 2002]. L'interaction d'E6 avec MGMT induit sa dégradation de manière E6AP dépendante ce qui sensibilise les cellules aux dommages alkylants [Srivenuogopal et al., 2002].

- **Perturbation de la structure épithéliale et de la différenciation**

Les HPV ont évolué afin de pouvoir se répliquer dans les différentes couches de l'épithélium squameux, environnement non permissif à la réplication virale. Une des caractéristiques des protéines E6 de haut risque est leur capacité à inhiber la différenciation des cellules épithéliales qui conduit normalement à la kératination et à la mort des cellules. Ainsi, 16E6 interfère avec la différenciation cellulaire dans les souris transgéniques K14-E6 [Pan and Griep, 1994] et cause une expansion des composants non différenciés de l'épithélium. De manière intéressante, cette activité d'E6 apparaît comme étant indépendante de p53 [Song et al., 1999]. 16E6 est également capable d'augmenter la résistance des kératinocytes au sérum et au calcium, agents capables d'induire une différenciation par une voie indépendante de p53 [Sherman et al., 1997]. Peu de choses sont connues sur le mécanisme impliqué. Cependant, 16E6 interagit avec E6BP/ERC 55 [Chen et al., 1995], qui serait une protéine de liaison au calcium localisée dans le réticulum endoplasmique. E6BP/ERC 55 forme *in vivo* un complexe avec E6 et E6AP. La différenciation de l'épithélium répond à un mécanisme dépendant du calcium et il a été émis l'hypothèse qu'E6BP (*E6 Binding Protein*) contribuerait avec E6 dans la perturbation de la différenciation terminale.

L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire affecte différents processus cellulaires incluant la morphologie, la prolifération et la migration cellulaire. La restriction de l'adhérence cellulaire à la matrice joue un rôle important dans la tumorigenèse. Cette adhérence est dépendante de structures spécialisées contenant des intégrines, de la vinculine, des kinases d'adhérence focale et la paxilline. L'activité de la paxilline va être régulée par une phosphorylation des tyrosines induite en réponse à divers stimuli incluant un traitement aux hormones de croissance (pour revue [Deakin and Turner, 2008]). La paxilline, protéine associée au complexe d'adhérence folliculaire et impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, est capable d'interagir avec les E6 de haut risque. La liaison des E6 de haut risque à la paxilline perturbe la formation des fibres d'actine et entraîne une perte de l'intégrité de l'épithélium [Schaller, 2001; Tong and Howley, 1997]. Une autre protéine clé dans l'adhérence cellulaire à la matrice est la zyxine. La zyxine est une molécule de l'adhérence cellulaire responsable de la liaison de la matrice extracellulaire au cytosquelette. Elle régule ainsi, la prolifération cellulaire, la différenciation. E6 lie la zyxine d'une manière similaire à la paxilline, et perturbe l'habilité de cette protéine à maintenir la

structure cellulaire [Degenhardt and Silverstein, 2001]. Une interaction entre E6 et la fibuline1 a également été démontrée [Du et al., 2002].

L'ensemble de ces événements contribue à la transformation cellulaire et à l'invasion des tissus par la tumeur en induisant une déstabilisation de la matrice extracellulaire.

- **Interaction avec les protéines à domaine PDZ**

Les protéines E6 de haut risque présentent à leur extrémité C-terminale un motif hautement conservé [Crook et al., 1991; Pim et al., 1994]. Ce motif contribue cependant à l'activité transformante d'E6 [Kiyono et al., 1997]. Cette région contient un motif de liaison aux domaines PDZ (xT/SxV) qui permet l'interaction hautement spécifique avec les protéines contenant des domaines PDZ [Doyle et al., 1996; Songyang et al., 1997]. Les domaines PDZ sont des modules d'interaction protéique constitués de 80 à 90 amino-acides, présents en plusieurs copies dans les protéines impliquées dans la formation de canaux ioniques, la signalisation et l'adhérence cellulaire. L'oncoprotéine E6 stimule la dégradation de ces protéines [Thomas et al., 2009] (**Tableau 2**).

PROTEINE	FONCTION	EFFETS INDUITS	REFERENCES
Dlg	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Gardiol et al., 1999]
Scribble	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Nakagawa and Huibregtse, 2000]
MAGI-1,MAGI-2 et MAGI-3	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur Localisation de PTEN à la membrane	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Thomas et al., 2002]
MUPP1	Signal de repliement	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Lee et al., 2000]
PATJ	Formation et intégrité des jonctions serrées	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination et dégradation directe par E6	[Storrs and Silverstein, 2007]
PSD95	Signal de repliement	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Handa et al., 2007]
PTPH1/PTPN3	Tyrosine phosphatase	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Jing et al., 2007]
PTPN13	Phosphatase	?	[Spanos et al., 2008]
TIP-1	Régulateur des interactions à PDZ	?	[Hampson et al., 2004]
TIP-2/GIPC	Voie de signalisation TGF β	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Favre-Bonvin et al., 2005]
CAL	Trafic intracellulaire	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination	[Jeong et al., 2007]
PAR3	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur	Dégradation par le système du protéasome et ubiquitination et relocalisation cellulaire	[Tomaic et al., 2009]

Tableau 2 : Les cibles de l'oncoprotéine E6 contenant des domaines PDZ (d'après [Thomas et al., 2009]). ? : inconnu.

La première protéine à PDZ cible de E6 à avoir été identifiée est la protéine hDlg [Kiyono et al., 1997; Lee et al., 1997]. hDlg est l'homologue humain de la protéine Dlg de *Drosophila melanogaster*. Elle est impliquée dans le maintien de l'adhérence cellulaire, de la

polarité apico-basale et de la prolifération de l'épithélium cellulaire. Au niveau cellulaire, son activité est régulée par phosphorylation et ubiquitination en fonction du degré des contacts cellulaires. L'oncoprotéine E6 perturbe cette régulation en stimulant sa dégradation par la voie protéosomale indépendante d'E6AP [Gardioli et al., 1999]. Cette interaction induit une rupture des jonctions cellulaires, abolit la polarité, altère le processus de différenciation et stimule la prolifération des kératinocytes. Depuis la découverte de cette interaction, de nombreuses interactions avec les protéines à domaine PDZ ont été décrites (pour revue [Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008]). E6 en interagissant avec ces protéines indispensables au maintien de l'adhérence cellulaire, de la polarité et de la régulation de la prolifération accentue le processus de cancérogénèse. Celui-ci conduit à une désorganisation des tissus et à l'établissement de métastases.

iii. Les motifs de liaison

Comme nous venons de le voir, E6 lie de nombreux partenaires cellulaires possédant des activités variées au sein de la cellule. De nombreux travaux ont été entrepris afin d'identifier et de déterminer une séquence ou un motif préférentiel de liaison. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la liaison d'E6 à p53, Bak, hMCM7, E6TP1 et c-myc est facilitée par l'association à l'ubiquitine ligase E3, E6AP [Matsumoto et al., 2006; Motoyama et al., 2004].

Les données obtenues par des expériences de double-hybride chez la levure conduisant à l'identification de peptides s'associant avec E6, les comparaisons de séquences connues des partenaires de liaison à E6 [Be et al., 2001] ainsi que l'utilisation de peptides inhibiteurs afin de bloquer la liaison de E6 [Liu et al., 2004] ont révélé que E6 se lie à une séquence consensus caractérisée par les résidus LxxOLsh [Baleja et al., 2006] dans lequel x représente n'importe quel acide aminé, O est un résidu hydrophobe, s est un acide aminé présentant une petite chaîne latérale et h est un acide aminé qui peut former de multiples liaisons hydrogènes avec sa chaîne latérale.

Dans le cas de l'interaction E6-E6AP, c'est le motif LQELLGE qui est responsable de l'interaction. Cette séquence consensus a également été référencée comme un motif LxxLL [Cooper et al., 2007; Cooper et al., 2003a] afin de mettre en évidence l'importance des trois leucines conservées aux positions 9, 12 et 13 pour faciliter la liaison d'E6 à ses partenaires.

En effet, la substitution de ces trois leucines abolit l'interaction d'E6 avec E6AP [Cooper et al., 2003a]. Une fois qu'E6 a lié E6AP le complexe peut alors lier d'autres partenaires cellulaires et induire leur dégradation. C'est le cas notamment pour p53, Bak, hMCM7, E6TP1 et c-myc.

La comparaison des séquences des HPV de haut risque a révélé la présence d'un domaine C-terminal conservé formé par les résidus xT/SxV dans lesquels x est un acide aminé. De manière intéressante, cette séquence est absente des HPV de bas risques. Elle va être responsable de l'interaction avec les protéines hDlg, hScrib, MUPP1, PATJ, PTPN3 et MAGI. L'interaction d'E6 avec ces cibles va être induite non pas par le motif contenant trois résidus de leucine, mais par un domaine PDZ conservé.

La dégradation de p53 par les E6 d'HPV de haut risque est l'un des mécanismes majeurs du processus de cancérogénèse. Deux sites d'interaction avec E6 au niveau de p53 ont pu être identifiés [Crook et al., 1991; Li and Coffino, 1996] [Huibregtse et al., 1991; Scheffner and Whitaker, 2003]: (i) le premier implique le domaine C-terminal de p53 compris entre les résidus 364 et 393. Cette interaction est indépendante de la liaison à E6-AP et est commune aux HPV de bas et haut risque. Elle n'est pas responsable de la dégradation de p53 [Li and Coffino, 1996] mais elle bloquerait l'activité transcriptionnelle de celui-ci [Lechner et al., 1992] en interférant avec les domaines d'oligomérisation de localisation nucléaire (ii) le second est dépendant de la liaison à E6AP et implique les résidus du domaine de liaison à l'ADN de p53 (*DBD DNA binding domain*) de la zone 113 à 290. L'interaction du complexe E6-E6AP avec ce domaine est nécessaire à sa dégradation [Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1993] mais pas suffisante [Mansur et al., 1995]. L'interaction avec une région en N-terminal comprise entre les résidus 92 et 112 serait en effet nécessaire.

c. Les propriétés transformantes de E6 et E7

L'activité transformante des HPV est une conséquence de leur stratégie de réplication au sein des cellules supra-basales de l'épithélium. En effet, les HPV vont promouvoir le maintien des cellules infectées en induisant une perturbation de la différenciation cellulaire et en réactivant leur croissance. Les deux oncoprotéines E6 et E7 comme nous avons pu le voir jouent un rôle clé dans cette transformation. Ces deux

protéines voient en effet leur fonction changer suite à l'intégration du génome dans la cellule hôte. Ainsi, leur fonction est d'établir les conditions nécessaires à la bonne réplication du virus mais après intégration leur expression continue conduit à l'acquisition de propriétés transformantes. Ces propriétés transformantes proviennent d'interactions et d'activités propres à E6 et E7 des HPV de haut risque. Elles vont agir de manière synergique au cours des étapes de la progression tumorale.

Bien que les deux oncoprotéines soient capables d'immortaliser chacune les cellules humaines, il apparaît que cette coopération conduit à des effets plus efficaces. Ainsi, tandis qu'E7 va stimuler la prolifération cellulaire, E6 va empêcher la réparation de l'ADN et l'apoptose en réponse au stress hyperprolifératif. En parallèle, ces deux oncoprotéines vont inhiber la réponse immunitaire antivirale et modifier le métabolisme des cellules infectées pour leur permettre une croissance constante. Par perturbation des contacts intracellulaires et des voies de signalisation, l'oncoprotéine E6 va permettre l'établissement de métastases.

d. Inhibition de l'oncoprotéine E6

Différentes stratégies ont été employées pour inhiber les fonctions de l'oncoprotéine E6 et restaurer la protéine suppresseur de tumeur p53 dans les cellules transformées. L'une d'entre elles va reposer sur l'expression dans les cellules de peptides ou de polypeptides capables de lier et d'inhiber spécifiquement E6. Par la technique du double-hybride dans la levure, des aptamères capables de lier E6 ont été développés. L'expression de ces peptides dans les cellules issues de cancer cervical provoque la remontée du taux de p53 et leur orientation vers l'apoptose [Butz et al., 2000]. Des études se sont intéressées aux propriétés inhibitrices des variants d'épissage d'E6 ou de mutants ponctuels. L'expression ectopique de la forme E6* est capable d'inhiber la dégradation de p53 et d'induire l'apoptose p53-dépendante [Pim and Banks, 1999]. D'autres groupes se sont intéressés à la capacité de certains anticorps anti-E6 à inhiber *in vitro* la dégradation de p53 induite par E6 [Courtete et al., 2007; Griffin et al., 2006; Lagrange et al., 2007]. De cette manière, des scFvs anti-16E6 ont été caractérisés et leur expression dans les cellules transformées par HPV16 a montré qu'ils permettraient de restaurer le taux de p53 et d'orienter les cellules vers l'apoptose [Griffin et al., 2006; Lagrange et al., 2007] (voir partie résultats). A ce jour, aucune drogue capable de lier et d'inhiber spécifiquement E6 n'a pu être isolée. En revanche des composés

chimiques ont été utilisés pour inhiber la dégradation de p53 par E6. Ainsi, les inhibiteurs de l'export nucléaire, la leptomycine et l'actinomycine D et sans cibler E6 vont induire une accumulation dans les noyaux de la protéine p53 [Freedman and Levine, 1998] et provoquer leur apoptose [Hietanen et al., 2000]. Suite à l'intégration chromosomique, nous avons vu que le contrôle exercé sur le promoteur précoce par la protéine E2 était perdu. Des travaux récents ont montré que la sur-expression de ce facteur de transcription dans les lignées HPV positives est capable d'induire une inhibition de la croissance cellulaire [Francis et al., 2000; Hwang et al., 1993]. Lorsqu'il est exprimé de manière continue et prolongée, la sénescence [Goodwin and DiMaio, 2000], l'apoptose [Blachon and Demeret, 2003; Demeret et al., 2003] ou encore la régression tumorale chez la souris [Graham and Herrington, 2000] sont induites. Les effets de E2 sur le cycle cellulaire serait la conséquence de la répression d'E6 et E7 tandis que l'effet pro-apoptotique serait du à une activité propre d'E2 sur la voie des caspases [Blachon and Demeret, 2003; Demeret et al., 2003]. Du fait qu'E6 est exprimée de manière constante dans les lésions cervicales et semble responsable de la progression du phénomène malin, cette protéine représente un candidat intéressant pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Plusieurs approches ont été testées afin de bloquer son expression dans les cellules HPV positives en utilisant par exemple des inhibiteurs sélectifs de la transcription virale [Goodwin and DiMaio, 2000], des antisens [Hamada et al., 1996a], des ribozymes ou encore des shARN ou des siARN. L'ensemble de ces approches induit la suppression de la croissance et une réduction concomitante de la tumorigenèse *in vivo*. Il est difficile d'obtenir des ARN messagers ciblant uniquement E6 du fait de l'expression polycistronique de E6 et E7. Le but thérapeutique majeur est de bloquer la dégradation de p53 induite par E6. Car en effet, la voie p53 reste totalement fonctionnelle dans les tumeurs cervicales [Burk, 1999]. Cependant cette approche ne peut pas être universelle du fait que l'inhibition de cette dégradation ne conduit pas toujours à une augmentation du niveau de p53. L'interaction d'E6 avec les protéines à domaines PDZ est aussi une cible thérapeutique intéressante. Le site de liaison est petit, exposé et la structure de nombreux domaines PDZ est résolue. De plus l'interaction de E6 avec les domaines PDZ est hautement spécifique de ce fait, il serait possible d'envisager de développer des agents chimio-thérapeutiques capables d'inhiber spécifiquement cette interaction.

Notre équipe a récemment mis en évidence une protéine E6 mutante contenant une seule mutation F47R. Ce mutant s'avère déficient pour la poly-ubiquitination et la dégradation de p53. Lorsqu'elle est exprimée dans les cellules HPV positives, la protéine 16E6F47R agit comme un dominant négatif. De plus, son expression prolongée supprime la prolifération des cellules HeLa en induisant une sénescence précoce. Ce phénotype semble indépendant de l'activité de liaison aux domaines PDZ. Les cellules HeLa sénescents exprimant le F47R conservent une expression de p53, hMDM2 et p21-CIP mais l'expression de 18E6 est diminuée. La sénescence induite est un phénomène dépendant de la voie de signalisation par p53 [Ristriani et al., 2009].

C. Les adénovirus

1. Classification

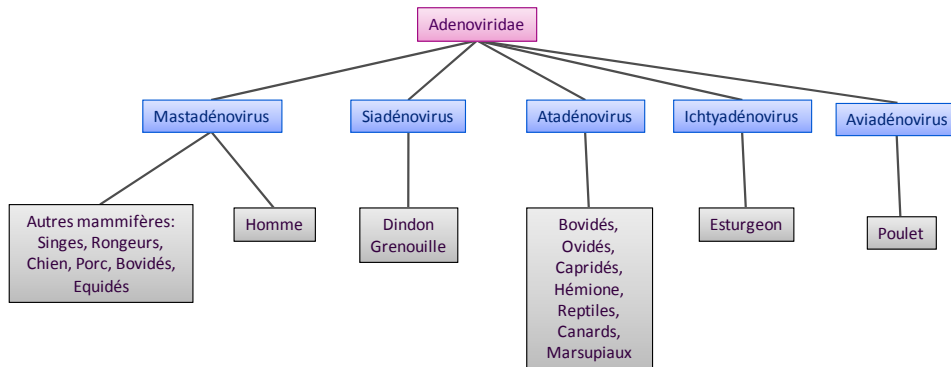
Depuis leur identification par [Rowe et al., 1953], à partir de fragments d'amygdales, les adénovirus ont fait l'objet d'une recherche intense. Devenus des modèles incontournables de biologie moléculaire, ils ont permis l'étude de processus cellulaires importants comme l'épissage des ARN messagers ou l'étude de la réplication de l'ADN [Rowe et al., 1953]. Durant cette période de nombreux sérotypes ont été découverts, certains sont même capables d'induire des tumeurs chez les rongeurs [Yabe et al., 1962].

Les adénovirus appartiennent à la famille des adenoviridae, définie en 1976, qui est subdivisée en quatre genres : les ata-adénovirus, avi-adenovirus, si-adenovirus et les mastadenovirus.

Les cinquante et un sérotypes identifiés chez l'homme [Horwitz, 2001] appartiennent au genre des mastadenovirus et sont répartis selon six espèces de A à F. Cette classification repose sur des homologies de séquences et sur les propriétés d'hémagglutination [Benko and Harrach, 2003; De Jong et al., 1999] (**Tableau 3**). Elle prend également en compte l'éloignement phylogénétique entre certains gènes. De plus, une corrélation existe entre l'espèce, le tropisme cellulaire et la pathologie induite. Ainsi, chez l'homme, les adénovirus sont la cause de gastroentérites, d'infections oculaires (conjonctivites bénignes) ou d'infections respiratoires de type rhino-pharyngites. Les infections respiratoires, souvent limitées aux voies respiratoires hautes sont provoquées essentiellement par trois espèces :

les espèces B, C et E. Dans de rares cas, les espèces B et E peuvent induire une infection des voies respiratoires basses qui conduit au développement de maladies respiratoires aiguës.

A.



B.

Espèce (anciennement sous-groupe)	Sérotypage	Récepteur utilisé	Nombre de répétitions β de la tige de la fibre	Tropisme
A	12, 31	CAR	23	intestinal
	18	ND		
B1	3	CD46 et CD80/86	6	respiratoire
	16, 21, 50	CD46		
	7	ND		
B2	11, 14, 35	CD46		rénal
	34	ND		
C	2, 5	CAR, Héparane Sulfate CMH-1	22	respiratoire
	1, 6	ND		
D	15, 19p	CAR	8	oculaire et autres
	8, 19a	Acide sialique		
	9, 10, 13, 17, 20 à 30, 32, 33, 36, 38, 39, 43, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51	ND		
E	4	CAR	12	respiratoire
F	40, 41	CAR	22/12	intestinal

Tableau 3 : La famille des adenoviridae A. Classification des *Adenoviridae*. B. Classification des *Mastadenovirus* humains. Les nombres de répétitions au niveau de la tige β correspondent au sérotypage noté **en gras** ND : Non déterminé

Les adénovirus de sérotype 2 et 5 (Ad2, Ad5), appartenant à l'espèce C, largement utilisés dans les essais de thérapie génique sont quant à eux peu pathogènes chez l'homme. En effet, dans la grande majorité des cas l'infection reste transitoire et les cellules infectées ainsi que le virus sont éliminés par le système immunitaire en utilisant à la fois la réponse innée et la réponse adaptative [Burgert et al., 2002].

2. Structure de la particule

Les adénovirus sont des virus non enveloppés, composés d'une molécule d'ADN double-brin linéaire de 36 kb. La particule virale, formant un virion d'un diamètre d'environ 70 nm, est composée d'une capsidie icosaédrique entourant un cœur nucléoprotéique [Stewart et al., 1993].

Grâce aux progrès réalisés en matière de cristallographie par rayons X et de reconstruction d'images à une résolution de 6 Å, il a été possible de déterminer la disposition de chacun des composants de la capsidie [Fabry et al., 2005; Saban et al., 2005]. Les onze protéines structurales principales ont tout d'abord été identifiées par migration sur gel SDS-PAGE et nommées de II à XII dans un ordre décroissant par rapport à leur masse moléculaire (**Tableau 4**).

Les capacités d'expérimentation utilisées à l'époque non pas permis d'identifier de protéine 1. Douze copies de homotrimère d'hexon (polypeptide II) forment chacune les vingt faces triangulaires de la capsidie ce qui en fait le principal composant [van Oostrum and Burnett, 1985]. Chacun des douze sommets est composé d'un complexe entre la protéine pentamérique dénommée penton-base (polypeptide III) et une fibre trimérique (polypeptide IV) (**Figure 16**).

	Constituants du virion	Masse moléculaire d'un monomère (kDa)	Caractéristiques et fonctions
Protéines de la capside	Hexon (II) (720)	109	capsomère majeure
	Penton Base (III) (60)	63	liaison aux récepteurs secondaires
	IIIa (60)	63	protéine « ciment » interne
	Fibre (IV) (36)	62	liaison aux récepteurs primaires
	VI (360)	22	liaison ADN-capside
	V	42	compactage de l'ADN
	VIII	15	protéine basique interne
	IX (240)	14	protéine de « ciment » externe
Protéines du core	Protéine terminale TP (2)	38	liaison covalente à l'ADN, réplication, transcription
	VII	19	compactage de l'ADN
	μ	11	compactage de l'ADN
Autres protéines	Protéase	23	clivage des précurseurs, maturation des virions
	Iva2	51	transactivation du promoteur tardif, encapsidation de l'ADN

Tableau 4 : Les composants du virion (d'après [Stewart et al., 1993]). Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de copie des protéines par virion.

De nombreuses protéines mineures contribuent également à la formation de la capside et joueraient un rôle dans son assemblage. Ainsi, l'ADN est enrobé dans un complexe protéique [Mirza and Weber, 1982] et chaque brin est lié à son extrémité à une protéine terminale (TP) [Rekosh and Russell, 1977]. Cette protéine terminale agit comme une amorce pour la synthèse d'ADN mais sert également d'ancre au chromosome viral [Schaak et al., 1990]. De par sa masse moléculaire estimée à près de 150×10^6 Da (pour l'Ad2, en sachant que son ADN représente déjà 22×10^6 Da) et sa taille (diamètre sphérique de 914 Å), l'adénovirus est trois fois plus grand que le poliovirus [van Oostrum and Burnett, 1985].

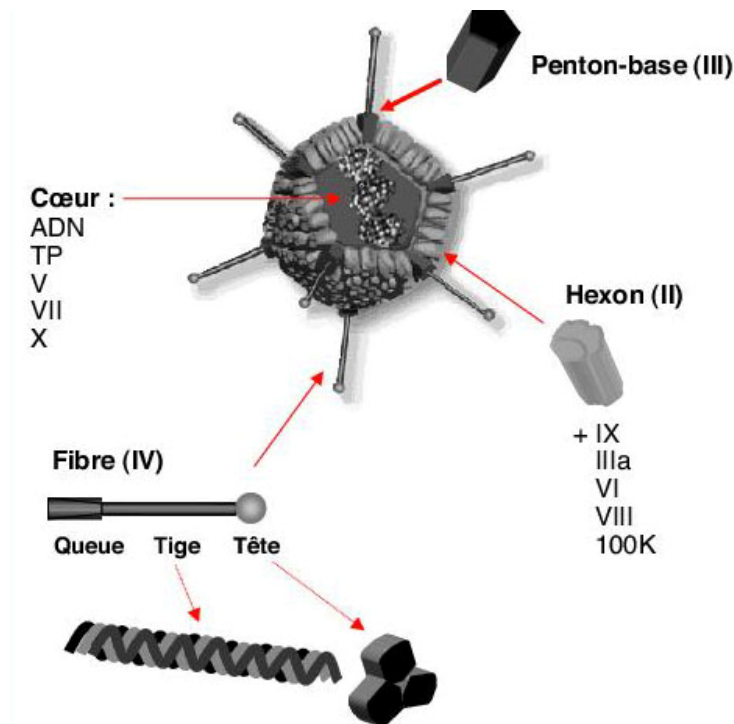


Figure 16 : Schéma représentatif de la particule virale et des principaux éléments structuraux de la capsidie et du nucléoïde interne (d'après http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/03/FB/72/texte_alt_085ql.jpg P. Boulanger). Le virion est constitué d'un ADN génomique de 36 kilobases, lié par des protéines basiques. Une capsidie protéique icosaédrique protège ce cœur nucléoprotéique. La protéine majoritaire de cette capsidie est l'hexon et à chaque sommet un complexe penton base- fibre est présent. De nombreuses protéines secondaires mineures contribuent également à la formation de la capsidie et jouent un rôle dans l'assemblage de celle-ci et dans l'enrobage de l'ADN viral.

3. Génome viral

Le génome de l'Ad5 entièrement séquencé [Chroboczek et al., 1992] présente une organisation en unités de transcriptions précoces (E1 à E4), intermédiaires (pIX, pIVa2) et tardives (L1 à L5) qui s'expriment de manière séquentielle (**Figure 17**). Historiquement, le chromosome a été divisé en cent unités de carte. Les gènes tardifs codent des protéines de structure alors que les gènes précoces codent des protéines régulatrices qui bloquent les mécanismes anti-viraux de la cellule hôte et préparent la réplication virale. La molécule linéaire d'ADN présente à ses extrémités des régions ITR (*Inverted Terminal Repeat region*) qui contiennent l'origine de réplication virale et permettent la circularisation de la molécule.

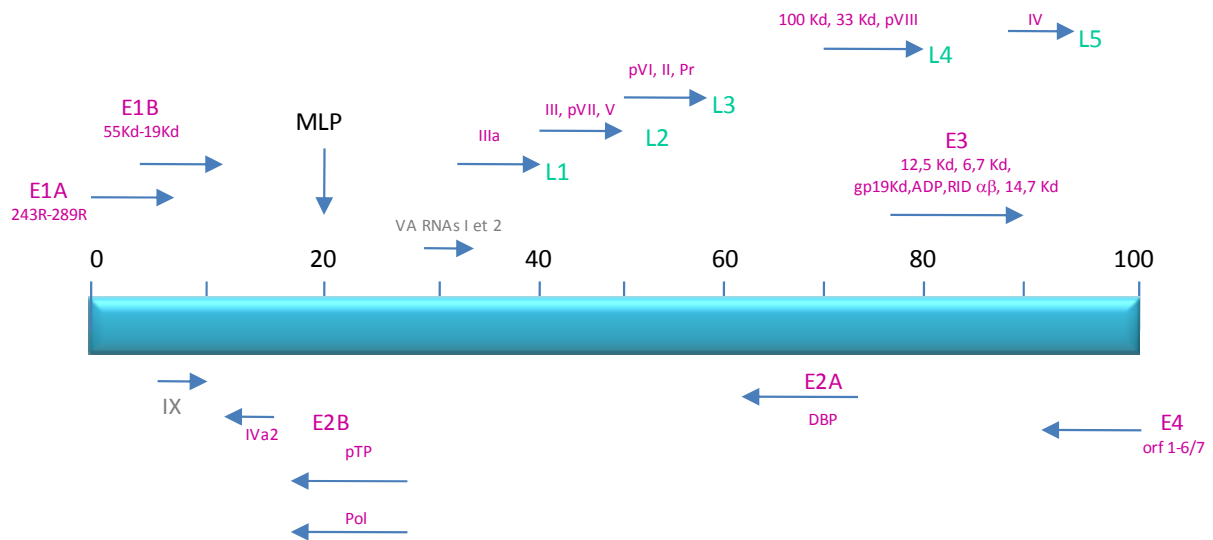


Figure 17 : Représentation schématique du génome de l'adénovirus (adapté de [Russell, 2000]). Le génome de l'Ad est constitué d'un ADN double brin linéaire d'environ 36 Kb. Il est caractérisé par l'existence de régions dites précoces (E1 à E4) et tardives (L1 à L5) indiquées par des flèches sur le schéma. Les gènes précoces régulent la transcription, induisent la croissance cellulaire, préviennent l'apoptose, modulent la réponse immunitaire de l'hôte ou induisent la libération des particules virales. Les gènes tardifs sont transcrits à partir d'un promoteur unique : le MLP et codent l'ensemble des protéines structurales.

4. Les acteurs de l'infection

a. Les protéines virales importantes

i. La fibre (polypeptide IV)

La fibre, polypeptide de 582 acides aminés chez l'Ad2, est liée de manière non covalente par son extrémité N-terminale à la surface du penton-base [Devaux et al., 1987; Zubieta et al., 2005]. Trente six copies de cette protéine sont assemblées en trimère au niveau des douze sommets de la capsid. Il a été montré qu'une séquence proche de son extrémité N-terminale (FNPVYPY) est hautement conservée entre les sérotypes [Zubieta et al., 2005]. De nombreuses liaisons hydrogènes et des ponts salins contribuent à la stabilité de l'interaction avec le penton-base. La séquence peptidique responsable de cette interaction est également bien conservée entre les sérotypes. La fixation de la fibre au penton-base induit des modifications conformationnelles coopératives qui permettent de ne laisser de la place que pour un trimère de fibre. La trimérisation de la fibre va être dépendante des séquences à la fois du bouton terminal et de la tige [Li et al., 2006].

Classiquement, la fibre peut être subdivisée en trois domaines : (i) une queue N-terminale, flexible, responsable de la liaison au penton base (ii) une tige centrale assez rigide

présentant des motifs répétés d'environ quinze résidus et (iii) un domaine C-terminal globulaire nommé bouton terminal (*knob* en anglais) qui joue un rôle crucial dans les interactions avec la cellule hôte. (**Figure 18**).

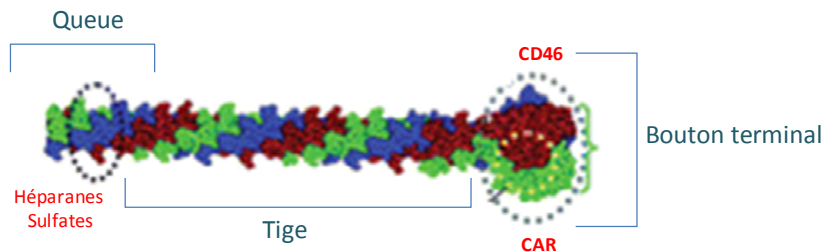


Figure 18 : Structure de la fibre de l'Ad5 (adaptée de [Russell, 2009]). La fibre est présente au niveau des douze sommets de l'icosahédre sous la forme d'un trimère. Elle est constituée de trois domaines structuraux distincts : la queue, la tige et le bouton. Le domaine « queue » fournit un ancrage à la fibre grâce à une association non covalente avec les protéines penton-base. L'interaction avec le récepteur naturel CAR, est facilitée par la présence de la tige qui éloigne le domaine globulaire. Le bouton terminal accomplit deux fonctions : (i) maintenir l'état trimérique de la fibre (ii) permettre l'interaction avec le CAR. Les sites de fixation aux récepteurs d'attachement sont notés en **gras**.

La fibre a été la seconde protéine de l'adénovirus cristallisée [Mautner and Pereira, 1971], mais ce cristal n'a pas permis une détermination de sa structure. Il a fallu attendre 1994, pour obtenir les premières informations concernant le bouton terminal de la fibre de l'Ad5 [Xia et al., 1994] en utilisant la cristallographie par rayons X (**Figure 19**).

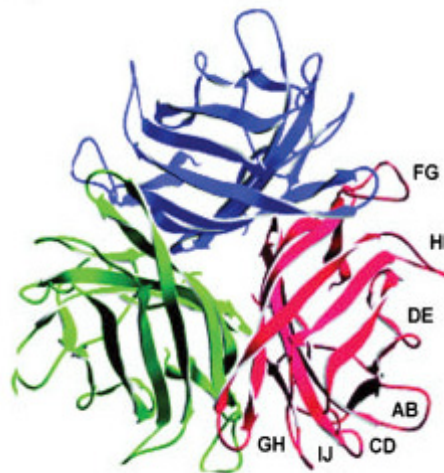


Figure 19 : Structure du bouton terminal de la fibre. Selon le modèle tridimensionnel de la fibre établi par [Xia et al., 1994], le domaine globulaire (bouton) ressemble à une hélice de bateau constituée de feuillets β reliés par des boucles. La boucle HI, qui relie les feuillets H et I, est exposée en dehors du bouton et fournit un lieu d'insertion privilégié pour des ligands hétérologues.

Le nombre de répétition variable au niveau de la tige entraîne une variation naturelle de la longueur de celle-ci en fonction des sérotypes [Green et al., 1983]. Ainsi, la fibre de l'Ad2 contenant 22 répétitions atteint une longueur d'environ 37 nm. Des glycosylations de

certaines résidus sérine de la tige ont également pu être mises en évidence sans qu'aucun rôle fonctionnel n'ait pu être déterminé [Cauet et al., 2005].

ii. Le penton-base

La base du penton (ou penton-base, polypeptide III) est une protéine pentamérique insérée stratégiquement au niveau des douze sommets de la capsid. Cette protéine possède une propriété fondamentale pour l'infection. En effet, elle est responsable de l'attachement et de l'internalisation de la particule virale. Durant le processus d'entrée cellulaire, le penton-base interagit avec les intégrines présentes à la surface de la cellule hôte. Une séquence RGD conservée chez tous les sérotypes humains à l'exception de l'Ad40, et de l'Ad41 est responsable de cette interaction. Pendant de nombreuses années, les seules données structurales concernant la base du penton étaient des figures de microscopie électronique. Récemment, la structure de la base du penton de l'Ad2 a été résolue [Zubieta et al., 2005]. Un tonneau constitué de huit brins β forme la partie basale du penton-base alors que sa partie supérieure est constituée essentiellement d'hélices α et de boucles lui donnant un aspect en tulipe.

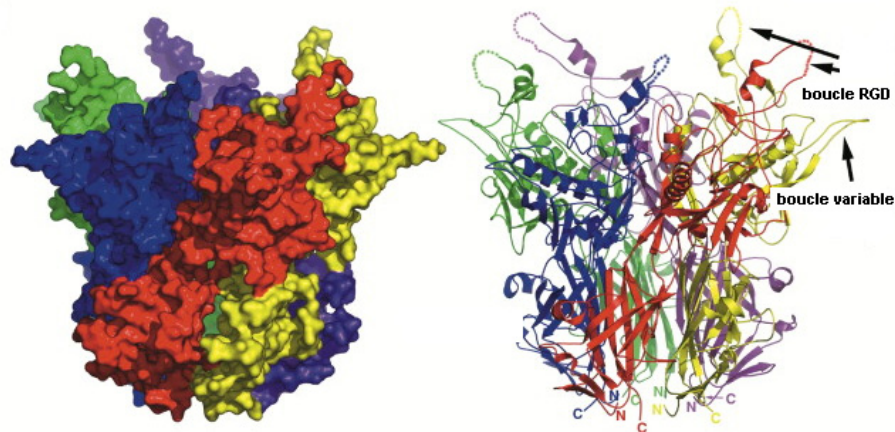


Figure 20 : Reconstitution par microscopie cryo-électronique de la protéine penton-base de l'Ad5 (d'après [Zubieta et al., 2005]). Deux boucles RGD sont visibles. Les extrémités N et C terminales sont également indiquées

Deux zones du penton-base présentent une grande variabilité entre les différents sérotypes : (i) la boucle RGD, flexible partiellement organisée et (ii) la boucle variable, au niveau des sommets du penton qui présente une longueur et une séquence variable en fonction des sérotypes dont la fonction reste encore inconnue (**Figure 20**).

Les résidus Gln 482 et Ile 484 ont été identifiés comme responsables de l'interaction avec la fibre. Suite à cette interaction, un ré-arrangement coopératif de la fibre a lieu. En effet, le changement de structure d'un monomère n'est possible dans l'environnement stérique que si l'ensemble des monomères change également de configuration. Cependant, dans le contexte d'une particule virale, le mode de fixation de la fibre au niveau de cette base pentamérique n'est pas connu. La boucle RGD jouerait également un rôle dans la sortie des endosomes [Shayakhmetov et al., 2005]. Il est intéressant de noter que le penton-base est capable de s'agréger pour former des dodécaèdres capables d'interagir avec les composants cellulaires [Fender et al., 2005; Vives et al., 2004].

b. Récepteurs d'attachement impliqués

La première étape de l'infection virale est la reconnaissance de la cellule hôte par le virus. Il s'agit d'une liaison de haute affinité entre le bouton terminal de la fibre et son récepteur primaire présent à la surface de la cellule hôte. Plusieurs récepteurs ont pu être identifiés.

i. CAR

Le récepteur des adénovirus le plus étudié est le CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), protéine de 46 kDa également responsable de l'internalisation des coxsackievirus du groupe B [Bergelson et al., 1997]. Membre de la superfamille des immunoglobulines, il est responsable au sein des cellules de l'adhérence cellulaire homotypique [Hassell et al., 1986] et est présent dans les jonctions intracellulaires spécialisées comprenant le disque cardiaque [Noutsias et al., 2001] et les jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées [Cohen et al., 2001]. Bien que sa distribution au sein des tissus humains ne soit pas bien définie, son ARN messager est présent dans de nombreux organes, incluant le cœur, le cerveau, le pancréas, les intestins [Tomko et al., 1997], les poumons, le foie et les reins [Fechner et al., 1999]. De plus, sa délétion, chez l'animal, conduit à l'apparition de malformations telles qu'une hyperplasie ventriculaire [Chen et al., 2006].

Son expression à la surface des cellules cibles permet l'attachement de certains virus appartenant à l'espèce A (Ad12), C (Ad2, Ad5), E (Ad4) et F (Ad41). Le récepteur CAR sous forme soluble interagit également avec l'Ad31 (espèce A), l'Ad9 et l'Ad19 (espèce D) ou avec

leurs fibres isolées [Roelvink et al., 1998]. Ces observations ont conduit à penser que le CAR serait le récepteur universel de tous les adénovirus en dehors de ceux de l'espèce B. Cependant, cela ne semble pas être le cas. En effet, les espèces sont constituées de virus hétérogènes et des virus de même sérotype peuvent différer dans leur manière d'interagir avec les récepteurs cellulaires. De plus, nombres des expériences ont été menées en utilisant des fibres isolées ou avec un récepteur soluble ce qui ne reflète pas ce qui se passe quand un virus entier interagit avec son récepteur au niveau de la surface cellulaire.

La structure cristallographique de la fibre liée au domaine N-terminal du CAR révèle qu'il interagit avec un site à la surface du trimère du bouton terminal de la fibre [Freimuth, 1996; Roelvink et al., 1999]. L'alignement des séquences du bouton terminal liant le CAR indique que les résidus de contact sont uniquement partiellement conservés entre les espèces. Cependant, la capacité de liaison au récepteur est d'une certaine manière maintenue malgré les variations de séquences du fait de la pression immunologique [Howitt et al., 2003]. La nécessité pour le virus de lier le CAR et les intégrines en même temps semblent imposer des contraintes géométriques pour les interactions avec les récepteurs. De ce fait, les virus liant le CAR ont besoin d'avoir une fibre longue [Roelvink et al., 1998; Shayakhmetov and Lieber, 2000] et flexible [Wu et al., 2002]. Bien que la fibre très courte de l'Ad9 soit capable de lier le CAR, cette interaction avec la cellule hôte apparaît être CAR-indépendante : son penton base est en effet capable d'interagir seul avec les intégrines cellulaires [Roelvink et al., 1996]. Un modèle dans lequel des fibres libres d'adénovirus faciliteraient la progression virale en brisant les jonctions intercellulaires dépendantes du CAR [Walters et al., 2002] a été proposé. Ce phénomène peut par exemple se produire quand les fibres de part leur taille trop courte ou une trop grande rigidité ne permettent pas une infection des cellules dépendantes du CAR. Le signal cellulaire induit par la liaison de l'Ad au CAR a été proposé comme inhibant la prolifération des cellules tumorales [Okegawa et al., 2001]

ii. Les héparanes sulfates glycosaminoglycanes

Les héparanes sulfates glycosaminoglycanes (HS-GAG) sont des carbohydrates sulfatés hétérogènes très abondants au niveau de la matrice extracellulaire et du glycocalyx cellulaire. Dans de nombreux cas, les glycosaminoglycanes sont liés à une protéine « core » formant ainsi des protéoglycanes [Hassell et al., 1986]. Les Ad2 et Ad5 lient les HS-GAG de

manière indépendante du CAR [Dehecchi et al., 2001; Dehecchi et al., 2000]. La reconnaissance des HS-GAG est permise grâce à un motif d'acides aminés basiques : KKTK, présent au niveau de la queue de la tige de l'Ad5 [Cardin et al., 1989]. La mutation de ce motif modifie de manière significative le tropisme du virus *in vivo*, bien qu'il n'ait pas été montré que cette altération résulte d'une modification de la liaison aux HS-GAG [Smith et al., 2003]. Le mécanisme par lequel les autres adénovirus lient les HS-GAG n'est pas connu. Cependant le site de liaison aux HS-GAG putatif est conservé dans l'ensemble de l'espèce C et absent des fibres des autres virus dont le génome est séquencé [Nemerow et al., 2009].

iii. CD46

Avant l'identification d'un récepteur spécifique, il avait été observé que l'Ad3, virus de l'espèce B, n'entre pas en compétition pour un site d'attachement avec les virus de l'espèce C (Ad2 ou l'Ad5). Le récepteur d'attachement utilisé serait donc différent [Defer et al., 1990; Stevenson et al., 1995].

Aucun virus de l'espèce B testé (Ad3, Ad7, Ad11 et Ad35) n'a été montré comme interagissant avec le CAR [Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998]. D'autres expériences de compétition suggèrent qu'il interagit avec au moins deux types de récepteurs [Segerman et al., 2003]. Ainsi, de nombreux adénovirus de l'espèce B ont été montrés comme liant CD46, protéine régulatrice exprimée sur toutes les cellules humaines nucléées, impliquée dans l'internalisation d'autres pathogènes (exemple : virus humain de l'herpès de type VI, virus *measles*) [Tornow et al., 1985]. Les virus de l'espèce B1 et B2 semblent tous les deux lier le CD46 qui représenterait donc le récepteur commun pour ce groupe. Cette liaison s'effectue au niveau du bouton terminale de la fibre [Gaggar et al., 2003; Segerman et al., 2003].

iv. CD80 et 86

L'infection par l'Ad3 de cellules dendritiques isolées dépend de l'interaction avec CD80 et/ou CD86 [Short et al., 2004]. Ces récepteurs, membres de la superfamille des immunoglobulines, sont exprimés sur les cellules présentatrices d'antigène et sont connus

pour leur fonction d'activation des lymphocytes T. Actuellement les mécanismes par lesquels les autres sérotypes interagissent avec ces deux types de récepteurs restent inconnus.

v. Les acides sialiques

De nombreux virus de l'espèce D (Ad37, Ad8, Ad19a) ont été montrés comme infectant les cellules après attachement aux acides sialiques $\alpha(2-3)$, composés carbohydrates communs des glycoprotéines et des glycolipides [Arnberg et al., 2000]. Des études cristallographiques montrent que les acides sialiques se lient à un site du sommet du bouton terminal de la fibre [Burmeister et al., 2004]. Les résidus potentiellement impliqués dans cette interaction sont conservés au sein des virus de l'espèce D.

Les trois adénovirus connus pour lier les acides sialiques provoquent des conjonctivites, cependant aucune relation n'a pu être établie entre cette capacité de liaison à une molécule de surface ubiquitaire et la spécificité de leur tropisme.

vi. Intégrines $\alpha M\beta 2$ et $\alpha L\beta 2$

Dans de nombreux cas, l'attachement du virus dépend d'une interaction directe entre le penton-base et les intégrines cellulaires de surface, sans nécessité de récepteur primaire pour la fibre. Ainsi, des virions d'Ad2 déficients pour la fibre sont capables d'infecter des monocytes, cellules CAR-négatives. Elles utilisent alors un mécanisme impliquant un attachement primaire aux intégrines de surface, suivi d'une interaction avec les αv -intégrines ($\alpha M\beta 2$ et $\alpha L\beta 2$) [Huang et al., 1996].

vii. Récepteurs protéiques et non protéiques

Le domaine $\alpha 2$ du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) a été rapporté comme induisant une interaction de haute affinité avec l'Ad5 lorsqu'il est exprimé sur des lignées cellulaires humaines déficientes en CMH. Le site d'attachement putatif de la fibre montre de faibles similarités de séquences avec les sites de liaison identifiés pour le CAR. Cependant, l'expression du CMH-1 à la surface de cellules de hamster montre qu'il présente peu d'affinité pour la fibre de l'Ad5 [Hong et al., 1997]. Le rôle de cette protéine ubiquitaire dans l'infection reste donc encore flou.

L'Ad5 a également été montré comme liant la molécule d'adhérence des cellules vasculaires, V-CAM1, membre de la superfamille des immunoglobulines exprimé sur les cellules endothéliales activées. [Cybulsky et al., 1991]. Du fait d'une expression plus importante de V-CAM1 à la surface des cellules présentant un endothélium athérosclérotique, il a été suggéré que l'infection induite par les V-CAM1 serait un outil de choix pour une thérapie génique ciblée de l'athérosclérose [Chu et al., 2001].

L'hexon de l'Ad5 interagit également avec le dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), composant du surfactant pulmonaire. Cependant le rôle de cette interaction reste inconnu *in vivo* [Balakireva et al., 2003].

c. Les intégrines, comme récepteur d'entrée cellulaire

De nombreux sérotypes d'adénovirus présentent un peptide RGD au niveau de leur penton-base. Il sert de sites de reconnaissance à des intégrines, membres d'une grande famille de récepteurs d'adhésion hétérodimérique ($\alpha\beta$). Le recrutement de ces intégrines par le penton-base, induit des signaux cellulaires, nécessaires à l'internalisation du virus, tels que l'activation de la PI3 (phosphatidylinositol 3) kinase, de p130 CAS (*Crk-associated substrat*) et des RhoGTPases [Li et al., 1998a] et permet également la sortie des endosomes [Wickham et al., 1994].

Les intégrines connues pour faciliter l'entrée du virus incluent le récepteur à la vitronectine, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ [Wickham et al., 1993], $\alpha v\beta 1$ [Li et al., 2001], $\alpha 3\beta 1$ [Salone et al., 2003] et $\alpha 5\beta 1$ qui reconnaissent tous des ligands RGD.

Le rôle de la liaison à ces intégrines a été très étudié pour les Ads de sérotype 2 et 5, reconnaissant comme récepteur d'attachement primaire le CAR. Cependant, l'interaction entre le motif RGD et les intégrines est aussi impliquée dans l'internalisation de virus qui lient d'autres récepteurs primaires [Mathias et al., 1994], avec une exception pour ceux de l'espèce F (Ad40 et Ad41). Il est important de noter qu'une mutation des séquences RGD présentes au niveau du penton-base ralentit mais ne prévient pas l'internalisation et l'infection par les Ads [Bai et al., 1993]. Cela indique que l'entrée de l'Ad se produit de manière indépendante des intégrines ou que l'interaction avec ces molécules intervient au niveau d'un autre motif.

L'internalisation de virus déficients en RGD est plus rapide dans les cellules exprimant un haut niveau de récepteur pour la fibre suggérant que le recrutement de multiples récepteurs pour la fibre pourrait compenser la perte de l'interaction au niveau du penton-base [Freimuth, 1996]. De plus, cette interaction joue un rôle clé dans l'étape de sortie des endosomes [Wickham et al., 1994].

5. Cycle viral

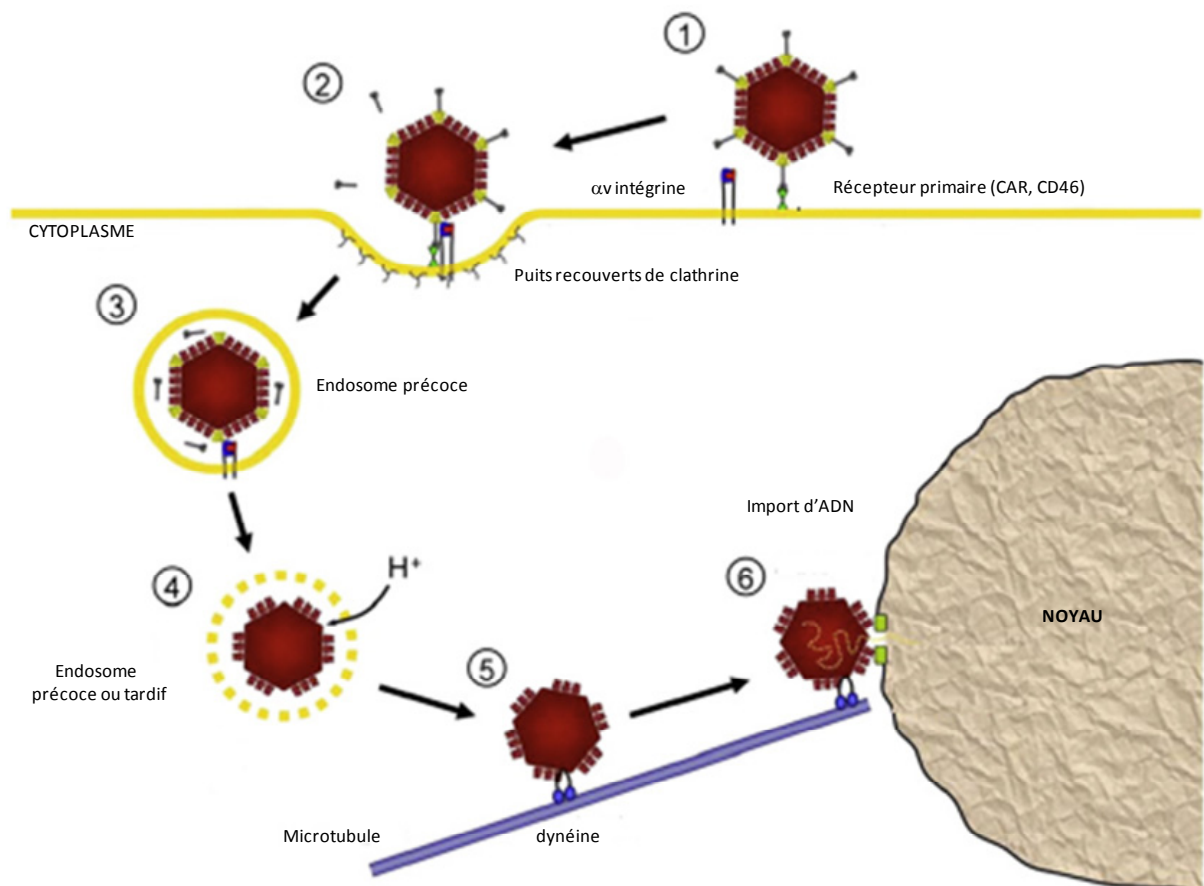


Figure 21 : Mécanisme d'entrée cellulaire de l'adénovirus. (1) Fixation de l'Ad à la surface cellulaire par deux types d'interaction : une avec CAR ou CD46, l'autre avec les α v-intégrines, (2) Endocytose du virion impliquant la voie des clathrines, (3) Dissociation progressive du virion au sein des endosomes précoces, (4) Relargage des protéines du vertex incluant pVI dans les endosomes, (5) Transport du virion partiellement dé-assemblé le long des microtubules grâce à la dynéine (6) Importation de l'ADN viral par les pores nucléaires.

a. Reconnaissance cellulaire et internalisation

Le cycle infectieux est initié suite à la liaison du virion aux récepteurs de la surface cellulaire (**Figure 1, étape 1**).

Les virus de l'espèce C (Ad2 et Ad5) se lient aux récepteurs de surface suivant deux types d'interaction ligand-récepteur. Une première interaction de haute affinité a lieu entre le bouton terminal de la fibre et le récepteur CAR à la surface de la cellule. Celle-ci est suivie d'une interaction de plus faible affinité entre un domaine RGD de liaison aux intégrines du penton- base et les intégrines cellulaires $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha M\beta 2$ et $\alpha 5\beta 1$ [Bergelson et al., 1997]. De manière combinée, ces deux interactions induisent une fixation irréversible et coopérative du virus à la surface de la cellule. Une liaison additionnelle de faible affinité entre les protéines de la capsid et les HS-GAG a également été montrée [Meier and Greber, 2003].

b. L'entrée

Une fois liée à la surface membranaire, la capsid pénètre au sein de la cellule par un procédé d'endocytose par un récepteur [Maxfield and McGraw, 2004] (**Figure 21, étape 2-3**). Un examen précoce par microscopie électronique a permis l'identification de vésicules entourant les virus. Ces vésicules présentent un manteau épais dense en électrons, qui a plus tard été identifié comme des vésicules recouvertes de clathrine [Dales and Choppin, 1962]. De plus, l'internalisation du virus nécessite la présence de cholestérol libre au sein de la membrane plasmique [Worgall et al., 2000].

Une démonstration fonctionnelle de l'endocytose a été faite en utilisant un système dans lequel les voies d'endocytose induites par la clathrine étaient inhibées par un dominant négatif. La dynamine est une protéine qui joue un rôle essentiel dans la rupture des puits recouverts de clathrine afin de former des vésicules libres [van der Bliek and Meyerowitz, 1991]. Le mutant K44A de la dynamine est thermosensible et agit comme un inhibiteur dominant négatif de l'endocytose en bloquant la formation des vésicules recouvertes à 37°C [Damke et al., 1994]. En l'utilisant, il a été alors démontré que l'infection par l'Ad est dépendante de l'endocytose par la clathrine.

c. Sortie dans le cytosol

La sortie dans le cytosol est l'une des étapes cruciales du cycle viral mais aussi la moins connue. Pour les Ad2 et Ad5, elle arrive rapidement après l'endocytose. [Greber et al., 1993] ont montré que la libération des particules dans le cytoplasme est inhibée par des

agents lysosomotropiques. De plus, elle nécessite *in vitro* un pH acide [Blumenthal et al., 1986]. Cependant, de nombreux autres travaux montrent un effet léger des amines lysosomotropiques sur l'infection par l'Ad [Rodriguez and Everitt, 1996]. La présence des particules virales dans les endosomes et un pH endosomal bas ne sont donc pas suffisants pour induire une perturbation des endosomes : d'autres facteurs doivent être impliqués. Un de ces facteurs est l'intégrine $\alpha\beta 5$ [Wickham et al., 1994]. En effet, l'interaction entre la base du penton et l'intégrine induirait un changement conformationnel du penton, conduisant à l'exposition de la protéine VI. Une fois dans l'endosome, le virus est exposé à un environnement réducteur ce qui active la protéase virale présente dans la capsidie qui va alors dégrader la protéine VI exposée [Wiethoff et al., 2005]. Ce clivage va permettre la libération de l'ADN viral déstabilisant ainsi la capsidie virale ce qui conduit à la lyse endosomale. La fibre serait également impliquée dans la sortie des endosomes. En effet, il a été démontré, que selon les sérotypes, elle entraîne une sortie plus ou moins rapide de l'endosome. Ainsi, les adénovirus de l'espèce B ne sortent pas au niveau des endosomes précoces (pH 6,5) mais s'accumulent dans les endosomes tardifs et les lysosomes où le pH est plus acide [Colin et al., 2004; Miyazawa et al., 2001]. Il a également été montré que la taille et la structure du génome encapsidé pouvait influencer l'endosomolyse [Shayakhmetov et al., 2004].

d. Translocation nucléaire

Après la sortie des endosomes, le virus est transporté au noyau le long du système microtubulaire. La capsidie se retrouve dans un environnement cytosolique visqueux qui agit comme une barrière à la diffusion au noyau. Afin de se déplacer au sein de la cellule, elle interagit avec des moteurs moléculaires cytosoliques telle que la dynéine cytoplasmique qui permet une liaison au réseau des microtubules d'actine [Leopold et al., 2000; Mabit et al., 2002; Suomalainen et al., 1999]. La capsidie va alors utiliser le complexe moteur dynéine-dynactine afin de se déplacer vers le centre organisateur des microtubules (MTOC). Ce mouvement va être favorisé par les voies des PKA, p38/MAPK et MK2. L'adénovirus doit ensuite se détacher de ce complexe pour rejoindre les pores nucléaires [Greber et al., 1997]. De manière surprenante, la protéine CRM1 (*Chromosome Maintenance Region*) d'export nucléaire est requise pour cet import [Strunze et al., 2005]. Une fois fixés à la surface

cytosolique du pore nucléaire, les virus délivrent leur génome au noyau de la cellule. La fixation se fait sur une protéine filamenteuse du complexe du pore nucléaire : CAN/Nup214 qui s'avère nécessaire au dé-assemblage de la particule [Trotman et al., 2001]. Le démantèlement et l'import de l'ADN sont permis par l'interaction avec l'histone H1 et les importines Imp β - Imp7.

e. Réplication et assemblage de particules virales

i. Phase précoce du cycle viral

Durant cette phase l'ensemble des protéines régulatrices des unités E1, E2, E3 et E4 sont synthétisées. Elles modifient la biologie de la cellule infectée son cycle cellulaire et diverses activités enzymatiques au profit de la réplication virale. Elle va aboutir à la réplication du génome viral en 6 à 12 heures en fonction du sérotype.

L'unité E1 (A et B) est immédiatement activée suite au transfert du génome dans le noyau de la cellule infectée. La région E1A est responsable du contrôle de la transcription des gènes précoces dont les produits sont nécessaires à la réplication de l'ADN viral (pour revue [Berk, 2005]). La protéine pIX, présente en grande quantité dans la capsid virale, contribuerait à l'activation immédiate de l'expression de la région E1A en agissant sur l'activité transcriptionnelle de son promoteur [Rosa-Calatrava et al., 2001]. Contrairement aux rétrovirus, l'accomplissement du cycle infectieux ne sera pas dépendant de l'état prolifératif de la cellule. En effet, E1A va favoriser l'entrée des cellules en phase S en activant l'expression de gènes cellulaires [Keblusek et al., 1999]. Cette propriété résulte en partie de son interaction directe avec des facteurs cellulaires tels que pRB, Jun et ATF2 impliqués dans le contrôle de la transcription.

La région E1B code les protéines E1B-55K et E1B-19K. L'interaction de la protéine E1B-55K avec la protéine suppresseur de tumeur p53 et sa coopération avec l'ORF6 de E4 facilitent l'entrée en phase S en inhibant l'activité transcriptionnelle de p53 [Teodoro and Branton, 1997; Wienzek et al., 2000]. La protéine E1B-19K, analogue fonctionnel de BCL2, a quant à elle une action anti-apoptique [Cuconati et al., 2002], qui favorise la réplication virale en évitant l'atrophie de la cellule hôte avant la libération des virus. Les produits de la

région E1 sont également impliqués dans la transition vers la phase tardive du cycle et dans le transport sélectif des ARN m viraux du noyau vers le cytoplasme.

L'unité E2 est elle-même subdivisée en deux produits : (i) la région E2A qui code la DBP (*single stranded DNA binding protein*). Cette protéine lie l'ADN simple brin et est impliquée dans la régulation de gènes viraux [Chang and Shenk, 1990] (ii) la région E2B code l'ADN polymérase virale et la protéine terminale (TP). Le précurseur de cette dernière, pTP, sert d'amorce à la réplication virale [Hay et al., 1995] en s'associant à l'ITR 5' du génome [Salas, 1991]. Sous sa forme mature, la TP est encapsidée et permet l'attachement du génome à la matrice nucléaire lors du transfert de l'ADN dans le noyau.

L'unité E3 n'est pas essentielle à la réplication virale *in vitro*, mais possède une fonction immuno-modulatrice. A partir de cette région, neuf ARN messagers sont générés par épissage alternatif d'un ARN pré-messager [Chow et al., 1979]. Ils vont conduire à la synthèse de six protéines dont les fonctions ont été caractérisées. Ainsi, la protéine gp19, localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, lie la chaîne lourde du CMH de classe I bloquant ainsi sa translocation et son incorporation au sein de la membrane plasmique [Burgert and Kvist, 1987]. Les cellules sont alors protégées de la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques. Les protéines 14,5 K et 10,5 K agissent en synergie pour inhiber l'expression du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) à la surface des cellules infectées limitant ainsi les réactions inflammatoires. Elles protègent d'autre part les cellules infectées de la cytolysse induite par le TNF α (*Tumour Necrosis Factor*) tout comme la protéine 14,7 K [Wang et al., 1988]. Les protéines 14,7 K, RID α , et RID β inhibent la voie pro-apoptotique. Enfin la protéine 11,6 K ou ADP (*Adenoviral Death Protein*), exprimée en faible quantité à partir du promoteur E3 au cours de la phase précoce mais produite en très grande quantité pendant la phase tardive à partir du MLP (*Major Late Promoter*) [Tollefson et al., 1992] facilite la lyse cellulaire et la sortie des particules virales.

Les produits des gènes dérivés de la cassette E4 facilitent le métabolisme de l'ARN messenger en collaboration avec ceux de la région E1. Cette région est complexe. Elle est à l'origine de dix huit messagers distincts produits par épissage alternatif [Virtanen et al., 1984]. Ces ARN messagers codent potentiellement sept polypeptides différents mais seulement quatre protéines sont retrouvées au cours de l'infection. Celles-ci présentent de nombreuses fonctions telles que l'initiation de la réplication viral, l'expression des gènes

tardifs, l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires, l'altération de l'ultra-structure du noyau de la cellule infectée, l'accumulation, l'épissage et le transport des ARN messagers précoces et tardifs (pour revue [Weitzman and Ornelles, 2005]).

ii. Transition vers la phase tardive

Cette étape se caractérise par l'activation de la transcription des gènes codant les protéines IVa2 et pIX. Les premiers ARNm de IVa2 apparaissent environ neuf heures après le début de l'infection et la protéine est détectable dès douze heures [Winter and D'Halluin, 1991]. La protéine IVa2 joue un rôle important dans l'activation du promoteur majeur de la phase tardive (MLP) et favorise ainsi la transition vers cette phase et la synthèse des protéines structurales. De même, la protéine pIX produite précocement va être nécessaire à l'activation du MLP [Lutz et al., 1997]. pIX joue également un rôle dans l'altération de l'ultra-structure nucléaire en séquestrant les protéines PML et SP 100 [Rosa-Calatrava et al., 2003].

Durant cette phase de transition, les ARN associés au virus (ARN-VA I et II) sont transcrits à partir de l'ARN polymérase cellulaire III [Liao et al., 1998]. Ainsi, l'ARN VA-II est accumulé entre trois et huit heures après l'infection alors que l'ARN VA-I augmente tout au long de la phase tardive. [Pruzan and Flint, 1995]. L'ARN VA-I s'avère être un antagoniste de la protéine kinase cellulaire DAI (*Double Stranded RNA activated protein Kinase*) qui est un facteur antiviral, inhibiteur de la synthèse protéique. L'ARN VA-I va donc prévenir son activation et contrôler ainsi l'initiation de la traduction des ARN m viraux tardifs [Philipson, 1995].

iii. Phase tardive

L'unité de transcription tardive (MLP) code un transcrite primaire de 29 Kb à l'origine de cinq familles d'ARN (L1 à L5) selon le site de polyadénylation utilisé. Ce transcrite est produit par l'ARN polymérase II sous le contrôle du MLP dont l'activité est stimulée par l'initiation de la réplication de l'ADN viral, la présence des protéines IVa2 et pIX et l'interaction avec certains facteurs de transcription. Tous les transcrits issus de ce promoteur contiennent une séquence non codante de deux cents nucléotides en 5' appelée TPL (*Tripartite Leader*). La reconnaissance du TPL par la protéine L4 100 K et l'ARN VA-I favorise la traduction des ARN messagers viraux tardifs par rapport aux ARN messagers cellulaires

[Philipson, 1995] en autorisant une initiation de la traduction indépendante du facteur cellulaire eIF4F.

f. Assemblage et libération des particules.

Après réplication de l'ADN viral, la synthèse des protéines virales de structure et l'assemblage ont lieu dans le noyau de la cellule hôte. Les trimères d'hexon et les oligomères de penton-base-fibre se forment et sont transportés vers le noyau seuls ou guidés par des protéines chaperonnes. Les capsides peuvent alors s'assembler selon une séquence bien ordonnée (pr revue [D'Halluin, 1995] : assemblage des protéines de capside, incorporation polarisée du génome viral dans les particules formées avec le concours des protéines L1, condensation de l'ADN grâce à l'incorporation des protéines V, VII et μ et enfin encapsidation de la protéase virale qui clive les précurseurs protéiques incorporés. Cette maturation finale induit un changement de conformation des complexes fibre-penton-base qui confèrent aux virions une capacité d'infection maximale. Généralement trente à quarante heures après l'initiation de la réplication, le cycle productif se termine par la mort des cellules et la libération des virions.

g. Endocytose via la voie des clathrines

L'assemblage des particules virales dans le noyau débute généralement huit heures après l'infection et conduit à la production de 10^4 - 10^5 particules par cellules qui sont libérées dans le cytoplasme en tant que particules matures, par lyse cellulaire, trente à quarante heures après l'infection (pour revue [Meier and Greber, 2003]).

D. Thérapie génique et adénovirus

1. Le concept de thérapie génique

Le concept de thérapie génique a été introduit en 1973 suite au développement des méthodes d'ADN recombinant. Il peut être défini comme l'utilisation de matériel génétique pour modifier les cellules d'un patient atteint ou non d'une maladie héréditaire. La thérapie génique peut donc potentiellement s'appliquer à un grand nombre de pathologies.

Le traitement du cancer par thérapie génique paraît prometteur. En effet, cette technologie, plus qu'une autre, tire profit de l'avantage des nouvelles découvertes en ce qui concerne les aspects moléculaires et génétiques liés aux pathologies tumorales. Elle offre en outre la possibilité d'un traitement plus ciblé et plus rationnel que ceux proposés actuellement. Deux méthodes transferts de gènes sont développées : le transfert *in vivo* dans lequel le transgène est injecté soit directement dans la tumeur soit dans la circulation systémique et le transfert *ex vivo* sur des cellules cibles de patients qui sont ré-implantées. En thérapie génique anti-cancéreuse, deux stratégies principales sont utilisées: la réversion du phénotype néoplasique par la correction des mutations induites et/ou l'élimination des cellules néoplasiques par l'activation du système immunitaire, par induction de la mort cellulaire ou par inhibition de l'angiogénèse. Sur l'ensemble des essais cliniques recensés en thérapie génique dans la littérature près de deux tiers sont destinés au traitement des cancers (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, **Figure 22**).

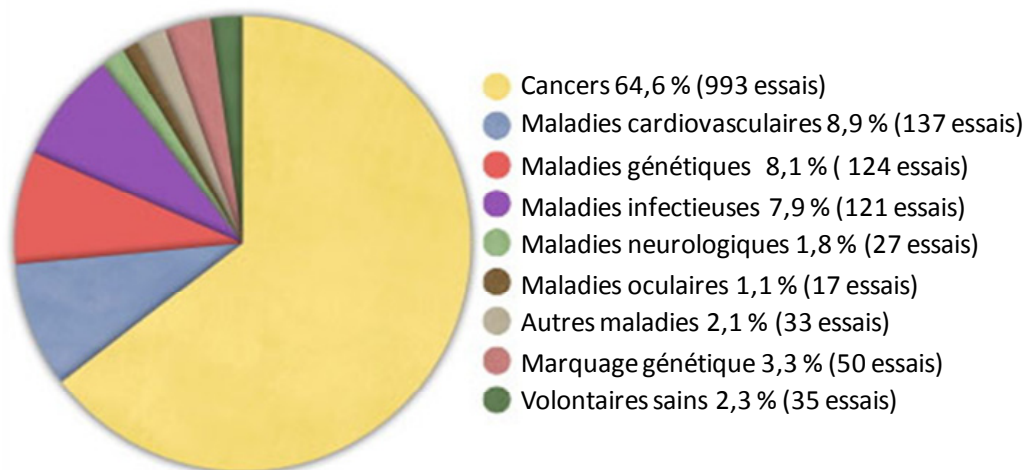


Figure 22 : Applications des essais cliniques depuis 1989 dans le monde, source <http://wiley.co.uk/genmed/clinical>, Mars 2009

2. Thérapie génique et cancer du col de l'utérus

De nombreuses stratégies de thérapie génique ont été utilisées pour le traitement des cancers telles que l'inhibition de l'angiogénèse, l'induction de la mort cellulaire par des gènes suicides, la réactivation des suppresseurs de tumeurs ou encore l'inhibition d'oncogène (pour revue [McCormick, 2001]).

Les cellules transformées par HPV souffrent d'addiction aux oncogènes [Weinstein and Joe, 2006]. En effet, l'expression continue des deux oncoprotéines E6 et E7 est

nécessaire et suffisante pour le maintien du phénotype transformé [Durst et al., 1987] [Pirisi et al., 1987; Yee et al., 1985]. L'analyse des séquences codant les protéines, p53 et pRB, principales cibles de E6 et E7, montrent que celles-ci ne présentent pas de mutations. Il s'avère donc envisageable de restaurer leur fonction par thérapie génique. Plusieurs études ont montré qu'il était possible d'inhiber sélectivement l'expression de E6 et E7 par l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques de l'ARN messenger bistronique codant ces protéines (pour revue [DiPaolo and Alvarez-Salas, 2004]). Ainsi, des ARN antisens spécifiques des ARN messagers de E6 et E7 d'HPV16 et 18 peuvent induire l'inhibition de l'expression des deux oncoprotéines et un arrêt de la croissance cellulaire en culture [Steele et al., 1993] mais aussi en modèle de xéno greffe chez la souris [He et al., 1998b]. Un ARN antisens de l'ARN messenger de 16E6 provoque quant à lui l'apoptose des lignées cellulaires transformées par HPV16 et une augmentation du taux du suppresseur de tumeur p53 [Cho et al., 2002]. L'inhibition spécifique de l'ARN messenger de 16E7 n'induit qu'une diminution de la croissance cellulaire [Cho et al., 2000]. Des siRNA (*Small Interfering ribonucleic acid*), petits ARN double brins de 21 à 25 nucléotides, ont également été testés dans les lignées transformées par HPV. Ainsi, plusieurs siRNA contre les messagers E6 et E7 ont été décrits. Certains vont induire une accumulation de p53 et un retard de la prolifération cellulaire [Jiang and Milner, 2002], d'autres provoquent l'apoptose des cellules transformées [Butz et al., 2003; Jiang and Milner, 2002]. Il a également été montré que leur administration *in vivo* dans un modèle murin de tumeur inhibe la croissance tumorale [Jonson et al., 2008].

Yamato et col., ont montré que l'inhibition d'E6 seule serait plus efficace que combinée à celle d'E7 [Yamato et al., 2006]. Des séquences d'ADN simple brin complémentaires de l'ARN messenger cible ont également été utilisées. Elles présentent l'avantage d'être plus facile à transférer dans les cellules et d'induire à la fois une inactivation du messenger mais aussi sa dégradation par la RNase H ou par une activité catalytique en cas d'utilisation de ribozyme. De telles séquences contre les ARN messagers de E6 et E7 sont capables d'inhiber la croissance des cellules transformées [Steele et al., 1993] en culture, et en xéno greffe chez la souris [Tan and Ting, 1995]. Néanmoins ces molécules sont extrêmement instables *in vivo*.

Carson et col., ont développé une nouvelle stratégie afin de prévenir la réplication dans les cellules infectées par HPV en utilisant une expression conditionnelle de la thymidine kinase (TK) de l'herpès simplex virus (HSV). La délivrance de l'HSV-TK par un *adeno-*

associated virus (AAV) suivi d'un traitement au ganciclovir résulte en une mort efficace des cellules HPV positives [Carson et al., 2005].

Les adénovirus réplikatifs conditionnels (CRAAd) sont également un bon espoir thérapeutique. Il a en effet été montré que le CRAAd Ad5- Δ 24RGD serait capable d'induire une oncolyse des cellules cervicales cancéreuses [Bauerschmitz et al., 2004]. Cette efficacité a également pu être montrée dans le modèle souris par injection intra-veineuse et intra-tumorale. De plus, aucune toxicité n'a été observée. Une autre approche qui utilise à son avantage la similarité entre les produits des gènes des virus à ADN, est la complémentation de mutants adénoviraux par les HPV [Balague et al., 2000]. Une méthode alternative pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses HPV est basée sur l'observation que les fonctions de p53 sont dans la plupart des cancers cervicaux inhibées. Le produit du gène d'E6 lie et inactive p53 en induisant sa dégradation. p73 est similaire en fonction à p53 mais n'est pas dégradé par E6 d'HPV. Das et col ont montré une inhibition de la croissance des cellules E6 positives suite à l'administration d'un Ad-p73 *in vitro* [Das et al., 2003]. Les Ads ont également été utilisés pour délivrer des ARN antisens de E6 et E7 *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Suite à l'infection des cellules, l'expression de pRb et p53 augmente et les cellules entrent en apoptose [Hamada et al., 2006]. Un adénovirus permettant l'expression de p53 a également été utilisé par Hamada et col., en infectant des cellules HeLa HPV 18 positives. *In vitro* la croissance cellulaire a été diminuée et la protéine p53 est détectable par western blot et immunofluorescence [Hamada et al., 1996b]. [Tsao et al., 1999] ont infecté des cellules cancéreuses HPV positives et négatives par un adénovirus recombinant contenant l'ADN complémentaire de p21. Une mort cellulaire massive par apoptose a été mise en évidence dans toutes les lignées cellulaires et des résultats similaires ont été observés dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Les adénovirus recombinants p21 seraient donc un nouvel outil pour le traitement des cancers cervicaux. Un virus atténué de la vaccine permettant l'expression des deux oncogènes E6 et E7 et de l'interleukine 2 a également permis le traitement de maladies malignes et pré-malignes induites par les HPV [Liu et al., 2004]. Récemment, [Bousarghin et al., 2009] ont montré qu'il était possible d'utiliser comme vecteur pour l'expression de shRNA (*small hairpin*) anti-E6 et E7 des pseudoparticules d'HPV. Ainsi, l'utilisation de shRNA anti-E6 induit une accumulation de la protéine p53 au niveau cellulaire et une réduction de la viabilité. Tandis qu'une expression de shRNA anti-E7 induit une inhibition de la croissance tumorale et la mort cellulaire. Une autre technique de

thérapie génique utilisée dans le cas du cancer du col de l'utérus est la thérapie génique dite vaccinnante. Ainsi, il a été montré que la transfection du gène codant CD80 dans des cellules HPV16 positives peut permettre l'obtention d'une réponse cytotoxique T positive contre 16E7 [Kaufmann et al., 1997]. Ce travail fut le premier à montrer que l'expression de CD80 peut induire la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques en utilisant 16E7 comme antigène. Gilligan et col, ont créé un adénovirus recombinant délété pour E1 et E3 et permettant l'expression de la molécule co-stimulatrice B7 [Gilligan et al., 1998]. Les cellules exprimant l'antigène B7 présentent un plus fort niveau de prolifération des lymphocytes T comparées aux cellules infectées par un virus contrôle. Ce virus présenterait donc une utilité pour le développement de vaccin. Une autre approche ciblant les cellules dendritiques a également été envisagée. Les cellules dendritiques sont reconnues comme des médiateurs clés de la réponse immunitaire T dépendante. Il a été montré qu'une modification génétique des cellules dendritiques peut induire une immunité anti tumorale. Ainsi dans l'étude de [Tillman et al., 2000], la protéine E7 d'HPV a été introduite au sein des cellules dendritiques en utilisant un Ad ciblant le CD40. Ce virus induit une maturation des cellules dendritiques, qui sont alors utilisées pour vacciner des souris. Dans le cas de xénogreffe chez la souris, les cellules dendritiques modifiées par E7 induisent une régression tumorale [Tillman et al., 2000].

3. Les méthodes de transfert de gènes

a. Vecteurs viraux

Les méthodes virales de transfert de gène représentent la catégorie la plus utilisée et la plus étudiée lors des essais cliniques. Un tableau présente les avantages et les inconvénients des principaux vecteurs (**Tableau 5**).

Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Adeno-associated virus	Transduction des cellules quiescentes et en division Durée d'expression longue <i>in vivo</i> Peu immunogène	Réadministration possible Taille limitée du transgène (4,5 kb) Production à des titres moyens (10^{10} particules infectieuses (pi)/mL)
Rétrovirus	Taux de transduction élevé <i>ex vivo</i> Durée d'expression assez longue Peu immunogène	Faible taux de transduction <i>in vivo</i> Transduction uniquement des cellules en division Risque de mutation insertionnelle Taille du transgène limité (environ 8 kb) Production difficile et titre faible (10^8 pi/mL)
Poxvirus ou virus de la vaccine	Capacité de transgène élevée (25 kb) Efficacité d'expression et transduction Infection de la plupart des types cellulaires	Fortement immunogène Difficulté à inhiber la réplication virale Fonctions de certains gènes inconnues Effets secondaires importants
Virus de l'herpès simplex	Infection de cellules quiescentes et en division Capacité de transgène élevée (30 kb) Production relativement aisée à des titres élevés Possibilité de limiter leur réplication par des drogues Manipulation du génome aisée	Effets secondaires importants Fonctions de nombreux gènes inconnues Haute antigénicité
Adénovirus	Taux de transduction élevé <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> Transduction des cellules quiescentes et en division Production aisée à des titres importants (10^{12} pi/ mL) Peu pathogène Non intégration dans le génome Génome très bien caractérisé	Taille limitée du transgène (maximum 7,5 kb) Réadministration possible Présence d'anticorps neutralisants en quantité importante dans la population Durée d'expression courte
ADN nu	Sécurité d'emploi Très peu immunogène Production simple	Transfection peu efficace Durée d'expression courte Ciblage de la transfection difficile
Lipides cationiques et particules d'ADN condensées	Transfection efficace <i>in vivo</i> pour les complexes non ioniques Peu immunogène	Transfection inefficace <i>in vivo</i> pour les complexes cationiques et toxicité Durée d'expression très courte

Tableau 5 : Comparatifs des systèmes de transfert de gène.

i. Les adéno-associated virus (AAV)

Ils appartiennent au genre dependovirus de la famille des parvoviridae et sont non pathogènes (pour revue [Daya and Berns, 2008]). Virus non répliatifs, ces virus non enveloppés à ADN simple brin doivent leur survie à un virus auxiliaire qui peut être de deux natures soit un Ad, soit un virus de l'herpès. Le génome est en fait une molécule d'ADN de polarité sens et antisens d'environ 4,7 kb. Des brins antisens et sens sont enveloppés dans des capsides de manière proportionnelle. Ce génome est caractérisé sur le plan structural par la présence de deux ITR palindromiques flanquant deux ORF qui vont servir d'origine de réplication. Deux étapes existent dans le cycle de vie de l'AAV : (i) en présence du virus auxiliaire qui conduit à une phase productive caractérisée par une réplication du génome, une expression des gènes viraux et la production du virion et (ii) en absence de virus auxiliaire, où les AAV peuvent entrer en latence grâce à une incorporation au niveau du chromosome 19. Le génome en cas d'infection par le virus auxiliaire peut alors se répliquer comme précédemment. Ce cycle est hautement régulé par des interactions complexes entre le génome de l'AAV, le virus auxiliaire et les protéines de l'hôte. Le tropisme du vecteur pourra alors être dépendant du vecteur auxiliaire utilisé. Les récepteurs de surface de nombreux AAV ont pu être identifiés, ainsi par exemple l'AAV-3 utilise les héparanes sulfates. Cependant, il est possible de le modifier en introduisant des modifications génétiques au sein des protéines structurales du virion. Néanmoins, ces virus présentent une faible capacité d'encapsulation ce qui limite la taille du transgène. Par la technique du *split gene* qui repose sur leur capacité à former des concatémères et à recombinaison au niveau des ITR il est possible d'augmenter la taille du transgène jusqu'à 10 kb [Grimm et al., 1998] .

ii. Les rétrovirus

- **Les oncorétrovirus**

Historiquement, il s'agit des premiers virus utilisés comme vecteur de transfert de gène [Mulligan, 1993]. Ce sont des virus à ARN retrouvés chez tous les vertébrés qui peuvent être classés en deux sous-familles (*orthoretrovirinae* et *spumavirinae*) et sept genres. Virus enveloppés, ils présentent une capsidie en forme de tronc de cône et un génome composé de deux molécules d'ARN monocaténares identiques de polarité positive (**Figure 23**). La

rétro-transcription en ADN de celui-ci est possible grâce à la rétrotranscriptase virale. Les oncorétrovirus les plus employés dérivent généralement des virus murins (MoMLV).

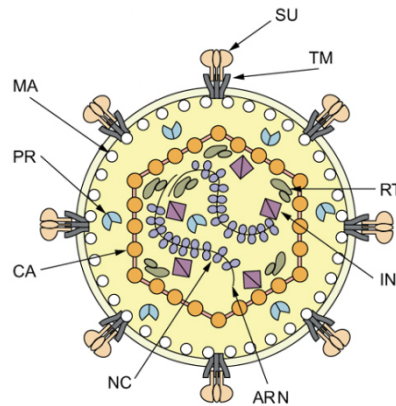


Figure 23 : Représentation schématique d'une particule rétrovirale. TM : composants transmembranaires, SU : composant de surface, IN : intégrase ; CA protéine de capsid, MA : protéine de la matrice, NC : protéine de la nucléocapside, RT reverse transcriptase, PR protéase rétrovirale .

Leur génome comprend à ses extrémités deux régions LTR qui contiennent le site d'initiation de la transcription, les séquences nécessaires à l'intégration chromosomique et une séquence activatrice. Après pénétration dans la cellule hôte, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN par l'action de la transcriptase inverse. Cette molécule d'ADN est alors intégrée de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte et les gènes peuvent être transcrits par l'utilisation de la machinerie cellulaire. Grâce à l'utilisation d'une séquence IRES plusieurs gènes thérapeutiques peuvent être placés sous le contrôle des mêmes séquences régulatrices dans un oncorétrovirus recombinant. La plupart du temps, dans les virus recombinants, les séquences virales LTR nécessaires sont conservées mais les régions codant les protéines virales Gag, Pol et Rev sont déléetées permettant l'insertion d'un fragment d'environ 8 kb. Le tropisme naturel de ces virus peut être modifié mais la plupart du temps, il s'agit de pseudo-particules [Mulligan, 1993]. Leur utilisation présente l'avantage d'exprimer de manière stable et prolongé le transgène qui est inséré au niveau du génome de la cellule hôte. Cependant leur utilisation *in vivo* manque d'efficacité car les rétrovirus sont rapidement neutralisés par le système du complément lorsqu'ils sont injectés de manière systémique. Une particularité intéressante de ces vecteurs est l'absence presque complète de gènes viraux dans le génome transféré. L'expression est donc restreinte à la protéine d'intérêt ce qui limite la réponse immunitaire et augmente la persistance des cellules infectées. L'intégration du génome dans le chromosome de la cellule hôte permet

une expression maintenue du transgène. Cependant son caractère aléatoire dans le chromosome est accompagné de l'insertion de promoteurs viraux qui entraîne potentiellement l'activation ou la dérégulation de proto-oncogènes. Une autre limitation majeure est due à leur incapacité à infecter des cellules post-mitotiques.

- **Les lentivirus**

Ils possèdent un génome et un cycle de réplication beaucoup plus complexes que les oncorétrovirus classiques. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), lentivirus le plus étudié, présente une structure organisationnelle de base identique aux oncorétrovirus. Cependant il présente des gènes accessoires dont les produits jouent un rôle crucial dans le cycle réplcatif. Ainsi, par exemple, les protéines Tat et Rev sont essentielles pour une expression efficace des gènes viraux. Tat active le promoteur LTR du VIH et permet la production d'ARN viral. Rev assure quant à elle son transport du noyau cellulaire au cytoplasme. Ces vecteurs sont capables d'infecter à la fois des cellules quiescentes et des cellules en division. Cependant le mécanisme précis de cette propriété est encore inconnu mais il semble facilité par de nombreuses protéines virales notamment la protéine de matrice Gag et la protéine accessoire Vpr [Kondo, 1995]. De nombreux obstacles doivent être contournés pour le développement de vecteurs recombinants, notamment du fait que de nombreuses protéines virales sont nécessaires à la propagation du virus et que celles-ci sont souvent toxiques. D'importants efforts de recherche sont en cours afin d'améliorer les étapes de production pour obtenir des titres plus élevés sans générer de vecteurs compétents pour la réplication. Cette recherche repose essentiellement sur le développement de nouvelles lignées d'encapsidation exprimant de manière stable les protéines virales.

iii. **Les poxvirus ou virus de la vaccine**

Ce sont des virus enveloppés de forme ovoïde qui contiennent une molécule d'ADN double brins linéaire de 130 à 375 kbp ([Moss and Shisler, 2001]. Dans cette famille, le virus de la vaccine est très largement utilisé comme vecteur de transfert de gène [Guo and Bartlett, 2004]. Son cycle réplcatif va entièrement se dérouler dans le cytoplasme de la cellule hôte. Actuellement il est très utilisé dans le traitement des cancers comme virus oncolytiques ou comme vecteurs permettant l'expression de suppresseur de tumeurs. La

taille de son génome a pour avantage de permettre l'insertion de plusieurs gènes, mais de ce fait il est également difficilement manipulable. De plus le récepteur responsable de son attachement à la cellule hôte reste encore inconnu. Pour cette raison, il paraît difficile de modifier son tropisme même si [Galmiche et al., 1997] ont réussi à le rediriger vers la molécule Erb-2 (pour revue [Kirn and Thorne, 2009]). Ces virus possèdent un large tropisme pour les tumeurs et ne nécessitent pas un récepteur de surface particulier pour pénétrer dans la cellule hôte mais ils utilisent de nombreux signaux cellulaires de membrane [Moss, 2006] [Mercer and Helenius, 2008]). Leur génome n'est pas intégré au sein de la cellule hôte mais ils se répliquent de petites structures nucléaires au sein du cytoplasme appelée « *viral factories* ». Ils sont très efficaces pour se propager au niveau de tumeur distante lors d'une injection systémique.

iv. Le virus de l'herpès simple (HSV)

Les virus de l'herpès de type I et II sont capables d'infecter une grande variété d'organes avec un tropisme particulier *in vivo* pour les cellules du système nerveux [Lachmann and Efstathiou, 1999]. Ce sont des virus à ADN linéaire d'environ 150 kb codant 70 à 80 protéines différentes (**Figure 24**).

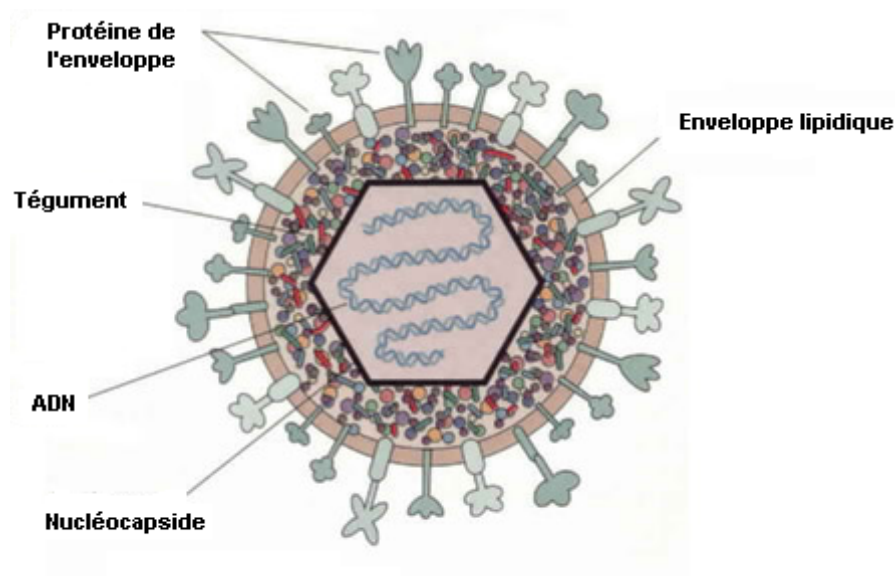


Figure 24 : Virion d'herpès simple virus. Il est composé de quatre principaux éléments : (i) un corps dense aux électrons comprenant; (ii) un ADN double brin; (iii) une capsidie icosaédrique et (iv) une enveloppe, source Elsevier 2002.

De manière spécifique, ils lient les héparanes sulfates cellulaires. Cette première interaction permet une liaison de forte affinité avec un second récepteur, membre de la famille du TNF ([Montgomery et al., 1996], s'ensuit alors une fusion des membranes virale et cellulaire qui aboutit au passage de la capsidie dans le cytoplasme. Dans certains neurones post-mitotiques, le virus peut entrer en phase de latence et persister sous forme épisomique pendant une dizaine d'années. Cette particularité fait de ces virus des outils de choix pour le traitement des maladies neurologiques (parkinson, ischémie ou autres...). Après l'infection de la cellule hôte, la protéine virale transactivatrice VP16 induit l'expression d'un grand nombre de gènes précoces qui sont eux même des régulateurs de l'expression des gènes entrant dans les processus de réplication virale et d'encapsidation. Une mutation de la protéine ICP4 entraîne une suppression de la capacité répliquative des HSV et de tels virus ont été utilisés *in vitro* et *in vivo* pour le transfert de gènes. Une autre approche va consister en l'utilisation d'amplicons (pour revue [Sena-Esteves et al., 2000]). Pour cela, un plasmide contenant le gène d'intérêt et uniquement l'origine de réplication du HSV ainsi que les séquences d'encapsidation sont co-transfectées avec un cosmide contenant le génome du HSV délété de ses séquences d'encapsidation. Le virus ainsi produit contient uniquement des séquences plasmidiques et n'induit donc pas de toxicité chez l'hôte. Le cosmide peut être remplacé au besoin par un virus auxiliaire apportant en trans les protéines nécessaires à l'élaboration du virus recombinant. La thérapie génique basée sur l'utilisation de tel virus déficient est en plein essor. En effet, ce système présente de nombreux avantages. Tout d'abord la capacité de clonage d'ADN hétérologue est supérieure à 50 kb, ensuite, l'HSV possède la capacité d'infecter des cellules quiescentes et de réguler de manière très fine l'expression des gènes thérapeutiques.

b. Méthodes non virales

Deux groupes de méthodes non virales de transfert de gène existent : les méthodes chimiques et les méthodes physiques. Parmi les méthodes physiques nous retrouvons notamment la micro-injection (introduction directe de l'ADN dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule), la technique dite de gène *gun* (utilisation de particule d'or ou de tungstène recouverte d'ADN), le champ électrique ou électroporation (déstabilisation locale de la membrane). Les méthodes dites chimiques vont quant à elles reposer sur l'utilisation de

vecteurs synthétiques qui vont permettre d'améliorer la pénétration de la molécule. Ces vecteurs sont composés de lipides ou de polymères synthétiques. Ainsi, les lipoplexes, ADN recouvert de lipides conduisant à la formation de liposomes, vont être de deux types : (i) anioniques ou neutres qui ne permettent pas un niveau d'expression important (ii) cationiques qui de part leur charge positive forment un complexe naturel avec l'ADN chargé négativement et permettent une interaction plus importante avec la membrane cellulaire [Zhdanov et al., 2002]. Cependant les lipoplexes ne présentent pas de ciblage cellulaire particulier d'où le développement de lipoploplexes ciblés auxquels a été ajouté un peptide de fixation à un récepteur spécifique [Scott et al., 2001]. Une seconde classe de vecteurs chimiques va être basée sur la formation d'un complexe entre l'ADN et des polymères, le plus utilisé étant le poly-éthylénimine (PEI). Celui-ci possède une capacité d'endosomolyse qui permet la libération de l'ADN dans le cytoplasme et son transfert au noyau. Souvent lors de l'utilisation en intra-veineuse, une couche de polymères hydrophiles est adjointe afin d'augmenter leur durée de vie et d'éviter les interactions non spécifiques. Le plus souvent, il s'agit du PEG (polyéthylène glycol).

Parallèlement à ces deux techniques, un transfert de gènes nus dans les tissus et organes sous forme plasmidique ou de fragment de PCR a également été utilisé [Nishitani et al., 2000].

4. Les adénovirus en thérapie génique

a. Méthodes de construction d'adénovirus recombinants

Les vecteurs adénoviraux recombinants sont obtenus par une ou plusieurs modifications de leur génome. Plusieurs méthodes ont été développées

i. Par ligation *in vitro*

Les premiers adénovirus recombinants ont été générés par ligation *in vitro* [Berkner and Sharp, 1983; Rosenfeld et al., 1991]. Cette méthode utilise le génome viral dans son ensemble et un plasmide contenant la partie gauche du génome adénoviral qui comprend l'ITR, la séquence d'encapsidation et la séquence *enhancer* d'E1A (0 à 1,3 unités de carte). Après insertion de la séquence du gène d'intérêt en aval de la séquence virale, le fragment digéré par *Clal* contenant la région gauche du génome et le gène d'intérêt est lié au génome

de l'Ad5 lui-même digéré par le site unique *ClaI*. Le produit de ligation obtenu est alors transfecté dans les cellules 293. Cependant cette méthode n'est pas très efficace et requière la purification des virus recombinants par plage de lyse car les virus sauvages ou ne contenant pas le transgène résultant d'une digestion incomplète ou d'une religation sont également produits. De plus, la région E1 n'est pas complètement éliminée ce qui limite considérablement la capacité d'insertion au sein du génome. Les sites uniques au sein du génome adénoviral sont rares et ne permettent pas une insertion à niveau précis d'où l'introduction de sites uniques aux endroits désirés [Gilardi et al., 1990] [Mizuguchi and Kay, 1998] [Mizuguchi and Kay, 1999] .

ii. Recombinaison homologue chez les mammifères

La découverte par Ruben en 1983 de forme circulaire de génomes adénoviraux dans les cellules infectées a permis le clonage de celui-ci sous forme plasmidique. Ces plasmides transfectés dans les cellules de mammifère se montrent infectieux [Ghosh-Choudhury et al., 1986] [Graham, 1984]. Ainsi une nouvelle méthode a été mise en place afin de cloner un gène au niveau de la région E1 [Graham et al., 1984]. Elle repose sur l'utilisation de deux plasmides : (i) un premier qui contient le gène d'intérêt entouré des séquences flanquant la région E1, l'ITR gauche et le signal d'encapsidation et (ii) un second contenant le génome entier de l'adénovirus délété pour la région E1 et de la séquence d'encapsidation sous forme circulaire [Bett et al., 1994]. Les plasmides sont transfectés dans les cellules 293, où la recombinaison a lieu entre les régions homologues. Des particules contenant le transgène sont alors générées et isolées par purification en plage de lyse. L'inconvénient majeur de ce système est la faible fréquence de recombinaison et le temps pris pour l'obtention des virus recombinants. Cette approche génère de plus un grand nombre de virus répliatifs ou RCA (*Replication-Competent Adenovirus*) (20 à 70 %) qui résultent d'une recombinaison avec la séquence E1 contenue dans le génome cellulaire. De nombreuses stratégies ont été développées afin de contourner ce problème. Ainsi, l'utilisation de vecteurs adénoviraux contenant un gène marqueur (GFP ou lac Z par exemple) permet une sélection des cellules contenant le virus recombinant [Davis et al., 1998]. Un effort particulier a également été fait quant à la génération de lignée d'encapsidation présentant une région E1 réduite à son minimum limitant ainsi les phénomènes de recombinaison [Imler et al., 1996]. Afin d'augmenter le taux de recombinaison permettant l'insertion du transgène des stratégies

basées sur l'utilisation du système Cre/lox ont été mises au point. Dans ce cas le génome adénoviral parental contient une séquence d'encapsidation flanquée de deux sites lox P. Sa co-transfection dans les lignées 293 exprimant de manière stable la recombinaise Cre, avec un plasmide contenant l'extrémité gauche du génome viral et le gène d'intérêt en aval duquel on retrouve un site lox P. Une première recombinaison délète la séquence d'encapsidation du génome parental et une seconde permet à ce génome de recombiner avec le plasmide grâce au site lox P en aval du gène d'intérêt [Hardy et al., 1997]. Cependant, la capacité de recombinaison par l'enzyme Cre n'est pas totale et des contaminants parentaux peuvent apparaître.

iii. Recombinaison homologue chez les bactéries

La recombinaison homologue chez *E. coli* a ensuite été exploitée pour la construction d'Ads recombinants [Chartier et al., 1996; He et al., 1998a]. Cette méthode tire à son avantage la haute performance d'une souche de bactéries en matière de recombinaison : les BJ5183 (recBCSbcBC). Comme pour la recombinaison dans les cellules de mammifères, cette méthode utilise deux plasmides (**Figure 25**) : (i) un plasmide contenant le génome de l'Ad entouré par deux sites de restriction pour l'enzyme *PacI*, le gène de résistance à l'ampicilline et une origine, et (ii) un plasmide dit navette qui contient la région gauche du génome incluant l'ITR gauche, le signal d'encapsidation et les séquences entourant la région E1 et le gène d'intérêt. Après linéarisation du plasmide génome par *PmeI*, la souche bactérienne BJ 5183 est co-transformée par les deux plasmides. La recombinaison a alors lieu entre les séquences chevauchantes et les clones sont isolés sur boîtes. De part leur génotype, les BJ 5183 ne permettent pas la production d'une grande quantité d'ADN, le plasmide obtenu sert pour transformer une souche bactérienne classique type DH10B. Une autre souche bactérienne (Top10F') a été utilisée avec succès pour générer des Ads recombinants [Renaut et al., 2002]. Son utilisation permet à la fois une bonne recombinaison et la production en quantité d'ADN plasmidique. Les clones sont alors testés par des techniques de biologie moléculaire classiques. Afin de produire les particules virales, le plasmide obtenu est digéré par *PacI* ce qui libère les ITR puis transfecté dans les cellules HEK-293. Contrairement aux autres méthodes de recombinaison homologues dans les cellules eucaryotes, la génération de RCA est extrêmement faible. [He et al., 1998a] ont décrit un système similaire dans lequel le plasmide navette contient en plus une partie de l'extrémité droite du génome viral le gène

de résistance à la kanamycine. Ce plasmide navette linéarisé est alors cotransfecté avec le plasmide génome circulaire dans les bactéries. L'évènement de recombinaison entre les extrémités du plasmide conduit à l'insertion du gène d'intérêt ainsi qu'à l'échange des parties plasmidiques dont la résistance à la kanamycine. Les génomes recombinants sont ainsi plus facilement sélectionnés (**Figure 25**).

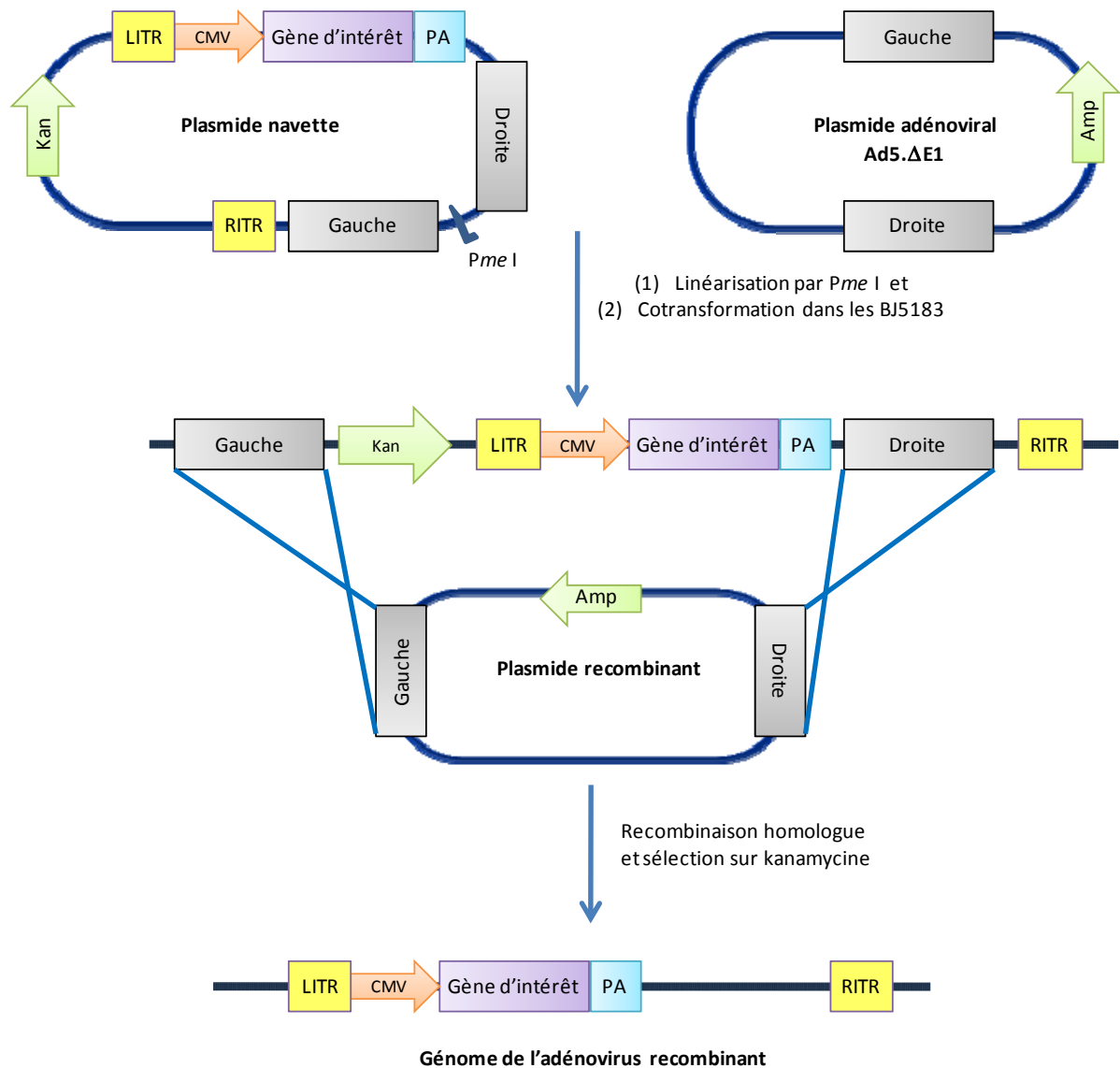


Figure 25 : Génération d'adénovirus recombinants par le système Adeasy™. Les plasmides navette et adénoviral sont transférés par électroporation dans les bactéries BJ5183 après linéarisation du plasmide navette par *Pme I*. Une recombinaison homologue entre les régions du bras gauche et du bras droit permet la génération d'un plasmide recombinant contenant la cassette d'expression du gène d'intérêt inséré à la place de la région E1 du génome adénoviral.

iv. Utilisation de la technique « gateway »

Cette nouvelle méthode de clonage largement développée dans le monde de la biologie moléculaire permet d'insérer un gène d'intérêt dans une batterie de vecteurs d'accueil dont des vecteurs adénoviraux. Cette technologie est commercialisée par la société Invitrogen sous le nom de Gateway™. Elle s'inspire du processus naturel d'intégration/excision du phage lambda dans le génome d'*E. coli* (Figure 26).

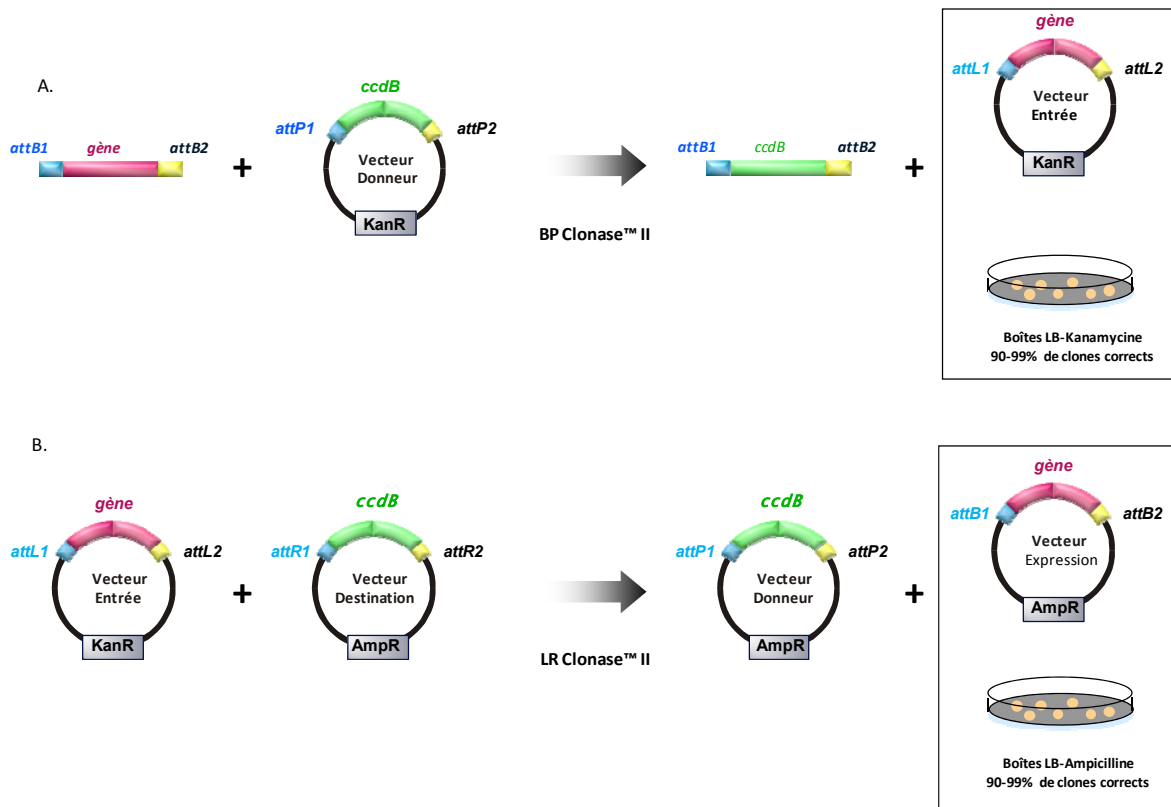


Figure 26 : La technologie Gateway® : A. Obtention du vecteur d'entrée B. Obtention du vecteur d'expression

Dans la bactérie, un site de recombinaison naturel att B est présent alors que dans le phage un site att P est retrouvé. Lors de l'infection de la bactérie par le phage, l'ADN du phage lambda recombine avec le génome de la bactérie au niveau de ces sites de recombinaison grâce à la présence d'une enzyme d'intégration spécifique. Cela conduit à l'introduction du génome du phage dans la bactérie. Une fois intégrés, les sites de recombinaison hybride prennent le nom d'att L et att R (pour droite et gauche). Cette réaction de recombinaison (LR/BP) est la base du clonage par la technologie Gateway™. La première étape du clonage consiste à obtenir l'ORF à cloner avec à chacune de ses extrémités deux sites de recombinaison att B : att B1 et att B2. Ces deux sites sont

légèrement différents l'un de l'autre ce qui permet d'assurer le processus de clonage directionnel. Cette opération est réalisée par une réaction de PCR utilisant un couple d'amorces dont les extrémités 5' sont constituées par les séquences att B1 et att B2. Lors de la deuxième étape, le produit de PCR doit être sous-cloné par recombinaison BP avec un vecteur donneur afin d'obtenir un plasmide dit d'entrée dans lequel l'ORF est flanqué de deux sites attL : att L1 et 2. La recombinaison est catalysée par la BP clonase II [™]. Enfin, ce plasmide (vecteur d'entrée) est co-incubé avec le vecteur de destination contenant le génome viral. Ce vecteur est muni des sites attR1 et attR2 recombinaison spécifiquement avec les sites att L1 et att L2. Un plasmide d'expression adénoviral est alors obtenu grâce à l'action de la LR Clonase [™] II. Lors de toutes ces étapes, la technique de sélection positive via l'utilisation du gène *ccdB* (*control of cell death B*) est utilisée [Bernard, 1996]. Seuls les clones présentant le gène d'intérêt seront capables de pousser du fait de l'inactivation du gène *ccdB*.

v. Autres méthodes

D'autres techniques ont été développées afin de produire des Ads recombinants : la recombinaison homologue dans la levure [Ketner et al., 1994], l'utilisation de la recombinaison induite par Cre-Lox (paragraphe D.4.a.ii), l'association d'une recombinaison chez la bactérie et dans les cellules de mammifères [Anderson et al., 2000], une basée sur l'utilisation de cosmide [Kojima et al., 1998], une basée sur l'utilisation de YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) [Ketner et al., 1994] (**Figure 27**).

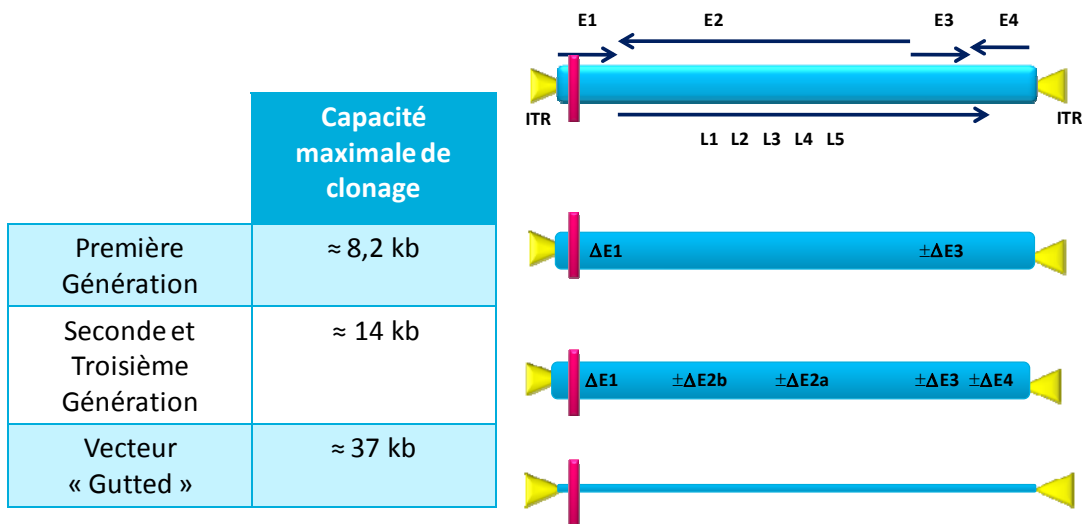


Figure 27 : Structure génomique des différentes générations de vecteurs adénoviraux. La localisation des unités de transcription précoces et tardives sont indiquées en haut sur le vecteur sauvage. Les régions ITR sont symbolisées par des triangles jaunes et la séquence d'encapsidation par un rectangle rose.

b. Vecteurs de première génération

Afin d'augmenter la sécurité biologique lors de l'administration d'adénovirus et d'étendre ainsi leur champ d'application thérapeutique, des vecteurs défectifs pour la réplication ont été générés par excision de la région E1. Cette région, localisée à l'extrémité gauche du génome code des protéines nécessaires à l'expression des autres gènes précoces et tardifs. Plusieurs types de délétions de cette région ont été réalisées avec une maximal de 3150 bp. Puisque les produits de la région E1 sont indispensables à la croissance virale, ils doivent être apportés en trans par des lignées cellulaires spécifiques telles que les 293 [Graham et al., 1977], les 911 [Fallaux et al., 1996] ou les PCR6 [Fallaux et al., 1998]. Nombreux de ces vecteurs de première génération ont été déléétés en plus d'une partie de la région E3. Cette délétion peut atteindre 3,1 kb. Cette région n'étant pas essentielle à la réplication virale, aucune complémentation n'est nécessaire. Néanmoins, pour certaines applications, il est intéressant de conserver cette région et même d'augmenter l'expression d'E3. En effet, par exemple, le produit gp 19K, responsable de la réduction de la réponse immune T cytotoxique contre le vecteur, pourrait améliorer la persistance du vecteur [Bruder et al., 1997]. Comme l'adénovirus peut encapsider approximativement 38 kb sans

que cela n'affecte son titre ni sa stabilité [Bett et al., 1993], des adénovirus délétés pour la région E1 peuvent accepter des insertions de plus de 5,1 kb alors que des adénovirus doublement délétés E1/E3 permettent le clonage de près de 8,2 kb. Cette première génération d'adénovirus permet l'obtention d'une réponse immune significative *in vivo*, principalement due à la synthèse de novo de protéines virales [Gilgenkrantz et al., 1995].

Bien que ces vecteurs soient largement utilisés comme véhicules de transfert de gène, des problèmes subsistent. Le premier survient lors de la production de tel vecteur dans les cellules 293. Celles-ci contiennent en effet, en plus de la région E1, les régions flanquantes présentent également dans le vecteur. Elles seraient responsables d'évènements de recombinaisons homologues qui donnent naissance à des virus compétents pour la réplication : les RCA (*Replicative Competent Adenovirus*) [Lochmuller et al., 1994]. D'autres lignées cellulaires ont donc été développées pour limiter ce phénomène en réduisant les parties flanquant la région E1 [Fallaux et al., 1998; Fallaux et al., 1996]. Un second problème survient lors de leur introduction chez l'hôte du fait de l'induction d'une forte réponse immunitaire T cytotoxique qui entraîne la destruction des cellules hôtes. Cette réponse serait de plus stimulée par l'observation d'une réplication faible même en l'absence de la région E1 [Yang et al., 1994] qui induit une expression des gènes tardifs *in vivo*. Cependant cette induction d'une forte réponse immunitaire peut être mise à profit lors de leur utilisation dans le cas de traitement de cancer ou pour une vaccination plus efficace. De plus, ces vecteurs de première génération ne permettent pas l'insertion de gènes de grande taille, de gènes multiples ou encore de gènes contrôlés par des promoteurs spécifiques.

c. Vecteurs de seconde génération

Deux nouvelles générations ont été construites avec pour but essentiel d'accroître la capacité d'accueil des vecteurs de première génération et de diminuer leur immunogénicité. La seconde génération d'adénovirus possède en plus d'une délétion des régions E1 et E3, une délétion d'une autre région essentielle à la réplication E2A ou E4. La production de ces virus a nécessité le développement de nouvelles lignées cellulaires. Ainsi, différentes lignées cellulaires ont été construites ; elles permettent l'expression de la protéine liant l'ADN E2a [Zhou et al., 1996], la protéine terminale E2b [Langer and Schaack, 1996] ou d'E4 [Wang et

al., 1995]. La délétion correspondante du genome, cumulée aux délétions de E1 et E3, permet une insertion d'environ 14 kb.

d. Vecteurs de troisième génération ou vecteur « gutted »

Ces vecteurs sont dépourvus de toutes les séquences virales codantes et ne conservent que les régions ITR et la séquence d'encapsidation [Kochanek, 1999]. De tels vecteurs peuvent incorporer des fragments d'ADN allant jusqu'à 37 kb. Leur production nécessite d'infecter les cellules d'une part avec le plasmide contenant le « mini-génome » viral et la cassette d'expression du transgène et d'autre part avec un virus auxiliaire (virus helper) qui apporte en trans les protéines nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules. La présence d'une mutation dans la séquence d'encapsidation du virus auxiliaire doit lui conférer un désavantage lors de l'assemblage des particules filles. La contamination par le virus auxiliaire reste malgré tout importante et la propagation de tel vecteur à des titres élevés reste difficile. Une amélioration significative a été apportée par l'utilisation du système cre-loxP, éliminant la séquence d'encapsidation du virus auxiliaire [Parks et al., 1996; Umana et al., 2001]. Une première étude clinique utilisant de tel adénovirus a récemment vu le jour dans le traitement de l'hémophile A.

e. Avantages et inconvénients des vecteurs adénoviraux

Le principal avantage quant à l'utilisation d'adénovirus est leur versatibilité. En effet, une fois construit un vecteur unique peut être utilisé pour l'expression de protéine en cellule humaine, l'étude des effets des produits des gènes en biologie cellulaire ou des études *in vivo* sur de nombreux tissus et de nombreuses espèces. La grande capacité des adénovirus permet l'expression de nombreux gènes. L'inconvénient majeur du système est la complexité de construction. Comme un adénovirus ne peut théoriquement pas s'intégrer dans les chromosomes de la cellule hôte, l'expression du transgène reste transitoire. *In vitro*, l'expression reste donc courte et pourrait limiter des études *in vivo* à moyen terme. Bien que les adénovirus aient été largement utilisés *in vivo* pour des études de fonction protéique, il réside toujours un problème par rapport à la réponse immunitaire de l'hôte. Une des principales conséquences de cette réponse immunitaire, est la limitation des études à long terme dans les animaux immunodéprimés.

E. Introduction du projet de recherche

Depuis plusieurs années, notre équipe s'est impliquée dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse en utilisant le modèle du cancer du col de l'utérus et d'HPV. L'introduction de ce mémoire a souligné le besoin de développer et d'améliorer les méthodes actuelles de traitements de ce type de cancer. Néanmoins, cette optimisation nécessite une bonne compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'infection par les papillomavirus humains. C'est dans ce contexte scientifique que s'est inscrit mon projet thèse qui comportait deux volets : (i) un premier plus fondamental qui consistait en l'étude fonctionnelle de mutants de l'oncoprotéine 16E6 et (ii) un second basé sur l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques des cellules transformées.

1. Etude fonctionnelle de l'oncoprotéine 16E6

Comme nous avons pu le voir, l'oncoprotéine E6 joue un rôle clé dans le développement des carcinomes du col utérin. Malgré sa petite taille, la structure d'E6 a résisté pendant une vingtaine d'année à toute analyse, du fait de la difficulté à produire cette protéine par voie recombinante sous forme repliée. En développant des approches d'optimisation de qualité de protéines dites « difficiles », notre équipe a finalement résolu et publié la structure RMN du domaine C-terminal de 16E6 [Nomine et al., 2006]. Plus récemment, un mutant de 16E6 défectueux pour la dégradation de p53, 16E6 F47R, a été isolé et caractérisé [Nomine et al., 2006; Ristriani et al., 2009]. Il est capable de rétablir un haut niveau protéique de p53 et déclenche la sénescence lorsqu'il est exprimé dans des cellules dérivées de tumeurs induites par HPV [Ristriani et al., 2009]. Dans le prolongement de cette percée scientifique, l'équipe a centré ses projets sur l'obtention de données structurales sur l'oncoprotéine entière seule ou complexée à un motif de liaison préférentiel. Ainsi, dans le but d'optimiser les conditions de purification de la protéine, de nombreuses études ont porté sur le phénomène d'auto-association de 16E6, mais également sur les zones d'interaction avec ses partenaires cellulaires, notamment l'ubiquitine ligase E6AP. Des mutants de l'interface de dimérisation ou de la surface potentielle de liaison à E6AP ont été

alors développés. Dans ce contexte, le but de mon projet était de connaître la relation entre auto-association de 16E6, liaison à E6AP et dégradation de p53, mais aussi le rôle joué par le complexe E6-E6AP-p53. Ces travaux font l'objet de la première partie des résultats.

2. Exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques

a. Immunisation intracellulaire

L'oncoprotéine E6 est capable, via l'interaction avec d'autres partenaires cellulaires, d'orienter la protéine suppresseur de tumeur p53 vers une voie de dégradation par le protéasome 26S. Dans les cellules tumorales du cancer du col de l'utérus, le gène codant la protéine p53 n'est pas muté. Plusieurs stratégies visant à neutraliser E6 ou les ARN messagers correspondants ont alors été proposées en vue d'augmenter le taux endogène de p53 pour induire un arrêt de la croissance ou la mort cellulaire (par exemple [Bousarghin et al., 2009; Butz et al., 2003]). Lors de mon projet de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement de fragments d'anticorps simple chaîne anti-16E6. En effet, au sein du laboratoire, des anticorps reconnaissant spécifiquement la partie N-terminale de 16E6 ont été développés [Giovane et al., 1999]. Ces anticorps sont capables d'inactiver *in vitro* la dégradation de p53 induite par 16E6. Suite au clonage et à l'expression de leurs domaines variables, nous avons obtenu plusieurs fragments d'anticorps simple chaîne (scFvs) ciblant 16E6 [Giovane et al., 1999; Sibler et al., 2005]. Dans ce contexte, mon travail a consisté en la caractérisation des effets induits suite à leur expression dans le contexte cellulaire. Ces travaux font l'objet du premier article.

b. Ciblage de vecteurs adénoviraux aux cellules transformées par HPV.

L'introduction de ce mémoire a également souligné la nécessité d'optimiser les vecteurs de transfert de gène afin d'améliorer l'efficacité et la spécificité des traitements anti-cancéreux de thérapie génique. En effet, le point commun de tous les vecteurs développés en vectorologie est leur manque de spécificité cellulaire ou leur tropisme naturel trop vaste empêchant un ciblage efficace des tissus cibles. Afin de sélectionner des ligands peptidiques permettant l'adressage et l'internalisation de molécules dans les cellules SiHa transformées par HPV16, l'approche phage-display a été utilisée au sein du laboratoire

[Robinson et al., 2005]. Une banque combinatoire de peptides cycliques fusionnés à la protéine majeure pVIII de la capside du bactériophage M13 a été utilisée. Après trois cycles de sélection sur les cellules SiHa, trois familles de peptides ont été individualisées (**Tableau 6**).

Les phages-peptides sélectionnés ciblent et ne sont internalisés que dans les cellules transformées par HPV 16 ou 18 (**Figure 28**). Ils sont donc un atout pour le développement de vecteurs de transfert de gène. Le but de mon travail fut alors de développer des adénovirus ciblant de manière préférentielle les cellules transformées par HPV en utilisant la spécificité de ces peptides. Dans un premier temps, des adénovirus pseudotypés ont été construits et testés. Leur caractérisation a fait l'objet du deuxième article. Parallèlement à ce travail, nous avons entrepris de développer un outil permettant un clonage rapide dans l'adénovirus. Cette méthode fait l'objet du troisième article.

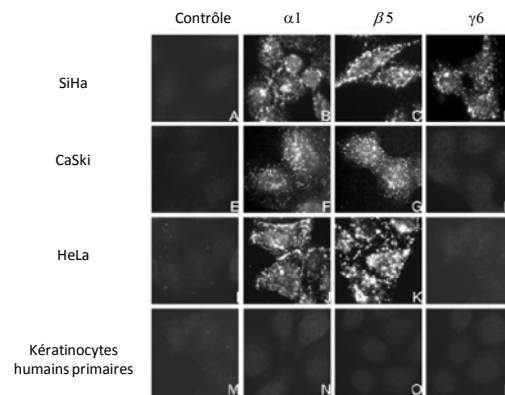
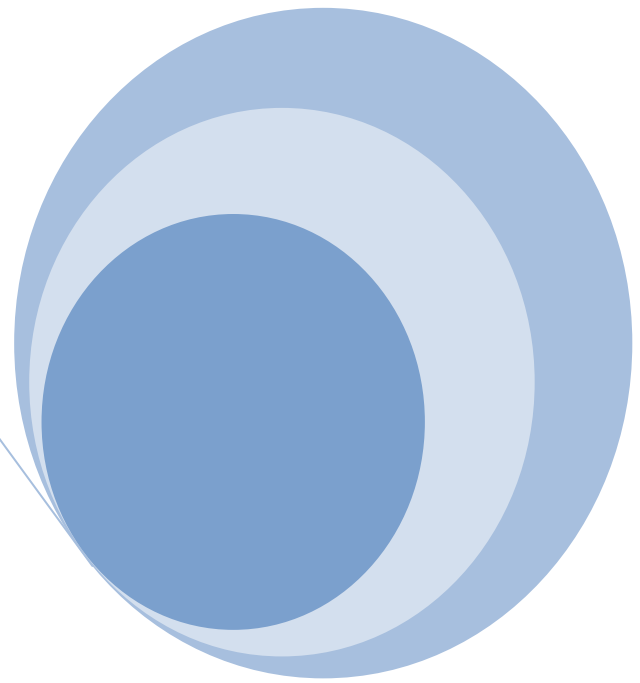


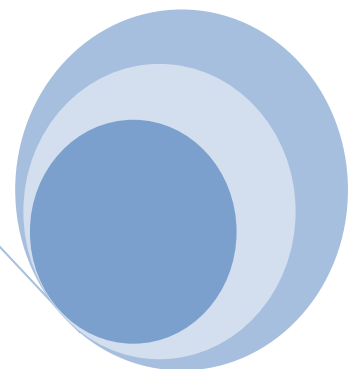
Figure 28 : Visualisation des phages-peptides internalisés et de leur localisation cellulaire par immunofluorescence. (d'après [Robinson et al., 2005]). Les cellules ont été incubées en présence de chloroquine (100 μ M) avec les phages-peptides sélectionnés contrôle, α 1, β 5 et γ 6 (1×10^{10} cfu/mL chacun) pendant 1 h à 4°C, puis lavées et incubées 2 h à 37°C. Les particules de phages ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-M13 et d'un anti-lapin TRITC. Grossissement x 400.

Famille	Clone	Séquence du peptide présenté	Fréquence
α	1	CRLTGGKGVGC	32
	2	CRRTNWQGAGC	6
	3	CQLTGTHGAGC	2
β	4	CADPNSVRAMC	4
	5	CADPNSVRAHC	4
γ	6	CAAHYRVGPWC	2

Tableau 6 : Séquences en acides aminés des peptides internalisants (d'après [Robinson et al., 2005]). Les peptides internalisants spécifiques des cellules transformées par HPV ont été sélectionnés par la technique de « phage display ». Après trois cycles de sélection-amplification sur des cellules SiHa, l'ADN de 50 clones a été purifié, séquencé et la composition en amino-acides a été déduite. La fréquence à laquelle chaque séquence a été retrouvée est indiquée dans la colonne de droite. Trois familles de peptides ont été définies suivant leur homologie de séquence. Les amino-acides identiques entre les peptides sont indiqués en **gras**.



Matériel et Méthodes



A. Matériel

1. Lignées cellulaires

NUMERO ATCC	NOM	ORGANISME D'ORIGINE	ORGANE	MALADIE	MORPHOLOGIE	PARTICULARITES
CRL-1573	293	<i>Homo sapiens</i>	rein		épithéliales adhérentes	transformées par l'ADN de l'Ad5 (segment allant du nucléotide 1 au 4344), expression des protéines E1A et B et d'une partie de la protéine pIX de l'Ad5
CRL-11268	293 T	<i>Homo sapiens</i>	rein		épithéliales adhérentes	contiennent l'antigène T de SV-40
[Von Seggern et al., 2000]	633	<i>Homo sapiens</i>	poumon	carcinome	épithéliales adhérentes, dérivées des cellules A549	transformées par l'Ad5, expression de la fibre de l'Ad5 et des régions E1
CRL-13002	GH 329	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	adénocarcinome	épithéliales adhérentes, dérivées des cellules HeLa	expression des régions E1A et B et d'une partie de la protéine pIX de l'Ad5, HPV18 positives
HTB-35	SiHa	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	carcinome	épithéliales adhérentes	HPV 16 positives (1 à 2 copies par cellule) p53 et pRB positive
CRL-1550	CaSki	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	carcinome Epidermoïde	épithéliales adhérentes	HPV 16 positives (environ 600 copies par cellule)
CL-2	HeLa	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	adénocarcinome	épithéliales adhérentes	HPV 18 positives, expression faible de p53, niveau d'expression normal de pRB
HTB-31	C33A	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	carcinome	épithéliales adhérentes	expression d'une protéine pRB de taille anormale et d'une protéine p53 mutée (R273C), négative pour l'ADN et l'ARN d'HPV
HTB-32	HT-3	<i>Homo sapiens</i>	col de l'utérus	carcinome	épithéliales adhérentes	expression de p53 et pRB
HTB-22D	MCF7	<i>Homo sapiens</i>	glande mammaire	adénocarcinome	épithéliales adhérentes	
CRL-5803	H1299	<i>Homo sapiens</i>	poumon	carcinome	épithéliales adhérentes	absence d'expression de la protéine p53
HTB-85	Saos-2	<i>Homo sapiens</i>	moelle	ostéocarcinome	épithéliales adhérentes	absence du gène codant p53
CCL-185	A549	<i>Homo sapiens</i>	poumon	carcinome	épithéliales adhérentes	
CRL-1651	Cos-7	<i>Cercopithecus aethiops</i>	rein		fibroblastes adhérentes	cellules transformées par SV-40

L'ensemble des caractéristiques des lignées cellulaires utilisées est présenté dans le tableau ci-dessus. Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Toutes les lignées cellulaires sont maintenues dans du milieu DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, Gibco®) complémenté avec 5 ou 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 50 µg/mL de gentamicine (Gibco®). Les cellules 633 sont cultivées dans du milieu MEM Zn²⁺ (milieu de Eagle modifié par Richter, Gibco®) complémenté avec 5 % ou 10 % SVF, 200 µg/mL d'hygromycine B (Invivogen) et 300 µg/mL de zéocine (Invivogen).

2. Plasmides

NOM	GENE DE RESISTANCE	PROMOTEUR	PARTICULARITES	Fournisseur
pcDNA3	ampicilline	CMV et T7	présence d'un multi-site de clonage (MCS)	Invitrogen
pTG3622	ampicilline		présence de la séquence du génome de l'Ad5 déléetée des régions E1 et E3	[Chartier et al., 1996]
pShuttle	kanamycine	CMV	présence d'un MCS et des séquences de recombinaisons homologues pour un clonage en remplacement de la région E1 dans le génome de l'Ad5	Clontech
pEGFP-C3	kanamycine	CMV	Présence d'un MCS en aval du gène codant l'EGFP-C3	Clontech
pAd5-CMV/TCS	ampicilline	CMV	présence du génome de l'Ad5 déléetée des régions E1 et d'un MCS en remplacement de la région E3 de l'Ad5	[Mailly et al., 2008]
pDV 137	ampicilline	CMV	plasmide permettant l'expression des fibres sauvages ou modifiées des adénovirus	[Nicklin et al., 2001]
pXJ 40	ampicilline	CMV et T7	plasmide d'expression et de clonage pour les différents mutants de16E6	
pcDNA ₃ -p53	ampicilline	CMV	plasmide d'expression eucaryote pour la protéine p53	
pAd5-EGFP pAd5-TK pAd5-TKEGFP pAd5-C6SF47RΔPDZ	ampicilline	CMV	plasmides contenant le génome de l'Ad5 déléetée de la région E1 et dont la région E3 est remplacée par l'un des transgènes	[Mailly et al., 2008]
pMBP-peptide E6AP	ampicilline	T7	plasmide permettant l'expression du peptide E6AP (LXXLL)	
pMBP-E6AP	ampicilline	T7	plasmide permettant l'expression dans les bactéries de la protéine E6AP entière	
pLeft/Right/TCS	ampicilline	CMV	présence des régions de recombinaisons homologues pour un clonage en remplacement de la région E3 dans le génome de l'Ad5	[Mailly et al., 2008]
pMP-TK	ampicilline	CMV	présence du gène permettant l'expression de la thymidine kinase de l'herpès simplex virus de type I (HSV-I)	

3. Adénovirus

	Nom	Modification des régions		Type de fibre
		E1	E3	
Adénovirus génétiquement modifiés	Ad5-GFP	délétée	EGFP-C3	sauvage
	Ad5-TK	délétée	TK-HSV-I	sauvage
	Ad5TK-EGFP	délétée	Fusion TK-EGFP	sauvage
	Ad5-6C6SF47R Δ PDZ	délétée	6C6SF47R- Δ PDZ	sauvage
	Ad5-1F4	délétée	scFv 1F4	sauvage
	Ad5-1F4-P41L	délétée	scFv 1F4-P41L	sauvage
	Ad5-1F4-L177P	délétée	scFv 1F4-L177P	sauvage
	Ad5-GFP Δ F/F	GFP	délété	délété pour le gène de la fibre
Adénovirus pseudotypés obtenus grâce au système de transfection-transduction mis au point par [Von Seggern et al., 2000]	Ad5-GFP-KO1	GFP	délété	fibre exprimée portant la mutation KO1
	Ad5-GFP- α 1	GFP	délété	fibre exprimée portant la mutation KO1 et le peptide α 1
	Ad5-GFP- β 4	GFP	délété	fibre exprimée portant la mutation KO1 et le peptide β 4
	Ad5-GFP- γ 6	GFP	délété	fibre exprimée portant la mutation KO1 et le peptide γ 6
	Ad5-GFP- <i>fiberless</i>	GFP	délété	dépourvu de fibre

4. Souches Bactériennes

Les souches bactériennes sont cultivées en milieu de culture Luria-Bertani (LB ; 10 g/L bactotryptone ; 5 g/L extrait de levure; 5 g/L NaCl) contenant ou non du bactoagar (15 g/L). Selon les cas, la sélection des clones est effectuée en présence d'ampicilline (100 μ g/mL) ou de kanamycine (50 μ g/mL).

5. Anticorps

TYPE	ANIMAL D'ORIGINE	SOURCE	UTILISATION	DILUTION
Anti-GFP	monoclonal de souris	Roche	<i>western blot</i>	1/1000 ^{ème}
Anti-TK	polyclonal de lapin	WC. Summers, Université de Yale	<i>western blot</i> immunofluorescence	1/300 ^{ème} 1/1300 ^{ème}
Anti-Flag		Sigma	<i>western blot</i> immunofluorescence	1/2000 ^{ème} 1/1000 ^{ème}
Anti-16E6 (6F4)	monoclonal de souris	ESBS-IGBMC	<i>western Blot</i> immunofluorescence	1/500 ^{ème} 1/1000 ^{ème}
Anti-lapin alexa 568	polyclonal de chèvre	Molecular Probes	immunofluorescence	1/1000 ^{ème}
Anti-lapin alexa 488	polyclonal de chèvre	Molecular probes	immunofluorescence	1/1000 ^{ème}
Anti-penton (708)	polyclonal de lapin	D. Von Seggern	<i>western Blot</i>	1/500 ^{ème}
Anti-hexon	monoclonal de souris	Abcam	<i>western Blot</i>	1/500 ^{ème}
Anti-B10	monoclonal de souris	IGBMC	<i>western Blot</i>	1/4000 ^{ème}
Anti-18E6	monoclonal de souris		<i>western Blot</i>	
Anti-Actine	polyclonal de lapin	Santa Cruz	<i>western Blot</i>	1/2000 ^{ème}
Anti-p53 (p1801 et FL393)	monoclonal de souris polyclonal de souris	Santa Cruz	<i>western Blot</i> immunofluorescence	1/1000 ^{ème} 1/500 ^{ème}
Anti-fibre (4D2)	monoclonal de souris	Abcam	<i>western Blot</i>	1/700 ^{ème}

B. Méthodes

1. Manipulation des acides nucléiques et clonage

a. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume final de 50 µL contenant environ 50 ng d'ADN matrice, 300 nM de chaque amorce, 5 µL de tampon de PCR 10X fourni, 200 µM de chaque dNTP (désoxyribonucleotide triphosphate) et 2,6 unités d'ADN polymérase. Dans le cas de PCR recombinantes, le kit « *Expand High Fidelity PCR system* » (Roche) est utilisé. En revanche pour l'amplification des ADN issus de colonies ou pour les tests de plasmides, le kit « *RedTaq® DNA polymerase* » (Sigma-Aldrich) est employé. Les cycles d'amplification (une phase de dénaturation 92°C - 1 min, une phase d'hybridation température variable en fonction de la température de fusion des amorces - 30 secondes et d'une phase d'élongation 72°C - temps variable en fonction de la longueur du fragment à amplifier) sont réalisés dans

un appareil *iCycler* (Biorad). La réaction de PCR est complétée par un cycle d'élongation (72°C - 10 min).

b. Electrophorèse sur gel d'agarose et purification d'ADN

Après PCR ou digestion par des enzymes de restriction, les fragments d'ADN de moins de 10 kb sont déposés sur un gel d'agarose (pourcentage variable en fonction de leur taille) contenant du bromure d'éthidium (BET, 1 µg/mL). La migration des échantillons dilués dans du tampon de dépôt 5X (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 50 % glycérol ; 0,1 M EDTA ; 0,1 % bleu de bromophénol ou xylène cyanol) est réalisée dans du tampon TBE (40 mM Tris-HCl ; 5 mM acide borique 1mM EDTA) à 80 V. Une estimation de la taille des fragments d'ADN est effectuée à l'aide du marqueur de taille « *DNA SmartLadder* » (Eurogentec). Les bandes d'ADN visualisées sous lampe ultraviolet sont ensuite au besoin purifiées par absorption sur colonne de silice (*GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit*, GE Healthcare). Pour les fragments d'ADN d'une taille supérieure à 10 kb, après une extraction par phénol-chloroforme ou une inactivation des enzymes comme indiquée par le fournisseur, la purification est réalisée par précipitation en utilisant deux volumes d'éthanol absolu froid et 150 mM NaCl.

c. Digestion enzymatique et ligation

Toutes les digestions d'ADN sont réalisées avec les endonucléases de restriction de chez *New England Biolabs®*, dans les conditions indiquées par le fournisseur en utilisant 5 unités d'enzyme pour digérer 1 µg d'ADN. Les ligations sont effectuées grâce à l'ADN ligase du bactériophage *T4* (*New England Biolabs®*) dans le tampon fourni. Après une incubation sur la nuit à 16°C, en respectant un rapport molaire vecteur/insert de 1/3, les produits de ligation sont dialysés 20 min à température ambiante, contre de l'eau milli-Q (*Millipore™*). Une fraction de la ligation correspondant à 100 ng de vecteur recombinant est alors utilisée pour la transformation de 2×10^9 bactéries électrocompétentes.

d. Transformation de bactéries compétentes

La préparation de bactéries électrocompétentes est réalisée à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance dont la densité optique à 600 nm est de 0,5 (soit 1×10^8 bactéries/mL). Après trois lavages successifs à l'eau bidistillée stérile et à 4°C, les bactéries sont concentrées quatre cents fois dans du glycérol 10 % et stockées à -80°C. 50 µL de bactéries électrocompétentes (soit environ 2×10^9 bactéries) sont transformées par 100 ng de vecteur recombinant grâce à la perméabilisation transitoire de la membrane induite par un choc électrique (capacitance 25 µF, résistance 200 Ω, différence de potentiel 2,5 kV, constante de temps entre 4 et 5 ms). Après re-suspension dans 1 mL de LB sans antibiotique et incubation d'une heure à 37°C sous agitation, des dilutions de la suspension bactérienne sont étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB-Agar supplémenté ou non en antibiotique de sélection. L'apparition de colonies individualisées est obtenue par une incubation à 37°C d'environ 16 h.

e. Extraction et purification des ADN plasmidiques

Les clones obtenus après transformation, sont repris dans 4 mL de LB contenant l'antibiotique approprié et laissés sous agitation à 37°C pendant 16 h. L'ADN plasmidique est obtenu par lyse alcaline. Brièvement le culot bactérien de la culture saturée est repris dans 300 µL de tampon TENS (10 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 1 mM EDTA ; 0,1 M NaOH ; 0,5 % SDS). Afin de précipiter les protéines, 150 µL d'acétate de sodium (3M pH 5) sont additionnés au lysat. Après mélange par retournements successifs, l'ensemble est centrifugé à 6 000 g pendant 10 min à 4°C. Le matériel génétique contenu dans le surnageant est alors précipité par l'ajout de deux volumes d'éthanol absolu froid. Après lavage des culots à l'aide d'éthanol à 70 %, l'ADN plasmidique est repris dans 50 µL d'une solution de TE (10 mM Tris HCl pH 7,9 ; 1 mM EDTA) contenant 50 µg/mL de RNase. Les plasmides ainsi extraits sont ensuite analysés par des digestions par des enzymes de restriction convenablement choisies ou servent de matrice pour une PCR test. Une fois le plasmide attendu obtenu, des quantités plus importantes de celui-ci sont préparées en utilisant le kit « *QIAfilter Plasmid Midi Kit* » (Qiagen) ou en réalisant des maxi-préparations classiques par purification sur gradient de chlorure de césium.

f. Séquençage

Après l'obtention des différentes constructions, un séquençage des inserts est réalisé afin de s'assurer de l'intégrité des séquences. Celui-ci est effectué en présence de 2 pmol d'amorce et de 500 ng de plasmide via la plateforme de l'IBMP ou de l'IGBMC.

2. Manipulation des protéines.

a. Transfection de cellules eucaryotes

Les transfections des cellules eucaryotes sont réalisées à l'aide de jetPEI™ (Polyplus transfection) en suivant les recommandations du fournisseur.

b. Test de survie cellulaire ou test MTT

Une solution de MTT de 0,5 mg/mL (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) est ajoutée aux cellules en culture. Après deux heures d'incubation, les cristaux de formazan formés sont solubilisés par addition d'une solution stop (40 mM HCl ; 64 % isopropanol; 32 % butan-2-ol). La densité optique est alors mesurée à 595 nm.

c. Migration sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western Blot

L'analyse d'un échantillon de protéine est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécylsulfate). Les protéines sont tout d'abord dénaturées par incubation avec un tampon dénaturant 4X (250 mM Tris HCl pH 6,8 ; 4 % SDS ; 40 % glycérol ; 0,35 M β -mercaptoéthanol) et par chauffage à 100°C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées sur gel, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon T (50 mM Tris-HCl pH 9,5 ; 125 g/L glycine) avec un appareil semi-sec (Trans-Blot, Biorad) pendant une heure à courant constant (220 mA). Après saturation de la membrane avec une solution de TBS (*Tris-Buffered Saline* 50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl) contenant 5 % de lait écrémé, les protéines sont révélées par une incubation d'une heure à température ambiante ou d'une nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire dilué dans une solution de TBS contenant 0,1 % NP40 et 5 % lait puis par

une incubation identique avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (*Horseradish peroxidase*). L'addition d'une solution d'ECL plus® (*Chemiluminescence detection kit*, Amersham Biotech) permet alors de visualiser le signal émis qui est capturé sur film radiographique. L'efficacité du transfert est vérifiée par révélation des protéines au rouge ponceau (0,5 % rouge ponceau ; 1 % acide acétique).

d. Préparation de protéines fusionnées à la GST

Les bactéries *E.coli* BL21 sont transformées par les plasmides contenant les cassettes d'expression des protéines fusionnées à la GST (Glutathion S-Transferase). Une culture de 25 mL est alors réalisée à partir d'une colonie. Le culot cellulaire repris dans 1,5 mL de tampon LSAB (100 mM Tris-HCl pH 8 ; 100 mM NaCl ; 1 % NP40 ; 2 mM DTT, cocktail d'inhibiteur de protéase « *Complete™* » (Roche applied Science) additionné de 0,03 % SDS est soniqué quatre fois 10 secondes avec 30 secondes entre chaque sonication à une constante de 10 %. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 min à 4°C, le surnageant est mis au contact de la résine de glutathion pré-équilibrée dans du tampon LSAB.

e. Synthèse *in vitro* de protéines

La synthèse *in vitro* de protéines est réalisée à 30°C pendant 2 h en utilisant le kit *TnT® Quick coupled transcription/translation system* (Promega), en présence de méthionine ³⁵S (*Easytag™*, Perkin Elmer®).

f. Dégradation *in vitro* de p53

L'étude de la dégradation de p53 par E6 est réalisée en incubant 5 µL et 2 µL des produits de traduction de E6 et p53 respectivement, dans un tampon contenant 25 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM NaCl ; 2 mM DTT. Après 2 h d'incubation à 28°C, la réaction est stoppée par l'addition de tampon de charge contenant à la place du β-mercapéthanol, 300 mM de DTT (paragraphe B.2.c) et analysée sur gel SDS-PAGE 12 %.

g. Test de liaison *in vitro* à E6-AP ou E6-AP peptide (*GST-Pull down*)

Les protéines E6AP-GST, peptide-GST ou peptide variable-GST immobilisées sur des billes de glutathion sont resuspendues dans 290 µL de tampon de liaison (100 mM Tris-HCl pH 8 ; 100 mM NaCl ; 2 mM DTT ; 1 % NP40) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéase « *Complete™* » (Roche applied Science). 10 µL des protéines E6 traduites et marquées *in vitro* au ³⁵S sont alors additionnées. La réaction de liaison est effectuée à 4°C pendant 4 h. Après trois lavages avec 1,5 mL de tampon de liaison, les billes sont reprises dans du tampon dénaturant 4X contenant 300 mM de DTT frais, puis révélées sur un gel SDS-PAGE 15 % après autoradiographie. Un contrôle correspondant à 10 % de l'*input* est également déposé.

h. Visualisation indirecte des protéines par immunofluorescence

Quarante huit heures après transfection, les cellules sont lavées au PBS (*Phosphate Buffered Saline* : 1 mM KH₂PO₄ ; 3 mM Na₂HPO₄, 2H₂O ; 150 mM NaCl pH 7,4) puis fixées 20 min à température ambiante à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4 %. Les cellules sont incubées pendant 10 min avec une solution de PBS-Triton 0,01 % rendant la membrane cellulaire perméable. Elles sont alors mises en présence d'anticorps primaire contre la protéine d'intérêt dilué dans du milieu de culture supplémenté avec 10 % SVF pendant une heure. Après trois lavages au PBS, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est appliqué pendant une heure à température ambiante dilué dans du milieu de culture supplémenté avec 10 % SVF dans l'obscurité. Les cellules sont alors lavées au PBS et incubées avec une solution de DAPI (4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole) (0,1 µg/mL) pendant 5 min. Après montage à l'aide de Fluoromount G (Southern Biotech), elles sont observées à l'aide d'un objectif à immersion en microscopie à fluorescence (Axioplan, Zeiss).

3. Production virale et amplification

a. Production d'adénovirus pseudotypés.

La production d'adénovirus pseudotypés suit le protocole mis en place par [Jakubczak et al., 2001]. Brièvement, pour la production d'un virus, le plasmide contenant la cassette d'expression de la fibre modifiée est transfecté l'aide de jetPEI™ (Polyplus transfection) en

suivant les recommandations du fournisseur dans cinq boîtes de 15 cm de diamètre cotées à l'aide de 0,1 mg/mL de polylysine de cellules 293 T. Vingt quatre heures après transfection, le milieu de culture est alors changé et les cellules transfectées sont mises au contact d'un mélange infectieux composé de milieu DMEM supplémenté avec 5 % de SVF et d'Ad5.GFP. Δ F/F⁻ à une MOI (*Multiplicity Of Infection*) virale de 350. Quarante huit heures après transfection, un effet cytopathique est observé. Les cellules sont alors récoltées puis lysées par choc thermique (congélation dans l'azote liquide-décongélation au bain-marie à 37°C). Les virions sont ensuite purifiés sur gradient de chlorure de césium (paragraphe B.3.c et **Figure 29**).

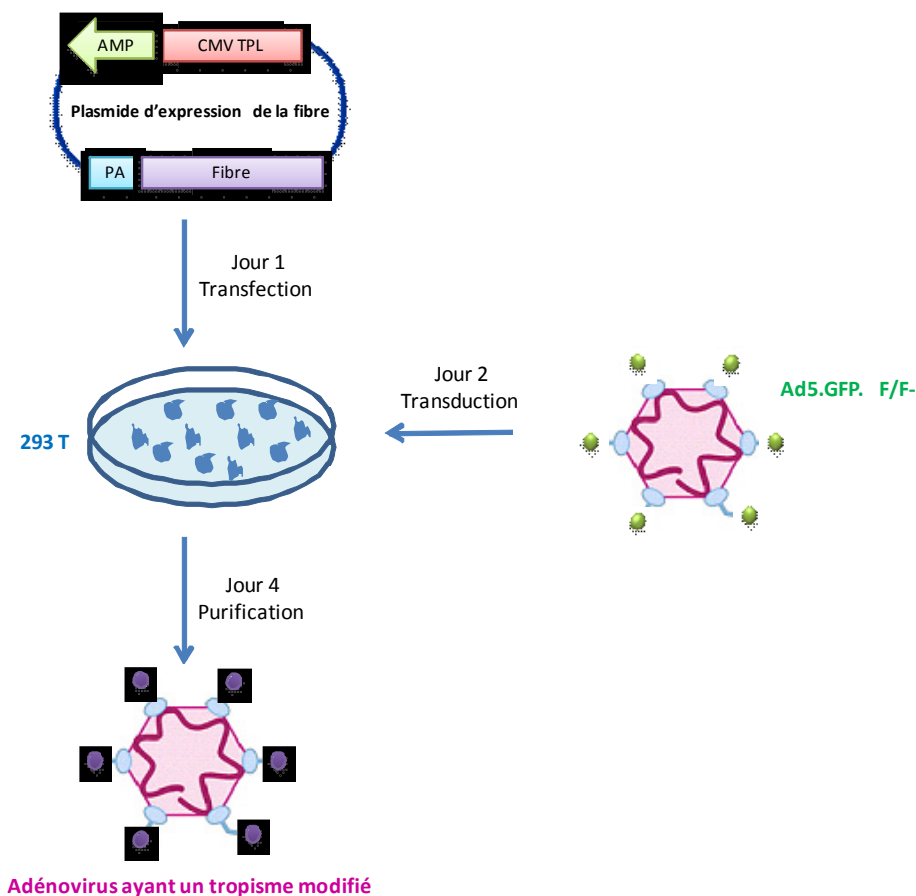


Figure 29 : Système de transfection/transduction permettant la production d'adénovirus pseudotypés, d'après [Jakubczak et al., 2001]. La lignée d'encapsidation 293T est transfectée à l'aide des plasmides contenant les gènes codant les fibres modifiées. Celles-ci sont ensuite transduites à l'aide de l'adénovirus Ad5. Δ F.F⁻ délété du gène codant la fibre. Les particules virales produites présentent un nouveau tropisme cellulaire qui dépend uniquement de la fibre incorporée à la surface de la capside. CMV : Promoteur CytoMégaloVirus, TPL : *TriPartite Leader*, Amp : Gène de résistance à l'ampicilline, PA : site de PolyAdénylation de SV-40

b. Production d'adénovirus recombinants.

La production d'adénovirus délétés pour la région E1 nécessite l'utilisation de cellules complémentant cette unité : les HEK-293 [Graham et al., 1977]. Ces cellules ont intégré dans leur chromosome 19, l'extrémité 5' du génome adénoviral de l'Ad5 ce qui les rend permissives pour les virus délétés de la région E1. Néanmoins, pour la production de virus exprimant une fibre modifiée ne permettant pas l'infection de cellules HEK-293, les étapes d'amplification sont réalisées soit (i) dans les 633 transcomplémentant E1 et la fibre sauvage qui permettent de produire tous virus présentant un nouveau tropisme, (ii) soit dans les GH329, transcomplémentant E1 et présentant à leur surface les molécules de surface nécessaires à l'infection par des virus présentant des fibres ciblant préférentiellement les cellules transformées par HPV. Les plasmides contenant soit les génomes modifiés, soit les génomes sauvages sont, linéarisés par l'enzyme *Pac I* puis transfectés à l'aide de jetPEI™ (Polyplus transfection) selon les cas, dans les cellules 633, GH329 ou HEK-293 en suivant les instructions du fournisseur. Une semaine après transfection, les cellules sont récoltées puis lysées par quatre cycles de choc thermique (congélation dans l'azote liquide-décongélation au bain-marie à 37°C). Les surnageants obtenus sont alors utilisés pour les passages d'amplification suivants en augmentant progressivement le nombre de cellules infectées. L'étape de production finale est dans tous les cas réalisée dans les HEK-293 en infectant en général une dizaine de boîtes d'un diamètre de 15 cm. Classiquement, les cellules sont infectées pendant 2 h par les surnageants précédents, puis récoltées après observation d'un effet cytopathique dans les 48 h.

c. Purification des virus et titration

Après production, les cellules récoltées sont reprises dans 5 mL de PBS puis lysées par choc thermique comme précédemment (paragraphe B.3.b). Le lysat cellulaire est alors centrifugé 10 min à 1 600 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu est déposé sur un gradient de chlorure de césium de densité 1,25 et 1,4 puis ultracentrifugé pendant 2 h à 25 000 tours par min à 18°C dans un rotor de type SW41 (Beckman Coulter). La bande correspondant à l'adénovirus est récupérée à l'interface des deux densités de chlorure de césium puis est déposée sur chlorure de césium de densité 1,34 et

ultracentrifugé pendant 18 h à 18°C à 35000 tours par min dans un rotor de type SW60 (Beckman Coulter). Les particules virales sont ensuite récupérées à l'aide d'une seringue et soit reprises dans du glycérol 40 %, soit dialysées contre un tampon de conservation (10 % glycérol ; 10 mM Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl ; 10 mM MgCl₂). Après une incubation à 56°C de 20 min en présence de SDS à 0,1 % d'une aliquote de virus, le nombre de particules physiques par mL est déterminé par le dosage de l'ADN viral à 260 nm. Le nombre de particules physiques est calculé en utilisant la formule suivante : 1unité de $DO_{260} = 1,1 \times 10^{12}$ particules virales/mL.

d. Préparation d'ADN viral à partir de particules

Afin de vérifier le génome des adénovirus produits, l'ADN des particules est extrait. Une adaptation du protocole mis en place par [Deryckere and Burgert, 1997], permet d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour effectuer par exemple un séquençage ou une digestion par des enzymes de restriction. Pour cela, 20 µL d'adénovirus pur sont mis au contact de protéinase K à raison de 0,5 mg/mL, pendant une heure à 55°C, dans du tampon composé de 100 mM de Tris HCl pH7,4 ; 150 mM NaCl ; 12,5 mM EDTA et 1 % SDS. Après deux extractions au phénol-chloroforme, l'ADN viral est précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu froid et de 150 mM NaCl. Le culot obtenu est alors lavé à l'éthanol 70 % et repris dans du TE (1mM Tris pH 7,9 ; 50 mM EDTA) avant analyse.

4. Manipulation des adénovirus

a. Conjugaison de fluorophores à la capsid virale

La conjugaison de fluorochromes à la capsid virale peut être de deux types : (i) une conjugaison au 5(6) FAM (5(6)-Carboxyfluorescein-Invitrogen) ou (ii) au Cy-3 (Invitrogen). Dans les deux cas, les adénovirus sont préalablement dialysés sur la nuit à 4°C contre un tampon bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,3 pour le 5(6) FAM et contre un tampon carbonate de sodium 0,1 M pH 9,3 pour le Cy-3. Les adénovirus sont ensuite incubés en présence de 40 µg/mL de 5(6) FAM (solution stock préparée à 10 mg/mL dans du DMSO) ou dans un rapport 1/9 avec du Cy-3 pendant 30 minutes à température ambiante. Afin d'éliminer, le fluorochrome en excès non fixé, les adénovirus marqués sont dialysés sur la

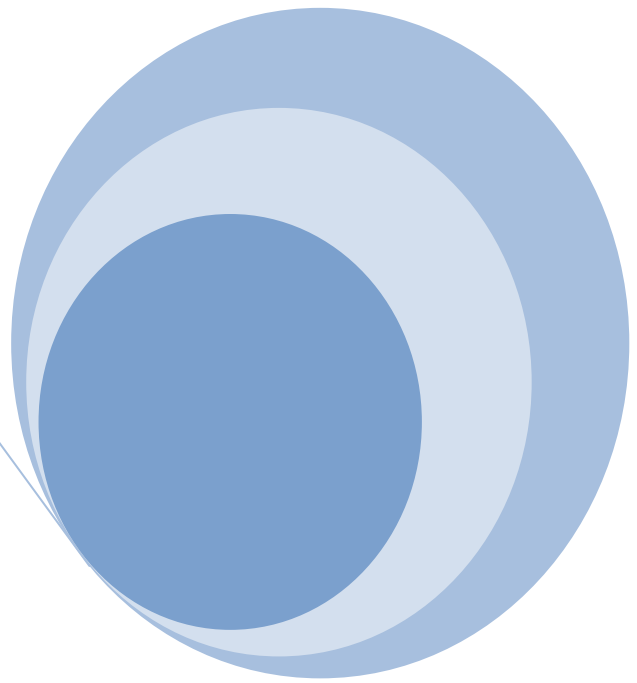
nuit à 4°C contre le tampon de conservation (paragraphe B.3.c). Une vérification de la conjugaison est effectuée par dénaturation des protéines, dépôt sur gel SDS-PAGE et révélation au fluoroimager (*Typhoon*[®] IGBMC) (adaptation de [Leopold et al., 1998; Miyazawa et al., 2001])

b. Test de trimérisation de la fibre et évaluation du pourcentage d'intégration

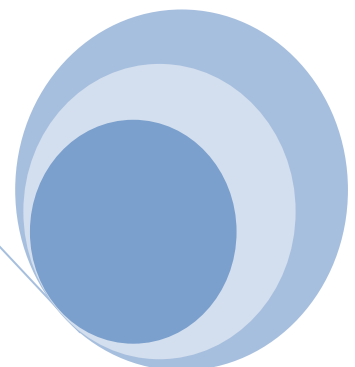
La trimérisation et l'expression de la fibre sont évaluées par une analyse par SDS-PAGE en condition dénaturante ou non suivie d'un western blot. 5×10^9 particules virales sont diluées dans du tampon dénaturant ou non (250 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 40 % glycérol ; 0,2 % bleu de bromophénol; 1 % ou 0,1 % SDS ; 0,35 M β -mercapto-éthanol) puis chauffées ou non à 100°C pendant 20 min. L'évaluation du pourcentage d'intégration de la fibre est effectuée en quantifiant à l'aide du logiciel *Quantity One*[®] (*Biorad*), les bandes obtenues en western blot pour la fibre et le penton et en effectuant le rapport fibre sur penton.

c. Internalisation et fixation des virus fluorescents.

5×10^4 cellules sontensemencées dans des *LabTek Chamber Slide*[™] (*Nunc*) 8 puits. Pour les essais de fixation, après 24 heures, les cellules sont incubées à 4°C avec 2×10^5 adénovirus marqués au 5 (6) FAM ou au Cy-3 dans du milieu DMEM dépourvu de sérum. Elles sont ensuite lavées ou non avec de la trypsine 0,025 % puis fixées avec 4 % paraformaldéhyde 15 min à température ambiante. Après marquage de l'ADN à l'aide d'une solution de DAPI, les lames sont montées en présence de Fluoromount-G (*Southern Biotech*) et observées au microscope confocal SP2-MP *Leica* (IGBMC) ou en microscopie par fluorescence (*Axioplan*, *Zeiss*). Pour étudier l'internalisation des virus, après l'incubation à 4°C, une période dite de « chasse » est effectuée pendant 15 ou 60 min à 37°C. Les cellules sont ensuite traitées de la même manière que précédemment. Les membranes cellulaires sont marquées à l'aide de phalloïdin-TRITC (*Sigma-Aldrich*).



Résultats



A. Etude fonctionnelle de l'oncoprotéine 16E6.

L'oncoprotéine E6, malgré sa petite taille, induit de nombreux changements au sein de la cellule hôte. Protéine multifonctionnelle majeure des HPV de haut risque, elle suscite un grand intérêt en matière de recherche du fait des applications thérapeutiques qui pourraient en découler.

1. Contexte scientifique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'oncoprotéine 16E6 a résisté pendant de nombreuses années à toute analyse structurale. Depuis 1995, notre équipe a travaillé sur ce problème et a résolu et publié la structure RMN de sa moitié C-terminale [Nomine et al., 2006]. Actuellement, ces données constituent encore les seules disponibles. Parallèlement, au sein du laboratoire, l'étude de différentes protéines E6 issues de différents types d'HPV a montré que l'auto-association de la protéine empêche toute concentration des échantillons à plus de 50 μM . Or pour une étude structurale, il est nécessaire d'obtenir d'excellents échantillons marqués (^{15}N et ^{13}C) suffisamment concentrés (de l'ordre de 300 μM) [Zanier et al en préparation]. Récemment, des échantillons solubles du domaine N-terminal de 16E6, dont la structure reste encore inconnue, ont été obtenus. Les biologistes structuraux de l'équipe ont ainsi montré que ce domaine dimérise avec une affinité (KD) estimée à 25 μM , valeur en adéquation avec les résultats publiés précédemment [Lipari et al., 2001]. En mesurant par RMN, le spectre du domaine N-terminal de la protéine 16E6 sauvage à différentes concentrations, ils ont réussi à cartographier son interface de dimérisation. Sur cette base, des mutations ponctuelles ont été introduites afin d'inhiber cette auto-association. Ainsi ils ont montré que l'addition d'une charge positive aux positions 43, 44 et 47 stabilise le domaine sous forme monomérique, probablement en induisant une répulsion électrostatique. Ils ont alors émis l'hypothèse que l'auto-association du domaine N-terminal de 16E6 serait le premier évènement d'une série qui conduirait à l'agrégation de la protéine entière à de fortes concentrations. En combinant la mutation F47R du domaine N-terminal à la mutation des quatre cystéines du domaine C-terminal aux positions 80, 97, 111 et 140, ils ont réussi à concentrer cette protéine à 0,4 mM et à obtenir un spectre RMN. Parallèlement, plusieurs publications antérieures de l'équipe ont montré que 16E6 portant la mutation F47R ne dégrade plus la protéine suppresseur de tumeur p53 mais continue à lier

parfaitement E6AP. Dans les cellules dérivées de tumeurs induites par HPV, ce mutant restaure le niveau d'expression de la protéine p53 et provoque la sénescence [Ristriani et al., 2009]. Sur le plan structural, la mutation F47R inhibe l'auto-association du domaine N-terminal de 16E6. Il serait donc possible que cette dimérisation de la protéine joue un rôle clé dans la dégradation de p53. Pour explorer cette hypothèse, des mutants ponctuels de l'interface de dimérisation du domaine N-terminal de 16E6, ont été développés et analysés sur le plan structural (**Figure 30**). Les biologistes structuraux de l'équipe ont pu montrer, par centrifugation analytique, que le domaine N-terminal de 16E6 forme un dimère transitoire. L'interface de dimérisation a également pu être cartographiée. Il restait une question en suspens : cette auto-association est-elle nécessaire à la dégradation de p53 ? comme le laisserait penser le mutant F47R [Ristriani et al., 2009].

L'interaction avec des motifs de type LxxLL, présents notamment dans la séquence protéique de l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP, est l'une des activités principales d'E6. De nombreux travaux de mutagenèse ont, par le passé, cherché à définir les zones impliquées dans cette liaison soit par délétion [Crook et al., 1991; Foster et al., 1994; Gewin and Galloway, 2001; Pim and Banks, 1999; Slebos et al., 1995] soit par mutations ponctuelles [Cooper et al., 2003b; Liu et al., 1999; Nakagawa et al., 2002; Nomine et al., 2006; Ristriani et al., 2002]. Ainsi, des mutations ponctuelles touchant les résidus de l'extrémité N-terminale de 16E6 ne semblent pas affecter cette liaison [Cooper et al., 2003b; Liu et al., 1999] tandis que des délétions de quelques résidus N-terminaux ou du ZD1 de E6 abolissent cette interaction. Cependant, les résidus situés au niveau du domaine ZD2 et entre les deux domaines de liaison au zinc seraient très importants [Cooper et al., 2003b; Liu et al., 1999]. A la lumière de nos conclusions, ces régions proposées s'avèrent erronées. En effet, les biologistes structuraux de l'équipe ont réussi par des expériences de RMN-HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) à cartographier la surface d'interaction d'E6HPV16 avec E6AP et le peptide LxxLL et à identifier les résidus impliqués. Des mutants ponctuels, onze en tout, de chacun des résidus de surface, ont été construits et purifiés afin d'étudier, au niveau biochimique, l'impact de ces mutations sur l'affinité du complexe E6-E6AP (**Figure 30**). L'ensemble de ces mutants conservent plus ou moins la solubilité du mutant de départ à savoir 16E6 4C4S. Il restait à étudier l'effet de leur expression sur la liaison à l'ubiquitine ligase E6AP et sur la dégradation de p53.

2. Résultats

Dans le but de tester les effets des mutants de l'interface de dimérisation et de l'interface de liaison à E6AP, nous avons construit des vecteurs d'expression eucaryotes qui permettent une expression sous le contrôle du promoteur CMV ou T7.

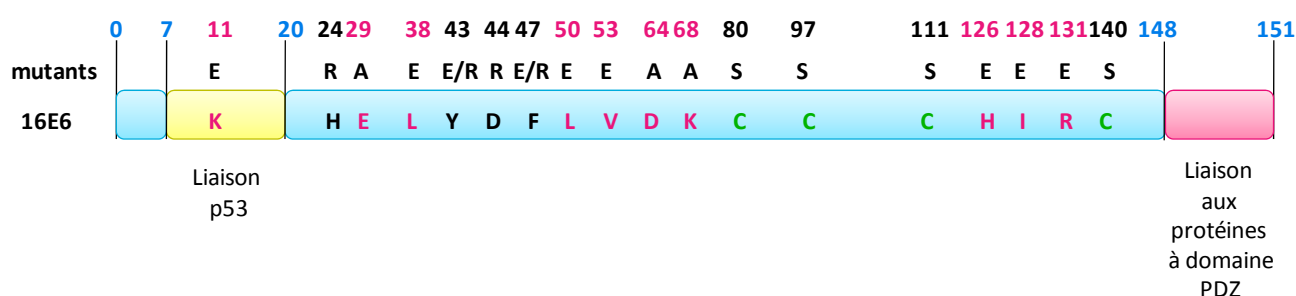


Figure 30 : Représentation schématique des mutations de 16E6. Les résidus impliqués dans l'auto-association de 16E6 et dans la liaison à E6AP sont respectivement indiqués en noir et rose. Les cystéines non conservées mutées en sérine sont notés en vert. Les domaines de liaison à p53 et aux protéines à domaine PDZ sont également représentés.

a. Phénomène d'auto-association et dégradation de la protéine p53

Afin d'étudier *in vitro* la dégradation de p53, l'ensemble des mutants de l'interface de dimérisation de 16E6 a été transcrit et traduit par un système d'expression en réticulocyte de lapin, contenant E6AP ainsi que le système d'ubiquitination par le protéasome (paragraphe B.2.c et f du matériel et méthodes). La détection de la synthèse protéique est possible via l'incorporation de méthionine radioactive ^{35}S . Après une incubation avec les mutants de l'interface de dimérisation de 16E6 (16E6 4C4S D44R, H24R, Y43R, Y43E, Y43R, F47R, F47E, Y43R F47E, Y43E F47R), la protéine p53 est révélée par autoradiographie. Les résultats obtenus sont présentés **figure 31 A**. La mutation du résidu en position 47 qu'elle soit seule ou combinée à la mutation du résidu 43, provoque une inhibition de la dégradation de p53 *in vitro*.

Afin de confirmer ces résultats dans les cellules, l'ensemble des mutants est transfecté dans les cellules C33A et leur localisation est révélée à l'aide d'un anticorps anti-16E6 [Lagrange et al., 2005]. Comme nous pouvons le constater sur la **figure 31 B**, la plupart des protéines conserve leur localisation nucléaire ce qui tend à indiquer un repliement

correcte. De manière naturelle, les cellules C33A expriment fortement la protéine p53 mutée (R273C). Grâce à un double marquage par immunofluorescence de 16E6 et de p53, il est donc possible de déterminer si la protéine p53 est dégradée. Les cellules exprimant 16E6 sauvage présentent une diminution drastique du signal de p53 alors que les cellules exprimant le dominant négatif 4C4S F47R présentent un taux de p53 quasi-normal. Comme le montre la **figure 31.B**, les résultats obtenus confirment les données obtenues *in vitro*. De manière surprenante, le mutant 4C4S D44R, monomérique en RMN au niveau de son domaine N-terminal, est toujours capable de dégrader p53 *in vitro* et dans les cellules C33A. L'auto-association de 16E6 ne serait donc pas nécessaire à cette dégradation.

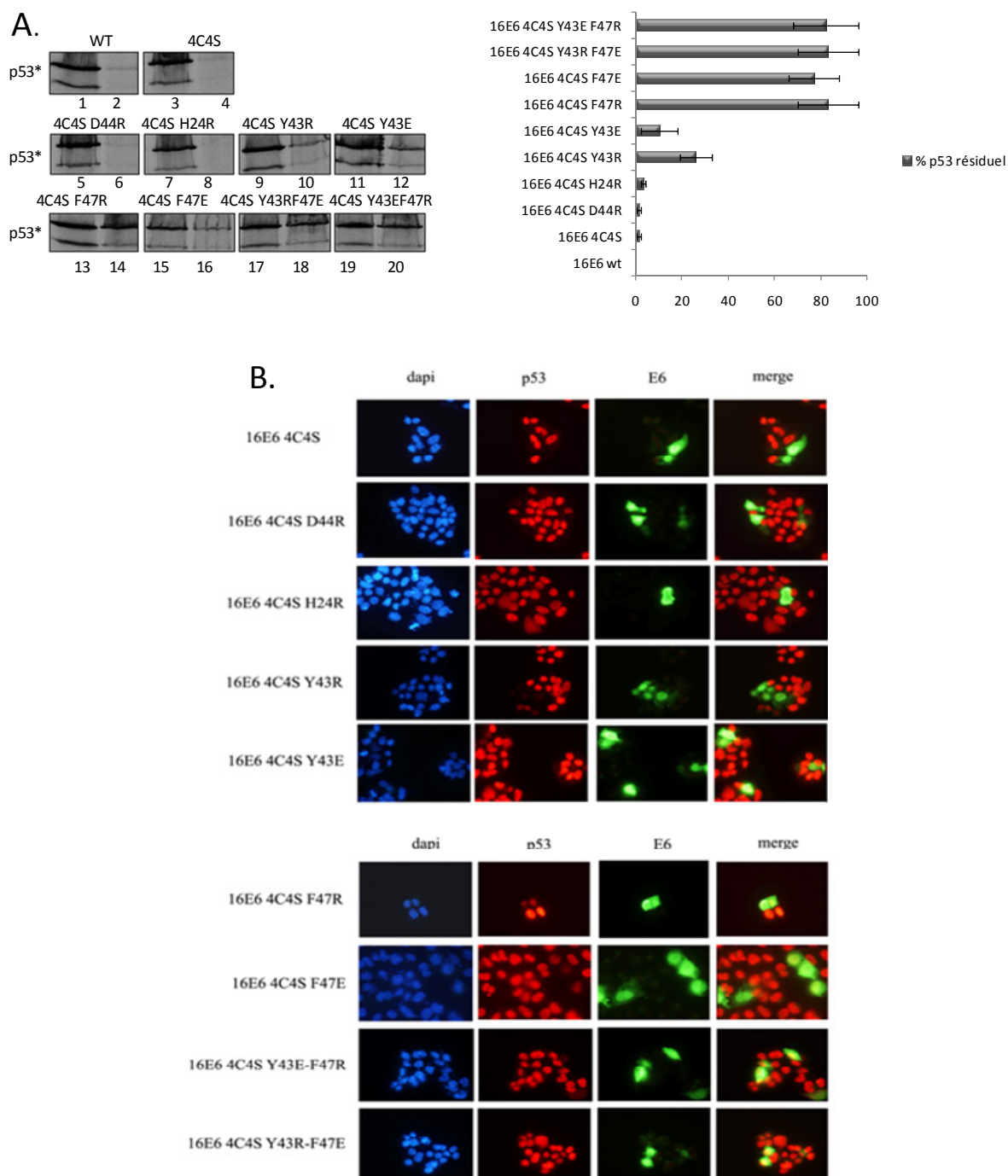


Figure 31 : Dégradation de p53 et auto-association de 16E6. A. Dégradation de p53 *in vitro* : Les protéines 16E6 mutées et p53 radiomarquées sont produites *in vitro* par traduction dans des extraits de réticulocytes de lapin. La dégradation de p53 induite par E6 est réalisée par une incubation de 2 heures à 28°C. Son étude est effectuée après migration sur gel SDS-PAGE et autoradiographie. Pour chaque réaction, le niveau de p53 présent au temps 0 (numéro impair) et au temps 2 heures (numéro pair) est comparé. Le pourcentage résiduel de p53 est quantifié en utilisant le logiciel Quantity One Software® (Biorad). B. Etude dans les cellules C33A : Vingt quatre heures après transfection des cellules C33A à l'aide des plasmides pXJ permettant l'expression des mutants de l'interface de dimérisation, les protéines E6 et p53 sont détectées par immunofluorescence. Les noyaux des cellules sont marqués à l'aide d'une solution de DAPI.

Par GST-Pull down, nous avons également analysé *in vitro*, la formation du complexe E6AP, E6. Pour cela, les mutants de l'interface de dimérisation (16E6 4C4S D44R, H24R, Y43R, Y43E, Y43R, F47R, F47E, Y43R F47E, Y43E F47R) de 16E6 transcrits et traduits en présence de ^{35}S ont été mis au contact avec la protéine GST fusionnée à la protéine E6AP entière ou au peptide de liaison LxxLL. Comme nous pouvons le constater sur la **figure 32 B.**, les résultats obtenus en présence de la fusion GST-E6AP ou GST-peptide LxxLL sont identiques. L'ensemble des mutants de l'interface de dimérisation de 16E6 continue à lier à la fois le peptide LxxLL et la protéine E6-AP entière *in vitro*. Ces mutations n'auraient donc aucun impact sur la formation du complexe E6-E6-AP et p53.

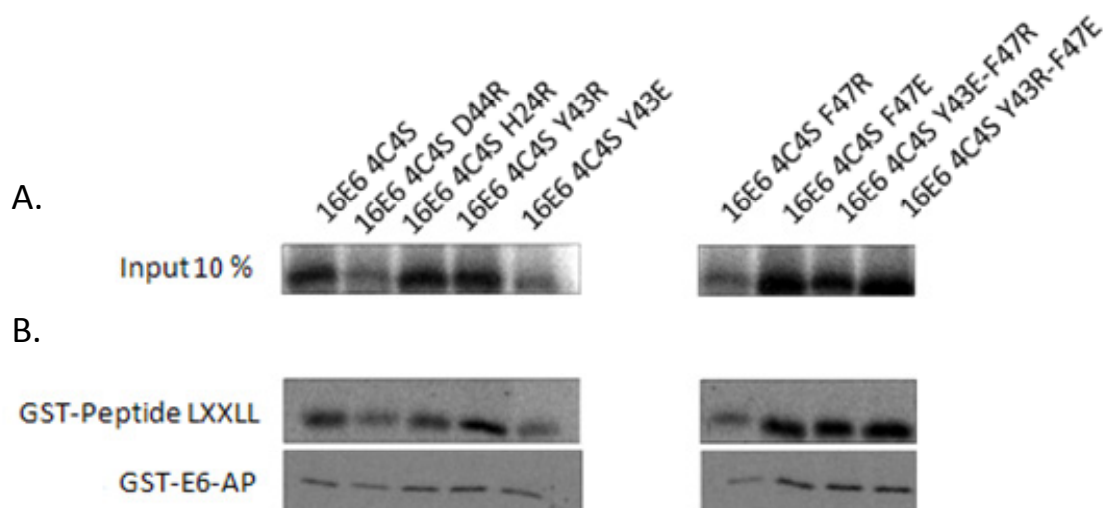


Figure 32 : Interaction des mutants de 16E6 avec E6AP et le peptide LxxLL. A. *Input* de la réaction B. Les protéines 16E6 radiomarquées ^{35}S sont incubées en présence de protéine GST fusionnée à E6AP ou au peptide LxxLL. L'ensemble des mutants continuent le lier le peptide et la protéine entière.

b. Interface de liaison à E6-AP et dégradation de p53

De la même manière, l'ensemble des mutants de la surface d'interaction potentielle à E6-AP (16E6 4C4S K11E, L50E, V53E, I128E, R131E, E29A, L38E, D64A, K68A et H126E) a été transcrit et traduit par un système d'expression en réticulocytes de lapin. Un test de dégradation de la protéine p53 *in vitro* a alors été réalisé. Comme nous pouvons le constater sur la **figure 33 A.**, les mutants 16E6 4C4S K11E, L50E, V53E, R131E, H126 et I128E sont incapables de dégrader *in vitro* la protéine p53. Cependant, en réalisant la même expérience

dans les cellules C33A, exprimant fortement p53, seul le mutant 16E6 4C4S K11E ne dégrade plus la protéine p53 (**Figure 33 B.**). Cette différence de résultats peut s'expliquer aisément. En effet, dans le système des réticulocytes de lapin seule la voie de dégradation de p53 par liaison à E6AP peut être étudiée. Néanmoins, au niveau cellulaire, d'autres voies de dégradation existent.

Nous avons ensuite testé *in vitro* les capacités de liaison à la protéine E6AP entière ou au peptide LxxLL. Comme nous pouvons le voir sur la **figure 34**, les mutations L50E, V53E et I128E entraînent une perte de liaison au peptide LxxLL. Celle-ci est corrélée à une perte de liaison à la protéine E6AP entière. La liaison de 16E6 se ferait donc vraisemblablement au niveau du peptide LxxLL de E6AP. De manière surprenante, la capacité de liaison à E6-AP du mutant de la surface de liaison à E6AP 16E6 4C4S K11E n'a pas été altérée. Ce mutant présente donc les mêmes propriétés que le mutant 16E6 F47R, précédemment décrit [Ristriani et al., 2009], à savoir la capacité de lier E6-AP ou le peptide LxxLL et d'inhiber la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules.

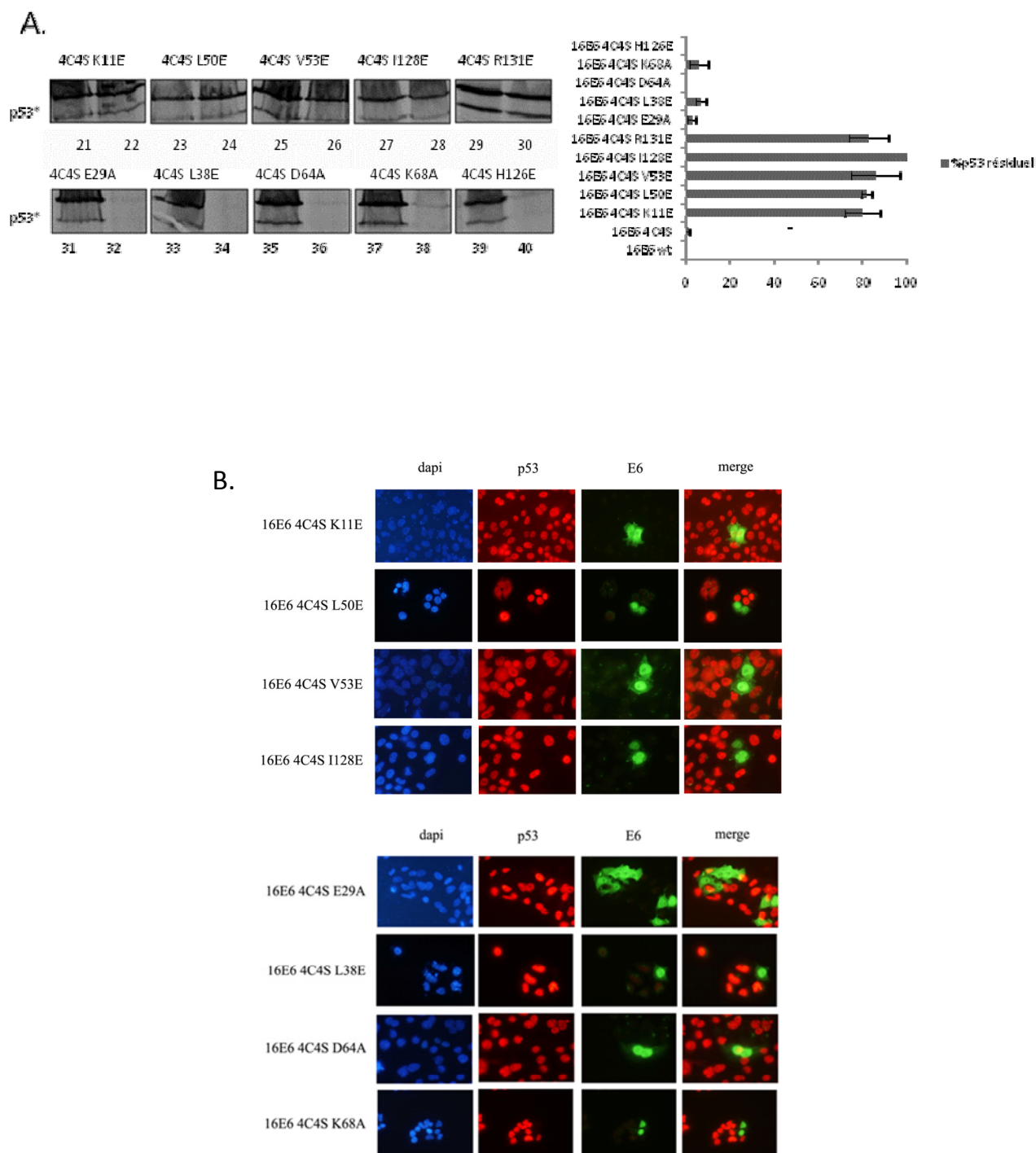


Figure 33 : Interface de liaison à E6AP et dégradation de p53. A. Dégradation de p53 *in vitro* : Les protéines 16E6 mutées et p53 radiomarquées sont produites *in vitro* par traduction dans des extraits de réticulocytes de lapin. La dégradation de p53 induite par E6 est réalisée par une incubation de 2 heures à 28°C. Son étude est effectuée après migration sur gel SDS-PAGE et autoradiographie. Pour chaque réaction, le niveau de p53 présent au temps 0 (numéro impair) et au temps 2 heures (numéro pair) est comparé. Le pourcentage résiduel de p53 est quantifié en utilisant le logiciel Quantity One Software® (Biorad). B. Etude dans les cellules C33A : Vingt quatre heures après transfection des cellules C33A à l'aide des plasmides pXJ permettant l'expression des

mutants de l'interface de dimérisation, les protéines E6 et p53 sont détectées par immunofluorescence. Les noyaux des cellules sont marqués à l'aide d'une solution de DAPI.

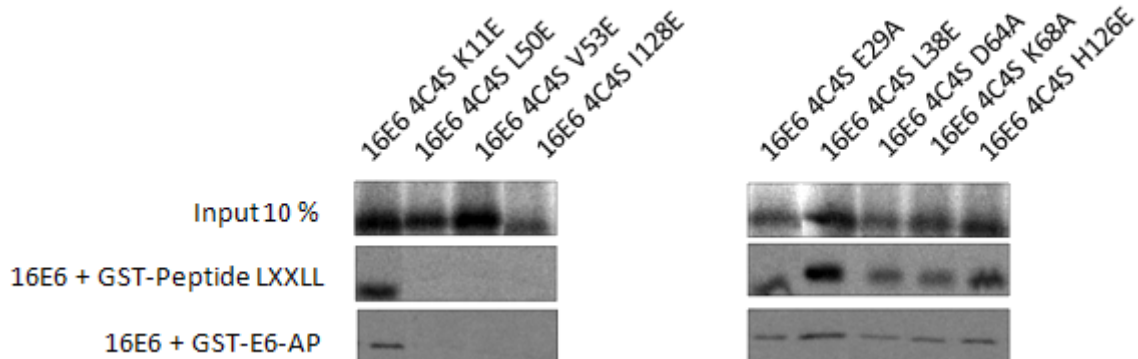


Figure 34 : Interaction des mutants de 16E6 avec E6AP et le peptide LxxLL. Les protéines 16E6 radiomarquées ^{35}S sont incubées en présence de protéine GST fusionnée à E6AP ou au peptide LxxLL. L'ensemble des mutants continuent de lier le peptide et la protéine entière.

c. Dégradation de p53 et effet dominant négatif

Au laboratoire, il a été montré que le mutant 16E6 F47R est un dominant négatif de l'oncoprotéine E6 d'HPV18 (18E6) et 16E6 [Ristriani et al., 2009]. Nous avons donc voulu tester si les mutants capables d'inhiber la dégradation de p53 *in vitro* sont également des dominants négatifs de 18E6. Afin de tester cette hypothèse, les mutants de 16E6 ont été transfectés dans les cellules HeLa (HPV 18 positives). Comme le montre la figure 34, les mutants de 16E6 au niveau des résidus 11, 43 et 47, lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules HeLa, induisent une remontée du taux de p53 endogène comparable à celle induite par l'utilisation du dominant négatif précédemment identifié 16E6 F47R. Le mutant 16E6 4C4S K11E présenterait donc un profil de dominant négatif par rapport à 18E6, similaire à celui du mutant 16E6 F47R (**Figure 35**).

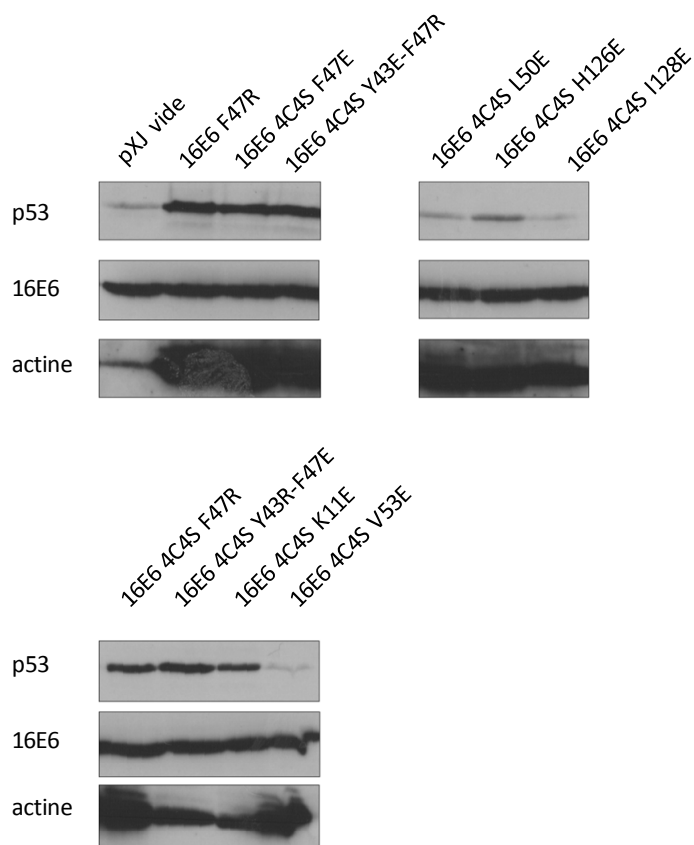


Figure 35 : Accumulation de p53 dans les cellules HeLa, HPV 18 positives. Les cellules HeLa (HPV18) ont été transfectées avec les plasmides pXJ vide ou pXJ-16E6 mutée comme indiqué. Vingt quatre heures après transfection, les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE 12 %, puis analysées par western blot en utilisant trois anticorps : un anti-p53, un anti-E6 et un anti-actine. Les mutants agissant sur la dimérisation de 16E6 induisent une accumulation de p53 au niveau des cellules HeLa, de même que le mutant de liaison à E6AP.

3. Conclusion-Discussion

	Mutation 16E6	Liaison à E6AP ou au peptide LxxLL <i>in vitro</i>	Dégradation de p53 <i>in vitro</i>	Dégradation de p53 dans les cellules C33A	Références
Mutations de l'interface de dimérisation du domaine N-terminal	4C4S	+++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S D44R	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S H24R	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S Y43R	++	++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S Y43E	++	++	+++	[Zanier, 2009]
	Y43G	nd	++	nd	[Nakagawa et al., 1995]
	4C4S F47R	++	-	-	[Zanier, 2009]
	4C4S F47E	++	-	+/-	[Zanier, 2009]
	6C6S F47R	++	-	-	[Nomine et al., 2006]
	F47R	++	-	-	[Ristriani et al., 2009]
	F47L	nd	+++	nd	
	4C4S Y43R F47E	++	-	-	[Zanier, 2009]
	4C4S Y43E F47R	++	-	-	[Zanier, 2009]

Tableau 7 : Bilan de l'étude des mutants de l'interface potentielle de dimérisation du domaine N-terminal de 16E6. (- : 0 à 5 %, +/- : 5 à 20%, ++ : 20 à 70 %, +++ : > 70 %)

A l'issue de ce travail, nous avons caractérisé deux types de mutants de l'oncoprotéine 16E6 :

(i) les premiers, mutants de la surface potentielle de dimérisation du domaine N-terminal de 16E6, nous ont permis de montrer que cette auto-association n'est pas nécessaire à la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules C33A (**Tableau 7**).

(ii) les seconds, mutants ponctuels de l'interface potentielle de liaison à E6AP, ont permis de montrer que la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules C33A peut intervenir de manière indépendante de la liaison à E6AP (**Tableau 8**).

	Mutation 16E6	Liaison à E6AP ou au peptide LxxLL <i>in vitro</i>	Dégradation de p53 <i>in vitro</i>	Dégradation de p53 dans les cellules C33A	Références
Mutations de l'interface potentielle de liaison à E6AP	4C4S K11E	++	-	-	[Zanier, 2009]
	K11E	++	-	-/(Saos-2)	[Cooper et al., 2003a]
	4C4S L50E	-	-	+++	[Zanier, 2009]
	L50G	nd	-	nd	[Nakagawa et al., 1995]
	4C4S V53E	-	-	+++	[Zanier, 2009]
	V53G	nd	+++	nd	[Nakagawa et al., 1995]
	4C4S I128E	-	-	+++	[Zanier, 2009]
	I128T	+/-	- (37°C)		[Liu et al., 1999]
	6C6S I128A	++	+/-	++	[Nomine et al., 2006]
	4C4S R131E	++	-	+++	[Zanier, 2009]
	R131A	nd	+/-	nd	[Ristriani et al., 2002]
	4C4S E29A	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S L38E	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S D64A	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
	4C4S K68A	++	+++	+++	[Zanier, 2009]
4C4S H126E	++	-	+++	[Zanier, 2009]	

Tableau 8 : Bilan de l'étude des mutants de l'interface potentielle de liaison à E6AP de 16E6. (- : 0 à 5 %, +/- : 5 à 20%, ++ : 20 à 70 %, +++ : > 70 %)

Le mutant 16E6 4C4S K11E s'avère particulièrement intéressant. En effet, il présente les mêmes propriétés que le mutant 16E6 F47R précédemment identifié [Ristriani et al., 2009] à savoir : (i) un domaine N-terminal monomérique dans les conditions mesurées, (ii) une capacité à inhiber la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules C33A, (iii) une capacité de liaison à E6AP, et (iv) un effet dominant négatif sur 18E6 lorsqu'il est exprimé dans les cellules HeLa. Il serait alors intéressant d'étudier le devenir de ces cellules, qui présentent suite à l'expression de 16E6 4C4S K11E, un taux élevé de p53. Deux types d'effets pourraient alors être envisagés : (i) soit l'augmentation du taux de p53 au sein des cellules induit une apoptose, (ii) soit la prolifération cellulaire est inhibée et les cellules entrent en sénescence.

L'ensemble des données concernant le phénomène d'auto-association du domaine N-terminal de 16E6, a été obtenu suite à des expériences *in vitro* de RMN. Il est donc important de noter que les mutants 4C4S K11E et F47R sont défectifs pour cette auto-association dans ces conditions particulières. Cependant, rien n'indique qu'au sein de la cellule, il en est de même. De ce fait, une étude de l'auto-association dans les cellules de ce domaine pourrait être envisagée.

B. Exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques

1. Immunisation intracellulaire par l'utilisation de scFvs anti-16E6

a. Introduction générale

L'utilisation de fragments d'anticorps de taille réduite et de haute affinité est recherchée pour le ciblage *in vivo* des tumeurs. En effet, à la différence des anticorps naturels (150 kDa) qui sont sécrétés et voient ainsi leur fonction de reconnaissance vouée à un environnement extracellulaire, les fragments d'anticorps de taille réduite (Fab, Fv ou scFv, environ 35 kDa) peuvent être exprimés dans les cellules eucaryotes pour cibler une protéine intracellulaire. Grâce à cette nouvelle perspective thérapeutique, plus couramment appelée immunisation intracellulaire, les anticorps ou intracorps peuvent être localisés dans un compartiment cellulaire (cytosol, noyau, réticulum endoplasmique...) par des séquences d'adressage appropriées et, du fait de leur extraordinaire spécificité, peuvent être utilisés pour neutraliser ou moduler l'activité fonctionnelle de molécules cibles.

i. Structure des scFvs

Forme d'intracorps la plus couramment utilisée en raison de sa faible taille et de sa relative facilité d'expression, les scFvs (fragment d'anticorps simple chaîne) dérivent généralement des immunoglobulines de type G (IgG). Les immunoglobulines, protéines tétramériques glycosylées, sont constituées de quatre chaînes : (i) deux chaînes lourdes (H=*Heavy*, 50 kDa) et (ii) deux chaînes légères (L=*Light*, 25 kDa), organisées en domaines globulaires et stabilisées entre elles par des ponts disulfures inter et intra-caténaux. Chaque chaîne légère et lourde contient à son extrémité N-terminale des domaines variables: VH et VL respectivement, porteurs de la variabilité de liaison avec l'antigène. L'extrémité C-terminale (CL pour les chaînes légères et CH1 à CH3 ou 4 pour les chaînes lourdes) est quant à elle constante et caractéristique de l'isotype. La spécificité de chaque immunoglobuline implique une immense variabilité des domaines VH et VL, néanmoins celle-ci n'est pas répartie de manière homogène. Ainsi, le long des 110 amino-acides constituant les domaines VH et VL, deux types de régions sont rencontrées: (i) les zones dites charpentes (*Framework* 1 à 4), relativement conservées qui assurent la structure en feuillets β et (ii) les régions "*Complementarity Determining Region*" (CDR1 à 3) qui forment

à l'extrémité de chaque feuillet β des boucles hypervariables déterminant la spécificité de l'anticorps. La combinaison des VH et VL crée un site hypervariable appelé site de liaison à l'antigène ou paratope. Ainsi, une IgG contiendra deux sites de liaisons à l'épitope: elle sera dite bivalente (**Figure 36**).

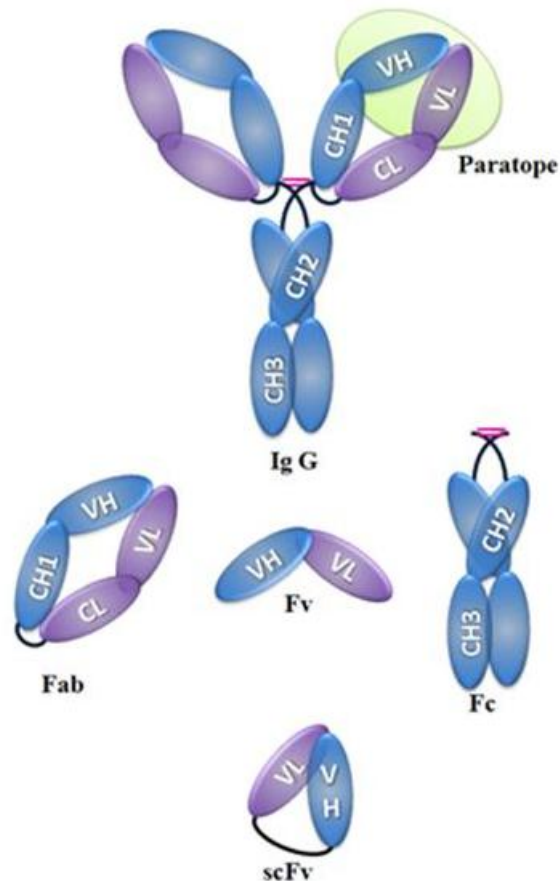


Figure 36 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline de type G et de ses dérivés. L'IgG est constituée de quatre chaînes : deux chaînes lourdes (H, en bleu) et deux chaînes légères (L, en violet), organisées en domaines globulaires et stabilisées entre elles par des ponts disulfures inter et intra-caténaires. Le site de reconnaissance à l'antigène ou paratope (en vert) est formé par l'association des deux domaines variables des chaînes lourdes et légères. La digestion protéolytique par la papaïne de l'Ig conduit à la libération de deux structures fonctionnelles : (i) le Fab (*fragment antigen binding*) constitué des deux premiers domaines d'une chaîne lourde (VH et CH1) associés de manière covalente à une chaîne légère (ii) le fragment cristallisable Fc composé des deux moitiés de chaînes lourdes restantes (CH2 et CH3). Le scFv résulte de l'association covalente par un lien peptidique (en noir) des domaines variables VH et VL constituant un Fv.

Plus petites entités capables de lier de manière monovalente l'antigène, les scFvs sont constitués de l'association de deux domaines variables VH et VL par un lien peptidique de cinq à vingt cinq résidus. Dans tous les cas, la partie C-terminale d'un domaine variable est liée à la partie N-terminale de l'autre par ce lien hydrophile et flexible. Deux

configurations sont alors possibles : (i) l'enchaînement VL-peptide-VH [Bird et al., 1988] et (ii) l'enchaînement VH-peptide-VL [Huston et al., 1988]. La capacité de la molécule résultante à former un scFv fonctionnel monomérique, dimérique (*diabody*), voire tétramérique va dépendre du lien peptique utilisé, le plus couramment employé étant $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ [Huston et al., 1988]. En effet, selon sa nature et sa longueur, l'une ou l'autre forme peut être favorisée [Hudson and Souriau, 2003]. Ainsi, un lien peptidique d'une taille inférieure à quinze résidus induit des contraintes stériques qui vont empêcher l'association des domaines d'une même molécule et promouvoir la formation d'homo-hétéro-dimères ou trimères ayant des propriétés pharmacocinétiques différentes des monomères (demi-vie, avidité) [Desplancq et al., 1994; Sawyer et al., 1994].

ii. Ingénierie des anticorps recombinants : Production et sélection

TYPE DE BANQUE	NAÏVE NATURELLE	NAÏVE SYNTHETIQUE	IMMUNISEE
Nature des gènes	Donneur naïf sans contact avec l'antigène	Donneur naïf et réarrangement <i>in vitro</i> des CDRs	Donneur en contact avec l'antigène
Affinité des fragments d'anticorps	Anticorps de faible affinité 10^{-6}M (10^7 clones) à 10^{-9}M (10^{10} clones)		Anticorps de forte affinité 10^{-9}M (10^5 clones)
Utilisation	Production de fragments d'anticorps contre n'importe quel antigène		Production de fragments d'anticorps contre un antigène unique
Avantages	Ne nécessite pas de donneur immunisé Isolation possible d'anticorps contre les antigènes du soi, non immunogènes et/ou toxique Suffisamment diversifiées pour tous les antigènes		Sélection d'une banque biaisée de petite taille Affinité élevée des anticorps sélectionnés du fait de leur maturité
Inconvénients	Banque de taille souvent importante Nature exacte du répertoire des gènes variables inconnue		Peu ou pas de contrôle de la réponse immune Nécessité de construire une nouvelle banque pour chaque antigène donné Toxicité des antigènes pouvant tuer le donneur Difficile d'isoler les antigènes du soi

Tableau 9 : Caractéristiques principales, avantages et inconvénients des banques combinatoires de fragments d'anticorps.

Deux grandes techniques permettent actuellement la production d'anticorps recombinants : (i) l'ingénierie moléculaire à partir d'ARNm issus d'hybridomes sécréteurs d'anticorps et (ii) l'utilisation de banques combinatoires aléatoires d'ADNc codant les domaines VH et VL, outil de choix notamment pour la production d'anticorps de type humain. Des banques combinatoires sont obtenues par clonage des domaines d'anticorps à partir d'une population de lymphocytes hétérogènes. Du fait de la réalisation théorique de l'ensemble des combinaisons VH et VL possibles, elles miment la diversité du répertoire d'anticorps naturels. Trois grands types de banques peuvent être distingués : (i) les naïves naturelles, obtenues à partir de gènes d'un donneur non immunisé (ii) les naïves synthétiques ou semi-synthétiques, construites à partir des mêmes gènes que les naïves, mais dont la diversité est augmentée en modifiant *in vitro* les gènes codant les boucles hypervariables et (iii) les immunisées, provenant d'un donneur qui a été immunisé contre l'antigène d'intérêt (**Tableau 9**). De manière générale, les anticorps recombinants issus de banques immunisées présenteront une meilleure affinité pour l'antigène.

iii. Neutralisation intracellulaire et autres utilisations

Les premières tentatives de neutralisation intracellulaire d'antigènes via l'utilisation d'anticorps monoclonaux microinjectés dans le cytoplasme [Graessmann et al., 1980; Morgan and Roth, 1988] ou exprimés dans les cellules [Biocca et al., 1990; Werge et al., 1990] ont permis la validation du concept d'immunisation intracellulaire introduit par Werge et col., en 1990 [Werge et al., 1990]. De part leur petite taille, les scFvs pénètrent et diffusent de manière uniforme plus facilement qu'un anticorps dans les tissus [Adams and Schier, 1999]. Ainsi, il est possible de les utiliser en tant qu'intracorps, pour cibler des tumeurs solides inaccessibles aux immunoglobulines. Ce sont également de puissants outils de génomique fonctionnelle. En effet, ils permettent de par leur haute affinité pour l'antigène cible d'explorer les fonctions de nombreuses protéines dans un contexte intracellulaire [Biocca and Cattaneo, 1995; Cattaneo and Biocca, 1999; Richardson et al., 1995]. Ainsi, l'activité d'une protéine intracellulaire peut être modulée de différentes manières par un scFvs : (i) l'interaction avec ses partenaires cellulaires peut être bloquée par une gêne stérique induite par la liaison du scFv [Cattaneo and Biocca, 1999] (ii) par fusion du scFv à une séquence d'adressage spécifique (NLS, NES...), la protéine cible peut être

relocalisée dans un compartiment cellulaire inapproprié à sa fonction [Cattaneo and Biocca, 1999; Sibler et al., 2003] (iii) la protéine cible peut être dirigée vers une voie de dégradation [Sibler et al., 2005; Zhou, 2005] enfin, (iv) ses fonctions peuvent être restaurées par une modification conformationnelle induite suite à la liaison du scFv [Caron de Fromentel et al., 1999]. La circulation rapide des scFvs entre les différents compartiments de l'organisme ainsi qu'un niveau de clairance élevé par les reins en font également des molécules appropriées pour l'élimination de substances diffusibles ou de toxines animales. De plus, ils s'avèrent être moins immunogènes que d'autres peptides ou protéines thérapeutiques, surtout s'ils sont sélectionnés à partir d'une banque d'origine humaine.

iv. Applications thérapeutiques

Trois champs d'investigation principaux de l'immunisation intracellulaire se sont développés (pour revue: [Lo et al., 2008] le traitement du SIDA, des maladies neuro-dégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington, pour revue [Cardinale and Biocca, 2008a; Cardinale and Biocca, 2008b]) et des cancers. Ainsi, dans le cas des anticancéreux, différentes approches ont été déployées: (i) la neutralisation d'oncoprotéines cellulaires telles que RAS [Cochet et al., 1998; Lener et al., 2000], Bcl-2 [Cohen-Saidon et al., 2003], p53 [Caron de Fromentel et al., 1999] ou virales telles que E6 et E7 d'HPV [Accardi et al., 2005; Culp et al., 2007; Dona et al., 2007; Griffin et al., 2006; Lagrange et al., 2007; Wang-Johanning et al., 1998], (ii) la rétention dans le réticulum endoplasmique de récepteurs impliqués dans certains types de cancers telles EGFR, ErbB-2 [Alvarez et al., 2000; Arafat et al., 2000; Arafat et al., 2002; Hyland et al., 2003; Richardson et al., 1998; Richardson et al., 1995], (iii) l'inactivation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que la cycline E [Strube and Chen, 2002].

v. Limitations et stratégies d'amélioration

Malgré les nombreuses investigations thérapeutiques en cours, aucun intracorporel n'est actuellement utilisé en thérapie. En effet, la littérature décrit peu d'essais cliniques utilisant des scFvs en thérapie génique du cancer. Ainsi, sur les neuf essais recensés à ce jour, trois sont indiqués dans le traitement du SIDA, quatre sont basés sur l'utilisation de protéines de fusion et permettent l'activation d'une réponse immunitaire vis-à-vis de

certaines cancers et un seul est préconisé dans le cadre du traitement du cancer ovarien (Tableau 10).

Indication	Protéine surexprimée	Vecteur utilisé	Effets	Références
Cancer ovarien	scFv@ErbB-2	Adénovirus	Suppression de l'expression de ErbB-2	[Alvarez and Curiel, 1997]
Infection VIH	scFv@GP120	Rétrovirus	Rétention de GP120 dans le RE	[Marasco et al., 1993]
	scFv@Rev		Inhibition de la réplication virale	[Duan et al., 1994]
	scFv@Tat			[Mhashilkar et al., 1999]
Lymphome CD20 positif	scFv-Zeta TCR	Plasmide nu	Relocalisation des lymphocytes au niveau des tumeurs	[Jensen et al., 1998]
Neuroblastome	scFv@CE7R-Fc-Zeta TCR	Rétrovirus		[Gonzalez et al., 2004]
	scFv@GD2-Fc-Zeta TCR			[Russell et al., 2002]
Gliome	scFv @II13-Fc-Zeta TCR			[Kahlon et al., 2004]

Tableau 8: Récapitulatif des essais cliniques utilisant des scFvs, source <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Outre le fait que les scFvs soient monovalents ce qui diminue leur avidité par rapport à un anticorps complet, les principales difficultés rencontrées lors des essais d'immunisation intracellulaire sont essentiellement dues à des problèmes de repliement. En effet, l'expression transitoire de scFvs dans des lignées cellulaires eucaryotes donne lieu de manière aléatoire à la formation d'agrégats insolubles s'accumulant dans le cytoplasme et étant extrêmement toxiques. Les immunoglobulines sont naturellement sécrétées par les cellules productrices. Elles cheminent alors dans le réticulum endoplasmique où elles acquièrent leur structure quaternaire avec notamment la mise en place des ponts disulfures intra et inter-caténaux. En revanche, l'expression des scFvs lors de l'immunisation

intracellulaire s'effectue au niveau du cytoplasme, environnement réducteur, ce qui empêche la formation des ponts intra-chaînes nécessaires à la stabilisation de la molécule [Biocca and Cattaneo, 1995; Visintin et al., 2004]. L'accumulation progressive des formes non-solubles de scFvs, par saturation des systèmes de protéolyse, provoque la formation de structures intracellulaires au niveau de la périphérie du noyau : les agrésomes [Cardinale et al., 2001; Garcia-Mata et al., 1999; Johnston et al., 1998]. Les scFvs y sont alors ubiquitinylés pour être dégradés par les protéasomes. Ainsi, une proportion variable des scFvs va s'agréger et de ce fait être inactive mais également toxique pour la cellule. Cependant, il semble que cet évènement soit non prédictif et dépend entièrement de la structure primaire de l'anticorps [Cattaneo and Biocca, 1999]. Le pH intracellulaire, la température, l'état redox, la présence de protéines facilitant le repliement des anticorps (les chaperonnes) ainsi que la disponibilité des voies de dégradation vont être autant de facteurs qui influencent la formation de ces agrégats.

Différentes stratégies ont été développées afin d'améliorer la stabilité des scFvs au niveau intracellulaire, le but étant d'obtenir des scFvs hyperstables dans un milieu oxydant et fonctionnels en milieu réducteur. Elles sont basées souvent sur la mutagenèse aléatoire ou dirigée des séquences codantes des scFvs dans le but d'obtenir une charpente moléculaire capable de se replier de manière stable sans formation de ponts disulfures. Plusieurs équipes ont notamment muté sélectivement certains résidus pour introduire des mutations dites stabilisantes : (i) les premières portant sur les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures [Proba et al., 1997; Proba et al., 1998; Worn and Pluckthun, 1998; Worn and Pluckthun, 1999] (ii) les secondes touchant la charpente des scFvs, notamment les résidus hydrophobes de l'interface VH-VL [Nieba et al., 1997]. Une autre stratégie consiste à employer la charpente de fragments d'anticorps recombinants reconnus pour leur stabilité intracellulaire et à en remplacer les séquences CDR par celles d'un scFv présentant un intérêt thérapeutique. La greffe de CDR a ainsi permis l'obtention de scFv plus stables en milieu réducteur avec une bonne affinité pour leur antigène [Desiderio et al., 2001; Ohage and Steipe, 1999]. De plus cette technique peut être étendue à la création d'une banque de scFvs solubles par modification des séquences hypervariables des scFvs servant de matrice [Philibert et al., 2007]. Une méthode de sélection *in vivo* de scFvs fonctionnels a été décrite [Tse et al., 2002; Visintin et al., 2002]. Cette approche, appelée IAC82 combine un criblage *in vitro* des scFvs par phage display suivi d'un criblage de

l'interaction antigène-anticorps par double hybride dans la levure. Enfin, afin d'augmenter la stabilité intracellulaire des scFvs il a été envisagé de les exprimer en fusion avec d'autres protéines comme la partie constante des molécules d'anticorps Fc [Strube and Chen, 2002; Strube and Chen, 2004] ou la protéine liant le maltose de *E. coli* : MBP [Bach et al., 2001; Shaki-Loewenstein et al., 2005]. Néanmoins, l'expression d'une protéine en fusion avec une protéine soluble peut améliorer la mono-dispersité de la molécule dans la cellule, mais ne garantit pas un repliement correct et actif de celle-ci [Nomine et al., 2001].

b. Contexte scientifique

Parmi les stratégies de neutralisation de l'oncoprotéine 16E6 développées par l'équipe, l'une va reposer sur l'immunisation intracellulaire utilisant des scFvs anti-16E6.

Au sein du laboratoire, deux scFvs, 1F4 et 1F1, capables de lier l'extrémité N-terminale de 16E6 et d'inhiber la dégradation de p53 *in vitro*, ont été purifiés à partir de périplasme d'*E. coli* [Giovane et al., 1999]. Cependant, l'expression transitoire de ces scFvs aussi bien dans le cytoplasme d'*E. coli* [Schwalbach et al., 2000] que dans les cellules de mammifères COS [Sibler et al., 2003], donne lieu à la formation d'agrésomes, agrégats insolubles, entraînant la mort des cellules par accumulation. L'environnement réducteur du cytoplasme est le principal responsable de cette instabilité structurale (**Tableau 11**). Suite à ces conclusions, un effort particulier a été réalisé afin d'améliorer la solubilité des scFvs existants. Ainsi, des expériences de mutagenèse à partir du squelette du 1F4 ont abouti à la caractérisation de deux nouveaux mutants :

(i) le **L177P** qui s'avère être un excellent témoin de la toxicité non spécifique due à la formation d'agrésomes. En effet, il est incapable de lier 16E6 mais possède les mêmes caractéristiques de solubilité que le 1F4 [Schwalbach et al., 2000].

(ii) le **P41L** qui s'avère plus soluble que le 1F4 lorsqu'il est exprimé dans le cytoplasme d'*E. coli* et qui a conservé ses capacités de liaison à 16E6 (Etienne Weiss, communication personnelle).

Très peu d'études se sont intéressées à l'interaction entre le scFv et son antigène dans un contexte intracellulaire, ni même à la solubilité de celui-ci. Ainsi, [Biocca et al., 1993] ont montré que des scFvs qui présentaient une activité neutralisante vis à vis d'un antigène donné dans le cytoplasme de cellules eucaryotes [Biocca et al., 1993; Werge et al., 1994]

sont en faites insolubles [Cardinale et al., 2001; Cardinale et al., 1998; Lener et al., 2000]. De plus, ils ont également montré que ces scFvs insolubles capables de lier l'antigène le séquestrent dans les agrésomes.

scFv	Solubilité E.coli		Solubilité dans les lignées cellulaires		Liaison à 16E6	Inhibition de la dégradation <i>in vitro</i> p53	Références
	dans le périplasme	dans le cytoplasme	Cos	CaSki, SiHa, HeLa et A459			
1F4	+++	-		ND	++	+	[Giovane et al., 1999; Sibling et al., 2003]
1F1	+++	-	ND	+	++	+	[Giovane et al., 1999]
1F4-P41L	+++	+	ND	++	++	+	
1F4-L177P	+++	-	ND	+	-	-	[Schwalbach et al., 2000]

Tableau 11 : Récapitulatifs des données sur les scFvs anti-16E6 disponibles au sein du laboratoire. ND : non déterminé

Le but de notre travail fut alors d'étudier l'effet spécifique des scFvs anti-16E6 dans les cellules transformées par HPV et de le corréler à leur solubilité et à leur capacité de liaison à l'antigène. En effet, au niveau cellulaire, deux populations de scFvs seront exprimés : (i) une agrégée, non spécifique, ne reconnaissant pas 16E6 mais dont l'expression induit une toxicité aspécifique pour la cellule, (ii) une soluble, moins importante, qui reconnaît 16E6 et dont l'expression doit provoquer une toxicité cellulaire spécifique. Un moyen efficace de délivrer les gènes codant les scFvs dans les lignées transformées par HPV devait cependant être trouvé. En effet, ces cellules s'avèrent réfractaires aux techniques classiques de transfections (phosphate de calcium, polyéthylèneimine ou encore lipides cationiques synthétiques). Afin de contourner cet obstacle, des adénovirus recombinants dérivés de l'Ad5 connu pour ses capacités inégalées en matière de transfert de gène ont

donc été utilisés. Les gènes codant les scFvs, sous le contrôle du promoteur CMV, ont pu être introduits par recombinaison homologue chez *E. coli* dans le génome de l'Ad5 dont les régions E1AB nécessaires à la réplication ont été délétées [Chartier et al., 1996]. Ainsi, nous avons développé une stratégie de neutralisation de 16E6 basée sur l'expression intracellulaire de scFvs via des adénovirus. Afin d'étudier les effets de chaque scFv de manière statistique et globale, ces virus recombinants non répliquatifs ont été utilisés pour transduire différentes lignées cellulaires cancéreuses (HPV positives ou non). Ces résultats ont donné lieu à une publication dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communication* [Lagrange et al., 2007].

Publication n°1

**Intracellular scFvs against the viral E6
oncoprotein provoke apoptosis in human
papillomavirus-positive cancer cells**

Magali Lagrange, **Charlotte Boulade-Ladame**, Laurent Mailly, Etienne Weiss, Georges
Orfanoudakis, François Deryckère

Signalement bibliographique ajouté par :

L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells

Magali LAGRANGE, Charlotte BOULADE-LADAME, Laurent MAILLY, Etienne WEISS, Georges ORFANOUDAKIS and François DERYCKERE

***Biochemical and biophysical research communications*, 2007, Volume 361, Numéro 2, Pages 487-492**

Copyright © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved

Publication n° 1 : p. 115-.... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.040>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

c. Discussion

Le but initial de ces travaux était d'étudier l'importance de la solubilité d'un scFv dans un contexte « d'immunisation intracellulaire » et de le corrélérer à un effet spécifique. Grâce à l'utilisation d'adénovirus recombinants, nous avons obtenu une efficacité de transduction proche de 100 %, nous permettant ainsi d'évaluer de manière statistique l'effet global des scFvs dans un contexte intracellulaire. Cependant, le titre viral a été adapté afin d'obtenir un équilibre entre un bon niveau d'expression et une efficacité de transduction comparable entre chaque lignée cellulaire de même qu'une expression homogène des scFvs pour chaque lignée. Deux types d'effets ont alors pu être identifiés : (i) une inhibition de la prolifération de l'ensemble des lignées testées, effet aspécifique dû à l'agrégation des scFvs non repliés (ii) une apoptose uniquement dans les cellules HPV16 positives après l'expression de scFvs liant 16E6, effet qui est proportionnel à la solubilité intracellulaire des scFvs exprimés. Une donnée intéressante concerne le scFv P41L. En effet, celui-ci demeure majoritairement insoluble dans les cellules humaines mais reste cependant plus soluble que les deux autres formes confirmant ainsi les données obtenues dans les bactéries [Schwalbach et al., 2000]. Aucune information n'a cependant pu être obtenue quant à la liaison et à la neutralisation de l'oncoprotéine 16E6 dans un contexte cellulaire. En effet, les niveaux intracellulaires de 16E6 trop faibles dans les lignées transformées par HPV nous ont conduit à l'utilisation de vecteurs permettant la surexpression de 16E6 dans les cellules HeLa (plus facilement transfectées mais HPV18 positives). Du fait du nombre peu important de cellules exprimant à la fois le scFv et E6, aucune conclusion n'a hélas, pu être établie. Les mécanismes moléculaires de l'induction de l'apoptose par les scFvs ont également été testés, mais aucune élévation du taux de p53 ne peut être corrélée à la séquestration de 16E6 par un scFv. D'autres mécanismes, indépendant de p53, pourraient être mis en jeu. En effet, tandis que le test de survie cellulaire (test MTT) révèle environ 40 % des cellules vivantes dans les CaSki et SiHa en présence de P41L, seuls 8 à 15 % des cellules meurent par apoptose. Il serait donc intéressant d'étendre cette étude à d'autres partenaires cellulaires tels que Bak, FADD, impliqués dans des voies pro-apoptotiques indépendamment de p53 ou encore les protéines à domaine PDZ jouant un rôle important notamment dans la prolifération cellulaire (pour revue [Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008]). Une inhibition de l'activité des protéasomes est montrée suite à l'accumulation des agrésomes formés par les scFvs

insolubles [Cardinale et al., 2003]. Cette saturation des systèmes de protéolyse pourrait être responsable de la mort cellulaire par apoptose puisqu'une action synergétique existerait entre la présence d'agrégats et le traitement par des inhibiteurs du protéasome [Cardinale et al., 2003]. Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres protéines telles que le prion [Jana et al., 2001]. Ainsi, la toxicité observée lors de notre étude pourrait être liée à la saturation des systèmes de protéolyse. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une étude de colocalisation entre les scFvs et les protéasomes. Afin d'améliorer la qualité des scFvs, d'autres perspectives peuvent être envisagées. En effet, malgré l'optimisation des conditions de transduction par les adénovirus, il serait également envisageable de moduler l'expression des scFvs en utilisant différents types de promoteurs tels que le promoteur de l'ubiquitine C humaine moins puissant que le promoteur CMV [Schorpp et al., 1996]. Puisque les scFvs ne sont pas capables de se replier correctement dans le cytoplasme, et qu'il est possible de les relocaliser dans un autre compartiment cellulaire, nous pourrions envisager : (i) de les relocaliser vers le réticulum endoplasmique, lieu naturel de synthèse des anticorps et (ii) permettre leur retour dans le cytoplasme. Les premiers essais menés combinant une séquence de localisation au réticulum endoplasmique à un domaine PTD (*Protein Translocation Domain*) en C-terminale du scFvs 1F4 n'ont pas permis la sortie du RE. Cependant, la distribution du scFv muni d'un domaine PTD semble plus diffuse et préférentiellement nucléaire, laissant penser que la protéine de fusion serait plus soluble. De nombreux travaux d'ingénierie moléculaire ont été développés afin d'améliorer la solubilité des scFvs exprimés dans le cytoplasme. Ainsi, parallèlement à notre étude, l'équipe du Pr.E.Weiss, a mis au point une nouvelle méthode de production et de sélection de scFvs actifs dans le contexte cytoplasmique. De nouvelles possibilités de sélection de scFvs solubles susceptibles de lier 16E6 et d'inhiber la dégradation de p53 *in vitro* peuvent alors être envisagées [Philibert et al., 2007].

2. Transduction préférentielle des cellules HPV positives par des adénovirus de type 5.

a. Introduction générale

Malgré des résultats précliniques intéressants, la thérapie génique utilisant les adénovirus en tant que vecteur de transfert doit être améliorée et de nouvelles approches développées afin de contourner les obstacles majeurs à sa réussite à savoir un manque de spécificité et une certaine toxicité cellulaire résultante. Récemment, il a été montré que la liaison de l'Ad à son récepteur primaire naturel CAR est une étape limitante dans le transfert de gène [Bauerschmitz et al., 2002]. En effet, des données suggèrent que malgré une expression ubiquitaire à la surface de la plupart des cellules épithéliales saines, l'expression et/ou une localisation aberrante du CAR dans les tumeurs peut induire une résistance à l'infection par l'adénovirus [Cripe et al., 2001; Dmitriev et al., 1998; Hemmi et al., 1998; Kasono et al., 1999; Li et al., 1999; Rauen et al., 2002]. Différentes stratégies de modification du tropisme viral dont le but est de conférer une spécificité cellulaire à l'Ad ont alors été mises au point afin de cibler spécifiquement un type cellulaire. Elles sont regroupées selon trois axes majeurs : (i) la première repose sur la régulation et la restriction de la transcription du transgène à un tissu donné (ii) la seconde est basée sur une modification de l'affinité du virus pour les cellules cibles, et enfin (iii) la troisième vise à produire des particules virales à réplication dites conditionnelles.

i. Ciblage transcriptionnel

A la différence du ciblage transductionnel, le ciblage transcriptionnel, ne va pas modifier le tropisme du virus, mais restreindre l'expression du transgène aux cellules cibles. En effet, lors de l'infection de la cellule hôte, la transcription de la cassette d'expression contenue dans l'adénovirus va se dérouler au sein du noyau sous le contrôle des ARN polymérases, des facteurs de transcription, des activateurs et des répresseurs cellulaires (**Figure 37**). Ainsi, de manière générale, il est possible de réguler son expression en amont en utilisant des séquences dites *enhancer*.

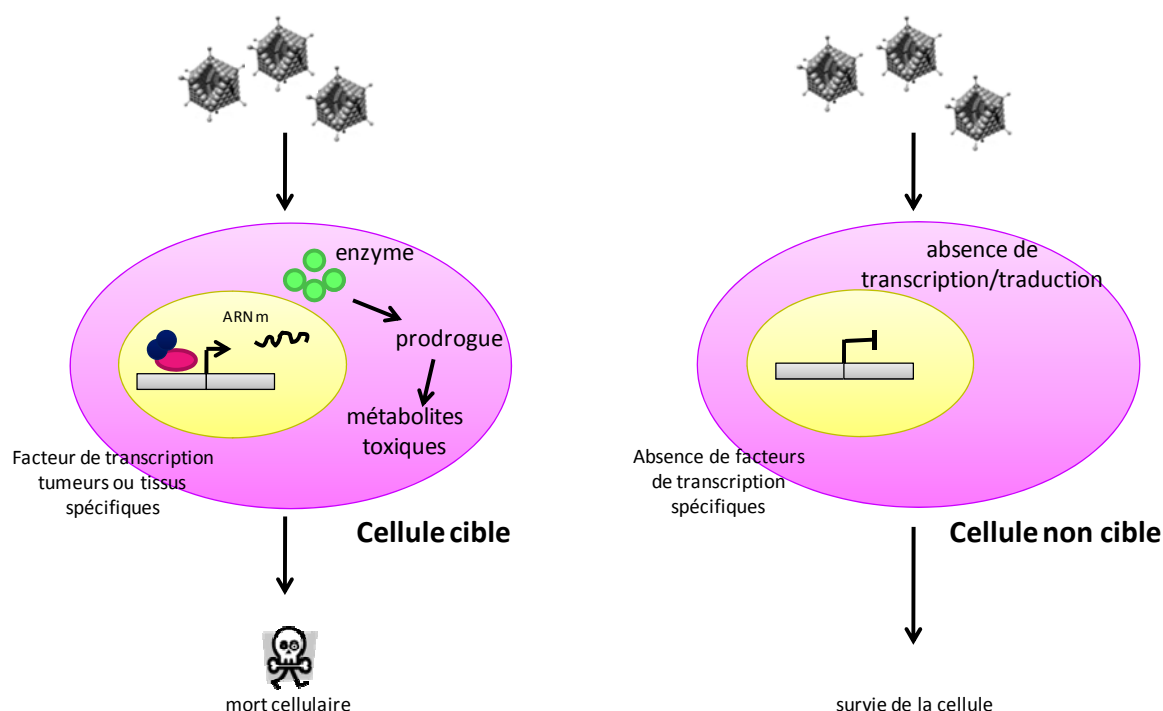


Figure 37 : Représentation schématique du mécanisme de ciblage transcriptionnel. Les adénovirus modifiés sont capables d’infecter l’ensemble des lignées cellulaires. Cependant, le transgène ne pourra être exprimé que dans les cellules exprimant les facteurs de transcription nécessaires à l’activation des promoteurs tissus ou tumeurs spécifiques.

Une première stratégie de ciblage transcriptionnel peut être envisagée en plaçant les gènes viraux ou le transgène sous le contrôle de promoteurs tissus ou tumeurs spécifiques : les TSP. Le virus sera alors capable d’infecter toute une variété de cellules, mais l’expression des gènes viraux et du transgène sera restreinte aux cellules exprimant les facteurs de transcriptions nécessaires à l’activation du TSP. Plusieurs promoteurs et séquences activatrices ont été étudiés et appliqués aux vecteurs adénoviraux (pour revue [Bauerschmitz et al., 2002; Haviv et al., 2002]). C’est le cas notamment, du promoteur du gène codant la hTERT (sous-unité de la télomérase humaine), du promoteur de la cyclo-oxygénase 2 [Kanerva et al., 2004] pour les cancers gastriques ou ovariens ou de l’ α -lactalbumine pour le traitement du cancer du sein [Anderson et al., 2000]. Une autre démarche va consister à utiliser des promoteurs inductibles soit par des agents chimiothérapeutiques (comme pour le promoteur du gène *erg1* qui est induit par le témozolomide [Yamini et al., 2004]), soit par des radiations [Anton et al., 2005] ou par une hypoxie [Chadderton et al., 2005]. Néanmoins, l’utilisation d’un tel ciblage n’empêche pas la dilution des vecteurs et leur rétention dans les cellules non cibles telles que les cellules du foie. De ce fait, une diminution significative de l’effet thérapeutique escompté peut être

observée. De plus, [Strauss, 1994] ont montré que les cellules saines également infectées pouvaient présenter un niveau basal d'expression du transgène qui serait plus ou moins toxique en fonction de sa nature.

ii. Ciblage transductionnel

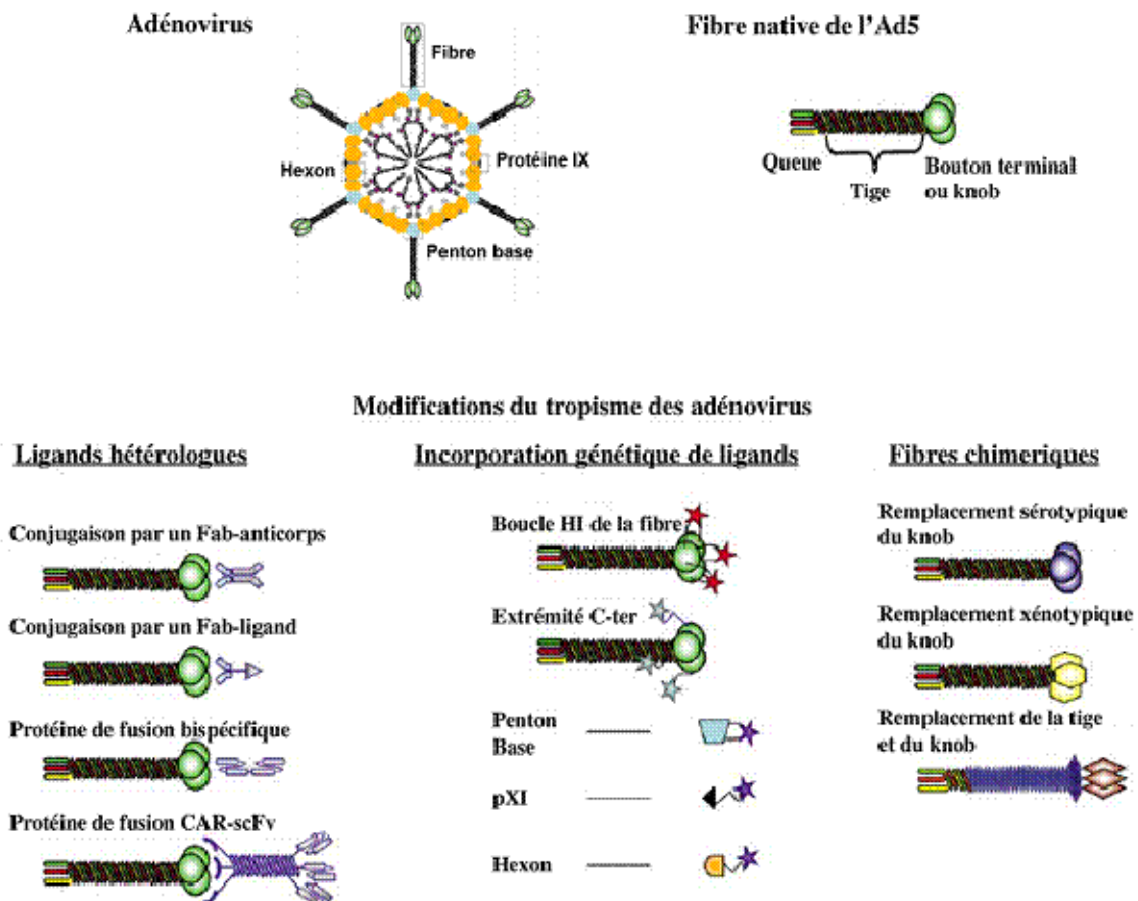


Figure 38 : Différentes stratégies de ciblage transductionnel des vecteurs adénoviraux (d'après [Mathis et al., 2005]).

L'élucidation des mécanismes d'entrée des adénovirus dans les cellules cibles a permis le développement d'un nouveau mode de ciblage dont l'objectif est d'induire une infection spécifique des cellules cibles sans affecter les tissus sains environnants : le ciblage transductionnel. Celui-ci repose sur une modification du tropisme naturel de l'adénovirus pour le récepteur CAR qui peut être de trois types : (i) une restriction de la transduction proprement dite, (ii) l'apport d'une nouvelle spécificité cellulaire ou (iii) la combinaison des deux (Figure 38).

Modification génétique de la fibre

Afin de rendre l'Ad « oncotrope », c'est-à-dire présentant une spécificité pour les cellules cancéreuses, de nombreuses modifications ont été apportées au niveau de la fibre. En effet, celle-ci constitue la protéine majoritairement impliquée dans l'interaction avec les récepteurs des cellules cibles.

Délétion complète de la fibre

La stratégie la plus radicale afin d'abolir le tropisme naturel du virus semble être d'éliminer la fibre de la surface du virus. Néanmoins, le succès de cette approche repose sur les capacités d'assemblage des virions en l'absence de fibre. En effet, même si, une étude a montré que des quantités appréciables de particules virales pouvaient s'accumuler dans les cellules infectées malgré l'absence du gène de la fibre; il a également été suggéré par l'utilisation de virus mutants thermosensibles que son ablation induirait une mauvaise maturation protéolytique de certaines particules virales, ainsi qu'une encapsidation incomplète de l'ADN viral [D'Halluin et al., 1980; Falgout and Ketner, 1988]. Ainsi, l'assemblage des particules sans fibre est possible, mais cette protéine reste indispensable à la maturation de la capsid [Legrand et al., 1999]. De plus, son rôle potentiel dans l'acidification des endosomes [Miyazawa et al., 2001] conduirait à une accumulation massive de particules sans fibre dans le cytoplasme et à la saturation des endosomes. Par conséquent, la fibre ne serait donc pas uniquement indispensable à la liaison aux cellules cibles, mais elle serait également importante pour les étapes ultérieures du cycle viral. Ainsi, les virus délétés pour la fibre ne semblent pas adaptés au développement de vecteurs ciblés et des stratégies plus fines ont du être envisagées.

Délétion du bouton terminal de la fibre

Une approche alternative à la délétion complète de la fibre a été développée. Elle consiste à remplacer le bouton terminal de la fibre, indispensable à la trimérisation et responsable du tropisme naturel du virus, par un motif de trimérisation exogène fusionné à une molécule de ciblage [Henning et al., 2002; Krasnykh et al., 2000; Magnusson et al., 2001; van Beusechem et al., 2000]. Ainsi, un motif de trente six résidus provenant de la protéine D du surfactant pulmonaire humain associé au peptide RGD-4C a été inséré à la place du bouton [Magnusson et al., 2001]. Le virus ainsi modifié a pu être produit et l'infection de cellules négatives pour le CAR via la voie des intégrines a été démontrée. Cependant, la

longueur de la tige, la présence de *linkers* flexibles ainsi que la taille et la structure du ligand influenceraient l'incorporation des fibres chimériques dans la capsid. D'autres motifs de trimérisation, tels que la fibratine du phage T4 [Krasnykh et al., 2001] ou un domaine de la protéine A de *Staphylococcus* [Henning et al., 2002] ont également été utilisés.

Insertion de ligands spécifiques au niveau de la fibre

La première tentative de modification de la fibre a consisté en l'incorporation au niveau de son extrémité C-terminale, d'un peptide GRP (*Gastrine Releasing Peptide*). Par la suite, des séquences RGD (liaison aux intégrines), polylysine (pK7, liaison aux héparanes sulfates) ou de liaison aux héparanes sulfates ont été incorporées avec succès [Wickham et al., 1997] et ont permis l'infection *in vivo* et *in vitro* de différents types cellulaires réfractaires à l'infection par l'Ad5 (cellules endothéliales et/ou musculaires lisses, [McDonald et al., 1999], cellules de myélomes [Gonzalez et al., 1999] et gliomes [Staba et al., 2000; Wu et al., 2002]). Les fibres ainsi modifiées sont correctement incorporées au sein de la capsid, les ligands sont toujours capables de lier leur cible et l'efficacité d'infection sur les cellules exprimant les molécules ciblées a pu être augmentée [Legrand et al., 1999; Michael et al., 1995; Wickham et al., 1997; Wickham et al., 1996]. Cependant, il semble que l'insertion de nombreux ligands empêche la trimérisation de la fibre et donc la génération de particules viables [Wickham et al., 1995; Yoshida et al., 1998]. En effet, la localisation de l'extrémité C-terminale au cœur du trimère de fibre [Xia et al., 1994] pourrait expliquer ces résultats, suggérant un rôle essentielle de cette région dans la stabilité de la structure quaternaire.

L'élucidation de la structure tridimensionnelle de la fibre par des études de cristallographie a permis de mettre en évidence des régions accessibles et non impliquées dans la trimérisation [Xia et al., 1994]. De manière alternative à l'extrémité C-terminale, ces régions peuvent représenter des sites potentiels d'insertion de ligands. Ainsi, un peptide peut être inséré au niveau de la boucle HI [Krasnykh et al., 1998]. La boucle HI présente en effet, plusieurs avantages : (i) elle est exposée à la surface du virus, (ii) elle n'est impliquée dans aucune interaction, (iii) sa longueur est variable d'un sérotype à l'autre ce qui laisse présager la possibilité d'incorporer un ligand de longueur variable, allant jusqu'à soixante trois amino-acides [Krasnykh et al., 2000]. De même, un peptide cyclique comportant le motif RGD-4C, identifié par phage display a été introduit avec succès et a permis d'augmenter l'infectivité de nombreux types cellulaires sur-exprimant les intégrines, de

manière indépendante du CAR [Dmitriev, 1998 #518]. Une double modification portant à la fois sur l'extrémité C-terminale (introduction polylysine pK7) et sur la boucle HI (introduction d'un motif RGD) a également pu être réalisée [Koizumi et al., 2003]. De manière intéressante, le mécanisme d'entrée de cet adénovirus doublement muté s'avère CAR-indépendant ce qui permet une infection des cellules CAR-négatives.

Modification des protéines de la capsid

L'hexon, protéine majoritairement exprimée à la surface du virion, a fait l'objet de très peu d'études sur la faisabilité d'incorporation de peptide. En effet, une forte instabilité de la particule virale a été observée lors de sa modification [Wu et al., 2005]. Cependant deux équipes ont pu montrer qu'il était possible d'incorporer des séquences peptidiques au niveau des régions hydrophiles non conservées entre les sérotypes appelées régions hypervariables (HRV). Ainsi, Vigne et col., ont incorporé une séquence dérivée d'une protéine du virus de la polyomélite et une séquence RGD dans la région hypervariable de la protéine hexon de l'Ad5 (HRV5) [Vigne et al., 1999]. Ils ont pu montrer que l'accessibilité de la séquence cible par un anticorps dépend fortement des séquences voisines mais aussi que la séquence RGD permettait un ciblage indépendant du CAR. De plus, ils ont montré que la substitution de l'HRV 5 induit une diminution drastique de la transduction de l'expression des transgènes au niveau des cellules hépatiques tandis que des adénovirus HRV5-modifiés sont toujours capables de transduire de manière efficace les hépatocytes [Vigant et al., 2008]. En effet, parallèlement à cette étude, il a été montré que la protéine hexon est responsable du transfert de gène dans le foie *in vivo* [Waddington et al., 2008] par une liaison de l'hexon au facteur de coagulation X humain. Wu et col., ont quant à eux incorporé une séquence de six histidines (His₆) dans les régions hypervariables des sérotypes 2 et 5 [Wu et al., 2005]. Cependant malgré l'accessibilité de cette séquence aux anticorps, ils n'ont pu montrer une dépendance de l'infection, ni un reciblage.

Comme pour l'hexon, très peu d'études ont porté sur la modification de cette protéine. Cependant un groupe a remplacé la séquence native haiRDGtfa, permettant la reconnaissance des intégrines $\alpha v\beta 3-5$, par la séquence eiLVDpst qui permet une fixation au intégrines $\alpha 4\beta 1$ exprimées fortement sur les lymphocytes et les monocytes [Wickham et al., 1995]. Par la suite, ils ont également incorporé un épitope dérivé de l'hémagglutinine du virus influenza et montré ainsi une légère infection dépendante du CAR dans des cellules

exprimant de manière stable un anticorps membranaire anti-hémagglutinine [Einfeld et al., 1999]. Pour un changement de tropisme viral, cette protéine semble très prometteuse. En effet, différentes protéines ont été incorporées avec succès à son extrémité C-terminale. Ainsi, par exemple, une fusion GFP a pu être réalisée rendant ainsi les virus fluorescents [Le et al., 2004; Meulenbroek et al., 2004] ou encore une fusion à l'HSV-TK a permis la visualisation des virus par tomographie à émission de positrons [Li et al., 2005]. L'Ad a également pu être redirigé vers les héparanes sulfates grâce à l'incorporation d'une séquence polylysine en pIX [Dmitriev et al., 2002]. L'une des contraintes majeures à l'incorporation en pIX vient de son expression au sein de la capsid et de son manque d'accessibilité. Cet obstacle semble cependant avoir été contourné par l'utilisation de *spaceur* en hélice α [Vellinga et al., 2004]. Néanmoins, pour un reciblage des adénovirus, les modifications de l'hexon ou de la protéine pIX restent moins efficaces qu'une modification de la fibre [Campos and Barry, 2006].

Ablation du tropisme naturel

Des études de mutagénèses ont permis de cartographier les résidus d'acides-amino impliqués dans l'interaction avec le CAR au niveau de la boucle AB, DE et DG [Kirby et al., 1999; Kirby et al., 2000]. Afin d'abolir l'interaction entre la fibre et le récepteur CAR, différents adénovirus ont été développés [Alemany and Curiel, 2001; Bewley et al., 1999; Einfeld et al., 1999; Jakubczak et al., 2001; Leissner et al., 2001; Santis et al., 1999; Smith et al., 2002]. Ces adénovirus sont incapables d'interagir avec le CAR mais ne présentent pas de spécificité pour un type cellulaire particulier. Nicklin et col., ont donc choisi de combiner les deux types d'approche à savoir : (i) l'abolition de l'interaction avec le CAR et (ii) l'apport d'une nouvelle spécificité cellulaire par modification génétique de la fibre afin d'obtenir des adénovirus infectant notamment spécifiquement les cellules endothéliales [Nicklin et al., 2003; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004] et pour diverses lignées cancéreuses.

Pseudotypage sérotypique

Les différents sérotypes d'adénovirus se distinguent en partie par un tropisme différent, lié à une reconnaissance de récepteurs cellulaires variables par le bouton terminale de la fibre [Defer et al., 1990; Stevenson et al., 1995]. Ainsi, par exemple, l'échange de la tige et du bouton de la fibre de l'Ad5 largement utilisé comme vecteurs de transfert de gènes, par ceux de l'Ad3 confère au vecteur un nouveau profil d'infection

[Krasnykh et al., 1998; Stevenson et al., 1995]. De même, le remplacement de la fibre du groupe C par celle du groupe D (sérotypage 17) augmente significativement l'infectivité des cellules pulmonaires humaines et du système nerveux central [Chillon et al., 1999]. Bien que donnant des résultats intéressants, cette approche présente l'inconvénient de dépendre du tropisme naturel des sérotypes existants, pour lesquels la nature et la distribution tissulaire des récepteurs sont peu connues. De plus, les applications potentielles sont limitées par la capacité de liaison au CAR d'un grand nombre de sérotypage [Roelvink et al., 1998]. Ainsi, les chances de trouver le virus permettant de cibler spécifiquement les cellules tumorales sont très faibles.

Pseudotypage xénotypique

	Modifications	Conséquences	Référence
Bouton terminal de la fibre de l'adénovirus humain (Ad2 ou 5) remplacé par le bouton de	CAV2 (Canin)	Ciblage des cellules du cancer ovarien	[Glasgow et al., 2004]
	CAV1 (Canin)		[Stoff-Khalili et al., 2005]
	BAV4 (Bovin)	Absence d'interaction avec le CAR Ciblage des cellules ovariennes	[Renaut et al., 2004]
	OV7 (Ovin)	Transduction des cellules CAR négatives Expression du transgène diminué dans le foie Nouvelles spécificité pour les cellules rénales et les cellules des muscles squelettiques	[Nakayama et al., 2006]
Vecteur d'origine animal utilisé	CELO (Avian)	Reconnaissance du CAR humain Absence de réaction croisée à un anticorps anti-Ad5	[Francois et al., 2001; Shashkova et al., 2005]
	CV68 (Chimpanzé)	Cellules CHO résistantes Interaction avec le CAR humain Infection des cellules dendritiques humaines	[Cohen et al., 2002; Farina et al., 2001]

Tableau 12 : Pseudotypage xénotypique et utilisation de vecteurs non humains.

Une source alternative de vecteurs est constituée par des Ad isolés chez les non-humains (chien, singe, mouton, vache ou poule) qui sont capables d'infecter les cellules humaines sans s'y propager. Ces vecteurs conservent théoriquement les avantages des Ad,

mais, insensibles à l'immunité préexistante contre les Ad humains, ils permettraient ainsi d'administrer des doses inférieures de vecteur pour une même efficacité *in vivo*. Ainsi deux types de vecteurs non humains ont été développés : (i) des pseudotypés utilisant comme base l'adénovirus de type 2 ou 5 (ii) des vecteurs dérivant de vecteurs non humains (**Tableau 12**).

Utilisation de molécules adaptatrices

Une nouvelle spécificité cellulaire peut être conférée aux vecteurs adénoviraux sans modification génétique par couplage de la capsid virale à des ligands hétérologues. Cette technique repose sur l'utilisation d'un ligand bi-spécifique ou bi-fonctionnel. Une telle molécule va être capable de reconnaître d'une part, une protéine de la capsid virale telle que la fibre ou la base du penton et d'autre part, un récepteur cellulaire. Un des avantages majeurs du système réside dans le fait que le tropisme naturel du virus est masqué, probablement par encombrement stérique. De plus, une protection vis-à-vis des anticorps neutralisants a été observée *in vitro et in vivo* [Croyle et al., 2001; Drapkin et al., 2000; Fisher et al., 2001]. Largement utilisés, les ligands peuvent être de différentes natures : (i) anticorps bispécifiques, (ii) protéine de fusion bispécifique, (iii) couplage chimique directe d'un ligand (utilisation de PEG) (iv) couplage via un pont biotine-avidine. Ainsi, par exemple, un conjugué utilisant un scFv anti-fibre couplé à un anticorps anti-CEA a été utilisé sur des lignées cancéreuses du sein [Korn et al., 2004]. Bien que ces approches aient montré leur efficacité, leur développement industriel semble limité par plusieurs facteurs : (i) la stabilité du complexe virus-ligand *in vivo* n'est pas connue, (ii) la répartition du ligand n'est pas forcément uniforme sur les virions ce qui fait apparaître des différences au niveau des lots produits conduisant à une augmentation des contrôles de qualité. (iii) l'infection via l'utilisation du CAR semble ne pas être totalement abolie [Israel et al., 2001].

Double ciblage

Les ciblage transcriptionnels et traductionnels peuvent être combinés afin de créer des adénovirus doublement ciblés. Ainsi, il est possible allier la sécurité due à l'utilisation de TSP à l'efficacité d'une transduction spécifique. Un tel ciblage a été testé *in vitro et in vivo* dans le cas du cancer ovarien. L'utilisation d'une molécule adaptatrice (*sCAR-fibritin-anti-erbB2 adapter*) combiné à un promoteur SLPI a augmenté la capacité de transfert génique

dans les cellules cibles en diminuant la contamination des cellules non cibles [Barker et al., 2003].

iii. Ciblage de la réplication et utilisation d'adénovirus répliatifs conditionnels

L'un des plus gros inconvénients quant à l'utilisation de vecteurs non répliatifs est leur manque d'efficacité en terme de transduction de masse tumorale. Afin de contourner cet obstacle des adénovirus oncolytiques spécifiques appelés adénovirus répliatifs conditionnels (CRADs) ont été développés. L'infection des cellules tumorales par de tels virus induit une réplication, une oncolyse et le relargage de particules virales dans l'environnement. Ce cycle répliatif permet une amplification locale importante de la dose appliquée. En effet, en théorie, un CRAD se répliquera jusqu'à ce que les cellules cibles cancéreuses permissives à sa réplication soient détruites par lyse. [Hemminki and Alvarez, 2002; Kanerva and Hemminki, 2004]. Les CRADs produits vont alors pouvoir migrer dans l'organisme et infecter des métastases distantes. De plus, les réactions immunitaires induites contre les cellules ciblées permettent d'amplifier l'éradication des cellules tumorales. Les cellules « saines » vont être épargnées du fait d'une non-réplication qui peut être de deux types : (i) Des mutations présentes dans le génome viral peuvent être compensées dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules saines. Ces mutants peuvent être construits en incorporant des mutations notamment au niveau de la région E1A ou B. Dans ce cas, la protéine E1 produite est incapable de lier les partenaires cellulaires nécessaires à la réplication virale dans les cellules saines mais peut le faire dans les cellules cancéreuses et (ii) Des promoteurs inductibles vont pouvoir être utilisés pour revue [Bauerschmitz et al., 2002; Hemminki and Alvarez, 2002]). Les TSP vont remplacer les promoteurs viraux endogènes afin de restreindre la réplication virale aux cellules cibles. De manière conventionnelle, le TSP réglera E1A mais il peut aussi réguler d'autres gènes précoces. (Ainsi, il a été montré que les régions E1A et B sous le contrôle du promoteur de l'hTERT permettent une augmentation de la réplication au niveau des cellules cibles d'un facteur mille par rapport aux cellules saines *in vitro* [Huang et al., 2004]. Une combinaison des deux approches a également été envisagée en utilisant un TSP contrôlant une région E1 mutée [Nettelbeck et al., 2002].

Le premier CRAds publié et le plus connu est l'ONYX-015 ou dl520 [Bischoff et al., 1996]. Ce virus comporte deux mutations au niveau du gène codant la protéine E1B-55kDa, impliquée entre autres dans l'inactivation de p53. Il est donc incapable de se multiplier dans les cellules saines qui expriment p53 mais se réplique de manière fonctionnelle dans les cellules p53 négatives ce qui est le cas dans pour la majorité des cellules tumorales. Cependant, la protéine E1B présente d'autres propriétés tels que le transport et la transcription des ARNm tardifs. Sa mutation pourrait donc induire une réplication inefficace en comparaison avec l'Ad sauvage [Dix et al., 2001]. Un autre virus contenant une délétion de 24 pb dans la région E1A a également été construit. Celui-ci exprime une protéine E1A mutée incapable d'interagir avec la protéine cellulaire pRB, mais toujours capable d'induire la transcription des gènes viraux. De ce fait, ce mutant se réplique uniquement dans les cellules pour lesquelles la voie pRB est défective [Casallo et al., 2003; Fueyo et al., 2000] ce qui semble le cas dans la plupart des cancers. Ces approches sont très prometteuses dans la mesure où elles permettent d'amplifier l'effet oncogénique par la lyse des cellules. Cependant, elles n'empêchent pas l'infection des tissus sains et notamment des cellules spléniques.

b. Contexte scientifique

Récemment, notre équipe a identifié, par *phage display*, des peptides capables d'adresser spécifiquement un virus (bactériophage) ou une protéine (GFP, *Green Fluorescent Protein*) dans les cellules SiHa (HPV16 positives). Ces peptides se sont avérés être un outil de choix pour le développement de vecteurs Ads capables de cibler de manière préférentielle les cellules cancéreuses du col de l'utérus infectées par HPV. Ces Ads pourront servir de vecteurs pour l'introduction de molécules thérapeutiques au sein des cellules tumorales, sans affecter les tissus sains environnant, diminuant ainsi considérablement les effets secondaires associés et les risques de rejet par le système immunitaire. Peu d'exemples d'un tel ciblage sont disponibles dans la littérature. Un vecteur adénoviral comportant à la fois un motif RGD inséré dans la boucle HI et une séquence polylysine en C-terminale du bouton de la fibre a pu être développé par [Rein et al., 2004]. Cet Ad est capable de transduire de manière plus efficace les cellules cervicales cancéreuses issues de lignées. D'autres travaux ont montré un effet oncolytique accru dans les lignées cancéreuses via l'utilisation de CRAd

[Balague et al., 2001] présentant un motif RGD au niveau de la boucle HI de la fibre et exprimant un mutant de p53 résistant à la dégradation par l'oncoprotéine E6 [Heideman et al., 2005]. Plus récemment, [Hsu et al., 2008] ont développé un CRAds, l'Ad-KFH qui est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur SCCA2 (*squamous cell carcinoma antigène 2*). Cet Ad se réplique et lyse de manière spécifique les cellules cancéreuses cervicales qui produisent le SCCA2. Bauerschmitz et col., ont également utilisé l'Ad5- Δ 24 RGD dans le cadre d'un traitement local et systémique du cancer cervical [Bauerschmitz et al., 2004]. L'ensemble de ces travaux a permis soit d'amplifier la réplication virale au sein des cellules cancéreuses soit d'améliorer l'efficacité de transduction. Cependant aucun travail n'a combiné l'abolition du tropisme naturel du virus à l'apport d'une nouvelle spécificité. Des résidus essentiels pour l'interaction avec le récepteur CAR ont été mis en évidence par des expériences de mutagénèses dirigées, principalement au niveau de la boucle AB, du feuillet β B, de la boucle FG [Kirby et al., 2000; Roelvink et al., 1999] et au niveau du feuillet β EF. Ces modifications ont pu être testées soit dans un contexte de fibre non incorporée soit dans un contexte capsidique. Ainsi, Jakubczak et col., ont montré que plusieurs modifications au niveau des boucles AB et CD abolissent de manière efficace l'interaction de l'adénovirus avec son récepteur CAR [Jakubczak et al., 2001]. La création d'un virus ciblant de manière préférentielle les cellules HPV positives a donc nécessité l'introduction de deux types de modifications : (i) l'une permettant d'abolir la liaison au récepteur primaire CAR (ii) l'autre apportant un nouveau tropisme au virus. Nous avons choisi d'introduire la mutation KO1 (S408-P409A) [Jakubczak et al., 2001] au niveau de la boucle AB afin d'abolir l'interaction avec le CAR. Des virus porteurs d'une telle modification ont été générés et en conservant une structure quaternaire correcte de leur fibre et sans présenter de défaut de maturation. Cette mutation présente en effet plusieurs avantages : (i) il s'agit de l'une des plus drastiques pour abolir la liaison au CAR (ii) elle n'interfère pas sur l'incorporation de la fibre au sein de la particule virale [Leissner et al., 2001] (iii) plusieurs travaux ont utilisé cette mutation seule ou en combinaison avec des peptides [Nicklin and Baker, 2002; Nicklin et al., 2003; Nicklin et al., 2001; Nicklin et al., 2004]. Afin de conférer un nouveau tropisme aux adénovirus, les ligands peptidiques spécifiques des cellules HPV positives précédemment identifiés ont été utilisés. En effet, Krasnykh et col., ont montré qu'un tel peptide pouvait être incorporé dans la boucle HI et exposé à la surface du virus sans altérer la structure trimérique de la fibre

[Krasnykh et al., 2001]. De plus, comme nous l'avons vu cette boucle présente en effet plusieurs avantages. Cependant, la modification du génome adénoviral requiert de longues et laborieuses étapes de clonage, limitées, entre autres par l'absence de sites uniques de restriction au niveau des régions à modifier. Ainsi, afin de tester de manière rapide, ce concept, nous avons choisi d'utiliser le système mis au point dans le laboratoire de notre collaborateur (D. Von Seggern, Scripps Institut, La Jolla, Californie, USA). Dans celui-ci, les cellules 293 T (contenant la région E1 nécessaire à la réplication virale) sont infectées par un Ad recombinant dépourvu de fibre, puis transfectées par un plasmide codant la fibre modifiée. Celle-ci est alors incorporée au niveau de la capsid virale par complémentarité sans modification du génome. Ainsi, il nous a été possible de produire de manière rapide (environ une semaine par préparation) des Ads dits « pseudotypés » (**Figure 29 Matériel et Méthodes**).

Les Ads pseudotypés nous ont permis de mettre en évidence, que la combinaison des mutations abolissant la liaison au CAR et l'introduction de peptides ne modifie ni la trimérisation de la fibre nécessaire à la bonne maturation du virion, ni sa capacité d'intégration à la surface de la capsid. Lors de tests de transduction sur des lignées HPV positives et négatives, nous avons également pu montrer que l'ablation de l'interaction avec le CAR par l'introduction de la mutation KO1 est suffisante pour restreindre le tropisme de l'Ad *in vitro*. De plus, l'insertion additionnelle des peptides internalisants sélectionnés par *phage display*, confère aux Ads une capacité de transduction préférentiellement dans les cellules transformées par HPV. Ces résultats ont donné lieu à une publication dans le journal *Archive in Virology* [Boulade-Ladame et al., 2008].

Publication n°2

Modification of adenovirus type 5 tropism for a preferential transduction of human papillomavirus-positive cancer cells.

Charlotte Boulade-Ladame*, Magali Lagrange*, Georges Orfanoudakis,
François Deryckère

* Co-premiers auteurs

Signalement bibliographique ajouté par :

l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Modification of adenovirus type 5 tropism for a preferential transduction of human papillomavirus-positive cancer cells

Magali LAGRANGE, Charlotte BOULADE-LADAME, Georges ORFANOUDAKIS and François DERYCKERE

***Archives of Virology*, 2008, Volume 153, Numéro 10, pages 1921-1925**

Copyright © 2009 Springer. Part of Springer Science+Business Media

Publication n° 2 : p. 131-.... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0185-8>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

c. Discussion

Malgré la multitude de publications présentant l'identification de peptides se fixant de manière spécifique à des molécules de surfaces ou à des cellules, très peu de résultats positifs ont été obtenus en terme de reciblage de vecteurs adénoviraux. Néanmoins, à l'issue de ce travail, nous sommes parvenus à produire des adénovirus dits « pseudotypés » comportant deux modifications au niveau du bouton terminal de la fibre (i) l'une abolissant l'interaction avec le récepteur CAR et (ii) l'autre permettant un ciblage préférentiel des cellules HPV positives validant ainsi une première approche de ciblage de vecteurs adénoviraux aux cellules HPV. Dans la littérature, seulement deux autres peptides ont donné des résultats positifs : (i) le peptide RGD-4C, isolé lors d'une sélection par phage display *in vitro* sur les intégrines $\alpha\beta 5$ [Koivunen et al., 1995] et *in vivo* [Pasqualini et al., 1997]. Mais les intégrines sont exprimées de manière ubiquistes au niveau de nombreux tissus et types cellulaires, ce qui ne confère pas au virus un tropisme virus-spécifique. (ii) le peptide HEW, isolé lors d'une sélection par *phage display* sur une lignée cellulaire du cancer du colon WiDr [Rittner et al., 2007]. Celui-ci est capable de conférer une spécificité cellulaire *in vitro* pour les cellules WiDr mais pas dans un contexte *in vivo*. Cette spécificité cellulaire a été augmentée par l'ablation de la liaison au CAR. La comparaison des résultats obtenus avec l'étude de Robinson et al utilisant des phages fusionnés aux mêmes peptides montre des différences au niveau de la spécificité d'internalisation. Ces différences peuvent s'expliquer tout d'abord par les méthodes de détection utilisées (expression de la GFP versus immunofluorescence) mais aussi par des mécanismes d'entrée cellulaire probablement distincts. En effet, les peptides sont présentés de manière différente par les phages et les adénovirus.

d. Résultats complémentaires

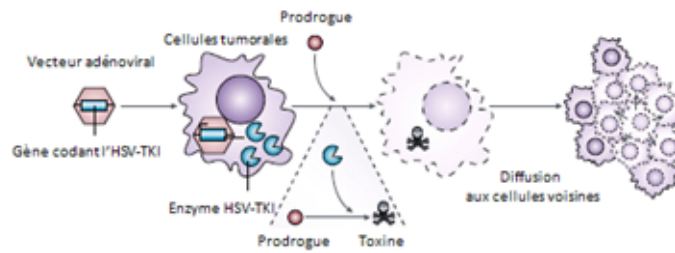
Suite à ces résultats très encourageants, nous avons décidé de développer des vecteurs Ads génétiquement modifiés et donc de cloner la séquence codant la fibre modifiée au sein du génome de l'Ad. En effet, des Ads génétiquement modifiés sont nécessaires pour envisager de les utiliser comme vecteurs de transfert de gènes mais aussi pour d'éventuels

essais *in vivo* dans les souris car cette approche nécessite un titre élevé et de grandes quantités de virus difficilement obtenues avec les Ads pseudotypés.

La construction de ces virus a donc nécessité plusieurs modifications au niveau du génome viral [Chartier et al., 1996; He et al., 1998]: (i) les virus ont été rendus non répliatifs afin de limiter les problèmes de sécurité et d'accroître la capacité d'intégration d'un transgène par délétion complète de la région E1 (ii) La séquence codant la fibre modifiée a été insérée dans le génome viral par recombinaison homologue en système bactérien (iii) le gène codant la thymidine kinase de l'herpès simplex virus de type I a été inséré en remplacement de la région E1. Ainsi, la génération d'un tel vecteur ciblé permettant l'expression d'un gène suicide devrait induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses. Malgré les nombreuses avancées en terme de clonage, les étapes essentielles à l'élaboration de vecteurs génétiquement modifiés se sont avérées longues et laborieuses. En effet, chaque clonage nécessite l'élaboration d'un vecteur navette et une recombinaison homologue dans le système bactérien avec un vecteur comportant le génome adénoviral (**Figure 40**). Ce système s'avère donc dépendant de la présence d'un site unique de restriction dans le génome viral au niveau de la région que l'on souhaite échanger. Naturellement le génome de l'Ad5 présente peu de sites de restrictions uniques tels que les sites *Cla* I dans la région E1 et *Spe* I au niveau de l'unité E3. Néanmoins aucun site n'existe au niveau de la région codant la fibre. Nous avons donc choisi d'en introduire un : le site *Swa* I. Les régions codant la fibre modifiée (mutation KO1 et présentation ou non des peptides) et la thymidine kinase ont été introduites de manière séquentielle. Tout au long des étapes de clonage et afin de vérifier que l'ensemble des modifications apportées n'a pas d'effet néfaste sur le génome viral divers contrôles ont été menés. Dans un premier temps, la structure quaternaire de la fibre a été analysée (**Figure 41.A**). Pour cela, les protéines totales issues de cellules HEK-293 transfectées avec les différentes constructions ont été extraites et analysées par *western blot*, comme dans le cas des adénovirus « pseudotypés ». Nous avons ainsi montré que la trimérisation et l'incorporation de la fibre n'ont pas été affectées par ces deux modifications génétiques. Dans un second temps, l'expression et la fonctionnalité de la thymidine kinase ont été vérifiées. Cette enzyme virale permet la phosphorylation d'un certain nombre d'analogues nucléotidiques tels que les analogues de la guanosine. Nous avons choisi d'utiliser le ganciclovir (GCV). Cette molécule est un agent anti-herpétique bien connu. Les thymidines kinases endogènes de la cellule eucaryote présentent une faible

affinité pour le GCV. De ce fait, il est très peu phosphorylé en temps normal. Néanmoins, lorsque le gène de l'HSV-TK est transféré dans les cellules à fort potentiel de division telles que les cellules cancéreuses, la thymidine kinase du virus de l'herpès provoque la phosphorylation du GCV en GCV mono-phosphate. Sous cette forme, le GCV est alors à nouveau phosphorylé par les thymidines kinases endogènes en GCV di-phosphates puis tri-phosphates. Cette forme active est ensuite utilisée par la cellule lors de la synthèse d'ADN à la place de la déoxyguanosine. Sa présence inhibe alors la progression de l'ADN polymérase et donc l'élongation du brin d'ADN conduisant la mort des cellules (**Figure 39**). Afin de confirmer l'expression de la protéine TK dans notre système, les cellules Cos-7 ont été transfectées à l'aide des plasmides navettes et finaux. Quarante huit heures après, la protéine TK a été révélée par immunofluorescence. L'expression de la TK s'avère homogène au sein des cellules transfectées. L'efficacité de la TK a ensuite été vérifiée après transfection des cellules Cos-7 et traitement avec des doses croissantes de GCV (0 à 50 µg/mL). Par microscopie, en contraste de phase, une forte mortalité des cellules traitées avec 50 µg/mL de GCV est observée. Parallèlement, la prolifération cellulaire des cellules Cos-7 ainsi traitées a pu être évaluée par un test méthyl-thiazol-tétrazolium (MTT). Seules les cellules Cos-7 transfectées deviennent sensibles à la prodrogue ce qui prouve bien une expression fonctionnelle de la TK. De plus, un effet dose dépendant du GCV sur la viabilité cellulaire est observé.

A.



B.

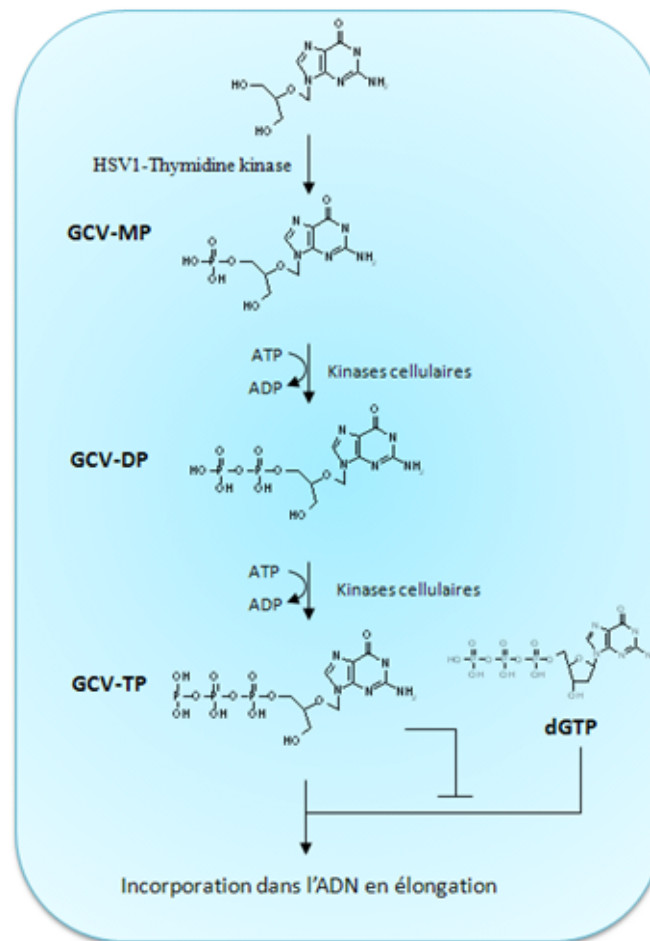


Figure 39 : Utilisation des gènes suicides. A. Transfert de gène suicide Le vecteur adénoviral contient le gène codant la thymidine kinase de l'HSV. Cette enzyme va assurée la conversion du substrat inactif (prodrogue) GCV en un produit toxique capable de diffuser dans les cellules avoisinantes. Dans le cadre d'un traitement, l'administration de la prodrogue et du substrat doit être locale (d'après [McCormick, 2001]) **B. Mécanisme d'action du Ganciclovir** Le ganciclovir (GCV), pro-médicament inactif et analogue de la déoxyguanosine, est phosphorylé en un composé monophosphaté: le GCV monophosphate (GCV-MP) par la thymidine kinase du virus de l'*Herpes simplex* de type 1 (HSV1). Ce GCV-MP est ensuite métabolisé en GCV-diphosphate (GC-DP) puis tri-phosphate (GCV-TP) par des kinases cellulaires. Sous sa forme active le GCV (ou GCV-TP) entre en compétition avec le 2'-déoxyguanosine triphosphate (dGTP) en tant que substrat pour l'ADN polymérase. L'insertion dans l'ADN en élévation provoque un arrêt prématuré de sa synthèse et donc la mort des cellules en division [Moolten, 1986].

Les étapes de clonage étant réalisées, la production de tels virus a nécessité des mises au point du fait de leur incapacité à transduire les cellules 293 classiquement utilisées pour une production d'Ads (**Figure 40**). Pour cela deux techniques ont été employées : (i) les plasmides contenant les génomes modifiés ont été linéarisés puis transfectés dans les cellules 633 [Von Seggern et al., 1999] transcomplémentants à la fois la région E1 et la fibre sauvage. Les virions produits sont alors des chimères exprimant à leur surface deux types de fibres : la fibre sauvage et la fibre modifiée. Après plusieurs cycles d'amplification, un dernier passage dans les 293 est alors effectué afin d'obtenir des particules virales exprimant uniquement la fibre modifiée et (ii) parallèlement, à la place des cellules 633, des cellules GH389, dérivant de cellules HeLa transfectées de manière stable par la région E1 de l'Ad, ont été utilisées pour réaliser les premiers cycles d'amplification. Grâce à cette technique, on s'affranchit de la production de virions chimériques. Dans les deux cas, la production n'a pas abouti à des taux de virus suffisants pour une étude plus approfondie.

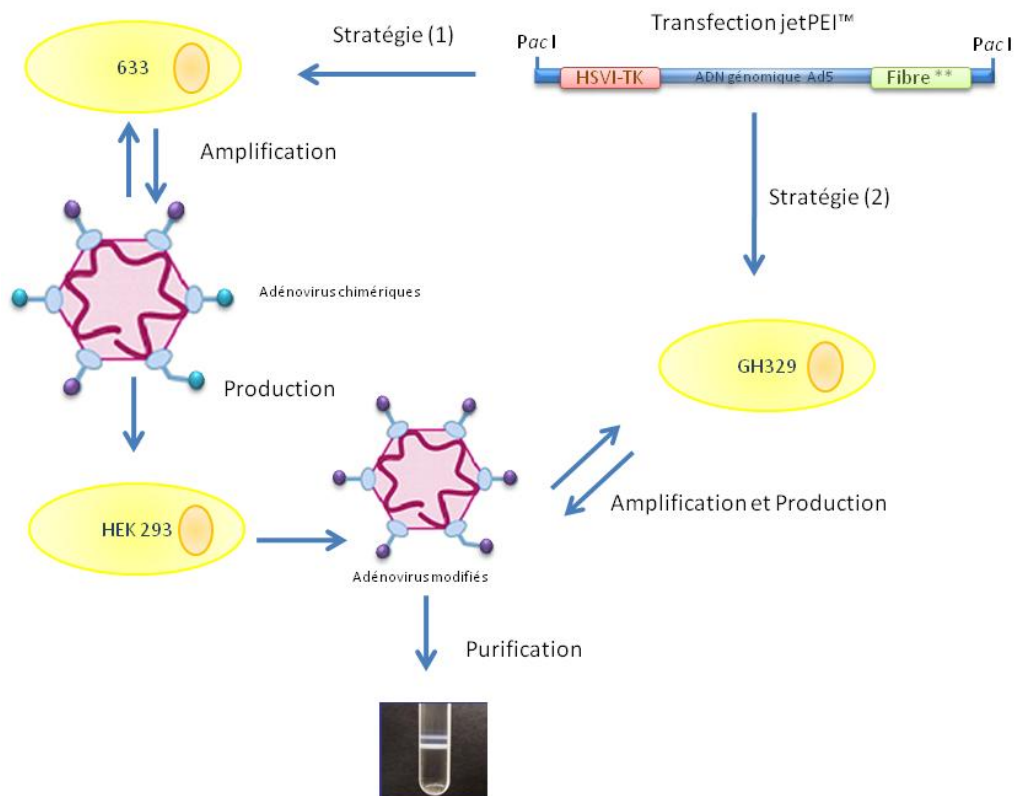


Figure 40 : Stratégies de production des virus recombinants En violet la fibre sauvage, en bleu la fibre modifiée

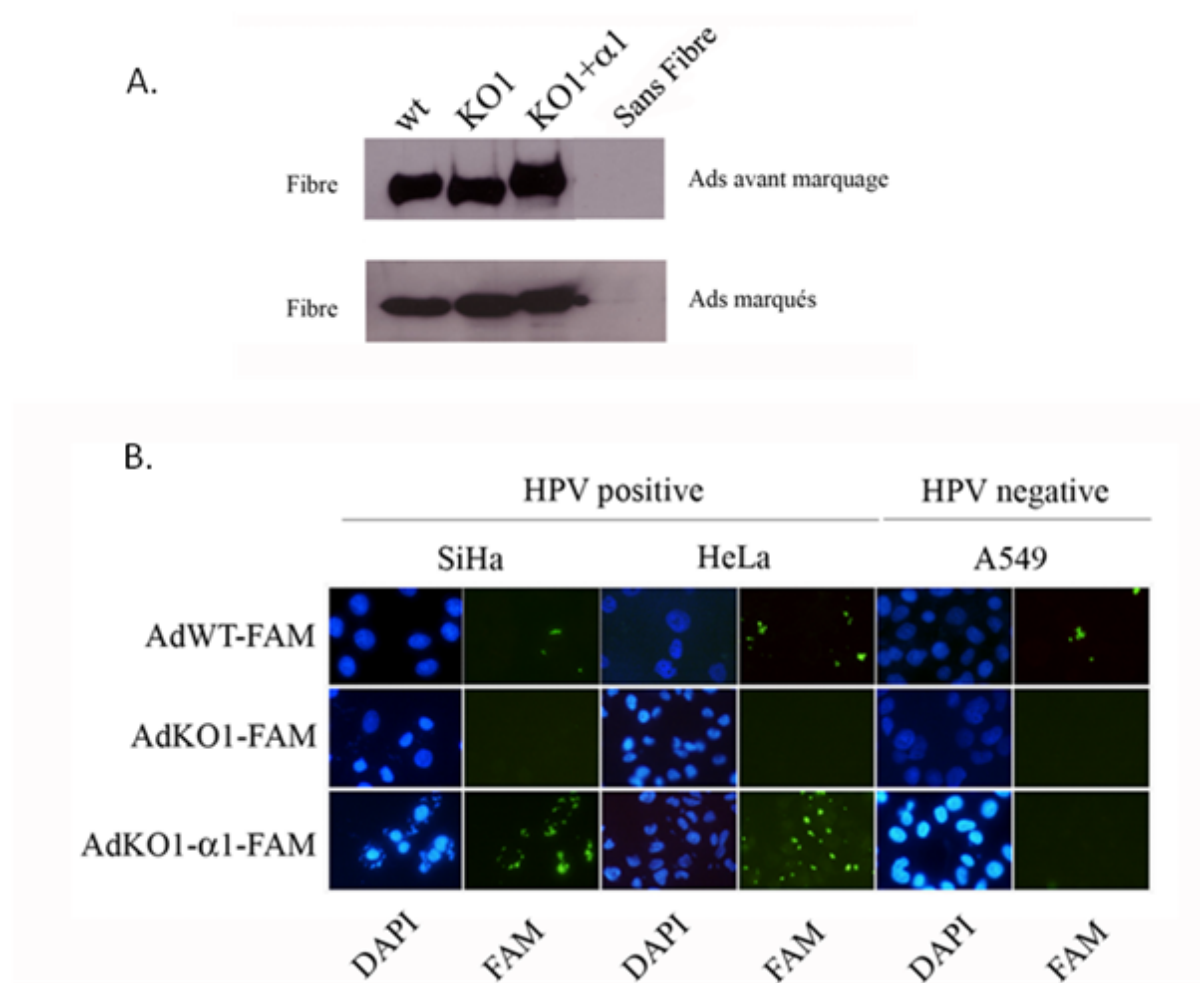


Figure 41 : Caractérisation des adénovirus pseudotypés : A. Analyse par *Western blot* des fibres. Une quantité équivalente de particules virales (5×10^9 particules) a été analysée par gel SDS-PAGE et western-blot. B. Endocytose des différents adénovirus dans les lignées cellulaires. Les cellules SiHa (HPV16) HeLa (HPV18) et A549 (HPV négative) ont été incubées avec des adénovirus marqués au FAM, puis examinés par microscopie par fluorescence.

Afin de comprendre pourquoi il n'est pas possible de produire en quantité suffisante de tels virus, nous avons choisi d'étudier les mécanismes impliqués dans leur internalisation. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé les virus pseudotypés qui ont servi à la validation du concept. Afin de pouvoir suivre les différentes étapes d'internalisation, les virus ont été conjugués de manière covalente à des fluorophores : la 5 (6)-carboxyfluorescéine succinimidyl ester (FAM) ou le Cy-3 [Leopold et al., 1998]. Ces agents se fixent au niveau des groupements amines libres des résidus de lysine ainsi qu'au niveau N-terminale de chaque protéine. L'efficacité de marquage ainsi que l'accessibilité des protéines ont été tout d'abord confirmés par analyse de la fluorescence émise. Le marquage s'est avéré efficace et celui-ci se fait préférentiellement sur les protéines de l'hexon, de la base du

penton et de la fibre. Certaines protéines internes au virion sont également marquées comme les protéines V, VI et VII. Le marqueur serait donc incorporé au sein de la capside et permettrait un marquage de la majorité des protéines virales. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'internalisation des virus et aussi leur devenir, les virus marqués ont été transduits dans les cellules HPV positives ou non (**Figure 41 B.**). Nous avons utilisé à notre avantage la présence d'un site tryptique au niveau d'une boucle exposée de la protéine hexon de la capside afin d'éliminer les virus non fixés à la surface cellulaire (Jornvall 80). Du fait de l'expression ubiquitaire du CAR, l'adénovirus sauvage est capable d'entrer dans l'ensemble des lignées. Parallèlement l'AdKO1 est déficient et l'AdKO1- α 1 ne transduisent que les cellules HPV positives. Une co-incubation des cellules SiHa avec du virus sauvage et l'AdKO1- α 1, montre une absence de colocalisation qui suggère des mécanismes d'entrée ou des voies cellulaires distincts qui restent à déterminer (**Figure 42 D.**). La suite de notre étude a porté uniquement sur les cellules SiHa dans la mesure où elles ont servi à la sélection des peptides [Robinson et al., 2005]. La première étape d'internalisation des virus dépend d'une liaison de haute affinité entre les protéines de la fibre et les récepteurs cellulaires de surface [Bergelson et al., 1997]. Pour l'AdKO1- α 1, cette liaison est inhibée par l'addition de trypsine 0,025% (**Figure 42 A.**). Ceci suggère que d'autres protéines participent à la liaison des virus pseudotypés à la surface des cellules SiHa. Grâce au marquage membranaire de la surface cellulaire par la phalloïdine et aux sections obtenues par microscopie confocale, nous avons confirmé que les adénovirus pseudotypés étaient bien endocytés au niveau des cellules SiHa (**Figure 42 B.**). Cette internalisation s'avère maximale à 60 minutes. Seulement quelques virus sont endocytés en 15 min (**Figure 42 C.**). Ceci suggère que le mécanisme d'internalisation serait différent de celui utilisé par le virus sauvage et prendrait plus de temps. En effet, l'Ad5 est classiquement localisé dans les endosomes acides 30 min après l'endocytose [Greber et al., 1993]. Le FAM utilisé pour marquer les adénovirus est sensible aux variations de pH. Son émission maximum est observée à pH basique et diminue rapidement lors de son acidification. Ce qui implique que les virus visualisés à 60 minutes ne sont pas dans les endosomes acides mais dans un compartiment où le pH serait d'environ 6,5 tel que les endosomes primaires.

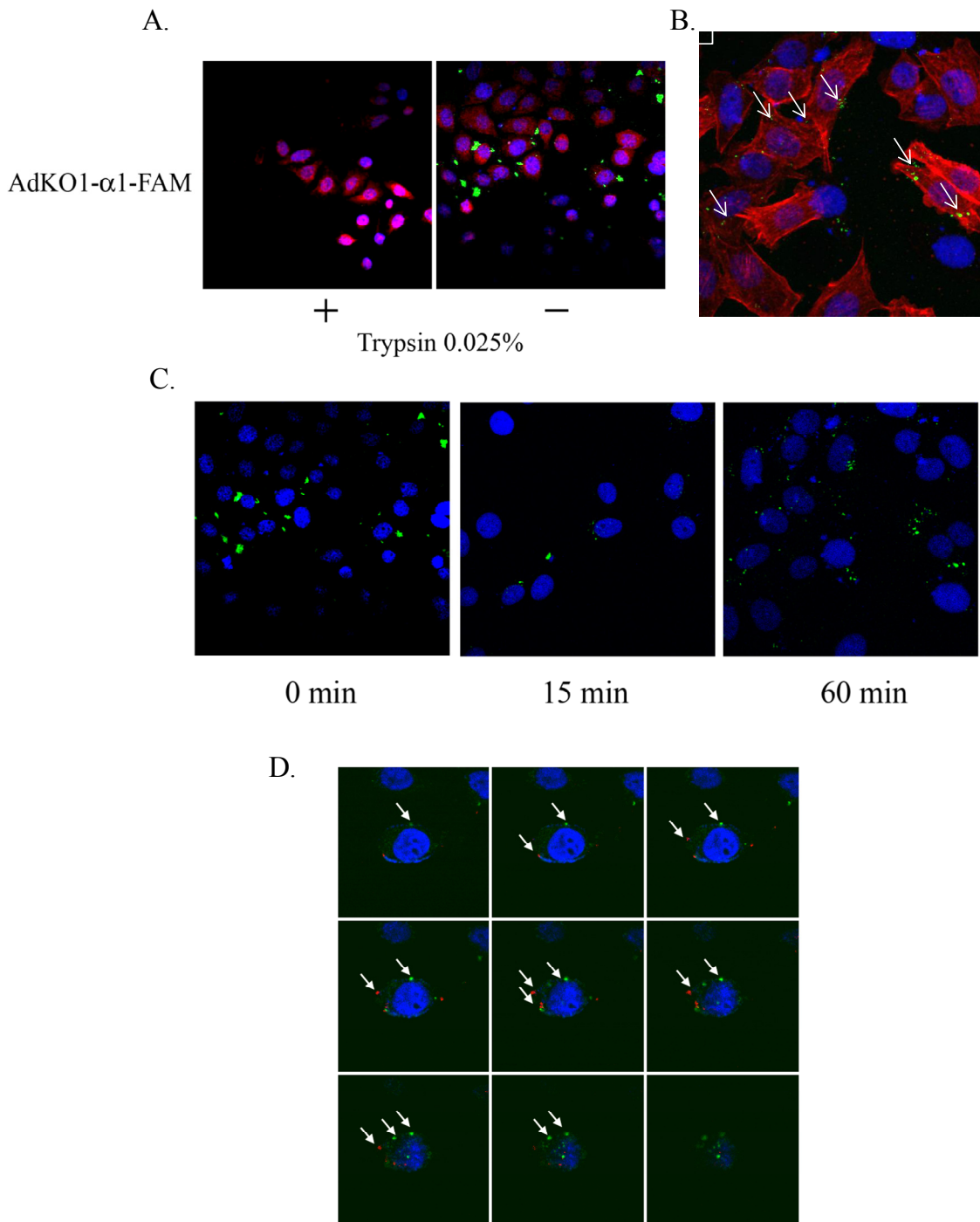


Figure 42 : Endocytose des adenovirus pseudotypés A. Endocytose spécifique de l'Ad KO1- α 1 dans les cellules SiHa. Les cellules sont incubées pendant 45 min à 4°C en présence d'Ad KO1- α 1 marqué au FAM à raison de 2×10^5 particules par cellule. Cette période est suivie d'une incubation d'une heure à 37°C et d'un rinçage ou non avec de la trypsin 0,025 %. B. Visualisation des particules virales au sein des SiHa par microscopie confocale. C. Cinétique d'infection des cellules SiHa par l'Ad KO1- α 1. D. Absence de colocalisation de l'Ad5 sauvage avec Ad KO1- α 1 dans les cellules SiHa. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI, les membranes cellulaires à la phalloïdin TRITC. L'ensemble des images de fluorescence est collectée par microscopie confocale. L'Ad5 sauvage est conjugué au Cy-3 (en rouge), l'Ad KO1- α 1 est conjugué au 5,6 FAM (en vert).

L'ensemble de cette étude n'explique cependant pas la production de virus à un titre si bas. Même si l'incorporation de la fibre n'est pas perturbée par les modifications introduites, il est probable que lors de la production des mutations se soient produites par recombinaison entre la fibre sauvage des 633 et nos fibres modifiées.

e. Perspectives

Dans un premier temps, une nouvelle tentative de production des virus modifiés est à envisager en effectuant après chaque cycle d'amplification des contrôles de la production. Des mises au point importantes et longues sont donc à envisager et il n'est pas possible d'appliquer la technique classique de production. Ainsi, par exemple, le titre viral pourrait être augmenté en utilisant plus ou moins de surnageant cellulaire pour les étapes d'amplification. Cependant, il serait intéressant d'approfondir l'étude des voies d'internalisation afin d'essayer d'identifier les voies cellulaires utilisées et de tenter d'identifier le ou les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des peptides. Cette information sera en effet, utile non seulement pour une meilleure compréhension des mécanismes d'immortalisation et de transformation oncogénique par HPV mais aussi pour l'utilisation de ces adénovirus en administration systémique. Un parallèle pourrait être fait avec l'étude réalisée à partir des phages peptides [Robinson et al., 2005]. Dans ce cas, la dépendance à la température ainsi que la colocalisation des protéines de fusion GFP-peptides avec un marqueur des endosomes suggère un mode d'entrée par endocytose. Des inhibiteurs de clathrine ne semblent pas avoir d'effet sur l'internalisation des protéines fusionnées aux peptides β tandis que l'inhibition de la voie des cavéoles bloque leur entrée. Si la plupart des vecteurs Ads utilisés en thérapie génique utilise un mécanisme d'endocytose via la voie des clathrines [Rogee et al., 2007], ils sont capables d'utiliser à leur avantage les voies d'endocytose par les radeaux lipidiques et les cavéoles pour infecter certains types cellulaires. Afin de déterminer précisément quelles voies d'entrée sont utilisées, il sera intéressant d'analyser tout d'abord l'effet de différents inhibiteurs de l'endocytose sur la capacité d'infection et/ou de transduction des Ads génétiquement modifiés par microscopie confocale (en collaboration avec la plateforme de l'IGBMC).

Quatre types de molécules déjà testées dans de nombreux articles pourront être utilisés : (i) la chlorpromazine, qui induit une désorganisation des puits recouverts de

clathrine au niveau de la membrane plasmique. (ii) le génistein et la filipin, drogues connues pour bloquer l'entrée par la voie des cavéoles et enfin (iii) le méthyl- β -cyclodextrine qui induit une déplétion en cholestérol des microdomaines sphingolipidiques de la membrane plasmique [Damm et al., 2005; Rogee et al., 2007].

Pour compléter cette étude, les capacités d'infection et/ou de transduction pourront alors être testées en présence de dominants négatifs des deux types de voies, à savoir :

- (i) pour la voie des clathrines, nous utiliserons le mutant de la protéine associée à la clathrine Esp15, nommé Esp15 Δ 95/295 qui ne possède ni le deuxième et ni le troisième domaine EH de Esp15. Une surexpression de ce mutant va induire une protéine à effet dominant négatif qui interfère spécifiquement avec la formation des puits recouverts de clathrine sans affecter les autres voies d'endocytose [Benmerah et al., 1999].
- (ii) pour la voie des cavéoles, nous utiliserons une fusion de la GFP à l'extrémité N-terminale de la cavéoline-1. En effet, il a été montré que celle-ci inhibe l'endocytose via la voie des cavéoles alors que la fusion en C-terminale n'a aucun effet [Rogee et al., 2007].

D'autres modifications de la capsid virale pourraient également être envisagées. En effet, il a été montré que l'ablation de l'interaction avec le CAR n'est pas suffisante pour modifier la biodistribution du vecteur dans l'organisme [Alemany and Curiel, 2001; Leissner et al., 2001; Martin et al., 2003; Nicklin et al., 2001]. Ainsi, des délétions au niveau des motifs RGD du penton-base, responsables de l'interaction avec les intégrines α v, ubiquitaires ont déjà été explorées avec succès [Einfeld et al., 1999; Mizuguchi et al., 2002]. Cependant, même combinées avec des mutations abolissant la liaison au CAR, la distribution *in vivo* des vecteurs n'est pas modifiée. La tige de l'Ad jouerait également un rôle important dans la détermination du tropisme *in vivo*. Smith et col., ont montré l'importance d'un motif KKTK dans l'interaction avec les glycosaminoglycanes héparanes sulfates (HSG) [Smith et al., 2003]. Koizumi et col., ont de même combiné les trois types de modification (ablation CAR, intégrines et HSG) et obtenu une transduction nettement diminuée au niveau des cellules hépatiques [Koizumi et al., 2003]. Il serait donc intéressant d'envisager l'introduction de ces modifications au niveau de nos fibres. Dans le cadre de notre étude nous pourrions ainsi

obtenir des vecteurs adénoviraux hautement spécifiques limitant ainsi les risques de dissémination et de dilution du vecteur dans l'organisme ainsi que la rétention hépatique.

Parallèlement à ce travail, en collaboration avec un post-doctorant de l'équipe, nous avons entrepris de développer une méthode afin de diminuer considérablement le temps nécessaire au clonage dans le génome adénoviral. Classiquement, pour celui-ci, une méthode astucieuse basée sur la recombinaison homologe dans les bactéries a été développée en 1996 par [Chartier et al., 1996]. Elle s'effectue en trois étapes : (i) insertion du transgène d'intérêt dans un vecteur dit navette (ii) digestion du plasmide dit navette et recombinaison homologe dans les bactéries avec un plasmide contenant le génome adénoviral (iii) sélection et caractérisation des clones. Grâce à notre nouvelle technique, il est possible d'insérer par simple ligation dans le génome adénoviral un fragment contenant le gène d'intérêt. Celui-ci sera alors sous le contrôle du promoteur CMV. En une seule étape, nous pouvons donc obtenir des plasmides d'Ads modifiés. Afin de valider ce travail, j'ai pu tester les capacités d'expression des nouvelles constructions par *western blot* et immunofluorescence. Ces résultats ont donné lieu à une publication dans *Virology Journal* [Mailly et al., 2008]

Publication n°3

**A novel adenovirus vector for easy cloning in the
E3 region downstream of the CMV promoter.**

Laurent Maily, **Charlotte Boulade-Ladame**, Georges Orfanoudakis, François
Deryckère

Short report

A novel adenovirus vector for easy cloning in the E3 region downstream of the CMV promoter

Laurent Mailly^{1,2}, Charlotte Boulade-Ladame¹, Georges Orfanoudakis¹ and François Deryckere*¹Address: ¹Unité Mixte de Recherche 7175, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, France and ²Unité Inserm 748, Institut de Virologie, Strasbourg, France

Email: Laurent Mailly - Laurent.Mailly@viro-ulp.u-strasbg.fr; Charlotte Boulade-Ladame - boulade@esbs.u-strasbg.fr; Georges Orfanoudakis - orfanoudakis@esbs.u-strasbg.fr; François Deryckere* - derycker@esbs.u-strasbg.fr

* Corresponding author

Published: 6 June 2008

Virology Journal 2008, 5:73 doi:10.1186/1743-422X-5-73

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/5/1/73>

© 2008 Mailly et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Received: 4 April 2008

Accepted: 6 June 2008

Abstract

The construction of expression vectors derived from the human adenovirus type 5 (Ad5), usually based on homologous recombination, is time consuming as a shuttle plasmid has to be selected before recombination with the viral genome. Here, we describe a method allowing direct cloning of a transgene in the E3 region of the Ad5 genome already containing the immediate early CMV promoter upstream of three unique restriction sites. This allowed the construction of recombinant adenoviral genomes in just one step, reducing considerably the time of selection and, of course, production of the corresponding vectors. Using this vector, we produced recombinant adenoviruses, each giving high-level expression of the transgene in the transduced cells.

Findings

The most commonly used method for generating recombinant adenoviral vectors is based on homologous recombination in *E. coli* [1,2]. This method requires a first cloning step into a shuttle plasmid containing a promoter for the expression of the transgene. After selection of recombinants, the plasmid DNA of each clone has to be transferred into an other bacterial strain (i.e. DH5 α , DH10b) because the homologous recombination is performed with BJ5183 *E. coli* strain [3] that does not allow for production of large quantities of plasmid. Improvements to this method have been made by using Top10F' bacteria that produce a high copy number of plasmids [4] or *in vitro* ligation for the subcloning of a gene of interest in the viral genome [5-7]. However, although these techniques allow efficient generation of recombinant adeno-

viral genomes, two-step plasmid manipulation is necessary.

Here, a simple approach for generating an Ad5 derived expression vector is described. The first step was to construct pAd5CMV/TCS, a plasmid containing the Ad5 genome deleted of E1 and containing the immediate early CMV promoter (CMVp) upstream of a triple cloning site (TCS) composed of three unique restriction sites (*Swa*I, *Bst*BI, *Cl*aI) in replacement of the E3 region. To obtain pAd5CMV/TCS, two DNA fragments surrounding the E3 region were PCR-amplified (for primers see Table 1), using pTG3622 [1] as template, and sequentially cloned on either side of the CMVp in pCDNA3 to give the pLeft/Right plasmid. Thereafter, annealed oligonucleotides, containing the TCS, were inserted into the *Bam*HI/*Not*I opened pLeft/Right to obtain the pLeft/Right/TCS. This

Table 1: Oligonucleotides used in this study (restriction sites are in bold)

Oligonucleotides used for:	5'-3' sequences	length of amplified fragments (bp)
Amplification of E3 flanking regions	CGCG ACGCGT TTTCGACAGGGCTAC CGCG ACGCGT GTTTCAGGCGCAGTTG CCCTAGAT CTAGAA TGGACG GCG TCTAGAT CCAATATTCTGGGTCC	2731 2013
Insertion of TCS in adenovirus genome	GATAACAG ATTTAAAT CCT TCGAAC CAGA ATCGAT GGCC ATCGAT TCTGTT CGAAGG ATTTAAATCTGTT	
PCR to check pAd5CMV/TCS	CGTGTCCATATGGATACACGGG TCCAGCATGGCTACAACCTC	2643
EGFP amplification from pEGFP3	AGGAAAAAAAA ATTTAAAT CCACCATGGTGAGCAAGGGCGA GGAGCT AGGAAAAAAAA ATCGAT CGCGTTAAGATACATTGAGTTTGGAC	1034
PCR to check pAd5CMV-EGFP	GGCACCAAAATCAACGGGAC AGGAAAAAAAA TCGAT CGCGTTAAGATTACATTGAGTTTGGAC	2312
Amplification of TK from pMBP-TK	AGGAAAAAAAA ATTTAAAT GCGCGTATGGCTTCGTAC AGGAAAAAAAA ATTTAAAT GAGTTAGCCTCCCCCATC AGGAAAAAAAA TCGAAT CAGTTAGCCTCCCCCATC	1129 1129

plasmid was then used to replace the E3 region by the CMVp and TCS, in pTG3622, using homologous recombination in *E. coli* as previously described [1] to obtain pAd5CMV/TCS (Fig. 1A).

Four different constructs were inserted into pAd5CMV/TCS to drive the expression of either the enhanced green fluorescent protein (EGFP), thymidine kinase from Herpes Simplex Virus type 1 (TK), a TK/EGFP fusion protein or a mutated form of the HPV16 E6 protein (Fig. 1A) [8]. The EGFP ORF and the SV40 polyadenylation site from the pEGFP-C3 (Clontech, Saint-Germain en Laye, France) was inserted using the *Swa*I and *Cla*I restriction sites after PCR amplification (primers are listed in Table 1). For the resulting plasmid, pAd5-EGFP, it is possible to exchange the EGFP ORF (using *Swa*I and *Bst*BI) while keeping the SV40 polyadenylation site (Fig 1A).

The TK ORF was PCR-amplified from pMBP-TK [9] and inserted into pAd5-EGFP either in replacement of the EGFP ORF (*Swa*I-*Bst*BI) or fused upstream of the EGFP coding sequence (*Swa*I). E6mut, a flag-tagged dominant negative mutant of HPV16 E6 protein (E6-6C/6S-F47R-ΔPDZ), was also successfully sub-cloned [8]. This was achieved by inserting a *Klenow*-repaired *Eco*RI fragment containing the E6mut ORF into the *Swa*I site of pAd5CMV/TCS. For each construction, a good ratio of positive clones was obtained, respectively 14/20, 6/20, 12/20 and 3/10, in only three days (from the start of cloning until the plasmid preparation and restriction verification).

The four corresponding recombinant adenoviruses were produced in 293 cells following classical procedures [10]

and tested on HeLa cells. The expression of the different proteins was examined by Western blotting (Fig 1B), EGFP fluorescence and immunofluorescence (Fig 1C). This demonstrated that (i) cells are were efficiently transduced, (ii) the fusion protein TK/EGFP conserved the green fluorescence conferred by its EGFP moiety, (iii) the fusion TK/EGFP conserved the TK epitopes, and (iv) the E6 mutant protein was well expressed and recognized by both anti-E6 and anti-Flag antibodies. Cells expressing TK are sensitive to the pro-drug ganciclovir and the ability of the fusion product to induce cell death was investigated using a Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay (Fig. 1D). This test demonstrated that both TK and TK/EGFP induced the death of HeLa cells after treatment with ganciclovir.

This approach can be easily used in any laboratory to rapidly produce recombinant adenoviruses. For this, a new vector derived from Ad5 has been created by inserting, in replacement of the E3 region, the CMVp followed by three unique restriction sites (*Swa*I, *Bst*BI,*Cla*I) that are absent from a ΔE1 Ad5 genome. This triple cloning site allows the easy cloning of a transgene that will be expressed from the CMVp. In addition, pAd5-EGFP, allows the cloning a cDNA of interest between the CMV promoter and the SV40 polyadenylation signal either in replacement of the EGFP ORF or in fusion with it. This is also possible with this vector to clone a second transgene in the E1 region by using homologous recombination in *E. coli* as previously described [2]. Four different transgenes were inserted into pAd5CMV/TCS. The construction of the corresponding genomes, contained in plasmids, was rapidly achieved (3 days instead of 7 to 10 days with homologous recombination in *E. coli*). In each case, a much higher proportion of

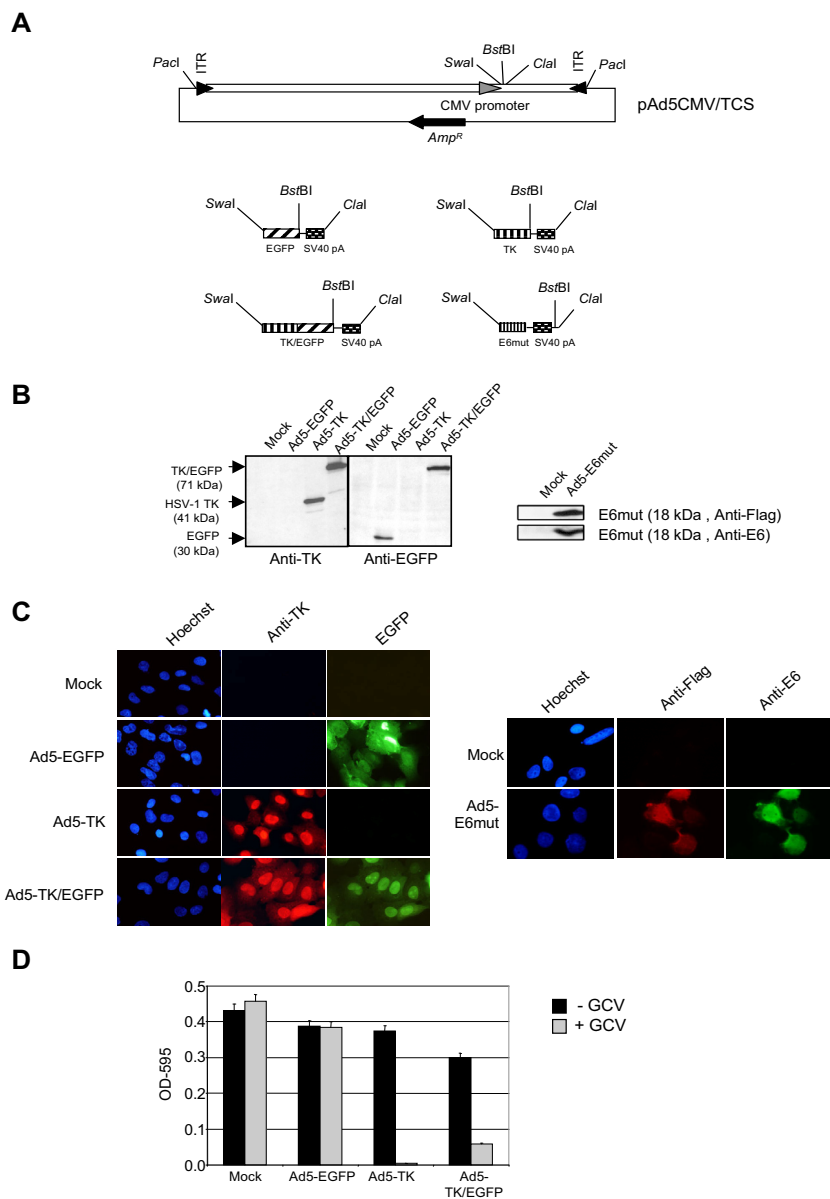


Figure 1
Expression of EGFP, TK, TK/EGFP and E6mut in HeLa cells after transduction with Ad5-EGFP, Ad5-TK, Ad5-TK/EGFP and Ad5-E6mut. (A) Restriction map of pAd5CMV/TCS and of the 4 different inserts. (B) HeLa cells were seeded on 24 well plates (1.2×10^5 cells/well) and transduced the next day with the different Ad vectors at a MOI of 1000. The TK/EGFP encoded fusion protein consisted of the entire TK protein at the N-terminus, a peptide linker SFKST and the complete EGFP protein at the C-terminus. Western-blotting analyses were carried out as described, using rabbit anti-TK antibody (obtained from William C. Summers, Yale University, New Haven, dilution 1/1300), mouse anti-EGFP antibody (Roche Diagnostics, dilution 1/1000), rabbit anti-Flag antibody (Sigma, dilution 1/2000) or mouse anti-HPV16 E6 protein antibody (1/500) [11]. (C) HeLa cells were seeded on 24 well plates and transduced as described above. Cells were fixed and treated for immunofluorescence microscopy as described [11] with anti-TK antibody (1/1300), with anti-Flag antibody (1/1000), or with anti-E6 antibody (1/1000) and with a goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa 568 (Molecular Probes, dilution 1/1000) or goat anti-mouse antibody coupled to Alexa 488 (Molecular Probes, dilution 1/1000). The nuclei were stained with Hoechst 33342 for 5 min at room temperature. Cells were viewed using a Zeiss Axioplan microscope (D) Cells were seeded and transduced as described above. Forty-eight hours after infection, cells were incubated, or not, with ganciclovir (GCV) at 20 μ g/mL. Four days later, surviving cells were analyzed using the MTT test (M2003, Aldrich-Sigma, St Quentin Fallavier, France) as described previously [12]. This test was performed in triplicates, error bars are standard deviations.

positive clones after ligation into pAdCMV5-TCS (30–70%) was obtained when compared to homologous recombination (15% at best in our laboratory). The constructs led to the production of infectious adenoviral particles that allowed the high-level expression of the different transgenes. This method of construction of adenovirus vectors is clearly faster and easier than conventional approaches and can be used by those who are not familiar with the homologous recombination system.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Design and conception of study (FD, GO); plasmid constructs and production of viruses (LM); gene expression analysis (LM, CB-L); manuscript preparation (LM, FD). All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge Emiliana Borrelli (IGBMC, Strasbourg) and the Transgene company (Strasbourg) for the gift of plasmids and Philip Robinson (CHU Bordeaux) for careful reading and fruitful discussion. This work was supported by the Université Louis Pasteur de Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Ligue Nationale Contre Le Cancer and the Cancéropôle-Grand-EST. L.M. was supported by a postdoctoral fellowship from the Cancéropôle-Grand-EST and C.B-L was supported by the Ministère de la Recherche.

References

- Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M: **Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli.** *J Virol* 1996, **70(7)**:4805-4810.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B: **A simplified system for generating recombinant adenoviruses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95(5)**:2509-2514.
- Hanahan D: **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J Mol Biol* 1983, **166(4)**:557-580.
- Renaut L, Bernard C, D'Halluin JC: **A rapid and easy method for production and selection of recombinant adenovirus genomes.** *J Virol Methods* 2002, **100(1-2)**:121-131.
- Mizuguchi H, Kay MA: **Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method.** *Hum Gene Ther* 1998, **9(17)**:2577-2583.
- Mizuguchi H, Kay MA: **A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors.** *Hum Gene Ther* 1999, **10(12)**:2013-2017.
- Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T: **In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 and E1 deletion regions for generation of recombinant adenovirus vectors.** *Biotechniques* 2001, **30(5)**:1112-4, 1116.
- Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G: **Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis.** *Mol Cell* 2006, **21(5)**:665-678.
- Mathis C, Hindelang C, LeMeur M, Borrelli E: **A transgenic mouse model for inducible and reversible dysmyelination.** *J Neurosci* 2000, **20(20)**:7698-7705.
- Maily L, Renaut L, Rogee S, Grellier E, D'Halluin JC, Colin M: **Improved gene delivery to B lymphocytes using a modified adenovirus vector targeting CD21.** *Mol Ther* 2006, **14(2)**:293-304.
- Lagrange M, Charbonnier S, Orfanoudakis G, Robinson P, Zanier K, Masson M, Lutz Y, Trave G, Weiss E, Deryckere F: **Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6.** *J Gen Virol* 2005, **86(Pt 4)**:1001-1007.
- Lagrange M, Boulade-Ladame C, Maily L, Weiss E, Orfanoudakis G, Deryckere F: **Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **361(2)**:487-492.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

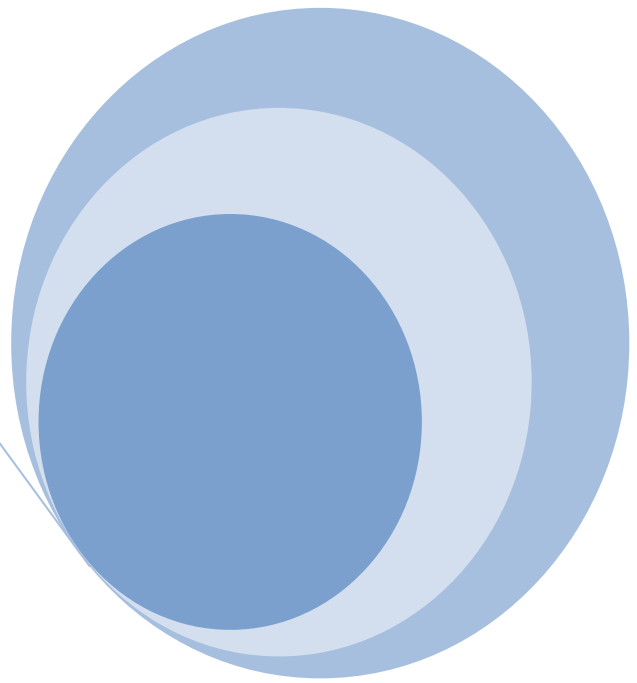
Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

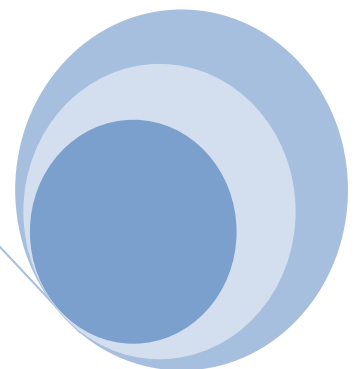
- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp





Conclusion Générale



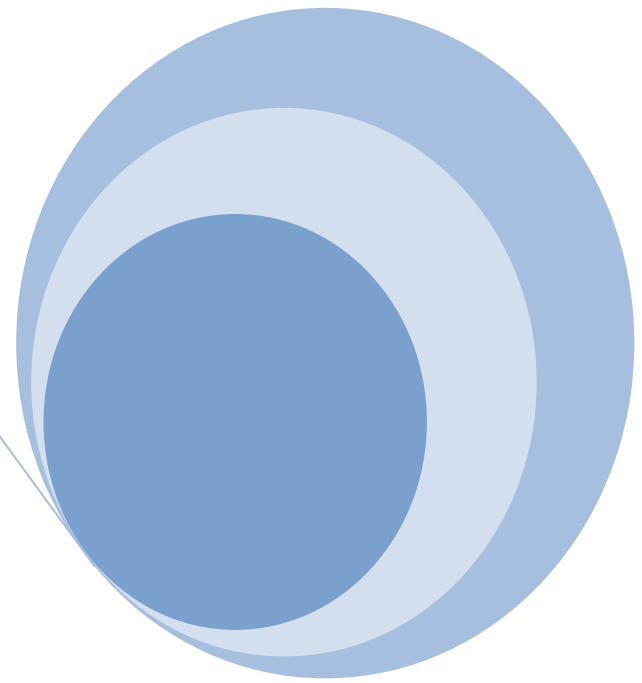
Deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme, les carcinomes du col utérin sont un problème de santé publique majeur. Les facteurs démographiques tels que le statut socio-économique conduisent à une distribution hétérogène de l'incidence de la maladie avec une concentration des cas dans les pays émergents. Celle-ci semble refléter les capacités d'accès au dépistage et/ou aux différents outils de prévention et de traitements. Ce cancer est associé dans 99 % des cas à une infection par les papillomavirus humains. Le mécanisme majeur par lequel les HPV contribuent à la progression et à l'initiation de la néoplasie est basé sur l'expression des deux oncoprotéines virales E6 et E7 qui vont agir notamment au niveau de points clés du cycle cellulaire. Cependant, l'infection par HPV seule n'est pas suffisante pour induire le phénomène de transformation et d'autres cofacteurs, tels que des variations génétiques ou des facteurs environnementaux, contribuent au processus. Actuellement, dans le cas du cancer du col de l'utérus, des méthodes conventionnelles de traitements par radiothérapie ou chirurgie sont proposées. Cependant, elles s'avèrent agressives et d'une efficacité réduite. Deux vaccins de type prophylactiques ont été récemment développés. Toutefois, leur caractère non curatif, ne permet pas le traitement des patientes infectées par des HPV ou ayant développé un cancer. Ainsi, en Europe, le taux de mortalité suite au développement d'un tel cancer reste élevé de l'ordre de 63 % [Sant et al., 2009]. De nombreux travaux de recherche ont donc été développés afin de mettre au point de nouveaux traitements plus efficaces. Ceux-ci nécessitent de bonnes connaissances des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le processus de carcinogénèse, le développement de nouvelles molécules thérapeutiques ainsi que l'optimisation des systèmes de transfert.

Le premier volet de ma thèse, plus fondamental, visait à établir une relation entre structure et fonction de l'oncoprotéine 16E6 au niveau cellulaire. Ainsi, nous avons caractérisé deux types de mutants de 16E6 : (i) les premiers concernent l'interface de dimérisation du domaine N-terminal de l'oncoprotéine. Grâce à leur utilisation, nous avons démontré que cette auto-association n'est pas nécessaire à la dégradation de p53 aussi bien *in vitro* que dans les cellules C33A. Elle n'interfère pas non plus, avec la liaison à l'ubiquitine ligase E6AP, (ii) les seconds concernent l'interface de liaison à E6AP. Leur usage nous a permis de montrer que cette liaison à l'ubiquitine ligase E6AP ne semble pas nécessaire au phénomène de dégradation de p53 par E6 dans les cellules. Lors de cette étude nous avons identifié un mutant intéressant : 16E6 4C4S K11E, présentant les mêmes caractéristiques

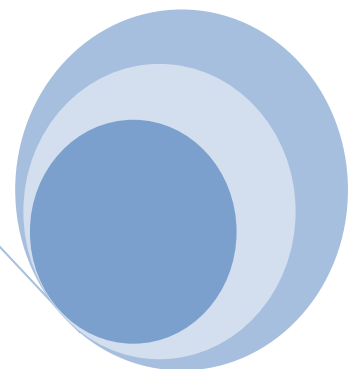
biologiques que 16E6 F47R précédemment identifié [Ristriani et al., 2009]. En effet, il est capable, *in vitro* et dans les cellules C33A, d'inhiber la dégradation de p53 et continue à lier E6AP dans les conditions expérimentales utilisées. De plus, il semble avoir le même effet dominant négatif que 16E6 F47R dans les cellules HeLa. Ce mutant présente un intérêt pour l'étude des phénomènes de prévention de la dégradation de p53, mais aussi thérapeutique dans la mesure où comme le F47R il semble induire, lors de son expression, la sénescence des cellules.

Dans le second volet de ma thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées. Pour cela nous avons employé deux méthodes basées sur l'utilisation de vecteurs adénoviraux. Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de l'expression intracellulaire de scFvs anti-16E6. Notre objectif était d'utiliser des scFvs afin de neutraliser 16E6 dans un contexte intracellulaire et d'induire l'apoptose des cellules par restauration des activités de p53. Nous avons montré que les scFvs induisent deux types d'effets : (i) une inhibition de la prolifération de l'ensemble des lignées testées, effet aspécifique dû à l'agrégation des scFvs non repliés, (ii) une apoptose uniquement dans les cellules HPV16 positives après l'expression de scFvs liant 16E6, effet qui est proportionnel à la solubilité intracellulaire des scFvs exprimés. Ensuite, notre objectif était de développer des adénovirus capables de cibler préférentiellement les cellules transformées par HPV. Ces adénovirus pourraient alors servir de vecteurs pour l'expression de molécules thérapeutiques au sein des cellules tumorales, sans affecter les tissus sains alentours. En utilisant les résultats très encourageants de l'étude *phage display* au sein du laboratoire [Robinson et al., 2005], nous avons utilisé la propriété des peptides isolés pour modifier le tropisme de l'adénovirus. La production d'adénovirus dits pseudotypés nous a permis de mettre en évidence, que la combinaison des mutations abolissant la liaison au CAR à l'introduction des peptides ne modifie ni la trimérisation, ni la capacité d'intégration de la fibre nécessaire à la bonne maturation du virion. Lors des tests de transduction sur des lignées HPV positives et négatives, nous avons également montré que la perte d'interaction avec le CAR est suffisante pour restreindre le tropisme de l'adénovirus *in vitro*. L'insertion additionnelle des peptides sélectionnés par phage display, a de plus, conféré aux adénovirus une capacité à transduire de manière préférentielle les cellules HPV positives. Néanmoins, leur production à plus grande échelle, sous forme génétiquement modifiée, n'a pas été possible. Les

récepteurs impliqués dans cette internalisation spécifique restent cependant inconnus. Leur identification pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires conduisant au développement des carcinomes du col utérin. De nouvelles stratégies thérapeutiques pourraient alors être élaborées.



Bibliographie



A.

Accardi L, Dona MG, Di Bonito P, Giorgi C (2005): Intracellular anti-E7 human antibodies in single-chain format inhibit proliferation of HPV16-positive cervical carcinoma cells. *Int J Cancer* 116:564-70.

Adams GP, Schier R (1999): Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods* 231:249-60.

Alemanly R, Curiel DT (2001): CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther* 8:1347-53.

Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, Curiel DT (2000): A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* 6:3081-7.

Alvarez RD, Curiel DT (1997): A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated delivery of an anti-erbB-2 single-chain (sFv) antibody gene for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Hum Gene Ther* 8:229-42.

Anderson LM, Krotz S, Weitzman SA, Thimmapaya B (2000a): Breast cancer-specific expression of the *Candida albicans* cytosine deaminase gene using a transcriptional targeting approach. *Cancer Gene Ther* 7:845-52.

Anderson RD, Haskell RE, Xia H, Roessler BJ, Davidson BL (2000b): A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 7:1034-8.

Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, Lowy DR (1987): Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *Embo J* 6:989-92.

Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ (1996): The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *Embo J* 15:1950-60.

Anton M, Goma IE, von Lukowicz T, Molls M, Gansbacher B, Wurschmidt F (2005): Optimization of radiation controlled gene expression by adenoviral vectors in vitro. *Cancer Gene Ther* 12:640-6.

Arafat W, Gomez-Navarro J, Xiang J, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT (2000): Antineoplastic effect of anti-erbB-2 intrabody is not correlated with scFv affinity for its target. *Cancer Gene Ther* 7:1250-6.

Arafat WO, Gomez-Navarro J, Buchsbaum DJ, Xiang J, Wang M, Casado E, Barker SD, Mahasreshti PJ, Haisma HJ, Barnes MN, Siegal GP, Alvarez RD, Hemminki A, Nettelbeck DM, Curiel DT (2002): Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv. *Gene Ther* 9:256-62.

Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, Wadell G (2000): Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 74:42-8.

Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L, Campo MS (2002): Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* 21:248-59.

B.

Bach H, Mazor Y, Shaky S, Shoham-Lev A, Berdichevsky Y, Gutnick DL, Benhar I (2001): Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312:79-93.

Bai M, Harfe B, Freimuth P (1993): Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J Virol* 67:5198-205.

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991): Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60:1445-56.

Balague C, Noya F, Alemany R, Chow LT, Curiel DT (2001): Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol* 75:7602-11.

Balague C, Zhou J, Dai Y, Alemany R, Josephs SF, Andreason G, Hariharan M, Sethi E, Prokopenko E, Jan HY, Lou YC, Hubert-Leslie D, Ruiz L, Zhang WW (2000): Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 95:820-8.

Balakireva L, Schoehn G, Thouvenin E, Chroboczek J (2003): Binding of adenovirus capsid to dipalmitoyl phosphatidylcholine provides a novel pathway for virus entry. *J Virol* 77:4858-66.

Baleja JD, Cherry JJ, Liu Z, Gao H, Nicklaus MC, Voigt JH, Chen JJ, Androphy EJ (2006): Identification of inhibitors to papillomavirus type 16 E6 protein based on three-dimensional structures of interacting proteins. *Antiviral Res* 72:49-59.

Banks L, Barnett SC, Crook T (1990a): HPV-16 E7 functions at the G1 to S phase transition in the cell cycle. *Oncogene* 5:833-7.

Banks L, Edmonds C, Vousden KH (1990b): Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* 5:1383-9.

Banks L, Spence P, Androphy E, Hubbert N, Matlashewski G, Murray A, Crawford L (1987): Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J Gen Virol* 68 (Pt 5):1351-9.

Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT (1989): Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 63:1404-7.

Barker SD, Coolidge CJ, Kanerva A, Hakkarainen T, Yamamoto M, Liu B, Rivera AA, Bhoola SM, Barnes MN, Alvarez RD, Curiel DT, Hemminki A (2003): The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *J Gene Med* 5:300-10.

Barnard P, McMillan NA (1999): The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259:305-13.

- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL (2001): Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8:1243-54.
- Baseman JG, Koutsky LA (2005): The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S16-24.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH (1998): p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395:124-5.
- Bauerschmitz GJ, Barker SD, Hemminki A (2002): Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). *Int J Oncol* 21:1161-74.
- Bauerschmitz GJ, Kanerva A, Wang M, Herrmann I, Shaw DR, Strong TV, Desmond R, Rein DT, Dall P, Curiel DT, Hemminki A (2004): Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. *Int J Cancer* 111:303-9.
- Be X, Hong Y, Wei J, Androphy EJ, Chen JJ, Baleja JD (2001): Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry* 40:1293-9.
- Benko M, Harrach B (2003): Molecular evolution of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 272:3-35.
- Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A (1999): Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* 112 (Pt 9):1303-11.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-3.
- Berk AJ (2005): Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* 24:7673-85.
- Berkner KL, Sharp PA (1983): Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* 11:6003-20.
- Bernard HU (2005): The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S1-6.
- Bernard P (1996): Positive selection of recombinant DNA by CcdB. *Biotechniques* 21:320-3.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8802-6.
- Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67:5911-21.
- Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM (1999): Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286:1579-83.

- Biocca S, Cattaneo A (1995): Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments. *Trends Cell Biol* 5:248-52.
- Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A (1990): Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *Embo J* 9:101-8.
- Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A (1993): Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 197:422-7.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-6.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F (1996): An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274:373-6.
- Blachon S, Demeret C (2003): The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* 85:813-9.
- Blumenthal R, Seth P, Willingham MC, Pastan I (1986): pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus. *Biochemistry* 25:2231-7.
- Borbely AA, Murvai M, Konya J, Beck Z, Gergely L, Li F, Veress G (2006): Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 87:287-94.
- Boulade-Ladame C, Lagrange M, Orfanoudakis G, Deryckere F (2008): Modification of adenovirus type 5 tropism for a preferential transduction of human papillomavirus-positive cancer cells. *Arch Virol* 153:1921-5.
- Bousarghin L, Touze A, Gaud G, Iochmann S, Alvarez E, Reverdiau P, Gaitan J, Jourdan ML, Sizaret PY, Coursaget PL (2009): Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol Cancer Ther* 8:357-65.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L (1994): Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo J* 13:5451-9.
- Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996): E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56:4620-4.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1999): The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *Embo J* 18:2449-58.
- Brinkman JA, Hughes SH, Stone P, Caffrey AS, Muderspach LI, Roman LD, Weber JS, Kast WM (2007): Therapeutic vaccination for HPV induced cervical cancers. *Dis Markers* 23:337-52.
- Bruder JT, Jie T, McVey DL, Kovesdi I (1997): Expression of gp19K increases the persistence of transgene expression from an adenovirus vector in the mouse lung and liver. *J Virol* 71:7623-8.

Burgert HG, Kvist S (1987): The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *Embo J* 6:2019-26.

Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A (2002): Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 269:273-318.

Burk RD (1999): Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. *Hosp Pract (Minneapolis)* 34:103-11; quiz 112.

Burmeister WP, Guilligay D, Cusack S, Wadell G, Arnberg N (2004): Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J Virol* 78:7727-36.

Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F (2000): Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6693-7.

Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F (2003): siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22:5938-45.

C.

Campos SK, Barry MA (2006): Comparison of adenovirus fiber, protein IX, and hexon capsomeres as scaffolds for vector purification and cell targeting. *Virology* 349:453-62.

Cardin AD, Jackson RL, Elledge B, Feldhake D (1989): Dependence on heparin chain-length of the interaction of heparin with human plasma low density lipoproteins. *Int J Biol Macromol* 11:59-62.

Cardinale A, Biocca S (2008a): Combating protein misfolding and aggregation by intracellular antibodies. *Curr Mol Med* 8:2-11.

Cardinale A, Biocca S (2008b): The potential of intracellular antibodies for therapeutic targeting of protein-misfolding diseases. *Trends Mol Med* 14:373-80.

Cardinale A, Filesi I, Biocca S (2001): Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments. The fate of the antigen-antibody complex. *Eur J Biochem* 268:268-77.

Cardinale A, Filesi I, Mattei S, Biocca S (2003): Evidence for proteasome dysfunction in cytotoxicity mediated by anti-Ras intracellular antibodies. *Eur J Biochem* 270:3389-97.

Cardinale A, Lener M, Messina S, Cattaneo A, Biocca S (1998): The mode of action of Y13-259 scFv fragment intracellularly expressed in mammalian cells. *FEBS Lett* 439:197-202.

Caron de Fromentel C, Gruel N, Venot C, Debussche L, Conseiller E, Dureuil C, Teillaud JL, Tocque B, Bracco L (1999): Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene* 18:551-7.

Carson A, Wang Z, Xiao X, Khan SA (2005): A DNA recombination-based approach to eliminate papillomavirus infection. *Gene Ther* 12:534-40.

- Cascallo M, Capella G, Mazo A, Alemany R (2003): Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res* 63:5544-50.
- Castellsague X, Munoz N (2003): Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*:20-8.
- Cattaneo A, Biocca S (1999): The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol* 17:115-21.
- Cauet G, Strub JM, Leize E, Wagner E, Van Dorsselaer A, Lusky M (2005): Identification of the glycosylation site of the adenovirus type 5 fiber protein. *Biochemistry* 44:5453-60.
- Chadderton N, Cowen RL, Sheppard FC, Robinson S, Greco O, Scott SD, Stratford IJ, Patterson AV, Williams KJ (2005): Dual responsive promoters to target therapeutic gene expression to radiation-resistant hypoxic tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:213-22.
- Chang LS, Shenk T (1990): The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J Virol* 64:2103-9.
- Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M (1996): Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 70:4805-10.
- Chakrabarti O, Krishna S (2003): Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 28:337-48.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ (1995): Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 269:529-31.
- Chen JW, Zhou B, Yu QC, Shin SJ, Jiao K, Schneider MD, Baldwin HS, Bergelson JM (2006): Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res* 98:923-30.
- Chillon M, Bosch A, Zabner J, Law L, Armentano D, Welsh MJ, Davidson BL (1999): Group D adenoviruses infect primary central nervous system cells more efficiently than those from group C. *J Virol* 73:2537-40.
- Cho CW, Poo H, Cho YS, Cho MC, Lee KA, Lee SJ, Park SN, Kim IK, Jung YK, Choe YK, Yeom YI, Choe IS, Yoon DY (2002): HPV E6 antisense induces apoptosis in CaSki cells via suppression of E6 splicing. *Exp Mol Med* 34:159-66.
- Cho Y, Cho C, Joung O, Lee K, Park S, Yoon D (2000): Development of screening systems for drugs against human papillomavirus-associated cervical cancer: based on E6-E6AP binding. *Antiviral Res* 47:199-206.
- Chow LT, Broker TR, Lewis JB (1979): Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J Mol Biol* 134:265-303.
- Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B (1992): The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186:280-5.
- Chu Q, St George JA, Lukason M, Cheng SH, Scheule RK, Eastman SJ (2001): EGTA enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to mouse tracheal epithelium in vivo. *Hum Gene Ther* 12:455-67.

Clemens KE, Brent R, Gyuris J, Munger K (1995): Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 214:289-93.

Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, Fridman WH, Schweighoffer F, Teillaud JL, Tocque B (1998): Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* 58:1170-6.

Cohen-Saidon C, Nechushtan H, Kahlon S, Livni N, Nissim A, Razin E (2003): A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival. *Blood* 102:2506-12.

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15191-6.

Cohen CJ, Xiang ZQ, Gao GP, Ertl HC, Wilson JM, Bergelson JM (2002): Chimpanzee adenovirus CV-68 adapted as a gene delivery vector interacts with the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Gen Virol* 83:151-5.

Cohen J, Enserink M (2008): Nobel Prize in Physiology or Medicine. HIV, HPV researchers honored, but one scientist is left out. *Science* 322:174-5.

Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F (2003): EUROCARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol* 14 Suppl 5:v128-49.

Colin M, Renaut L, Mailly L, D'Halluin JC (2004): Factors involved in the sensitivity of different hematopoietic cell lines to infection by subgroup C adenovirus: implication for gene therapy of human lymphocytic malignancies. *Virology* 320:23-39.

Cooper B, Brimer N, Vande Pol SB (2007): Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53. *J Virol* 81:12675-9.

Cooper B, Schneider S, Bohl J, Jiang Y, Beaudet A, Vande Pol S (2003a): Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology* 306:87-99.

Cooper K, Evans M, Mount S (2003b): Biology and evolution of cervical squamous intraepithelial lesions: a hypothesis with diagnostic prognostic implications. *Adv Anat Pathol* 10:200-3.

Cottage A, Downen S, Roberts I, Pett M, Coleman N, Stanley M (2001): Early genetic events in HPV immortalised keratinocytes. *Genes Chromosomes Cancer* 30:72-9.

Courtete J, Sibling AP, Zeder-Lutz G, Dalkara D, Oulad-Abdelghani M, Zuber G, Weiss E (2007): Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Mol Cancer Ther* 6:1728-35.

Cripe TP, Dunphy EJ, Holub AD, Saini A, Vasi NH, Mahller YY, Collins MH, Snyder JD, Krasnykh V, Curiel DT, Wickham TJ, DeGregori J, Bergelson JM, Currier MA (2001): Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 61:2953-60.

Crook T, Fisher C, Masterson PJ, Vousden KH (1994): Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. *Oncogene* 9:1225-30.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH (1991): Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67:547-56.

Croyle MA, Cheng X, Sandhu A, Wilson JM (2001): Development of novel formulations that enhance adenoviral-mediated gene expression in the lung in vitro and in vivo. *Mol Ther* 4:22-8.

Cuconati A, Degenhardt K, Sundararajan R, Anselm A, White E (2002): Bak and Bax function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J Virol* 76:4547-58.

Culp TD, Christensen ND (2004): Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319:152-61.

Culp TD, Spatz CM, Reed CA, Christensen ND (2007): Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology* 361:435-46.

Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Davis VM, Gimbrone MA, Jr., Collins T (1991): Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am J Pathol* 138:815-20.

D.

D'Halluin JC (1995): Virus assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 1):47-66.

D'Halluin JC, Milleville M, Martin GR, Boulanger P (1980): Morphogenesis of human adenovirus type 2 studied with fiber- and fiber and penton base-defective temperature-sensitive mutants. *J Virol* 33:88-99.

Dales S, Choppin PW (1962): Attachment and penetration of influenza virus. *Virology* 18:489-93.

Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mouglin C (2003): Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403.

Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994): Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127:915-34.

Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A (2005): Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168:477-88.

Daniels PR, Sanders CM, Coulson P, Maitland NJ (1997): Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6-associated protein. *FEBS Lett* 416:6-10.

Das S, El-Deiry WS, Somasundaram K (2003): Efficient growth inhibition of HPV 16 E6-expressing cells by an adenovirus-expressing p53 homologue p73beta. *Oncogene* 22:8394-402.

Davis AR, Meyers K, Wilson JM (1998): High throughput method for creating and screening recombinant adenoviruses. *Gene Ther* 5:1148-52.

- Davy CE, Ayub M, Jackson DJ, Das P, McIntosh P, Doorbar J (2006): HPV16 E1--E4 protein is phosphorylated by Cdk2/cyclin A and relocalizes this complex to the cytoplasm. *Virology* 349:230-44.
- Davy CE, Jackson DJ, Raj K, Peh WL, Southern SA, Das P, Sorathia R, Laskey P, Middleton K, Nakahara T, Wang Q, Masterson PJ, Lambert PF, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J (2005): Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* 79:3998-4011.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT (2003): Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307:1-11.
- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (1998): The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72:142-50.
- Daya S, Berns KI (2008): Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583-93.
- De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC (1999): Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37:3940-5.
- Deakin NO, Turner CE (2008): Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121:2435-44.
- Dechecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, Santacatterina M, Chilosi M, Cabrini G (2001): Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol* 75:8772-80.
- Dechecchi MC, Tamanini A, Bonizzato A, Cabrini G (2000): Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 268:382-90.
- Defer C, Belin MT, Caillet-Boudin ML, Boulanger P (1990): Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J Virol* 64:3661-73.
- Degenhardt YY, Silverstein S (2001): Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol* 75:11791-802.
- Dell G, Wilkinson KW, Tranter R, Parish J, Leo Brady R, Gaston K (2003): Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol* 334:979-91.
- Demeret C, Garcia-Carranca A, Thierry F (2003): Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22:168-75.
- Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA (1994): Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4382-6.
- Deryckere F, Burgert HG (1997): Rapid method for preparing adenovirus DNA. *Biotechniques* 22:868-70.

Desiderio A, Franconi R, Lopez M, Villani ME, Viti F, Chiaraluce R, Consalvi V, Neri D, Benvenuto E (2001): A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold. *J Mol Biol* 310:603-15.

Desplancq D, King DJ, Lawson AD, Mountain A (1994): Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng* 7:1027-33.

Devaux C, Caillet-Boudin ML, Jacrot B, Boulanger P (1987): Crystallization, enzymatic cleavage, and the polarity of the adenovirus type 2 fiber. *Virology* 161:121-8.

DiPaolo JA, Alvarez-Salas LM (2004): Advances in the development of therapeutic nucleic acids against cervical cancer. *Expert Opin Biol Ther* 4:1251-64.

Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW (2001): Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol* 75:5443-7.

Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT (1998): An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 72:9706-13.

Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT (2002): Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol* 76:6893-9.

Dona MG, Giorgi C, Accardi L (2007): Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis. *BMC Cancer* 7:25.

Doorbar J (2006): Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110:525-41.

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Naphine S, Sterling J, Winter G, Griffin H (1997): Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 238:40-52.

Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L (1990): Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 178:254-62.

Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R (1996): Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85:1067-76.

Drapkin PT, O'Riordan CR, Yi SM, Chiorini JA, Cardella J, Zabner J, Welsh MJ (2000): Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia. *J Clin Invest* 105:589-96.

Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA (2004): Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett* 205:81-8.

Du M, Fan X, Hong E, Chen JJ (2002): Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 296:962-9.

Duan L, Zhang H, Oakes JW, Bagasra O, Pomerantz RJ (1994): Molecular and virological effects of intracellular anti-Rev single-chain variable fragments on the expression of various human immunodeficiency virus-1 strains. *Hum Gene Ther* 5:1315-24.

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K (2000): The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10002-7.

Duensing S, Munger K (2003): Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13:9-23.

Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L (1987): Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1:251-6.

Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E (1992): Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 66:6893-902.

E.

Edmonds C, Vousden KH (1989): A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Virol* 63:2650-6.

Eichten A, Westfall M, Pietenpol JA, Munger K (2002): Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* 295:74-85.

Einfeld DA, Brough DE, Roelvink PW, Kovessi I, Wickham TJ (1999): Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J Virol* 73:9130-6.

Elenius K, Vainio S, Laato M, Salmivirta M, Thesleff I, Jalkanen M (1991): Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol* 114:585-95.

F.

Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, Schoehn G (2005): A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *Embo J* 24:1645-54.

Falgout B, Ketner G (1988): Characterization of adenovirus particles made by deletion mutants lacking the fiber gene. *J Virol* 62:622-5.

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998): New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9:1909-17.

- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ (1996): Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7:215-22.
- Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, Marsh J, Ertl HC, Wilson JM (2001): Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol* 75:11603-13.
- Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, Jalinot P (2005): Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol* 79:4229-37.
- Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J, Poller W (1999): Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 6:1520-35.
- Fender P, Boussaid A, Mezin P, Chroboczek J (2005): Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* 340:167-73.
- Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ (2004): The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279:25729-44.
- Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ (2002): The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:21730-9.
- Fisher KD, Stallwood Y, Green NK, Ulbrich K, Mautner V, Seymour LW (2001): Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther* 8:341-8.
- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M (2002): Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* 76:10009-14.
- Foster SA, Demers GW, Etscheid BG, Galloway DA (1994): The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol* 68:5698-705.
- Francis DA, Schmid SI, Howley PM (2000): Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol* 74:2679-86.
- Franco EL, Harper DM (2005): Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 23:2388-94.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE (1999): Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180:1415-23.
- Francois A, Etteradossi N, Delmas B, Payet V, Langlois P (2001): Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids. *J Virol* 75:5288-301.

Freedman DA, Levine AJ (1998): Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* 18:7288-93.

Freimuth P (1996): A human cell line selected for resistance to adenovirus infection has reduced levels of the virus receptor. *J Virol* 70:4081-5.

Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP (2000): A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19:2-12.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA (1997): Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11:2090-100.

G.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A (2003): CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9:1408-12.

Galmiche MC, Rindisbacher L, Wels W, Wittek R, Buchegger F (1997): Expression of a functional single chain antibody on the surface of extracellular enveloped vaccinia virus as a step towards selective tumour cell targeting. *J Gen Virol* 78 (Pt 11):3019-27.

Gammoh N, Isaacson E, Tomaic V, Jackson DJ, Doorbar J, Banks L (2009): Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene* 28:2299-304.

Gao Q, Kumar A, Srinivasan S, Singh L, Mukai H, Ono Y, Wazer DE, Band V (2000): PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem* 275:14824-30.

Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999): Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146:1239-54.

Gardiol D, Kuhne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L (1999): Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18:5487-96.

Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ (2006): Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1915-26.

Gewin L, Galloway DA (2001): E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* 75:7198-201.

Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA (2004): Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18:2269-82.

Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Brinkley P, Rudy J, Graham FL (1986): Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* 50:161-71.

Giampieri S, Storey A (2004): Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer* 90:2203-9.

Gilardi P, Courtney M, Pavirani A, Perricaudet M (1990): Expression of human alpha 1-antitrypsin using a recombinant adenovirus vector. *FEBS Lett* 267:60-2.

Gilgenkrantz H, Duboc D, Juillard V, Couton D, Pavirani A, Guillet JG, Briand P, Kahn A (1995): Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum Gene Ther* 6:1265-74.

Gilligan MG, Knox P, Weedon S, Barton R, Kerr DJ, Searle P, Young LS (1998): Adenoviral delivery of B7-1 (CD80) increases the immunogenicity of human ovarian and cervical carcinoma cells. *Gene Ther* 5:965-74.

Giovane C, Trave G, Briones A, Lutz Y, Wasylyk B, Weiss E (1999): Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53. *J Mol Recognit* 12:141-52.

Glasgow JN, Kremer EJ, Hemminki A, Siegal GP, Douglas JT, Curiel DT (2004): An adenovirus vector with a chimeric fiber derived from canine adenovirus type 2 displays novel tropism. *Virology* 324:103-16.

Gonzalez R, Verecque R, Wickham TJ, Vanrumbeke M, Kovessi I, Bauters F, Fenaux P, Quesnel B (1999): Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein. *Gene Ther* 6:314-20.

Gonzalez S, Naranjo A, Serrano LM, Chang WC, Wright CL, Jensen MC (2004): Genetic engineering of cytolytic T lymphocytes for adoptive T-cell therapy of neuroblastoma. *J Gene Med* 6:704-11.

Gonzalez SL, Stremmler M, He X, Basile JR, Munger K (2001): Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75:7583-91.

Goodwin EC, DiMaio D (2000): Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12513-8.

Graessmann M, Graessmann A, Mueller C (1980): Monkey cells transformed by SV40 DNA fragments: flat revertants synthesize large and small T antigens. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 1:605-10.

Graham DA, Herrington CS (2000): HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol* 53:201-6.

Graham FL (1984): Covalently closed circles of human adenovirus DNA are infectious. *Embo J* 3:2917-22.

Graham FL, Rowe DT, McKinnon R, Bacchetti S, Ruben M, Branton PE (1984): Transformation by human adenoviruses. *J Cell Physiol Suppl* 3:151-63.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.

Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A (1997): The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *Embo J* 16:5998-6007.

Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75:477-86.

Green NM, Wrigley NG, Russell WC, Martin SR, McLachlan AD (1983): Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *Embo J* 2:1357-65.

Griffin H, Elston R, Jackson D, Ansell K, Coleman M, Winter G, Doorbar J (2006): Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *J Mol Biol* 355:360-78.

Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA (1998): Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9:2745-60.

Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A (1998): Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8058-63.

Grossman SR, Laimins LA (1989): E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 4:1089-93.

Guo ZS, Bartlett DL (2004): Vaccinia as a vector for gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* 4:901-17.

H.

Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R (1998): IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26:205-13.

Hamada K, Sakaue M, Alemany R, Zhang WW, Horio Y, Roth JA, Mitchell MF (1996): Adenovirus-mediated transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 63:219-27.

Hamada K, Shirakawa T, Gotoh A, Roth JA, Follen M (2006): Adenovirus-mediated transfer of human papillomavirus 16 E6/E7 antisense RNA and induction of apoptosis in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 103:820-30.

Hampson L, Li C, Oliver AW, Kitchener HC, Hampson IN (2004): The PDZ protein Tip-1 is a gain of function target of the HPV16 E6 oncoprotein. *Int J Oncol* 25:1249-56.

Han Y, Loo YM, Militello KT, Melendy T (1999): Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* 73:4899-907.

Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T (2007): E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J Virol* 81:1379-89.

- Hansan JE (2007): Searching for confidence in an era of uncertainty: a ten-year journey with Dr. Robert Morris. *J Aging Soc Policy* 19:147-58.
- Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML (1997): Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 71:1842-9.
- Harwood CA, Proby CM (2002): Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 15:101-14.
- Hassell JR, Kimura JH, Hascall VC (1986): Proteoglycan core protein families. *Annu Rev Biochem* 55:539-67.
- Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A, Nagi P, Krasnykh V, Dmitriev I, Wang M, Naito S, Lei X, Hemminki A, Carey D, Curiel DT (2002): Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res* 62:4273-81.
- Hay RT, Freeman A, Leith I, Monaghan A, Webster A (1995): Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 2):31-48.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998a): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2509-14.
- He YK, Lui VW, Baar J, Wang L, Shurin M, Almonte C, Watkins SC, Huang L (1998b): Potentiation of E7 antisense RNA-induced antitumor immunity by co-delivery of IL-12 gene in HPV16 DNA-positive mouse tumor. *Gene Ther* 5:1462-71.
- Heideman DA, Steenbergen RD, van der Torre J, Scheffner M, Alemany R, Gerritsen WR, Meijer CJ, Snijders PJ, van Beusechem VW (2005): Oncolytic adenovirus expressing a p53 variant resistant to degradation by HPV E6 protein exhibits potent and selective replication in cervical cancer. *Mol Ther* 12:1083-90.
- Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I, Dummer R (1998): The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9:2363-73.
- Hemminki A, Alvarez RD (2002): Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs* 16:77-87.
- Henning P, Magnusson MK, Gunneriusson E, Hong SS, Boulanger P, Nygren PA, Lindholm L (2002): Genetic modification of adenovirus 5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A. *Hum Gene Ther* 13:1427-39.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S (2003): Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 95:1772-83.
- Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP (2000): Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8501-6.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25-7.

- Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA (1997): Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 16:2294-306.
- Horwitz MS (2001): Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* 279:1-8.
- Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA (2009): Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384:324-34.
- Howitt J, Anderson CW, Freimuth P (2003): Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Curr Top Microbiol Immunol* 272:331-64.
- Hsu KF, Wu CL, Huang SC, Hsieh JL, Huang YS, Chen YF, Shen MR, Chung WJ, Chou CY, Shiao AL (2008): Conditionally replicating E1B-deleted adenovirus driven by the squamous cell carcinoma antigen 2 promoter for uterine cervical cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 15:526-34.
- Huang Q, Zhang X, Wang H, Yan B, Kirkpatrick J, Dewhirst MW, Li CY (2004): A novel conditionally replicative adenovirus vector targeting telomerase-positive tumor cells. *Clin Cancer Res* 10:1439-45.
- Huang S, Kamata T, Takada Y, Ruggeri ZM, Nemerow GR (1996): Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 70:4502-8.
- Hudson PJ, Souriau C (2003): Engineered antibodies. *Nat Med* 9:129-34.
- Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, Harper JW, Munger K (2007): Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 81:9737-47.
- Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Munger K (2005): Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11492-7.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991): A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 10:4129-35.
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R, et al. (1988): Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5879-83.
- Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D (1995): The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 211:227-33.
- Hwang ES, Riese DJ, 2nd, Settleman J, Nilson LA, Honig J, Flynn S, DiMaio D (1993): Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J Virol* 67:3720-9.
- Hyland S, Beerli RR, Barbas CF, Hynes NE, Wels W (2003): Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor. *Oncogene* 22:1557-67.

I.

Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F (2002): Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo J* 21:4741-8.

Imler JL, Chartier C, Dreyer D, Dieterle A, Sainte-Marie M, Faure T, Pavirani A, Mehtali M (1996): Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther* 3:75-84.

Israel BF, Pickles RJ, Segal DM, Gerard RD, Kenney SC (2001): Enhancement of adenovirus vector entry into CD70-positive B-cell Lines by using a bispecific CD70-adenovirus fiber antibody. *J Virol* 75:5215-21.

J.

Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A (2000): Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14:3065-73.

Jakubczak JL, Rollence ML, Stewart DA, Jafari JD, Von Seggern DJ, Nemerow GR, Stevenson SC, Hallenbeck PL (2001): Adenovirus type 5 viral particles pseudotyped with mutagenized fiber proteins show diminished infectivity of coxsackie B-adenovirus receptor-bearing cells. *J Virol* 75:2972-81.

James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ (2006): Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol* 80:5301-7.

Jana NR, Zemskov EA, Wang G, Nukina N (2001): Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10:1049-59.

Jensen M, Tan G, Forman S, Wu AM, Raubitschek A (1998): CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 4:75-83.

Jeong KW, Kim HZ, Kim S, Kim YS, Choe J (2007): Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene* 26:487-99.

Jiang M, Milner J (2002): Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 21:6041-8.

Jing M, Bohl J, Brimer N, Kinter M, Vande Pol SB (2007): Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 81:2231-9.

Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009): Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83:2067-74.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998): Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883-98.

Jones DL, Thompson DA, Munger K (1997): Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 239:97-107.

Jonson AL, Rogers LM, Ramakrishnan S, Downs LS, Jr. (2008): Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 111:356-64.

Jordan LB, Monaghan H (2004): Pathology of the cervix: recent developments. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 16:248-54.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM (1999): The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810-22.

K.

Kadish AS, Ho GY, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH (1997): Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89:1285-93.

Kahlon KS, Brown C, Cooper LJ, Raubitschek A, Forman SJ, Jensen MC (2004): Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res* 64:9160-6.

Kanerva A, Bauerschmitz GJ, Yamamoto M, Lam JT, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A (2004): A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma. *Gene Ther* 11:552-9.

Kanerva A, Hemminki A (2004): Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer* 110:475-80.

Kasono K, Blackwell JL, Douglas JT, Dmitriev I, Strong TV, Reynolds P, Kropf DA, Carroll WR, Peters GE, Bucy RP, Curiel DT, Krasnykh V (1999): Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5:2571-9.

Kaufmann AM, Gissmann L, Schreckenberger C, Qiao L (1997): Cervical carcinoma cells transfected with the CD80 gene elicit a primary cytotoxic T lymphocyte response specific for HPV 16 E7 antigens. *Cancer Gene Ther* 4:377-82.

Keblusek P, Dorsman JC, Teunisse AF, Teunissen H, van der Eb AJ, Zantema A (1999): The adenoviral E1A oncoproteins interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21(CIP1/WAF1). *J Gen Virol* 80 (Pt 2):381-90.

Ketner G, Spencer F, Tugendreich S, Connelly C, Hieter P (1994): Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6186-90.

Kim KH, Yoon DJ, Moon YA, Kim YS (1994): Expression and localization of human papillomavirus type 16 E6 and E7 open reading frame proteins in human epidermal keratinocyte. *Yonsei Med J* 35:1-9.

- Kirby I, Davison E, Bevil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G (1999): Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. *J Virol* 73:9508-14.
- Kirby I, Davison E, Bevil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G (2000): Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* 74:2804-13.
- Kirn DH, Thorne SH (2009): Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 9:64-71.
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ (1998): Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84-8.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M (1997): Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11612-6.
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996): Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82.
- Kochanek S (1999): Development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy. *Thromb Haemost* 82:547-51.
- Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E (1995): Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology (N Y)* 13:265-70.
- Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T (2003): Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5:267-76.
- Kojima H, Ohishi N, Yagi K (1998): Generation of recombinant adenovirus vector with infectious adenoviral genome released from cosmid-based vector by simple procedure allowing complex manipulation. *Biochem Biophys Res Commun* 246:868-72.
- Kondo M (1995): Predominance of codon 215 mutation in reverse transcriptase-coding region of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-resistant HIV-1 isolates after long-term AZT therapy. *Kansenshogaku Zasshi* 69:1278-85.
- Korn T, Nettelbeck DM, Volkel T, Muller R, Kontermann RE (2004): Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med* 6:642-51.
- Krasnykh V, Belousova N, Korokhov N, Mikheeva G, Curiel DT (2001): Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *J Virol* 75:4176-83.
- Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N, Curiel DT (1998): Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 72:1844-52.

Krasnykh V, Dmitriev I, Navarro JG, Belousova N, Kashentseva E, Xiang J, Douglas JT, Curiel DT (2000): Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity. *Cancer Res* 60:6784-7.

Kuhne C, Gardiol D, Guarnaccia C, Amenitsch H, Banks L (2000): Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene* 19:5884-91.

Kukimoto I, Aihara S, Yoshiike K, Kanda T (1998): Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 249:258-62.

Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H, Band V (2002): Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22:5801-12.

L.

Lachmann RH, Efstathiou S (1999): Gene transfer with herpes simplex vectors. *Curr Opin Mol Ther* 1:622-32.

Lagrange M, Boulade-Ladame C, Mailly L, Weiss E, Orfanoudakis G, Deryckere F (2007): Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361:487-92.

Lagrange M, Charbonnier S, Orfanoudakis G, Robinson P, Zanier K, Masson M, Lutz Y, Trave G, Weiss E, Deryckere F (2005): Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *J Gen Virol* 86:1001-7.

Langer SJ, Schaack J (1996): 293 cell lines that inducibly express high levels of adenovirus type 5 precursor terminal protein. *Virology* 221:172-9.

Le LP, Everts M, Dmitriev IP, Davydova JG, Yamamoto M, Curiel DT (2004): Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. *Mol Imaging* 3:105-16.

Lechner MS, Laimins LA (1994): Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 68:4262-73.

Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA (1992): Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J* 11:3045-52.

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT (2000): Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74:9680-93.

Lee SS, Weiss RS, Javier RT (1997): Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6670-5.

Legrand V, Spehner D, Schlesinger Y, Settelen N, Pavirani A, Mehtali M (1999): Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J Virol* 73:907-19.

- Leissner P, Legrand V, Schlesinger Y, Hadji DA, van Raaij M, Cusack S, Pavirani A, Mehtali M (2001): Influence of adenoviral fiber mutations on viral encapsidation, infectivity and in vivo tropism. *Gene Ther* 8:49-57.
- Lener M, Horn IR, Cardinale A, Messina S, Nielsen UB, Rybak SM, Hoogenboom HR, Cattaneo A, Biocca S (2000): Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies. The case of p21Ras. *Eur J Biochem* 267:1196-205.
- Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG (1998): Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther* 9:367-78.
- Leopold PL, Kreitzer G, Miyazawa N, Rempel S, Pfister KK, Rodriguez-Boulan E, Crystal RG (2000): Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* 11:151-65.
- Li E, Brown SL, Stupack DG, Puente XS, Cheresch DA, Nemerow GR (2001): Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol* 75:5405-9.
- Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR (1998a): Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 72:8806-12.
- Li J, Lad S, Yang G, Luo Y, Iacobelli-Martinez M, Primus FJ, Reisfeld RA, Li E (2006): Adenovirus fiber shaft contains a trimerization element that supports peptide fusion for targeted gene delivery. *J Virol* 80:12324-31.
- Li J, Le L, Sibley DA, Mathis JM, Curiel DT (2005): Genetic incorporation of HSV-1 thymidine kinase into the adenovirus protein IX for functional display on the virion. *Virology* 338:247-58.
- Li M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL (1998b): Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* 72:2160-7.
- Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, Matlashewski GJ, Koromilas AE (1999): The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* 18:5727-37.
- Li X, Coffino P (1996): High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 70:4509-16.
- Liao HJ, Kobayashi R, Mathews MB (1998): Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8514-9.
- Lipari F, McGibbon GA, Wardrop E, Cordingley MG (2001): Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein. *Biochemistry* 40:1196-204.
- Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R (2006): Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 281:578-86.

Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V, Androphy EJ (1999): Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* 73:7297-307.

Liu Y, Liu Z, Androphy E, Chen J, Baleja JD (2004): Design and characterization of helical peptides that inhibit the E6 protein of papillomavirus. *Biochemistry* 43:7421-31.

Lo AS, Zhu Q, Marasco WA (2008): Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol*:343-73.

Lochmuller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G (1994): Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5:1485-91.

Loo YM, Melendy T (2004): Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78:1605-15.

Lutz P, Rosa-Calatrava M, Kedinger C (1997): The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol* 71:5102-9.

M.

Mabit H, Nakano MY, Prank U, Saam B, Dohner K, Sodeik B, Greber UF (2002): Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol* 76:9962-71.

Magnusson MK, Hong SS, Boulanger P, Lindholm L (2001): Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *J Virol* 75:7280-9.

Mailly L, Boulade-Ladame C, Orfanoudakis G, Deryckere F (2008): A novel adenovirus vector for easy cloning in the E3 region downstream of the CMV promoter. *Virol J* 5:73.

Mansur CP, Marcus B, Dalal S, Androphy EJ (1995): The domain of p53 required for binding HPV 16 E6 is separable from the degradation domain. *Oncogene* 10:457-65.

Mantovani F, Banks L (2001): The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20:7874-87.

Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY (1993): Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7889-93.

Martin K, Brie A, Saulnier P, Perricaudet M, Yeh P, Vigne E (2003): Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. *Mol Ther* 8:485-94.

Masson M, Hindelang C, Sibler AP, Schwalbach G, Trave G, Weiss E (2003): Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* 84:2099-104.

Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G (1994): Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol* 68:6811-4.

Mathis JM, Stoff-Khalili MA, Curiel DT (2005): Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24:7775-91.

Matsumoto Y, Nakagawa S, Yano T, Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa K, Minaguchi T, Wada O, Ooishi H, Matsumoto K, Yasugi T, Kanda T, Huibregtse JM, Taketani Y (2006): Involvement of a cellular ubiquitin-protein ligase E6AP in the ubiquitin-mediated degradation of extensive substrates of high-risk human papillomavirus E6. *J Med Virol* 78:501-7.

Mautner V, Pereira HG (1971): Crystallization of a second adenovirus protein (the fibre). *Nature* 230:456-7.

Maxfield FR, McGraw TE (2004): Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:121-32.

McCormick F (2001): Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 1:130-41.

McDonald GA, Zhu G, Li Y, Kovesdi I, Wickham TJ, Sukhatme VP (1999): Efficient adenoviral gene transfer to kidney cortical vasculature utilizing a fiber modified vector. *J Gene Med* 1:103-10.

McLaughlin-Drubin ME, Munger K (2009): The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384:335-44.

McMurray HR, McCance DJ (2003): Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 77:9852-61.
Meier O, Greber UF (2003): Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 5:451-62.

Mercer J, Helenius A (2008): Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320:531-5.

Meulenbroek RA, Sargent KL, Lunde J, Jasmin BJ, Parks RJ (2004): Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the virion--generation of fluorescent virus through the incorporation of pIX-GFP. *Mol Ther* 9:617-24.

Mhashilkar AM, LaVecchio J, Eberhardt B, Porter-Brooks J, Boisot S, Dove JH, Pumphrey C, Li X, Weissmahr RN, Ring DB, Ramstedt U, Marasco WA (1999): Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum Gene Ther* 10:1453-67.

Michael SI, Hong JS, Curiel DT, Engler JA (1995): Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther* 2:660-8.

Mirza MA, Weber J (1982): Structure of adenovirus chromatin. *Biochim Biophys Acta* 696:76-86.

Miyazawa N, Crystal RG, Leopold PL (2001): Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol* 75:1387-400.

Mizuguchi H, Kay MA (1998): Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 9:2577-83.

Mizuguchi H, Kay MA (1999): A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 10:2013-7.

Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T (2002): CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* 9:769-76.

Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002): Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J* 21:4754-62.

Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG (1996): Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87:427-36.

Moolten FL (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 46:5276-81.

Morgan DO, Roth RA (1988): Analysis of intracellular protein function by antibody injection. *Immunol Today* 9:84-8.

Moss B (2006): Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344:48-54.

Moss B, Shisler JL (2001): Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol* 13:59-66.

Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T (2004): The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 50:9-19.

Mulligan RC (1993): The basic science of gene therapy. *Science* 260:926-32.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM (1989): Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J* 8:4099-105.

Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006): Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/1-10.

N.

Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S (2002): Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res* 22:1655-60.

Nakagawa S, Huibregtse JM (2000): Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20:8244-53.

Nakayama M, Both GW, Banizs B, Tsuruta Y, Yamamoto S, Kawakami Y, Douglas JT, Tani K, Curiel DT, Glasgow JN (2006): An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice. *Virology* 350:103-15.

Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB (2000): Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 132:810-9.

Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL (2009): Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* 384:380-8.

Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R, Curiel DT (2002): Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 62:4663-70.

Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF (2003): The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77:6957-64.

Nicklin SA, Baker AH (2002): Tropism-modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2:273-93.

Nicklin SA, Dishart KL, Buening H, Reynolds PN, Hallek M, Nemerow GR, Von Seggern DJ, Baker AH (2003): Transductional and transcriptional targeting of cancer cells using genetically engineered viral vectors. *Cancer Lett* 201:165-73.

Nicklin SA, Von Seggern DJ, Work LM, Pek DC, Dominiczak AF, Nemerow GR, Baker AH (2001): Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol Ther* 4:534-42.

Nicklin SA, White SJ, Nicol CG, Von Seggern DJ, Baker AH (2004): In vitro and in vivo characterisation of endothelial cell selective adenoviral vectors. *J Gene Med* 6:300-8.

Nieba L, Honegger A, Krebber C, Pluckthun A (1997): Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* 10:435-44.

Nishitani M, Sakai T, Kanayama H, Himeno K, Kagawa S (2000): Cytokine gene therapy for cancer with naked DNA. *Mol Urol* 4:47-50.

Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G (2006): Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 21:665-78.

Nomine Y, Charbonnier S, Ristriani T, Stier G, Masson M, Cavusoglu N, Van Dorsselaer A, Weiss E, Kieffer B, Trave G (2003): Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain. *Biochemistry* 42:4909-17.

Nomine Y, Ristriani T, Laurent C, Lefevre JF, Weiss E, Trave G (2001): Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expr Purif* 23:22-32.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W (2001): Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the

cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104:275-80.

O.

Ohage E, Steipe B (1999): Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability. *J Mol Biol* 291:1119-28.

Ohlenschlager O, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, Ramachandran R, Baum M, Korbas M, Meyer-Klaucke W, Durst M, Gorlach M (2006): Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene* 25:5953-9.

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT (2001): The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61:6592-600.

Ozbun MA, Meyers C (1998): Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* 72:2715-22.

P.

Pan H, Griep AE (1994): Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development. *Genes Dev* 8:1285-99.

Pan H, Griep AE (1995): Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* 9:2157-69.

Papanicolaou GN (1949): A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann Intern Med* 31:661-74.

Park JS, Boyer S, Mitchell K, Gilfor D, Birrer M, Darlington G, El Deiry W, Firestone GL, Munger K, Band V, Fisher PB, Dent P (2000): Expression of human papilloma virus E7 protein causes apoptosis and inhibits DNA synthesis in primary hepatocytes via increased expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6). *J Biol Chem* 275:18-28.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005): Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL (1996): A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13565-70.

Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E (1997): Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol* 15:542-6.

Passalaris TM, Benanti JA, Gewin L, Kiyono T, Galloway DA (1999): The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol Cell Biol* 19:5872-81.

Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ (1999): The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 18:5061-72.

Patrick DR, Oliff A, Heimbrook DC (1994): Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem* 269:6842-50.

Patterson NA, Smith JL, Ozbun MA (2005): Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol* 79:6838-47.

Philibert P, Stoessel A, Wang W, Sibler AP, Bec N, Larroque C, Saven JG, Courtete J, Weiss E, Martineau P (2007): A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol* 7:81.

Philipson L (1995): Adenovirus--an eternal archetype. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 1):1-24.
Pim D, Banks L (1999): HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene* 18:7403-8.

Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L (1994): Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 9:1869-76.

Pirisi L, Yasumoto S, Feller M, Doniger J, DiPaolo JA (1987): Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 61:1061-6.

Proba K, Honegger A, Pluckthun A (1997): A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding. *J Mol Biol* 265:161-72.

Proba K, Worn A, Honegger A, Pluckthun A (1998): Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol* 275:245-53.

Pruzan R, Flint SJ (1995): Transcription of adenovirus RNA polymerase III genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 1):201-26.

R.

Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V, Schmitt LD, McCormick F (2002): Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res* 62:3812-8.

Rein DT, Breidenbach M, Wu H, Han T, Haviv YS, Wang M, Kirby TO, Kawakami Y, Dall P, Alvarez RD, Curiel DT (2004): Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int J Cancer* 111:698-704.

Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, Schwartz A (2000): Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* 19:5944-50.

Rekosh DM, Russell WC (1977): Processing of the precursor to the major core polypeptide of adenovirus type 5 removes a region near the amino terminus. *Virology* 82:513-7.

Renaut L, Bernard C, D'Halluin JC (2002): A rapid and easy method for production and selection of recombinant adenovirus genomes. *J Virol Methods* 100:121-31.

- Renaut L, Colin M, Leite JP, Benko M, D'Halluin JC (2004): Abolition of hCAR-dependent cell tropism using fiber knobs of Adenovirus serotypes. *Virology* 321:189-204.
- Richardson JH, Hofmann W, Sodroski JG, Marasco WA (1998): Intrabody-mediated knockout of the high-affinity IL-2 receptor in primary human T cells using a bicistronic lentivirus vector. *Gene Ther* 5:635-44.
- Richardson JH, Sodroski JG, Waldmann TA, Marasco WA (1995): Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3137-41.
- Ristriani T, Fournane S, Orfanoudakis G, Trave G, Masson M (2009): A single-codon mutation converts HPV16 E6 oncoprotein into a potential tumor suppressor, which induces p53-dependent senescence of HPV-positive HeLa cervical cancer cells. *Oncogene* 28:762-72.
- Ristriani T, Nomine Y, Laurent C, Weiss E, Trave G (2002): Protein mutagenesis with monodispersity-based quality probing: selective inactivation of p53 degradation and DNA-binding properties of HPV E6 oncoprotein. *Protein Expr Purif* 26:357-67.
- Ristriani T, Masson M, Nomine Y, Laurent C, Lefevre JF, Weiss E, Trave G (2000): HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J Mol Biol* 296:1189-203.
- Rittner K, Schreiber V, Erbs P, Lusky M (2007): Targeting of adenovirus vectors carrying a tumor cell-specific peptide: in vitro and in vivo studies. *Cancer Gene Ther* 14:509-18.
- Robinson P, Stuber D, Deryckere F, Tedbury P, Lagrange M, Orfanoudakis G (2005): Identification using phage display of peptides promoting targeting and internalization into HPV-transformed cell lines. *J Mol Recognit* 18:175-82.
- Rodriguez E, Everitt E (1996): Adenovirus uncoating and nuclear establishment are not affected by weak base amines. *J Virol* 70:3470-7.
- Roelvink PW, Kovesdi I, Wickham TJ (1996): Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J Virol* 70:7614-21.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ (1998): The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72:7909-15.
- Roelvink PW, Mi Lee G, Einfeld DA, Kovesdi I, Wickham TJ (1999): Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286:1568-71.
- Rogee S, Grellier E, Bernard C, Loyens A, Beauvillain JC, D'Halluin J C, Colin M (2007): Intracellular trafficking of a fiber-modified adenovirus using lipid raft/caveolae endocytosis. *Mol Ther* 15:1963-72.
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM (1998): Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12:2061-72.

Rosa-Calatrava M, Grave L, Puvion-Dutilleul F, Chatton B, Kedinger C (2001): Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol* 75:7131-41.

Rosa-Calatrava M, Puvion-Dutilleul F, Lutz P, Dreyer D, de The H, Chatton B, Kedinger C (2003): Adenovirus protein IX sequesters host-cell promyelocytic leukaemia protein and contributes to efficient viral proliferation. *EMBO Rep* 4:969-75.

Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Paakko PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, et al. (1991): Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 252:431-4.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84:570-3.

Russell JS, Raju U, Gumin GJ, Lang FF, Wilson DR, Huet T, Tofilon PJ (2002): Inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment: lack of involvement in radiosensitization. *Cancer Res* 62:2318-26.

Russell WC (2000): Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81:2573-604.

Russell WC (2009): Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90:1-20.

S.

Saban SD, Nepomuceno RR, Gritton LD, Nemerow GR, Stewart PL (2005): CryoEM structure at 9A resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells. *J Mol Biol* 349:526-37.

Salas M (1991): Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60:39-71.

Salone B, Martina Y, Piersanti S, Cundari E, Cherubini G, Franqueville L, Failla CM, Boulanger P, Saggio I (2003): Integrin alpha3beta1 is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5. *J Virol* 77:13448-54.

Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R (2009): EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 45:931-91.

Santis G, Legrand V, Hong SS, Davison E, Kirby I, Imler JL, Finberg RW, Bergelson JM, Mehtali M, Boulanger P (1999): Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR. *J Gen Virol* 80 (Pt 6):1519-27.

Sapp M, Day PM (2009): Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* 384:400-9.

Sawyer JR, Schlom J, Kashmiri SV (1994): The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 7:1401-6.

Schaak J, Schedl P, Shenk T (1990): Transcription of adenovirus and HeLa cell genes in the presence of drugs that inhibit topoisomerase I and II function. *Nucleic Acids Res* 18:1499-508.

- Schaller MD (2001): Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20:6459-72.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-36.
- Scheffner M, Whitaker NJ (2003): Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol* 13:59-67.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL (2001): Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* 286:3106-14.
- Schneider-Gadicke A, Kaul S, Schwarz E, Gausepohl H, Frank R, Bastert G (1988): Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro. *Cancer Res* 48:2969-74.
- Schoehn G, El Bakkouri M, Fabry CM, Billet O, Estrozi LF, Le L, Curiel DT, Kajava AV, Ruigrok RW, Kremer EJ (2008): Three-dimensional structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J Virol* 82:3192-203.
- Schorpp M, Jager R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H, Angel P (1996): The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res* 24:1787-8.
- Schwalbach G, Sibler AP, Choulier L, Deryckere F, Weiss E (2000): Production of fluorescent single-chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 18:121-32.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H (1985): Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-4.
- Scott ES, Wiseman JW, Evans MJ, Colledge WH (2001): Enhanced gene delivery to human airway epithelial cells using an integrin-targeting lipoplex. *J Gene Med* 3:125-34.
- Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N (2003): Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77:9183-91.
- Sena-Esteves M, Saeki Y, Fraefel C, Breakefield XO (2000): HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol Ther* 2:9-15.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R (2003): Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 77:13125-35.
- Shaki-Loewenstein S, Zfania R, Hyland S, Wels WS, Benhar I (2005): A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods* 303:19-39.
- Shamanin VA, Androphy EJ (2004): Immortalization of human mammary epithelial cells is associated with inactivation of the p14ARF-p53 pathway. *Mol Cell Biol* 24:2144-52.

- Shamanin VA, Sekaric P, Androphy EJ (2008): hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J Virol* 82:3912-20.
- Shashkova EV, Cherenova LV, Kazansky DB, Doronin K (2005): Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors. *Cancer Gene Ther* 12:617-26.
- Shayakhmetov DM, Eberly AM, Li ZY, Lieber A (2005): Deletion of penton RGD motifs affects the efficiency of both the internalization and the endosome escape of viral particles containing adenovirus serotype 5 or 35 fiber knobs. *J Virol* 79:1053-61.
- Shayakhmetov DM, Li ZY, Ni S, Lieber A (2004): Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J Virol* 78:5368-81.
- Shayakhmetov DM, Lieber A (2000): Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* 74:10274-86.
- Sherman L, Alloul N (1992): Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology* 191:953-9.
- Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, Herrero R, Hutchinson ML, Bratti C, Zahniser D, Morales J, Hildesheim A, Helgesen K, Kelly D, Alfaro M, Mena F, Balmaceda I, Mango L, Greenberg M (1997): Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer* 81:89-97.
- Shirasawa H, Jin MH, Shimizu K, Akutsu N, Shino Y, Simizu B (1994): Transcription-modulatory activity of full-length E6 and E6*I proteins of human papillomavirus type 16. *Virology* 203:36-42.
- Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT (2004): Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* 322:349-59.
- Sibler AP, Courtete J, Muller CD, Zeder-Lutz G, Weiss E (2005): Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells. *Febs J* 272:2878-91.
- Sibler AP, Nordhammer A, Masson M, Martineau P, Trave G, Weiss E (2003): Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Exp Cell Res* 286:276-87.
- Simmonds M, Storey A (2008): Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis. *Int J Cancer* 123:2260-6.
- Slebos RJ, Kesis TD, Chen AW, Han SM, Hedrick L, Cho KR (1995): Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology* 208:111-20.
- Smith RH, Afione SA, Kotin RM (2002): Transposase-mediated construction of an integrated adeno-associated virus type 5 helper plasmid. *Biotechniques* 33:204-6, 208, 210-1.

Smith TA, Idamakanti N, Rollence ML, Marshall-Neff J, Kim J, Mulgrew K, Nemerow GR, Kaleko M, Stevenson SC (2003): Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther* 14:777-87.

Smotkin D, Prokoph H, Wettstein FO (1989): Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 63:1441-7.

Song S, Pitot HC, Lambert PF (1999): The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 73:5887-93.

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997): Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-7.

Spanos WC, Hoover A, Harris GF, Wu S, Strand GL, Anderson ME, Klingelutz AJ, Hendriks W, Bossler AD, Lee JH (2008): The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol* 82:2493-500.

Srivenugopal KS, Mullapudi SR, Ali-Osman F (2002): Phosphorylation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: experience with a GST-fusion protein and a new pull-down assay. *Cancer Lett* 181:87-93.

Staba MJ, Wickham TJ, Kovesdi I, Hallahan DE (2000): Modifications of the fiber in adenovirus vectors increase tropism for malignant glioma models. *Cancer Gene Ther* 7:13-9.

Stacey SN, Jordan D, Williamson AJ, Brown M, Coote JH, Arrand JR (2000): Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol* 74:7284-97.

Stauffer Y, Raj K, Masternak K, Beard P (1998): Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* 283:529-36.

Steele C, Cowser LM, Shillitoe EJ (1993): Effects of human papillomavirus type 18-specific antisense oligonucleotides on the transformed phenotype of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 53:2330-7.

Stevenson SC, Rollence M, White B, Weaver L, McClelland A (1995): Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol* 69:2850-7.

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM (1993): Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* 12:2589-99.

Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Glasgow JN, Le LP, Stoff A, Everts M, Tsuruta Y, Kawakami Y, Bauerschmitz GJ, Mathis JM, Pereboeva L, Seigal GP, Dall P, Curiel DT (2005): A human adenoviral vector with a chimeric fiber from canine adenovirus type 1 results in novel expanded tropism for cancer gene therapy. *Gene Ther* 12:1696-706.

Storrs CH, Silverstein SJ (2007): PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol* 81:4080-90.

- Strauss M (1994): Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Ther* 1:156-64.
- Strube RW, Chen SY (2002): Characterization of anti-cyclin E single-chain Fv antibodies and intrabodies in breast cancer cells: enhanced intracellular stability of novel sFv-F(c) intrabodies. *J Immunol Methods* 263:149-67.
- Strube RW, Chen SY (2004): Enhanced intracellular stability of sFv-Fc fusion intrabodies. *Methods* 34:179-83.
- Strunze S, Trotman LC, Boucke K, Greber UF (2005): Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell* 16:2999-3009.
- Suomalainen M, Nakano MY, Keller S, Boucke K, Stidwill RP, Greber UF (1999): Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144:657-72.

T.

- Tan TM, Ting RC (1995): In vitro and in vivo inhibition of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. *Cancer Res* 55:4599-605.
- Teodoro JG, Branton PE (1997): Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* 71:3620-7.
- Thomas M, Banks L (1998): Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17:2943-54.
- Thomas M, Banks L (1999): Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 80 (Pt 6):1513-7.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, Banks L (2002): Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 21:5088-96.
- Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L (1995): HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 10:261-8.
- Thomas MC, Chiang CM (2005): E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell* 17:251-64.
- Thomas MK, Tsang SW, Yeung ML, Leung PS, Yao KM (2009): The roles of the PDZ-containing proteins bridge-1 and PDZD2 in the regulation of insulin production and pancreatic beta-cell mass. *Curr Protein Pept Sci* 10:30-6.
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI (2000): Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 60:5916-21.
- Tillman BW, Hayes TL, DeGrujil TD, Douglas JT, Curiel DT (2000): Adenoviral vectors targeted to CD40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. *Cancer Res* 60:5456-63.

Tollefson AE, Scaria A, Saha SK, Wold WS (1992): The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J Virol* 66:3633-42.

Tomaic V, Gardiol D, Massimi P, Ozbun M, Myers M, Banks L (2009): Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene* 28:1-8.

Tomko RP, Xu R, Philipson L (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3352-6.

Tong X, Howley PM (1997): The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4412-7.

Tornow J, Polvino-Bodnar M, Santangelo G, Cole CN (1985): Two separable functional domains of simian virus 40 large T antigen: carboxyl-terminal region of simian virus 40 large T antigen is required for efficient capsid protein synthesis. *J Virol* 53:415-24.

Trotman LC, Mosberger N, Fornerod M, Stidwill RP, Greber UF (2001): Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol* 3:1092-100.

Tsao YP, Huang SJ, Chang JL, Hsieh JT, Pong RC, Chen SL (1999): Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDII/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol* 73:4983-90.

Tse E, Lobato MN, Forster A, Tanaka T, Chung GT, Rabbitts TH (2002): Intracellular antibody capture technology: application to selection of intracellular antibodies recognising the BCR-ABL oncogenic protein. *J Mol Biol* 317:85-94.

Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ (2008): Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153:397-408.

U.V.

Umana P, Gerdes CA, Stone D, Davis JR, Ward D, Castro MG, Lowenstein PR (2001): Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol* 19:582-5.

van Beusechem VW, van Rijswijk AL, van Es HH, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR (2000): Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther* 7:1940-6.

van der Blik AM, Meyerowitz EM (1991): Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* 351:411-4.

van Oostrum J, Burnett RM (1985): Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol* 56:439-48.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R (2003): Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8211-6.

Vellinga J, Rabelink MJ, Cramer SJ, van den Wollenberg DJ, Van der Meulen H, Leppard KN, Fallaux FJ, Hoeben RC (2004): Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J Virol* 78:3470-9.

Vigant F, Descamps D, Jullienne B, Esselin S, Connault E, Opolon P, Tordjmann T, Vigne E, Perricaudet M, Benihoud K (2008): Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver. *Mol Ther* 16:1474-80.

Virtanen A, Gilardi P, Naslund A, LeMoullec JM, Pettersson U, Perricaudet M (1984): mRNAs from human adenovirus 2 early region 4. *J Virol* 51:822-31.

Visintin M, Meli GA, Cannistraci I, Cattaneo A (2004): Intracellular antibodies for proteomics. *J Immunol Methods* 290:135-53.

Visintin M, Settanni G, Maritan A, Graziosi S, Marks JD, Cattaneo A (2002): The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. *J Mol Biol* 317:73-83.

Vives RR, Lortat-Jacob H, Chroboczek J, Fender P (2004): Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* 321:332-40.

Von Seggern DJ, Huang S, Fleck SK, Stevenson SC, Nemerow GR (2000): Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Virol* 74:354-62.

Von Seggern DJ, Chiu CY, Fleck SK, Stewart PL, Nemerow GR (1999): A helper-independent adenovirus vector with E1, E3, and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol* 73:1601-8.

W.

Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SM, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IM, Monteiro RQ, Barouch DH, van Rooijen N, Napoli C, Havenga MJ, Nicklin SA, Baker AH (2008): Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132:397-409.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9.

Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ (2002): Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110:789-99.

Wang-Johanning F, Gillespie GY, Grim J, Rancourt C, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT (1998): Intracellular expression of a single-chain antibody directed against human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein achieves targeted antineoplastic effects. *Cancer Res* 58:1893-900.

Wang EW, Scott MO, Ricciardi RP (1988): An adenovirus mRNA which encodes a 14,700-Mr protein that maps to the last open reading frame of region E3 is expressed during infection. *J Virol* 62:1456-9.

- Wang Q, Jia XC, Finer MH (1995): A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus vectors containing two lethal gene-region deletions. *Gene Ther* 2:775-83.
- Weinstein IB, Joe AK (2006): Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3:448-57.
- Weitzman MD, Ornelles DA (2005): Inactivating intracellular antiviral responses during adenovirus infection. *Oncogene* 24:7686-96.
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2004): Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64:3878-84.
- Werge TM, Baldari CT, Telford JL (1994): Intracellular single chain Fv antibody inhibits Ras activity in T-cell antigen receptor stimulated Jurkat cells. *FEBS Lett* 351:393-6.
- Werge TM, Biocca S, Cattaneo A (1990): Intracellular immunization. Cloning and intracellular expression of a monoclonal antibody to the p21ras protein. *FEBS Lett* 274:193-8.
- Wickham TJ, Carrion ME, Kovesdi I (1995): Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 2:750-6.
- Wickham TJ, Filardo EJ, Cheresch DA, Nemerow GR (1994): Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol* 127:257-64.
- Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Kovesdi I (1997): Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunol Immunother* 45:149-51.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR (1993): Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-19.
- Wickham TJ, Roelvink PW, Brough DE, Kovesdi I (1996): Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotechnol* 14:1570-3.
- Wienzek S, Roth J, Dobbstein M (2000): E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* 74:193-202.
- Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR (2005): Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 79:1992-2000.
- Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D (2002): Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24:275-90.
- Winter N, D'Halluin JC (1991): Regulation of the biosynthesis of subgroup C adenovirus protein IVa2. *J Virol* 65:5250-9.
- Worgall S, Worgall TS, Kostarelos K, Singh R, Leopold PL, Hackett NR, Crystal RG (2000): Free cholesterol enhances adenoviral vector gene transfer and expression in CAR-deficient cells. *Mol Ther* 1:39-48.

Worn A, Pluckthun A (1998): An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Lett* 427:357-61.

Worn A, Pluckthun A (1999): Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry* 38:8739-50.

Wu H, Han T, Belousova N, Krasnykh V, Kashentseva E, Dmitriev I, Kataram M, Mahasreshti PJ, Curiel DT (2005): Identification of sites in adenovirus hexon for foreign peptide incorporation. *J Virol* 79:3382-90.

Wu H, Seki T, Dmitriev I, Uil T, Kashentseva E, Han T, Curiel DT (2002): Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum Gene Ther* 13:1647-53.

Wu SY, Chiang CM (2007): The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 282:13141-5.

X.Y.

Xia D, Henry LJ, Gerard RD, Deisenhofer J (1994): Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure* 2:1259-70

Yabe Y, Trentin JJ, Taylor G (1962): Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:343-4.

Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M (2006): Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer*

Yamini B, Yu X, Gillespie GY, Kufe DW, Weichselbaum RR (2004): Transcriptional targeting of adenovirally delivered tumor necrosis factor alpha by temozolomide in experimental glioblastoma. *Cancer Res* 64:6381-4.

Yang X, Bani MR, Lu SJ, Rowan S, Ben-David Y, Chabot B (1994): The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6924-8.

Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM (1985): Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119:361-6.

Yoshida Y, Sadata A, Zhang W, Saito K, Shinoura N, Hamada H (1998): Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Hum Gene Ther* 9:2503-15.

Yuan H, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL, Schlegel R (2001): Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* 75:7848-53.

Z.

Zhdanov RI, Podobed OV, Vlassov VV (2002): Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* 58:53-64.

Zhou H, O'Neal W, Morral N, Beaudet AL (1996): Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J Virol* 70:7030-8.

Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY, Frazer IH (1993): Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol* 74 (Pt 4):763-8.

Zhou P (2005): Targeted protein degradation. *Curr Opin Chem Biol* 9:51-5.

Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einkenkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M (2003): A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 22:3977-84.

Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S (2005): The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell* 17:121-35.

Zwerschke W, Mannhardt B, Massimi P, Nauenburg S, Pim D, Nickel W, Banks L, Reuser AJ, Jansen-Durr P (2000): Allosteric activation of acid alpha-glucosidase by the human papillomavirus E7 protein. *J Biol Chem* 275:9534-41.

Sites internet

<http://www-dep.iarc.fr/>

<http://acces.inrp.fr/>

<http://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php?lang=2>

<http://www.soundprint.org/getImage/ID/162/HPV.jpg>

<http://virology-online.com/viruses/papilloma.gif>

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/vir/e

[docs/00/03/FB/72/texte_alt_085ql.jpg](http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/vir/e/docs/00/03/FB/72/texte_alt_085ql.jpg)

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Cancer du col de l'utérus : Etude de l'oncoprotéine E6 du papillomavirus humain de type 16 et adressage de vecteurs adénoviraux

Deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme, les carcinomes du col utérin sont associés dans 99 % des cas à une infection par un virus à ADN : le virus du papillome humain (HPV de type 16 et 18 essentiellement). L'effet oncogène des HPV est principalement provoqué par l'intégration des gènes codant deux oncoprotéines virales, E6 et E7, dans le génome de la cellule infectée. L'inhibition spécifique de l'oncoprotéine E6 constitue un enjeu thérapeutique majeur. En effet, elle doit provoquer la restauration de la voie dépendante de p53 et permettre l'orientation des cellules cancéreuses vers l'apoptose. Cependant, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite une bonne compréhension des mécanismes de carcinogenèse, la découverte de molécules biologiques actives mais aussi l'optimisation de leur vectorisation. C'est dans ce contexte scientifique que s'est inscrit mon projet de thèse. Celui-ci est articulé autour de trois axes de recherche dont le but est : (i) déterminer l'activité biologique de mutants de l'oncoprotéine E6 d'HPV de type 16 (16E6) afin d'établir les relations entre structure et fonctions au niveau cellulaire, (ii) développer des ligands biologiques (scFvs) capables d'inhiber 16E6 dans un contexte cellulaire (iii) générer des vecteurs recombinants ciblant de manière préférentielle les cellules cancéreuses transformées par HPV.

Au cours de ce travail nous avons, par des études fonctionnelles, montré que l'auto-association du domaine N-terminal de 16E6 n'est pas nécessaire à la dégradation de p53 *in vitro* et dans les cellules C33A. De plus, cette dégradation peut se faire de manière indépendante de l'ubiquitine ligase E6AP. Nous avons également montré que des fragments d'anticorps (scFvs) interagissant avec l'extrémité N-terminale de 16E6 bloquent la dégradation de p53 *in vitro* et induisent une mort cellulaire spécifique des cellules HPV positives. Parallèlement à ce projet, nous avons produit des vecteurs adénoviraux pseudotypés ciblant de manière préférentielle les cellules HPV positives.

Mon travail de thèse a donc permis (i) une meilleure compréhension de la relation entre auto-association de 16E6, liaison à E6AP et dégradation de p53 (ii) l'étude d'une technique d'immunisation intracellulaire basée sur l'expression de scFvs anti-16E6 et enfin (iii) la construction d'adénovirus ciblant de manière préférentielle les cellules HPV positives.

Le développement de mutants de 16E6 inhibant les activités de l'oncoprotéine ainsi que de scFvs anti-16E6 pourrait conduire à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de détruire de manière ciblée les cellules tumorales du col de l'utérus.

Mots clés : Papillomavirus, cancer du col de l'utérus, adénovirus, scFvs, oncoprotéine E6, thérapie génique, ciblage cellulaire