

## Transfert du CFTR par vecteurs de gènes dérivés des adénovirus ou par trogocytose de microparticules membranaires : mécanismes moléculaires et applications à la mucoviscidose

Gaëlle Gonzalez

### ▶ To cite this version:

Gaëlle Gonzalez. Transfert du CFTR par vecteurs de gènes dérivés des adénovirus ou par trogocytose de microparticules membranaires : mécanismes moléculaires et applications à la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10261 . tel-00819319

### HAL Id: tel-00819319 https://theses.hal.science/tel-00819319

Submitted on 30 Apr 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





N° d'ordre : 261-2011

Année 2011

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

#### L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE ED341-E2M2 Evolution Ecosystèmes - Microbiologie Modélisation

#### DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 Décembre 2011

par

Gaëlle GONZALEZ

### Transfert du CFTR par vecteurs de gènes dérivés des adénovirus ou par trogocytose de microparticules membranaires: mécanismes moléculaires et applications à la mucoviscidose

Directeurs de thèse : Madame la Dr. Saw-See Hong et Monsieur le Pr. Pierre Boulanger

#### JURY :

Monsieur le Pr. Gabriel Bellon Monsieur le Pr. Pierre Lehn Monsieur le Dr. Marc Chanson Monsieur le Dr. Pascal Fender Président Rapporteur Rapporteur Examinateur

## **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**

#### Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire Vice-président du Conseil Scientifique Secrétaire Général

#### M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. AnnatM. le Professeur D. SimonM. le Professeur J-F. MornexM. G. Gay

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

## Remerciements,

Je tiens à remercier le Pr. Jean François Mornex, Directeur de l'UMR 754 "Rétrovirus et Pathologie comparée" pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie l'association Vaincre la Mucoviscidose pour avoir supporté mon travail de thèse.

Je remercie sincèrement le Dr Saw-See Hong et le Pr Pierre Boulanger pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse. Je souhaite leur témoigner ma reconnaissance pour la confiance qu'ils m'ont accordée à de multiples occasions, pour leur grande expertise scientifique, leur patience, leur sympathie et leur bonne humeur.

Merci à Monsieur le Professeur G. Bellon d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre Lehn et Monsieur le Docteur Marc Chanson pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de leur soutien par l'intermédiaire de l'association Vaincre la Mucoviscidose.

Merci à Monsieur le Docteur Pascal Fender d'avoir accepté d'expertiser mon travail de son œil expert sur l'Adénovirus.

Je remercie particulièrement les membres de l'équipe "Rétrovirus, Intégrase, Virus et Vaccin". Merci à Corinne Ronfort pour son soutien, à Karen Moreau pour m'avoir fait découvrir l'enseignement, à Marie-Pierre (MP) pour sa bonne humeur quotidienne, à Kathy pour ses moments de "câblages" partagés.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'UMR 754 avec qui j'ai pu partager de nombreuses discussions scientifiques ou non, des moments de détente, de rire. Je remercie tout particulièrement Barbara Gineys, Marie-Pierre Confort, Sylvie Farget (Madame Farget) et Monique Martingay (Momo) pour leur soutien, leur conseil, les bons moments partagés et leur amitié !

Un grand Merci à mes parents, à Marion et François qui m'ont soutenue à chaque instant, qui m'ont épaulée, encouragée et qui ont toujours cru en moi ! Merci pour tout !

Un grand merci à Sylvain, pour son soutien inconditionnel, sa tendresse et son amour.

## Table des matières

Table des matières	5
Table des figures	11
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	15
I. La mucoviscidose	19
1. Historique	21
2. Le canal CFTR	21
2.1. Le gène CFTR	21
2.2. La protéine CFTR et ses fonctions	23
2.2.1. Structure du CFTR	23
2.2.2. Régulation de la protéine CFTR	23
2.2.3. Propriétés du canal CFTR	24
2.2.3.1. Canal ionique	24
2.2.3.2. Régulateur d'autres canaux ioniques	24
2.3. Les mutations du gène <i>CFTR</i>	27
2.3.1. Les classes de mutations	27
2.3.1.1. Classe I : mutations affectant la synthèse de la protéine CFTR	27
2.3.1.2. Classe II : défaut de maturation de la protéine.	27
2.3.1.3. Classe III : défaut de régulation du canal Cl-	29
2.3.1.4. Classe IV : défaut de conductance du canal Cl	29
2.3.1.5. Classe V : défaut de stabilité de l'ARNm	29
2.3.1.6. Classe VI : défaut de stabilité de la protéine	29
2.4. Corrélation entre Génotype et Phénotype dans la mucoviscidose	30
2.4.1. Atteinte pancréatique.	30
2.4.2. Atteinte pulmonaire	31
2.4.3. Atteinte intestinale	31
2.4.4. Limite des corrélations génotype / phénotype	31
2.5. Biologie cellulaire du CFTR.	32
2.5.1. Généralités	32
2.5.2. Maturation du CFTR	32
2.5.3. Trafic intracellulaire de la protéine CFTR	33
2.5.3.1. Compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC)	33
2.5.3.2. Transport du CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique	35
2.5.4. Endocytose, Recyclage du CFTR et voies de dégradation	35
3. Thérapies actuelles de la mucoviscidose	37
3.1. Thérapie génique de la mucoviscidose	37
3.1.1. Les vecteurs viraux	38
3.1.1.1. Vecteurs rétroviraux	38
3.1.1.2. AAV	39
3.1.1.3. Adénovirus et vecteurs adénoviraux	39
3.2. Thérapie protéique	41
3.2.1. Mutations de classe I	41
3.2.2. Mutations de classe II	41
3.2.3. Mutations de classe III	42
3.2.4. Mutations de classe IV	43

II. Les vecteurs adénoviraux	. 45
1. Classification des Adénovirus	. 47
2. Structure de l'Adénovirus	. 49
3. Le Génome viral	. 53
4. Le cycle viral	. 53
4.1. Phase précoce	. 53
4.1.2. Trafic intracellulaire	. 55
4.1.3. Activation des gènes viraux	. 55
4.1.4. Réplication du génome viral	. 57
4.2. Phase tardive	. 59
4.3. Variations observées pour l'Ad5F35	. 61
5. Récepteurs cellulaires	. 63
5.1. Le récepteur CAR « Coxsackie and Adenovirus Receptor »	. 63
5.2. CD46	. 65
5.3. Les Héparanes Sulfates (HS)	. 65
5.4. L'acide sialique	. 66
5.5. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I)	. 66
5.6. VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule -1)	. 67
5.7. CD80/CD86	. 67
5.8. Desmogléine-2	. 67
5.9. GD1a glycane	. 67
6. Tropisme des vecteurs adénoviraux : rôle du facteur de coagulation X (FX)	. 69
6.1. Le Facteur X	. 69
6.1.1. Historique	. 69
6.1.2. Le gène <i>F10</i>	. 69
6.1.2.1. Structure de la protéine FX	. 69
6.1.3. Rôle des facteurs de coagulation et plus précisément du FX dans le tropisme <i>in vivo</i> of	des
adénovirus	. 71
7. Thérapie génique de la mucoviscidose et vecteurs adénoviraux	. 71
7.1. Vecteurs adénoviraux comme vecteurs de transfert de gène	. 71
7.1.1. Les vecteurs adénoviraux défectifs pour la réplication	. 73
7.1.1.1. Vecteurs adénoviraux de première génération	. 73
7.1.1.2. Vecteurs adénoviraux de seconde génération	. 75
7.1.1.3. Vecteurs "gutless"	. 76
III. Les vésicules membranaires : Microvésicules et Exosomes	. 79
1. Introduction générale	. 81
2. La voie endocytaire	. 81
2.1. Endosomes de tri	. 81
2.2. Les corps multivésiculaires (Multivesicular bodies ou MVBs)	. 83
2.2.1. Lipides et protéines caractéristiques	. 83
2.2.2. Les signaux de tri vers les MVBs	. 85
2.2.2.1. Les complexes ESCRT (Endosomique Sorting Complexes required for transport	ou
complexe d'adressage endosomal requis pour le transport) dans la biogénèse des MVB.	. 85
3. Les microvésicules (Mv)	. 87
3.1. Biosynthèse	. 87
3.2. Composition	. 89
4. Les exosomes	. 91
4.1. Historique	. 91
4.2. Composition moléculaire	. 93
4.2.1. Composition protéique et lipidique	. 93
4.2.2. Protéines ubiquitaires	. 93
4.2.3. Lipides	. 95
4.3. Régulation de la sécrétion des exosomes	. 95
4.4. Fonctions	. 95

4.4.1. Les exosomes permettent une communication intercellulaire	95
4.4.2. Transfert d'ARN	96
4.4.3. Nouveau véhicule "contrôlé" de thérapie génique	96
5. Implications médicales des microvésicules et exosomes	97
5.1. Microvésicules et pathologies cardio-vasculaires	97
5.2. Microvésicules et maladies auto-immunes	97
5.3. Rôles des exosomes en oncologie	97
VI. Objectifs de la thèse	101
VII. Matériels et méthodes	107
1. Culture cellulaire	109
1.1. Les cellules HEK-293	109
1.2. Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)	109
1.3. Les cellules CHO -GFP-CFTR	109
2. Virus	109
2.1. Les vecteurs adénoviraux	109
2.1.1. Production des stocks adénoviraux	110
2.1.1.1. Amplification	110
2.1.1.2. Préparation des stocks viraux	110
2.1.1.3. Purification des stocks adénoviraux	110
2.1.1.4. Titration des stocks adénoviraux	111
2.2. Infection adénovirale	111
2.3. Marquage à l'Alexa 488 et à l'Alexa 555 respectivement des vecteurs adénoviraux e	t du 111
3. Quantification des protéines par la technique de Bradford	112
4. Détection des protéines par cytométrie en flux	112
5. Techniques de biologie moléculaire	112
5.1 Technique de clonage pour l'obtention du plasmide épisomal pCEP <sub>4</sub> -GFP-CFTR	112
5.1.1. Digestion par des enzymes de restriction	113
5.1.2. Purification des produits de digestion sur gel d'agarose : purification de l'insert "e	GFP-
CFTRwt"	113
5.1.3. Purification des produits de digestion du plasmide "vecteur" par extraction phénol	-
chloroforme	113
5.1.4. Ligation	113
5.1.5. Transformation bactérienne par choc thermique	114
5.1.6. "Mini-prep" d'ADN plasmidique	114
5.1.7. Digestion de l'ADN plasmidique pour vérifier la présence de l'insert eGFP-CFTR	wt
dans le plasmide vecteur.	114
5.1.8. "Maxi prep" afin d'amplifier l'ADN plasmidique pCEP <sub>4</sub> -eGFP-CFTR	114
5.2. Extraction ADN	114
5.3. Extraction ARN et Transcription inverse	114
5.4. PCR quantitative en temps reel	115
6.1 Centrifugations différentielles	119
6.2 Fractionnement des exosomes et microvésicules sur gradient continu de sucrose	119
6.3 Microsconie électronique	119
7 Tests d'efflux de radiotraceurs	119
7.1 Principe	120
7.2 Protocole standard	120
7.3. Analyse	121
8. Mesure du potentiel de membrane par la sonde DiSBAC <sub>2</sub> (3)	121
8.1. Principe	121
8.2. Protocole standard	121
8.3. Analyse	122
9. Techniques de microscopie	122

9.1. Microscopie électronique	122
9.2. Microscopie confocale	122
VIII. Résultats et Discussion	125
6. Première partie : L'entrée et le trafic intracellulaire des adénovirus humains en présence	du
facteur X de coagulation sont déterminés par le sérotype de la fibre et non par l'interaction	
hexon-FX les héparanes sulfates.	129
6.1. Introduction	129
6.2. Résultats	131
6.2.1. Le FX se fixe à la protéine hexon des vecteurs adénoviraux de sérotype 5 (Ad5) via	a son
domaine γ carboxilique (Gla) et sert de "pont" pour l'attachement du vecteur aux héparar sulfates (HS) ou aux molécules HSPG cellulaires.	ies 131
6.2.2. L'expression d'HSPG à la surface des cellules est nécessaire pour leur transduction	ı par
l'Ad5wt en présence de FX.	131
6.2.3. Les motifs KKTK (de la fibre) et RGD (de la base de penton) n'interviennent pas d	lans
la transduction des cellules exprimant des molécules d'HSPG par l'Ad5wt en présence de	e FX.
6.2.4 Mise en ávidence d'un comportement paradoxal du vecteur chimárique Ad5E25 vi	133 à
vis du FX et des HSPG	133
6.2.5 Fixation et internalisation du complexe FX-Ad5F35 dans les cellules CHO exprime	ant
les molécules d'HSPG	135
6.2.5.1. Fixation aux cellules	135
6.2.5.2. Entrée dans la cellule	135
6.2.5.3. Libération extracellulaire	137
6.2.6. Trafic intracellulaire et compartimentalisation du complexe FX-Ad5F35 dans les	
cellules CHO K1	137
6.2.6.1. Imagerie cellulaire en temps réel	137
6.2.6.2. Rétention de l'Ad5F35 dans le compartiment endosomal tardif	139
6.2.7. Observation des particules d'Ad5wt et d'Ad5F35 internalisées dans les cellules en	100
présence ou non de FX par microscopie électronique	139
6.2.8. Absorption cellulaire et retention du FX en presence ou non des particules adenovi	rates. $1/1$
6.3. Conclusions et perspectives	143
7 Deuxième partie · Le vecteur chimérique Ad5F35-GFP-CFTR permet de restaurer l'activ	vité
CFTR après transduction par le pôle apical d'épithéliums respiratoires reconstitués de pati	ents
atteints de mucoviscidose et sans effets cytotoxiques apparentés.	149
7.1. Introduction	149
7.2. Résultats et discussion	149
7.2.1. Mise en évidence d'un effet inhibiteur sur l'activité canal à chlorure du CFTR aprè	S
transduction par le vecteur Ad5-GFP-CFTR	149
7.2.2. L'inhibition de l'activité canal chlore est due aux protéines virales de capsides	151
7.2.3. L'effet négatif sur le CFTR est dû à la protéine de capside base de penton	151
7.2.4. Le motif RGD de la base de penton est responsable de l'effet négatif observé sur	1.50
I activite du CFTR	153
7.2.5. Developpement d'un vecteur chimerique : l'Ad5F135-GFP-CFTR	133
7.2.6. Restauration de l'activité CFTR après transduction par l'AdSFSS-GFP-CFTR à lai	155
7.2.7. L'Ad5Ei35-GEP-CETR transduit de facon efficace par le pôle apical les épithélium	133 ne
reconstitués de natients atteints de mucoviscidose	157
7.2.8. Restauration de l'activité CFTR après transduction par l'Ad5F35-GFP-CFTR	197
d'épithélium de patients mucoviscidosiques.	157
7.2.9. Durée d'expression du transgène GFP-CFTR au sein d'épithéliums reconstitués	
transduits par le pôle apical.	157
7.3. Conclusions et perspectives	159

8. Troisième partie : Transfert intercellulaire du CFTR par trogocytose : microvésicules et	
exosomes	. 163
8.1. Introduction	. 163
8.2. Preuve de concept et faisabilité du transfert intercellulaire de molécules bioactives par	les :
MPs: modèle expérimental de la glycoprotéine membranaire CD46	. 163
8.2.1. Production de microparticules membranaires (MP) pseudotypées CD46	. 165
8.2.2. Fonctionnalité des molécules CD46 exprimées à la surface des MP évaluée par fixa	tion
du vecteur adénoviral Ad5F35.	. 167
8.2.3. Efficacité du transfert des molécules CD46 par les MP	. 167
8.2.4. Fonctionnalité des molécules CD46 après transfert aux cellules réceptrices via les M CD46.	1P <sub>30</sub> - . 167
8.2.4.1. Test de fonctionnalité de la protéine CD46 comme protéine régulatrice de la cascade du complément.	. 167
8.2.4.2. La protéine CD46 est fonctionnelle en tant que récepteur cellulaire au vecteur adénoviral Ad5F35	. 169
8.3. Application à la glycoprotéine CFTR	. 169
8.3.1. Création d'une lignée stable CHO exprimant la protéine CFTR taggée GFP (CHO-C	3FP-
CFTR)	. 169
8.3.2. Fractionnement des populations MP <sub>30</sub> et MP <sub>100</sub> sur gradient continu de sucrose et	
efficacité relative de l'incorporation de la protéine GFP-CFTR dans chacune des fractions 8.3.3. Les MP permettent un transfert de la protéine GFP-CFTR aux cellules CHO CFTR(	. 171 -).
	. 1/1
8.3.4. Les MP permettent un transfert d'ARNm codant pour la proteine GFP-CFTR dans l	es
2 2 5 Los protóines CED CETD transférées par des MD sont fonctionnelles	172
8.5.5. Les proteines OFF-CFTK transferees par des MF sont fonctionnelles	174
0.4. Conclusions et Perspectives	177
	, 1 / /
X. Annexes	. 185
XI. Références bibliographiques	. 199

# Table des figures

Figure 1 : Structure du gène CFTR et de la protéine CFTR	. 22
Figure 2 : Régulation des différents transporteurs ioniques par la protéine CFTR	. 26
Figure 3 : Classification des mutations du gène CFTR en fonction des altérations moléculaires	. 28
Figure 5 : Illustration du processus de biosynthèse et de maturation du CFTR	. 34
Figure 6 : Modèle représentant le trafic intracellulaire du CFTR	. 36
Figure 7 : Structure d'une particule adénovirale	. 48
Figure 8 : Reconstitution par microscopie crvo-électronique de la protéine penton-base (capsomère de pentor	n)
de l'Ad5.	, . 50
Figure 9 : Structure du bouton terminal de la fibre.	. 50
Figure 10 · Schéma représentant l'organisation du génome des adénovirus de sérotype 2 et 5	52
Figure 11: Description temporelle des étapes du cycle viral et de l'expression des gènes.	. 54
Figure 12 · Rénlication du génome adénoviral	56
Figure 12 · Nepheuten au generie auchernalise	58
Figure 14 : Représentation schématique du trafic intracellulaire des adénovirus des sous-arounes A et B	60
Figure 14 : Représentation schématique des différents récenteurs cellulaires nermettant l'attachement et	. 00
l'entrée des adénovirus (Ad)	62
Figure 16: Modèle de mécanisme de nassage des adénovirus vers la surface anisale de l'énithélium	. 02 61
Figure 10. Modele de Inécumisme de passage des ademovinas vers la sarjace aplicate de l'épithénam.	. 04 69
Figure 17. Representation schematique des résentaurs collulaires journe du PA.	. 00
Figure 18: Representation schematique des recepteurs centulaires jouant un role airect ou indirect dans la liais	son
Sigure 10. Deprésentation achémotique des trais générations de vectoure dévinée de l'adépauirus humanie	. 70
Figure 19: Representation schematique des trois generations de vecteurs derives de l'adenovirus numain	. 72
Figure 20: Representation schematique de la production de vecteur adenoviraux "gutiess" via le système	
	. 74
Figure 21: Representation schematique des differents compartiments endocytaires.	. 80
Figure 22: Tri des proteines et formation du MVB.	. 84
Figure 23: Représentation schématique de la biosynthèse des exosomes dans le MVB	. 86
Figure 24: Fonctionnement de la flippase, de la floppase et de la scramblase	. 88
Figure 25 : Rôle du calcium dans la genèse des microvésicules	. 88
Figure 26: Représentation schématique de la formation de microvésicules	. 90
Figure 27: Représentation schématique d'une microvésicule et de ses principaux constituants	. 90
Figure 28: Principales protéines présentes au sein des exosomes	. 92
Figure 29: Représentation schématique des différents mécanismes éventuels utilisés par les exosomes pour	
permettre une communication intercellulaire	. 94
Figure 30: PCR quantitative en temps réel en présence de la molécule Sybr Green	116
Figure 31: Programme utilisés pour réaliser les expériences de PCR quantitative en temps réel	118
Figure 32: Analyse in vitro, par SPR, de la fixation des capsomères d'hexon de l'Ad5wt et de la fixation de	
vecteurs Ad5 mutés ou non sur des HS immobilisés en présence ou non de FX	130
Figure 33: Comparaison de l'efficacité de transduction des cellules CHO K1 et CHO-2241 par le vecteur Ad5wt	<u>-</u>
GFP, en présence ou non de FX,	132
Figure 34 : Comparaison de l'efficacité de transduction des cellules CHOK1 et CHO-2241 par des vecteurs	
adénoviraux sauvage et mutants dans en présence ou non de FX	132
Figure 35 : Analyse par SPR de la fixation du vecteur chimérique AdV5F35 à la surface de FX immobilisé (A) et	-
d'HS immobilisés (B, C) en présence de FX	134
Figure 36: Comparaison de l'efficacité de transduction et du niveau d'expression du transgène GFP entre les	
vecteurs adénoviraux Ad5wt, AdV5F35 à différentes MOI (200, 1000, et 5000) en présence ou non de FX	136
Figure 37: Comparaison de l'absorption cellulaire (A) et de la libération cellulaire (B) des vecteurs Ad5wt et	
AdV5F35 par les cellules CHO K1	136
Figure 38: Clichés de microscopie confocale sur les cellules CHO K1 transduites par différents vecteurs	
adénoviraux.	138
Figure 39: Clichés de microscopie électroniaue des cellules CHO K1 transduites par le vecteur Ad5wt	140
Figure 40: Clichés de microscopie électronique des cellules CHO K1 transduites par le vecteur AdV5F35	142

Figure 41 : Clichés de microscopie confocale de cellules CHO K1 incubées avec du FX seul ou des vecteurs
adénoviraux
Figure 42 : Analyse par SPR de l'interaction entre le FX et la protéine hexon en fonction du pH 145
Figure 43 : Mise en évidence de l'effet négatif d'un vecteur adénoviral sur l'activité CFTR
Figure 44 : Mise en évidence de l'effet négatif d'un vecteur adénoviral.sur l'activité CFTR
Figure 45 : L'effet inhibiteur sur le CFTR est dû aux protéines de la capside adénovirale (a-d), et cartographie de
l'activité inhibitrice sur la molécule de base de penton (e-g)150
Figure 46 : Analyse par test d'efflux d'iode de l'activité CFTR en présence des vecteurs adénoviraux
Ad5Pb <sup>EGD</sup> GFP, Ad5GFP $\Delta$ knob et Ad5GFP-R7-RGD4C
Figure 47 : (a) Mise en évidence (par test d'efflux d'iode) de l'absence de toxicité du vecteur chimérique Ad5F35-
GFP sur l'activité canal chlore du CFTR endogène et (b) mise en évidence de la voie d'entrée du vecteur Ad5F35-
GFP (par test de compétition avec les protéines virales solubles)
Figure 48 : Analyse en microscopie à fluorescence de trois lignées cellulaires (CF-KM4, MM39 et A549)
transduites par l'Ad5F35-GFP et l'Ad5-GFP
Figure 49 : Analyse en test d'efflux d'iode de l'activité CFTR des cellules CF-KM4 transduites par le vecteur
Ad5F35-GFP-CFTR
Figure 50 : Mise en évidence de l'efficacité de transduction du vecteur Ad5F35-GFP-CFTR via le pôle apical
d'épithéliums reconstitués de patients mucoviscidosiques (CF-HAE) 156
Figure 51 : Clichés de microscopie confocale d'épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose
(CF-HAE) transduits via le pôle apical par l'Ad5F35-GFP-CFTR
Figure 52 : Mise en évidence de la restauration de l'activité CFTR dans des CF-HAE après transduction par
l'Ad5F35-GFP-CFTR
Figure 53 : Durée d'expression de la protéine GFP-CFTR au sein d'épithéliums reconstitués de patients sains
(HAE) transduits par le pôle apical avec l'Ad5GFP-CFTR et l'Ad5F35-GFP-CFTR
Figure 54 : Schéma représentant la purification et le fractionnement des populations de MP 164
Figure 55 : Clichés de microscopie élctronique de différentescellules réceptrices après transfert de MP 164
Figure 56 : Clichés de microscopie électronique de MP pseudotypées CD46
Figure 57 : Analyse de l'expression et de la fonctionnalité des molécules CD46 transférées par les MP 166
Figure 58 : Analyse de la fonctionnalité de la protéine CD46 transférée aux cellules CHO comme récepteur
cellulaire du vecteur adénoviral Ad5F35168
Figure 59 : Analyse de l'expression, de la réactivité immunologique et de la fonctionnalité de la protéine GFP-
CFTR exprimée dans les cellules CHO-GFP-CFTR
Figure 60 : Cinétique d'expression de la protéine GFP-CFTR à la membrane des cellules réceptrices CHO après
transfert via les MP
Figure 61 : Clichés de microscopie confocale de cellules CHO K1 après transfert de MP <sub>30</sub> pendant 5 jours 172
Figure 62 : Cinétique d'expression de la protéine GFP-CFTR à la surface des cellules CHO K1 après transfert des
MP
Figure 63 : Détection d'ARNm-GFP-CFTR dans les différentes populations de MP <sub>30</sub> et MP <sub>100</sub> ainsi que dans les
cellules CHO après transfert des MP
Figure 64 : Mesure de l'activité canal à ions chlorure du CFTR dans les cellules CHO K1 après transfert de MP en
utilisant la sonde fluorescente DiSBAC <sub>2</sub> (3)

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des mutations les plus courantes du gène CFTR et relation avec le phénotype sévère	? ou
modéré de la maladie basé sur l'atteinte pancréatique des patients	. 31
Tableau 2 : Formes de glycosylation de la protéine CFTR au cours de sa maturation	. 34
Tableau 3 : Classification des adénovirus humain	. 48
Tableau 4 : Les onze protéines de structure de l'adénovirus	. 50
Tableau 5: Récapitulatif des récepteurs connus pour les adénovirus humains	. 64
Tableau 7: Protéines de classe E constitutives des complexes ESCRT chez la levure et leurs homologues chez	
l'Homme	. 82
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel	117
Tableau 9 : Analyse par cytométrie en flux du nombre de MP exprimant la protéine GFP-CFTR dans les	
différentes sous-populations de MP <sub>30</sub> et MP <sub>100</sub> at analyse par qPCR du contenu en ARN de ces MP	170

## Liste des abréviations

AAV	Virus associé à l'adénovirus (Adeno-associated Virus)
ABC AcMNPV	Transporteur liant l'ATP ( <i>ATP Binding Cassette</i> ) Baculovirus d'Autographa californica ( <i>Autographa californica Multicapsid</i> <i>NucleoPolyhedrosis Virus</i> )
Ad	Adénovirus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Protéine de mort cellulaire codée par l'adénovirus (Adenovirus Death Protein)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP	Protéine Adaptatrice
APC	1er nom de l'adenovirus (Adeno-Pharyngo-Conjunctival virus)
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CAL CAR	Ligand associé au CFTR ( <i>CFTR associated ligand</i> ) Récepteur commun au Coxsackie B3 et à l'adénovirus ( <i>Coxsackie and adenovirus receptor</i> )
CD CFTR	Cluster de Différentiation Canal chlorure régulateur de la conductance membranaire ( <i>Cystic Fibrosis</i> <i>Transmembrane conductance Regulator</i> )
CFTRAF508	Protéine CFTR portant la délétion de la phénylalanine en position 508
СНО	Lignée cellulaire de Carcinome Ovarien de Hamster (Chinese Hamster Ovarian)
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMV	CytoMégaloVirus
COPII	Protéine II des vésicules de transport (Coat Protein II)
СРА	Cellule Présentatrice d'Antigène
Da	Dalton
DICS-X	Déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X
DiSBAC <sub>2</sub> (3) DMEM	(1.3-dialkylthiobarbituric acid) oligomethine oxonol Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco ( <i>Dulbecco's Minimum Essential Modified</i> <i>Medium</i> )
DO	Densité optique
DSG-2	Protéine Desmogléine-2
E1 à E4	Unités de transcrition précoces de l'adénovirus (Early)
ENaC ESCRT	Canal sodique épithélial ( <i>Epithelial Na Channel</i> ) Complexe d'adressage endosomal requis pour le transport ( <i>Endosomique Sorting Complexes Required for Transport</i> )
FX	Facteur de coagulation X
FXa	Facteur de coagulation X activé
GFP	Protéine fluorescente verte de méduse (Green Fluorescent Protein)
HEK	Lignée cellulaire embryonnaire humaine de rein (Human Embryonic Kidney)
HS	Héparane Sulfate
HSP	Protéine de choc thermique (Heat Shock Protein)
HSPG	Héparane Sulfate ProtéoGlycane

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILV	Vésicules intraluminales (IntraLuminal Vesicles)
ITR	Répétitions terminales répétées (Inverted Terminal Repeat)
kb	kilobase
L1 à L5	Unités de transcription tardives de l'adénovirus (Late)
LBPA	Acide Lyso-Bis-phosphatidique (Lyso-Bis-Phosphatidic Acid)
LT	Lymphocyte T
MOI	Multiplicité d'infection (Multiplicity Of Infection)
MP	Microparticule membranaire
MV	Microvésicule
MVB	Corps multi-vésiculaire (MultiVesicular Body)
NBD ORCC	Domaine de liaison à l'ATP du CFTR ( <i>Nucleotide Binding Domain</i> ) Canal chlorure régulé par le calcium intracellulaire ( <i>Outwardly Rectifying Chloride</i> <i>Channel</i> )
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
Pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérase en chaine (Polymerase Chain Reaction)
pfu	Particule infectieuse (plaque forming unit)
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
РКА	Protéine Kinase Dependante de l'Adénosine monophosphate cyclique
РКС	Protéine kinase C
рр	particule physique
R	Domaine Régulateur du CFTR
RGD	Arginine-Glycine-Acide Aspartique
ROMK	Canal potassique sensible à l'ATP (Renal outer Medullary Potassium Channel)
RSV	Virus du Sarcome de Roux
RT	Reverse Transcription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Syndrôme d'ImmunoDéficience Humaine
SVF	Serum de Veau Fœtal
TMD	Domaine Transmembranaire du CFTR (TransMembrane Domaine)
TSG101	Tumor Suceptibility Gene 101
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLP	Virus-like particle
Vps	Vacuolar protein sorting

# I. La mucoviscidose

#### 1. Historique

Les premiers rapports médicaux évoquant les symptômes associés à la maladie datent du Moyen-âge. On parlait d'enfants au goût salé lorsqu'on les embrassait. Ces enfants avaient une espérance de vie limitée.

Une des premières descriptions médicales des symptômes associés à la pathologie date de 1595. Le Pr. Pieter Raw réalisa l'autopsie d'une jeune patiente affaiblie et décela les lésions pancréatiques. Les multiples symptômes observés chez les malades (diarrhées, atteintes pulmonaires et anomalies pancréatiques) sont associés au début du XXème siècle. Le terme « fibrose kystique » caractérisant l'état physiopathologique des tissus respiratoires et pancréatiques est utilisé pour la première fois dans les années 1930. Ce terme est centré sur les atteintes pancréatiques de la maladie. C'est en 1943 que Sydney Farber mis en évidence que la pathologie est due à une diffusion généralisée de mucus visqueux. L'appellation « Mucoviscidose » (maladie du mucus épais) fut dès lors admise.

Le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif furent suggérés en 1945 par Anderson et Hodges. Au cours des années 1950, fut développé le test de diagnostic rapide, toujours utilisé de nos jours, basé sur l'augmentation de salinité de la sueur des malades. Cette anomalie fut précisée dans les années 1980 : l'augmentation de salinité correspond à un défaut de perméabilité des cellules épithéliales aux ions chlorure. Le mécanisme du défaut à l'origine de la maladie est resté longtemps inconnu.

Le gène dont la mutation provoque la maladie fut localisé en 1985 par l'équipe du Dr Lap-Chee Tsui. Il se localise sur le bras long du chromosome 7. En 1989, le Dr Lap-Chee Tsui en collaboration avec les Dr. Riordan et Collins isolent le gène responsable de la maladie et le nomment *CFTR* pour *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (J R Riordan et al. 1989).

#### 2. Le canal CFTR 2.1. Le gène CFTR

Le gène *CFTR* est un gène de taille importante situé sur le bras long du chromosome 7 dans la région q31.2. Il s'étend sur 250kb et comprend 27 exons (Figure 1). Il est transcrit en un ARNm de 6 kb et code une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés : la protéine CFTR (« Cystic Fibrosis transmembrane regulator ») (Zielenski et al. 1991).



Figure 1 : Structure du gène CFTR et de la protéine CFTR

- (A) Le gène CFTR est constitué de 27 exons (bleu) séparés par des séquences introniques (gris).
- (B) La protéine CFTR est constituée de différents domaines : les domaines transmembranaires (TM), les domaines de liaison à l'ATP (NBD) et le domaine régulateur R.

#### 2.2. La protéine CFTR et ses fonctions

#### 2.2.1. Structure du CFTR

La protéine CFTR est une protéine transmembranaire de 170 kDa composée de 1480 acides aminés. Elle appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). Les transporteurs ABC correspondent à une famille de protéines impliquées dans le transport de divers éléments à travers la membrane plasmique (Higgins 1992).

Le CFTR s'organise en 5 domaines (Figure 1) :

- 2 domaines transmembranaires (TM) constitués chacun de 6 sous-unités. Ces domaines interviennent dans la formation du pore. Alors que le domaine TM2 est peu impliqué, le domaine TM1 joue un rôle principal dans la conductance et la sélectivité du canal (Devidas et W B Guggino 1997).
- 2 domaines cytoplasmiques de liaison aux nucléotides (NBD Nucleotides Bining Domain). Ils présentent des sites consensus de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Ils fournissent ainsi l'énergie nécessaire au transport des solutés et interviennent dans la régulation des mécanismes d'ouverture et de fermeture ATP dépendants du canal CFTR. NBD1 serait impliqué principalement dans l'ouverture du canal alors que NBD2 serait impliqué dans les 2 évènements (Sheppard et M J Welsh 1999; D C Gadsby et Nairn 1999).
- 1 domaine régulateur (R) spécifique au CFTR. Ce domaine correspond aux résidus 590 à 831 de l'exon 13. Il présente huit des dix sites de phosphorylation par les protéines kinases A, phénomène nécessaire à l'ouverture du canal par l'ATP (Berger et M J Welsh 1991). La phosphorylation du domaine R par la PKA augmente de 100 fois l'activité du canal alors que la phosphorylation par la PKC n'augmente que modestement cette activation. L'état déphosphorylé du domaine R maintient le canal fermé, alors que des modifications de conformation interviennent dans le passage à l'état ouvert (Cotten et M J Welsh 1997).

La structure tridimensionnelle du CFTR a été obtenue recemment (Mornon et al., 2009 ; Rosenberg et al., 2011). Cette avancée permet de comprendre le fonctionnement de la protéine à l'échelle moléculaire et peut permettre ainsi la synthèse de molécules capables d'aider la protéine à reprendre une conformation correcte.

#### 2.2.2. Régulation de la protéine CFTR

Pour des températures physiologiques (37°C), la durée d'ouverture du canal CFTR est comprise entre 100 et 250 ms. Les mécanismes qui contrôlent son ouverture et sa fermeture sont des événements séquentiels, impliquant des étapes de phosphorylation suivies de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP.

L'un des modèles le plus largement accepté, qui s'appuie sur des études structure-fonction, propose que des changements de conformation du domaine R, après phosphorylation, permettent le passage des ions chlorure. La levée de l'inhibition imposée par l'état déphosphorylé du domaine R stimule l'interaction entre l'ATP et les domaines NBD.

La première étape de l'activation du canal passe par une phosphorylation par une PKA stimulée par l'AMPc. Le degré de phosphorylation du domaine R détermine la probabilité d'ouverture du canal. Bien que les résidus phosphorylables du domaine R soient connus, les résidus impliqués dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal sont incertains (David C Gadsby, Vergani, et Csanády 2006; Hwang et al. 1994). *In vitro* (canal isolé), neuf résidus serines sont phosphorylés par la PKA, situés dans le domaine R : 660, 670, 700, 712, 737, 753, 768, 795, et 813. Les cinétiques de phosphorylation sont influencées par la structure locale de la protéine CFTR, ainsi que par la proximité et l'activité sélective des phosphatases endogènes de la cellule. La phosphorylation du canal CFTR par les PKC semble stimuler une phosphorylation ultérieure par la PKA (Yurko-Mauro et Reenstra 1998). Ces données suggèrent qu'une phosphorylation de base par les PKA et les PKC est nécessaire pour entraîner l'activation du canal, en agissant sur des sites de phosphorylation essentiels. Après phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des protéines phosphate inactive le canal (F Becq et al. 1993).

La seconde étape consiste en la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sur les sites NBD. Ceci entraîne un changement conformationnel des domaines transmembranaires du canal CFTR. Cette étape correspond à l'étape limitante dans l'ouverture et la fermeture du canal

(D C Gadsby et Nairn 1999; Foskett 1998). Dans des expériences de protéine de fusion, les activités ATPasiques ont été localisées sur les résidus 433-589 pour le domaine NBD1, et 1208-1399 pour le domaine NBD2 (Seibert et al. 1997; Mathews et al. 1998).

#### 2.2.3. Propriétés du canal CFTR

#### 2.2.3.1. Canal ionique

La protéine CFTR est un canal à spécificité anionique permettant la diffusion passive des ions chlorure. Il se distingue des autres canaux chlorure épithéliaux par sa séquence de perméabilité (Br<sup>-</sup> >Cl>I>F<sup>-</sup>). Le canal CFTR est sélectif pour les anions plutôt que les cations monovalents. En effet, la perméabilité du CFTR au chlorure est plus importante que celle de l'iodure (Sheppard et M J Welsh 1999).

#### 2.2.3.2. Régulateur d'autres canaux ioniques

Le nom « régulateur transmembranaire de conductance » donné à la protéine CFTR était basé sur l'observation de nombreuses anomalies au sein des épithéliums mucoviscidosiques, incluant une

régulation altérée d'autres canaux chlorure tel que l'ORCC (M Egan et al. 1992; Gabriel et al. 1993) ou encore une hyperabsorption des ions sodium par le canal Na<sup>+</sup> sensible à l'amiloride (Knowles et al. 1981; Quinton 1983; Boucher 1999). La perte de l'activité chlorure qui pourrait être impliquée dans le transport transépithélial de l'eau et des ions (Quinton 1983; Anderson et al. 1991; Bear et al. 1991) n'étant pas suffisante pour expliquer les dysfonctionnements observés, l'hypothèse d'une fonction régulatrice a donc été émise (**Figure 2**). En effet, le CFTR appartient à la superfamille des transporteurs ABC et présente la capacité à fixer des protéines contenant des domaines PDZ (D B Short et al. 1998).

#### - Le canal ORCC (Outwardy Rectifying Chloride Channel)

L'ORCC est un canal chlorure régulé par l'AMPc dont on a longtemps pensé qu'il pouvait être responsable du défaut de conductance membranaire retrouvé dans la mucoviscidose. La présence du canal CFTR fonctionnel est indispensable à l'activation du canal ORCC par les PKA (Protéine Kinase A). CFTR régule ORCC par des interactions membranaires ou cytoplasmiques (Schwiebert et al. 1999).

#### - Le canal ENaC (Epithelial Na Channel)

Ce canal responsable de l'influx d'ions Na<sup>+</sup> au pôle apical des cellules épithéliales, aussi appelé canal sodique, est sensible à l'amiloride. De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'interaction CFTR-ENaC. De récentes données tendent à envisager une interaction directe entre les deux protéines (Berdiev, Qadri, et Dale J Benos 2009). Il est admis que l'absorption accrue de sodium au niveau de l'épithélium respiratoire de patients mucoviscidosiques est corrélée à une déficience d'activité du CFTR.

#### - Les canaux potassiques (K)

Des études ont démontré que l'expression de CFTR influence l'activation AMPc dépendent de canaux K (Loussouarn et al. 1996). Au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des voies respiratoires, le canal potassique ROMK1 a été identifié. Le CFTR serait couplé à cette protéine, lui procurant ainsi une sensibilité à divers stimuli (Konstas et al. 2002). Le CFTR est donc capable de transférer les effets d'agonistes ou d'antagonistes sur d'autres protéines modifiant de ce fait leur activité.



**Figure 2 : Régulation des différents transporteurs ioniques par la protéine CFTR** D'après (Schwiebert et al. 1999)

#### 2.3. Les mutations du gène CFTR

La mucoviscidose est due à des mutations dans le gène *CFTR*. A ce jour, plus de 1600 mutations ont été répertoriées sur le site du Consortium International d'analyse Génétique de la Mucoviscidose (htttp///www.genet.sickkids.on.ca/cftr). La plupart de ces mutations sont des mutations ponctuelles. Les plus fréquentes correspondent à des mutations faux sens (42%) puis viennent les mutations dues à un décalage du cadre de lecture (16%), des mutations d'épissage (12%), des mutations non sens (10%). La fréquence de certaines mutations varie énormément d'un groupe géographique à l'autre. Ces mutations induisent soit des dysfonctionnements soit un défaut de localisation de la protéine CFTR. Elles affectent tous les domaines de la protéine, avec toutefois une forte concentration de mutations graves au niveau du domaine NBD1. Elles sont divisées en 6 classes distinctes basées sur le mécanisme responsable de l'activité réduite du canal CFTR (**Figure 3**).

#### 2.3.1. Les classes de mutations

#### 2.3.1.1. Classe I : mutations affectant la synthèse de la protéine CFTR

Ces mutations, qualifiées de « mutations nulles », empêchent la synthèse de protéines CFTR stables et fonctionnelles ou résultent en la synthèse de protéines tronquées instables rapidement dégradées. Les mutations non-sens réduisent les niveaux d'expression des ARNm de 95% par rapport au niveau d'expression normal (Hamosh, Rosenstein, et G R Cutting 1992). Ces mutations génèrent un phénotype sévère tel que l'insuffisance pancréatique, et sont souvent associées à une dégénérescence des poumons.

#### 2.3.1.2. Classe II : défaut de maturation de la protéine

Ces mutations perturbent le processus de maturation de la protéine et son adressage à la membrane plasmique. Ce type de mutation entraîne un déficit qualitatif et/ou quantitatif de protéines insérées à la membrane plasmique.

La mutation  $\Delta$ F508, mutation la plus répandue dans la mucoviscidose appartient à ce groupe.

Cette mutation consiste en une délétion de 3 nucléotides codant pour l'acide aminé Phénylalanine en position 508 dans le domaine NBD1. Elle induit la formation d'une protéine modifiée qui n'atteint pas la membrane plasmique suite à un défaut de maturation. La protéine CFTR∆F508 est bien synthétisée mais sa maturation est stoppée au niveau du réticulum endoplasmique (F Zhang, Kartner, et G L Lukacs 1998).

Cl-						
Normal	Absence de synthèse protéique	Arrêt de maturation	III Régulation défectueuse	Conductance diminuée	V Synthèse réduite	VI Instabilité à la membrane plasmique
	Mutation Non-Sens	Mutation Faux-Sens	Mutation Faux-Sens	Mutation Faux-Sens	Mutation Faux-Sens	Délétion du C- terminal
	G542X	N1303K	G551D	R117H	A455E	<b>T</b> 70
	Décalage du cadre de lecture	Délétion F508del			Epissage alternatif	
	394delTT				3849+10k bC?T	
	Mauvais épissage					
	1717-1G? A					

**Figure 3 : Classification des mutations du gène** *CFTR* **en fonction des altérations moléculaires** D'après (F Becq 2003)



Figure 4 : Schéma représentant les principaux organes touchés par la mucoviscidose.

#### 2.3.1.3. Classe III : défaut de régulation du canal Cl-

Les mutations de classe III conduisent à la synthèse d'une protéine correctement produite et adressée à la membrane apicale mais qui n'est pas activée par l'AMPc. Ces mutations se localisent au niveau des domaines NBD, domaines présentant les sites de fixation à l'ATP. Le canal Cl<sup>-</sup> n'est plus activé et reste donc fermé. Les mutations G551D et G551S situées dans le domaine NBD1 et les mutations S125SP et G1349D situées dans le domaine NBD2 sont incluses dans ce groupe. Ces mutants sont associés à des insuffisances pancréatiques et des phénotypes sévères.

#### 2.3.1.4. Classe IV : défaut de conductance du canal Cl-

Cette classe comprend des mutations qui altèrent la conductance du canal CFTR. La protéine CFTR est correctement adressée à la membrane et répond aux stimuli mais génère un courant d'ions chlorure très faible (mutation R117H). Ces mutations se localisent préférentiellement dans les domaines transmembranaires formant le pore du canal. L'expression de tels mutants en système hétérologue conduit à la formation d'un flux d'ions chlorure activé par l'AMPc (Sheppard et M J Welsh 1993). Le courant est réduit, la probabilité d'ouverture du canal est donc bien plus faible. D'autres mutations, localisées au niveau de l'exon 13 codant pour le domaine régulateur R, ont un effet sur les niveaux de conductance du canal. Certaines mutations présentent une diminution de la conductance du canal (mutations G622D, R792G) alors que d'autres induisent une augmentation de cette conductance (mutations H620Q, A800G) (Vankeerberghen et al. 1998).

#### 2.3.1.5. Classe V : défaut de stabilité de l'ARNm

Cette classe regroupe des mutations altérant la stabilité de l'ARNm. Ces mutations sont situées soit dans le promoteur, soit dans les sites d'épissage du gène *CFTR* (ex :  $3849+10kbC \rightarrow T$ ), soit sur sa partie codante avec des mutations faux-sens (ex : A455E). Elles conduisent à une synthèse protéique réduite.

#### 2.3.1.6. Classe VI : défaut de stabilité de la protéine

Cette classe regroupe des protéines CFTR présentant un défaut de stabilité. Ceci est du à une délétion de 70 à 98 acides aminés au niveau du domaine C terminal du CFTR (M Haardt et al. 1999). Le domaine Ct n'est pas impliqué dans la synthèse et la fonction du canal à ions chlorure ; il est indispensable au maintien de la stabilité du CFTR. La délétion la plus courte, de 70 acides aminés, correspond à la mutation Q1412X. Elle est associée à une forme sévère de la maladie : insuffisance pancréatique associée à des infections respiratoires récurrentes. L'étude des protéines tronquées en

système hétérologue a permis de montrer que les protéines mutantes se localisent à la membrane des cellules et répondent aux stimuli d'AMPc de façon similaire à la protéine sauvage. Cette région n'intervient pas dans la synthèse et la fonction du canal CFTR mais joue un rôle sur sa demi-vie.

#### 2.4. Corrélation entre Génotype et Phénotype dans la mucoviscidose

Une corrélation entre les mutations du CFTR (le génotype) et les manifestations cliniques de la maladie a été mise en évidence. Le phénotype de la maladie est très hétérogène selon les patients en fonction du génotype CFTR associé. Des individus présentant la même mutation peuvent développer différentes manifestations de la maladie (**Figure 4**).

La pénétrance de la maladie est fréquemment de 100 % chez les patients homozygotes présentant des mutations dites « sévères ». Il s'agit de mutations pour lesquelles l'absence du CFTR corrèle avec une insuffisance pancréatique (plus de 95 % des cas), une atteinte du foie, l'âge de diagnostic de la maladie (inférieur à 1 an) et un taux élevé d'ions chlorure dans la sueur. La sévérité de la maladie est variable, avec des formes atténuées sans insuffisance pancréatique ou avec une atteinte respiratoire modérée. Les mutations menant à ce phénotype sont associées à une activité pancréatique normale (environ 80 % des cas), un âge de diagnostic plus tardif (plus de 10 ans) et une atteinte pulmonaire plus modérée.

#### 2.4.1. Atteinte pancréatique

C'est pour la fonction pancréatique que la corrélation génotype / phénotype est la plus évidente. L'atteinte pancréatique se caractérise par un défaut d'excrétion des enzymes de type lipase et trypsine dans la lumière intestinale. Les enzymes agissent alors directement sur le tissu pancréatique contribuant ainsi à la fibrose. Les sujets en insuffisance pancréatique possèdent généralement deux mutations de classe I, II ou III (Santis et al. 1990).

Une première étude a été réalisée en 1990 par E Kerem sur 293 patients. Les résultats montrent que 99 % des patients homozygotes  $\Delta$ F508 ont une insuffisance pancréatique alors que 28 % des patients hétérozygotes composites  $\Delta$ F508 / non  $\Delta$ F508 et 64 % des patients non  $\Delta$ F508 / non  $\Delta$ F508 sont "suffisants" pancréatiques (E Kerem et al. 1990). Il existe donc une corrélation directe entre l'homozygotie  $\Delta$ F508 et l'insuffisance pancréatique. Cette étude associée aux travaux de Kristidis et al. (Kristidis et al. 1992) a permis de classer les mutations CFTR en mutations sévères et modérées en fonction de l'insuffisance pancréatique (**Tableau 1**). Une association de deux mutations sévères conduit au développement d'une insuffisance pancréatique alors que l'association de deux mutations modérées ou l'association d'une mutation sévère et d'une mutation modérée n'altère pas la fonction pancréatique. Toutefois, un faible taux de patients homozygotes  $\Delta$ F508 ou hétérozygotes composites  $\Delta$ F508 / G551D ou R334W ne développent pas d'insuffisance pancréatique. Une généralisation sur le phénotype de chaque mutation ne peut donc pas être réalisée (E Kerem et B Kerem 1995).

Mutation	Sévère	Modérée
Classe I	G542X, R5533X, W1282X	
Classe II	ΔF508, N1303K, Δ1507	
Classe III	G551D	
Classe IV		R117H, R347P, R334W
Classe V		A455E

 Tableau 1 : Classification des mutations les plus courantes du gène CFTR et relation avec le phénotype sévère ou modéré de la maladie basé sur l'atteinte pancréatique des patients.

D'après (E Kerem et B Kerem 1995; Kristidis et al. 1992)

#### 2.4.2. Atteinte pulmonaire

La corrélation entre le génotype et l'atteinte pulmonaire est plus controversée. Bien que la principale cause de la mortalité de la mucoviscidose soit due à l'atteinte respiratoire, une grande variabilité de celle-ci tant sur l'âge de diagnostic que sur sa sévérité est observée. Les effets directs sur les poumons des mutations les plus communes telles que  $\Delta$ F508 sont difficiles à établir. Cette difficulté à définir des relations étroites entre le phénotype et le génotype pourrait être liée à la complexité du gène *CFTR* ainsi qu'à des facteurs environnementaux pouvant modifier le développement, la progression et la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Tsui et al. 1985).

#### 2.4.3. Atteinte intestinale

Les patients peuvent présenter une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal. L'épithélium intestinal a une fonction d'absorption de NaCl via les canaux ENaC et d'eau ainsi qu'une fonction de sécrétion de mucus, de bicarbonate et de KCl. Les patients atteints de mucoviscidose présentent une forte absorption de NaCl via le canal ENaC. Ceci est dû à l'absence de régulation de ce canal par CFTR. Le génotype homozygote  $\Delta$ F508 est associé à une forte perméabilité intestinale (Hallberg et al. 1997).

#### 2.4.4. Limite des corrélations génotype / phénotype

Compte tenu de la diversité des mutations, de l'évolutivité de la maladie et du degré d'atteinte des différents organes, l'établissement d'une corrélation absolue entre le génotype et le phénotype est difficile. Ainsi, l'association de plusieurs mutations sur le même allèle peut conduire à des modifications du phénotype voir à des réversions du phénotype, l'une pouvant moduler l'effet de l'autre. De plus, une corrélation entre le phénotype de la maladie et le niveau d'épissage du CFTR a été établie (Chiba-Falek et al. 1998).

Des facteurs génétiques et environnementaux moduleraient la sévérité de la maladie. En effet, une extrême variabilité de l'expression clinique chez les patients CF présentant le même génotype CFTR au sein d'une même fratrie ont été mise en évidence (Borgo et al. 1990).

#### 2.5. Biologie cellulaire du CFTR

#### 2.5.1. Généralités

La synthèse de la protéine CFTR se réalise en 3 étapes. La première (1) consiste en la transcription du gène *CFTR* en ARNm, suivie de (2) l'épissage de ce dernier. La dernière étape (3) correspond à la traduction de l'ARNm épissé en protéine.

La traduction a lieu au niveau des polysomes. La séquence N-terminale du CFTR est une séquence hydrophobe linéaire nommée peptide signal. Elle permet l'ancrage du complexe ARNm / ribosome au réticulum endoplasmique (RE) via le SRP (*Signal Recognition Particle*). La translocation du CFTR est initiée dans la lumière du RE suivie par l'orientation des boucles cytoplasmiques et par l'insertion des segments transmembranaires dans la bicouche lipidique du RE (Sadlish et Skach 2004).

D'après l'étude menée par Chen et ses collaborateurs en 2000, le repliement du CFTR serait cotraductionnelle. Le domaine N-terminal acquerrait une activité fonctionnelle alors que le domaine Cterminal serait en cours de formation (Eva Y.-J. Chen, Bartlett, et David M. Clarke 2000). D'autres études sont en faveur d'un repliement post-traductionnel (Eva Y Chen et al. 2004; Du, Manu Sharma, et Gergely L Lukacs 2005). Une fois correctement repliée, la protéine CFTR acquière la conformation de "protéine canal" suite à des modifications post-traductionnelles et pourra ainsi quitter le RE. Le RE contient des protéines chaperonnes capable de reconnaître des protéines naissantes et permettent ainsi d'assurer un repliement approprié. Seule la calnexine est connue pour interagir avec la protéine CFTR naissante (Pind, J R Riordan, et D B Williams 1994).

#### 2.5.2. Maturation du CFTR

Dans le RE, un oligosaccharide est greffé à la chaine polypeptidique naissante au niveau de la 4<sup>ème</sup> boucle extracellulaire de CFTR. Cette addition co-traductionnelle est appelée N-glycosylation. La protéine monoglycosylée, nommée "core glycosylé", est reconnue par la calnexine qui favorise son repliement. Une fois que la protéine a atteint un certain degré de repliement, le CFTR se sépare alors de la calnexine et est apte à être transporté vers l'appareil de Golgi (Amaral 2005) (**Figure 5**).

La maturation de la protéine CFTR a lieu dans les compartiments du Golgi. Elle se traduit par une augmentation de la masse moléculaire de CFTR de 20 kDa, due aux modifications enzymatiques réalisées dans l'appareil de Golgi et consistant en la maturation des glycannes N-liés, lui donnant ainsi sa forme hautement glycosylée. La protéine CFTR mature, appelée complexe-glycosylé, est ensuite dirigée vers la membrane plasmique par des vésicules. Une fois délivrée à la membrane, la protéine

La Mucoviscidose

canal est rapidement internalisée en une réserve subapicale de protéines qui pourra être recyclée ou envoyée vers la voie de dégradation lysosomale.

Durant sa biosynthèse, la protéine CFTR existe au moins sous quatre formes de glycosylation différentes (S H Cheng et al. 1990; Ward et Kopito 1994) qui sont nommées : forme A, forme B, forme B' et forme C (**Tableau 2**).

La maturation de la protéine CFTR est peu efficace. Seulement 20 à 50 % des précurseurs nouvellement synthétisés seront transformés en molécules matures. Le faible taux de maturation du CFTR n'est pas une caractéristique des transporteurs ABC car certains atteignent un degré de maturation de près de 100 %.

#### 2.5.3. Trafic intracellulaire de la protéine CFTR

La protéine CFTR est transportée jusqu'à la membrane apicale des cellules épithéliales ou elle assurera sa fonction de protéine-canal à chlorure. Son transport reste cependant mal connu. La protéine se localise dans de nombreux compartiments : RE, Golgi, endosomes et lysosomes (Bertrand et Raymond A Frizzell 2003) (**Figure 6**).

#### 2.5.3.1. Compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC)

La protéine CFTR est exportée du RE dans des vésicules COPII (Coat Protein II) qui bourgeonnent depuis le RE (Xiaodong Wang et al. 2004). Les vésicules COPII sont constituées de protéines recouvrantes Sec23p/Sec24p ; Sec13p/Sec31p et la GTPase Sar 1 (Kuehn et Schekman 1997). Une fois leur manteau protéique éliminé, ces vésicules fusionnent avec le complexe tubulo-vésiculaire ERGIC situé du côté *cis* du Golgi (Aridor et al. 1995).

La protéine CFTR possède un signal d'export du RE lui permettant d'emprunter cette voie de transport. Il s'agit des acides aminés D565 et D567 exposés à la surface du domaine NBD1. Une mutation au niveau de ces acides aminés résulte en la rétention du CFTR dans le RE (Xiaodong Wang et al. 2004).

Deux voies d'adressage sont proposées pour la voie de sécrétion de la protéine CFTR suivant son export via les vésicules COPII (Jin-San Yoo et al. 2002).

La voie conventionnelle de transport du CFTR à travers l'appareil de Golgi consiste en un transport progressif de la protéine des compartiments *cis* vers le *trans* Golgi concomitant avec la maturation des oligosaccharides (Xiaodong Wang et al. 2004).

La seconde voie, dite non-conventionnelle, propose un transfert direct du CFTR par des vésicules entre le RE et le *trans*-Golgi (Jin-San Yoo et al. 2002). L'étude d'Okiyoneda *et al.* montre que dans les cellules CHO, la protéine CFTR est transportée du RE au cis Golgi et aux endosomes précoces. Le
Formes du CFTR	Etat de glycosylation	Poids moléculaire
Forme A	Précurseur non glycosylé	130 kDa
Forme B	Forme immature dite "core-glycosylé"	140 kDa
Forme B'	Forme maturée de la forme B dans le Golgi (30%)	140 kDa
Forme C	Forme mature hautement glycosylée	170 kDa

Tableau 2 : Formes de glycosylation de la protéine CFTR au cours de sa maturation.



**Figure 5 : Illustration du processus de biosynthèse et de maturation du CFTR.** D'après (Amaral 2005)

transport aux endosomes précoces serait nécessaire à la maturation des oligosaccharides dans le compartiment *cis*-golgien (Okiyoneda et al. 2004). Cette voie est en accord avec la faible proportion de CFTR dans l'appareil de Golgi.

## 2.5.3.2. Transport du CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique

Le mécanisme de transport de la protéine à la membrane plasmique des cellules est peu connu. Il est admis que des interactions protéine-protéine sont impliquées dans le trafic intracellulaire du CFTR. Il s'agit en particulier d'interactions entre la partie C-terminale du CFTR via la séquence DTRL et des protéines à domaines PDZ NHE-RF1 (Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchange Regulatory Factor) et CAL (CFTR Associated Ligand). L'interaction CFTR/NHE-RF1 favorise l'adressage du canal à la membrane plasmique contrairement à l'interaction CFTR/CAL qui favorise la séquestration de la protéine CFTR dans la cellule (Jie Cheng, Hua Wang, et William B Guggino 2004). D'autres études démontrent qu'en absence de la séquence DTRL au niveau de la partie C-terminale de CFTR, les protéines NHE-RF1 et CFTR se dissocient sans incidence sur la localisation à la membrane apicale du CFTR sur sa stabilité et son activité canal à ions chlorure (Mohamed Benharouga et al. 2003; Ostedgaard et al. 2003). D'autres signaux seraient donc impliqués dans le trafic du CFTR de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique.

#### 2.5.4. Endocytose, recyclage du CFTR et voies de dégradation

Après avoir atteint la membrane plasmique, la protéine CFTR est rapidement internalisée (Prince, Workman, et Marchase 1994; Bertrand et Raymond A Frizzell 2003). Cette internalisation est médiée par des vésicules à manteau de clathrine qui vont adresser les protéines aux endosomes (G L Lukacs et al. 1997).

Les motifs di-leucine et tyrosine présents au niveau des domaines N et C terminaux du CFTR constituent le signal d'endocytose (Prince et al. 1999; W Hu, Howard, et G L Lukacs 2001). La protéine CFTR forme un complexe avec la myosine VI et la protéine adaptatrice Disabled 2 (Dab2) (Swiatecka-Urban et al. 2002) puis est ensuite recrutée au sein de ces vésicules. Ce mécanisme permet de réguler le nombre de canaux CFTR présents à la surface apicale des cellules épithéliales.

L'internalisation de CFTR est réalisée via l'interaction entre des protéines adaptatrices spécifiques de la membrane plasmique telles que les complexes AP-1 et AP-2 (Adaptator Protein) et des séquences spécifiques présentes aux extrémités de CFTR (N A Bradbury et al. 1994). AP-1 participe au transport des protéines du TGN (TransGolgi Network) vers d'autres compartiments tels que les lysosomes alors qu'AP-2 intervient au niveau de la membrane plasmique. Après bourgeonnement d'une vésicule de clathrine depuis la membrane plasmique et perte de son manteau, AP-2 et la clathrine sont recyclées à la membrane plasmique comme protéines solubles. Des expériences de pull-down ont montré que CFTR se lie à AP-2 via son domaine C-terminal et non à AP-1 (Weixel et N A Bradbury 2000).



## Figure 6 : Modèle représentant le trafic intracellulaire du CFTR.

(i) la protéine CFTR est transportée du RE à l'appareil de Golgi, les protéines mal conformées seront dégradées par le protéasome (v), une fois maturée dans le Golgi la protéine CFTR sera transportée jusqu'à la membrane plasmique ; (ii) le CFTR est internalisé dans des vésicules à manteau de clathrine puis est recyclé à la membrane directement ou via la voie des endosomes (iii). Une partie du CFTR est adressée aux endosomes tardifs (iv). D'après (Ameen, Silvis, et Neil A Bradbury 2007)

L'internalisation de CFTR est perturbée par inhibition de l'interaction AP-2/CFTR ou si le site de fixation de CFTR à la myosine VI est masqué (N A Bradbury et al. 1994; Jie Cheng, Hua Wang, et William B Guggino 2004; Gentzsch et al. 2004). Les protéines présentes dans ces vésicules sont recyclées à la membrane ou adressées à la voie de dégradation via les endosomes tardifs et/ou les lysosomes. Les protéines qui sont recyclées sont transportées vers le compartiment des endosomes de recyclage (Mukherjee, Ghosh, et Maxfield 1997). Il a été démontré que CFTR entre dans ce compartiment et est recyclé à la membrane plasmique (Picciano et al. 2003). Ce phénomène est indispensable pour pallier à l'internalisation constitutive et l'augmentation de la présence de CFTR à la membrane (Manu Sharma et al. 2004).

# 3. Thérapies actuelles de la mucoviscidose

Une dynamique très interactive regroupe aujourd'hui généticiens, biologistes cellulaires et moléculaires, physiologistes et cliniciens dans la lutte contre la mucoviscidose ce qui explique le large éventail de stratégies thérapeutiques envisagées.

Les traitements actuels se concentrent à traiter les conséquences du dysfonctionnement de la protéine CFTR, afin d'améliorer la qualité et la durée de vie des patients. En effet, la durée de vie moyenne d'un enfant mucoviscidosique était il y a une quinzaine d'année, d'environ 5 ans. Actuellement, grâce aux traitements médicamenteux, à la kinésithérapie, la moyenne d'âge des patients est d'environ 30 ans en France et atteint même 40 ans au Danemark.

La découverte en 1985 et le clonage en 1989 du gène *CFTR* responsable de la maladie a permis d'envisager une nouvelle voie thérapeutique: la thérapie génique.

Une autre perspective de traitement ciblée sur la protéine CFTR mutée, dénommée "thérapie protéique", offre l'espoir d'une approche thérapeutique spécifique des différentes classes de mutation du *CFTR*.

## 3.1. Thérapie génique de la mucoviscidose

La mucoviscidose étant une maladie monogénique, c'est tout naturellement que de grands espoirs de guérison sont nés avec l'apparition du concept de thérapie génique.

La thérapie génique correspond à l'insertion d'une copie du gène *CFTRwt* dans les cellules épithéliales des patients. L'acheminement du gène sain dans les cellules cibles nécessite l'utilisation de vecteurs viraux ou synthétiques permettant une expression durable du transgène sans engendrer de toxicité ou de réponse immunitaire de la part de l'hôte. Nous développerons ici les différents vecteurs viraux utilisés dans la lutte contre la mucoviscidose.

## 3.1.1. Les vecteurs viraux

#### 3.1.1.1. Vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux utilisés communément en thérapie génique dérivent du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou de rétrovirus apparentés à d'autres espèces.

Ces vecteurs présentent plusieurs avantages. Il s'agit de vecteurs intégratifs permettant une durée d'expression du transgène à long terme et de façon stable sans induire de forte réponse immunitaire de l'hôte. De plus, il est possible d'insérer dans leur génome des transgènes de grande taille (environ 8 kb). Des travaux datés de 2002 ont montré qu'il était possible d'obtenir une expression spécifique et stable du transgène en fonction d'un type cellulaire donné en utilisant les séquences régulatrices appropriées (Imren et al. 2002). L'efficacité de transduction des particules rétrovirales peut être améliorée en pseudotypant ces dernières avec des protéines de fusion comme la protéine G du virus VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*).

Les résultats obtenus sur cellules épithéliales situées au pôle apical d'épithélium respiratoire sont décevant : la protéine VSV-G ne fusionne pas avec ces cellules (Johnson et al. 2000). D'autres protéines de fusion ont été testées sur vecteurs rétroviraux FIV (*Felin Immunodeficience Virus*). Il s'agit de l'hémagglutinine GP75 du virus humain influenza D et de la protéine gp64 du baculovirus AcMPPV (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*). Ces deux protéines sont compétentes pour l'amélioration de l'efficacité de transduction des cellules primaires murines de l'épithélium nasal murin (Sinn et al. 2005).

L'utilisation de vecteurs rétroviraux présente également des inconvénients. Les vecteurs dérivés des rétrovirus infectent uniquement des cellules en division contrairement aux vecteurs lentiviraux capable de transduire à la fois des cellules quiescentes et des cellules en division. La production de ces vecteurs est faible et fastidieuse (environ 10<sup>8</sup> pfu/mL). L'inconvénient majeur correspond à l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule. Bien qu'elle constitue un atout majeur pour la pérennisation de la transmission de l'information génétique, cette dernière constitue un danger. En effet, l'insertion est aléatoire et peut engendrer des mutations affectant l'état physiologique du patient. Ceci s'est confirmé par l'essai clinique du Pr. Fisher. Dix enfants "bulles" présentant un déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DICS-X) ont reçu une allogreffe de cellules de moelle osseuse dans lesquelles une version fonctionnelle du gène codant pour la chaîne  $\gamma$  courante commune aux récepteurs de plusieurs interleukines a été introduite à l'aide d'un vecteur rétroviral. Deux des dix enfants ont développé une leucémie dont un est malheureusement décédé. Une analyse génétique a montré que dans les deux cas le gène yc s'était inséré au même endroit dans le génome à proximité du gène LMO2, gène impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse. L'intégration d'un vecteur rétroviral est théoriquement aléatoire ; la découverte d'une insertion identique chez ces deux patients fut troublante (Nienhuis, Dunbar, et Sorrentino 2006). Les deux enfants atteints de leucémie étaient les plus jeunes patients de l'étude, à savoir un mois et trois mois au moment du traitement,

alors que les autres enfants avaient au moins six mois. De plus, ils avaient reçu les doses les plus importantes de cellules thérapeutiques.

Aux vues des investigations menées et en considérant que 9 enfants ont ainsi pu être sauvés, l'AFSSAPS a autorisé la reprise de l'essai en mai 2004 avec la mise en place de modifications de protocole afin de diminuer le risque de survenue de cet effet indésirable.

# 3.1.1.2. AAV

Les virus associé à l'adénovirus (AAV) sont des virus naturellement déficients pour leur réplication et qui n'ont jamais été associés à une maladie quelconque chez l'homme. Il s'agit de petits virus à ADN (parvovirus) capables de transduire des cellules quiescentes. Les AAV offrent des avantages potentiels par rapport aux adénovirus. En effet, ils s'intègrent dans le génome de la cellule et permettraient donc une expression plus longue du transgène. Ces virus sont peu immunogènes. Néanmoins, ils sont difficiles à cultiver et peuvent transporter des trangènes de petites tailles (inférieure à 4.8 kb). L'ADNc CFTR représentant quasiment la taille maximale d'insertion (4443 pb), ceci pose un problème pour le choix du promoteur.

Les AAV reconnaissent deux récepteurs cellulaires. D'une part, les HSPG exprimés à la membrane basolatérale des épithéliums respiratoires et d'autre part, les acides sialiques également abondants sur l'épithélium respiratoire. L'AAV de sérotype 6 s'est révélé le plus efficace dans la transduction d'épithélium respiratoire (Halbert, Allen, et A D Miller 2001). Des essais cliniques de phase I et II ont été réalisés avec différents sérotypes d'AAV (John A Wagner et al. 2002; Moss et al. 2004). Aucune réponse inflammatoire et aucun phénomène de toxicité n'a été mis en évidence à la suite de ces essais. Cependant, aucun bénéfice clinique n'a été obtenu pour les patients ainsi traités.

## 3.1.1.3. Adénovirus et vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux ont été les premiers vecteurs de transfert de gène utilisés dans la lutte contre la mucoviscidose (R H Simon et al. 1993; Douglas et al. 1996). Ces vecteurs présentent plusieurs avantages. Le virus parental, l'Adénovirus, est très faiblement pathogène et présente un tropisme naturel pour les voies respiratoires (en particulier les sérotypes 2 et 5 appartenant au sous-groupe C). Il s'agit d'un virus non intégratif qui n'interfère donc pas avec l'intégrité du génome cellulaire. Il est possible d'insérer des transgènes d'une taille comprise entre 5 et 8 kpb. L'adénovirus est produit à haut titre et est facilement manipulable. Plusieurs sérotypes du sous-groupe C sont désormais bien caractérisés et sont utilisés comme vecteur d'expression *in vivo* et *in vitro*.

Le premier essai de thérapie génique de la mucoviscidose utilisant un vecteur adénoviral a été réalisé en 1993. Des doses croissantes de vecteur non réplicatif, dit de première génération et portant le transgène CFTR, ont été administrées à des primates (R H Simon et al. 1993; Douglas et al. 1996). Cette première étude a permis de démontrer qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression du trangène CFTR, l'intensité de la réponse inflammatoire et la dose virale administrée. Les essais suivant furent entrepris directement sur des patients mucoviscidosiques (Boucher et al. 1994; Crystal et al. 1994). Le transgène fut détecté *in vivo*. Aucune réponse inflammatoire significative n'a été détectée pour des doses virales inférieures à 2.10<sup>9</sup> pfu.

L'année 1995 fut propice à la réalisation de plusieurs essais cliniques utilisant des vecteurs adénoviraux de première génération directement appliqués sur l'épithélium nasal des patients (Crystal et al. 1994; Knowles et al. 1995; M J Welsh et al. 1995). Un très faible, voir aucun, bénéfice clinique pour les patients fut observé. Le transgène CFTR a pu être détecté par RT-PCR pendant plus de 8 jours mais aucune restauration de l'activité canal chlorure ne fut observée *in vivo* (ceci étant dû à l'apparition d'une réponse immunitaire par l'organisme receveur). L'équipe du Pr.Bellon administra ce vecteur sous forme d'aérosol au niveau nasal et bronchique (Bellon et al. 1996). Le transgène CFTR fut détecté jusqu'à 21 jours après administration. Aucun effet toxique et aucune élévation du titre d'anticorps neutralisant anti-adénovirus n'ont été détectés. En effet, les doses de vecteurs utilisés étaient comprises entre  $10^5$  et 5,4. $10^8$  pfu, doses identifiées comme étant en dessous du seuil de toxicité. Ces études montrent que les vecteurs adénoviraux sont de bons vecteurs de transfert de gène lorsqu'ils sont utilisés à une dose inférieure à 2. $10^9$  pfu.

Par la suite, l'administration répétée à quelques semaines d'intervalles de doses croissantes de vecteurs adénoviraux (jusqu'à 10.<sup>10</sup> pfu) a été réalisé au niveau de l'épithélium nasal de patients CF. Cette étude a montré une correction partielle de l'activité canal à ions chlorure du CFTR ainsi que l'apparition modérée d'une réponse humorale chez les patients (J Zabner et al. 1996). Des doses de vecteurs comprises entre 3.10<sup>6</sup> et 2.10<sup>9</sup> pfu ont été administrées de façon répétée par spray endobronchique. Aucune réponse immunitaire dirigée contre le vecteur n'a été détectée. L'expression transitoire du CFTR a été mis en évidence jusqu'à 30 jours après administration. Cependant cette expression diminue dès la seconde administration et n'est plus détectée à la 3<sup>ème</sup> administration (Harvey et al. 1999).

En 2001, 2 essais cliniques menés par les Docteurs Joseph et Perricone (Joseph et al. 2001; Perricone et al. 2001) déterminent les différentes réponses de patients CF suivant le mode d'application du vecteur adénoviral.

Un premier bilan des différents essais cliniques réalisés jusqu'à ce jour peut être réalisé. Le transfert direct *in vivo* dans les cellules épithéliales pulmonaires est possible, et cela avec un minimum d'effets indésirables. Cependant, quelque soit le vecteur viral employé, l'expression du gène *CFTR* est transitoire et l'efficacité de correction de l'activité canal à ions chlorure est faible. Il est actuellement indispensable d'optimiser les conditions d'administration de ces vecteurs pour permettre d'envisager de traiter au long terme la mucoviscidose.

## 3.2. Thérapie protéique

Cette stratégie thérapeutique a pour but de palier l'effet délétère des différentes mutations, et de permettre une expression apicale de la protéine CFTR. Les différentes approches pharmacologiques varient suivant la classe de mutation envisagée.

#### 3.2.1. Mutations de classe I

Ces thérapies traitant les mutations "non-sens" de classe I interviennent sur l'étape de traduction de l'ARN messager, en empêchant une mutation aboutissant à la formation d'un codon stop, et donc provoquant l'arrêt de la synthèse protéique. La protéine CFTR issue de cet ARN messager est donc tronquée. La protéine CFTR n'ayant pas une conformation tridimensionnelle normale, est inactive.

Certaines molécules, par exemple des aminosides comme la gentamycine, peuvent influencer cette étape de traduction, en diminuant l'affinité de liaison de l'ARNt sur le codon correspondant. Grâce à la gentamycine, un ARNt pourra se lier au niveau d'un codon stop, permettant ainsi l'incorporation d'un acide aminé ; le processus de traduction pourra se poursuivre (Bedwell et al. 1997). En effet, Howard et al. ont démontré, après transfection de cellules possédant la mutation G542X ou R553X par l'ADN complémentaire de CFTR en présence d'aminoglycosides G418, la synthèse d'une protéine CFTR fonctionnelle et de taille normale (Howard, R A Frizzell, et Bedwell 1996).

Un essai clinique a été entrepris. Il correspond à une étude réalisée sur 9 patients homozygotes pour une mutation de classe I ayant reçu un traitement par gentamycine pendant 14 jours (Wilschanski et al. 2003). Une modification de la différence de potentiel nasal a été observée ainsi qu'un effet bénéfique de la gentamycine. Cependant des effets secondaires graves (néphropathies et surdité) se sont développés après administration de l'antibiotique ne permettant pas une administration à long terme.

#### 3.2.2. Mutations de classe II

Les mutations de classe II correspondent à un défaut de maturation cellulaire de la protéine CFTR (absence de modifications post-traductionnelles), la plus connue étant la mutation  $\Delta$ F508. Le rôle des traitements en vue de corriger les mutations de cette classe sera celui de "chaperon" pour la protéine CFTR, afin que la protéine puisse migrer du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi sans être dégradée, et s'exprimer au niveau membranaire. Ainsi, après le phénylbutyrate qui a fait l'objet d'un essai clinique de phase II dés 1998, sans nouvelles données cliniques depuis (R C Rubenstein et P L Zeitlin 1998) , une autre étude démontrant l'activité de la génistéine (isoflavone inhibitrice de tyrosine kinase), et du 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) a été réalisée sur des cellules épithéliales bronchiques exprimant la mutation  $\Delta$ F508 : une expression apicale de CFTR et un efflux d'ions chlorure ont été observés (Andersson et Roomans 2000). D'autres molécules ont été identifiées depuis, telles que les aminoarylthiazoles ou encore les gunazoline (Pedemonte et al. 2007; Van Goor et al. 2006).

L'équipe du Pr. F. Becq a mis en évidence une molécule permettant le ré-adressage à la membrane cellulaire de la protéine CFTR $\Delta$ F508, le miglustat. Des tests *in vivo*, sur des souris CFTR  $\Delta$ F508, se sont révélés être très encourageants (Norez et al. 2006). Utilisée pour traiter deux maladies rares (les maladies de Gaucher et de Niemann Pick de type C), sa sécurité et sa tolérance ont déjà été évalués sur l'Homme. Un essai clinique sur 25 patients homozygotes pour la mutation  $\Delta$ F508 a été entrepris dès septembre 2007. Des études complémentaires ont montré les effets bénéfiques du miglustat. Une étude datée de 2009, menée par l'équipe du Pr. Becq, démontre que le traitement quotidien de cellules pulmonaires humaines homozygotes  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 par de faibles concentrations de miglustat permet une correction progressive, maintenue et reversible du phénotype malade (Norez et al. 2009). La correction est observée dès 3 à 4 jours de traitement puis se stabilise. Si le traitement est stoppé, les cellules présentent de nouveau un phénotype malade. Une seconde étude, menée par B. Lubamba et ses collaborateurs, *in vivo*, sur des souris CFTR  $\Delta$ F508 confirme les résultats précédents. Une administration de miglustat à faible concentration au niveau de l'épithélium nasal de ces souris normalise le transport des ions chlorure et sodium au bout d'une heure (Lubamba et al. 2009).

Cependant, les résultats de l'essai clinique entrepris dès 2007 ne sont pas concluants. Le miglustat n'aurait aucun effet sur les patients présentant la mutation  $\Delta$ F508. Néanmoins, les résultats issus des travaux scientifiques de plusieurs laboratoires démontrent les effets bénéfiques de cette molécule. Des études complémentaires pré-cliniques sont nécessaires pour comprendre l'absence d'effet au cours du premier essai clinique afin de transposer chez le patient les résultats obtenus au laboratoire.

## 3.2.3. Mutations de classe III

Cette approche vise à corriger le défaut de la fonction canal à ions chlorure du CFTR lorsque celle-ci est correctement insérée à la membrane. Un essai clinique de phase I a été réalisé avec du CPX et a permis de mettre en évidence le rôle de cette molécule sur la conductance de la protéine CFTR (Arispe et al. 1998). Le CPX permettrait de traiter les mutations de classe II et III. Une nouvelle molécule potentialisatrice du CFTR a récemment été découverte. Il s'agit du Vertex-770 (VX-770), aussi connu sous le nom d'Ivacaftor (Van Goor et al. 2009). Le VX-770 corrige directement l'activité canal à ions chlorure du CFTR en activant l'ouverture AMPc-dépendante du canal, permettant ainsi le transport des ions chlorure à travers la membrane cellulaire. Une première étude présentant les résultats d'un essai clinique de phase II portant sur 39 patients adultes porteurs d'au moins une mutation G551D a été publiée à la fin de l'année 2010 (Accurso et al. 2010). Cette étude présente le potentiel thérapeutique du VX-770 administré par voie orale. Les résultats montrent plusieurs éléments encourageants notament une diminution sensible de la concentration en ions chlorure dans la salive, une restauration partielle de l'activité à ions chlorure du CFTR et une amélioration faible mais sensible des fonctions pulmonaires. Récemment, l'étude clinique de phase III dénommée STRIVE menée sur un grand nombre de patients (161) et sur une plus longue période (48 semaines) a révélé

une amélioration clinique significative chez les patients porteurs de la mutation G551D. Au-delà du VX-770 qui concerne la mutation G551D affectant 4 à 5 % des malades, ces résultats démontrent qu'une intervention pharmacologique sur la protéine CFTR défectueuse permet une correction de cette dernière. Cette avancée est source d'espoir pour les patients porteurs d'autres mutations du *CFTR* pour lesquelles des molécules sont en cours d'essais cliniques. Des résultats d'un essai clinique de phase II, combinant les molécules VX-770 et VX-809, réalisé sur des patients homozygotes pour la mutation  $\Delta$ F508, sont attendus au cours de l'année 2011.

## 3.2.4. Mutations de classe IV

Les mutations de classe IV sont responsables d'un défaut de conductance de l'ion chlore. Une étude réalisée sur l'épithélium nasal d'un modèle murin porteur d'une mutation de classe IV (R117H) a montré que la milrinone (inhibiteur des phosphodiestérases de classe 3) couplée à la forskoline (appartenant à la famille des diterpènes, activateur de l'adenyl cyclase) est capable de favoriser la conduction de chlore en élevant l'AMPc intracellulaire (K Kunzelmann et Schreiber 1999). Ces résultats prometteurs pourraient inciter au passage en clinique, cependant, un effet non négligeable de la milrinone (action inotrope positive), la rend difficilement utilisable actuellement chez des patients mucoviscidosiques.

# II. Les vecteurs adénoviraux

## 1. Classification des Adénovirus

Les Adénovirus ont été isolés en 1953 par Rowe et al. (Rowe WP, 1953) à partir de fragments d'amygdales. Après 2 à 3 semaines de culture, une dégénérescence des tissus était observée. Lors de la mise en contact du surnageant de culture avec des cellules saines, l'effet cytopathique était transféré aux cellules. Le Dr Rowe venait ainsi de mettre en évidence un nouvel agent pathogène : l'Adénovirus, initialement dénommé virus APC (Adeno-Pharyngo-Conjonctival).

Les Adénovirus ont été isolés chez de nombreux vertébrés (Davidson et al, 2003). Ils possèdent un génome à ADN double brin ; ils sont alors classés dans le groupe I de la classification de Baltimore.

Ils appartiennent à la famille *Adenoviridae*, divisée en 4 genres distincts : les *Mastadenovirus* isolés chez les mammifères, y compris chez l'Homme ; les *Aviadenivirus* (virus aviaires), les *Atadenovirus* isolés chez les ruminants et les *Siadenovirus* infectant certaines espèces de grenouilles et d'oiseaux.

On distingue actuellement 52 sérotypes d'adénovirus humains, divisés en 7 sous-groupes : A, B, C, D, E, F et G (**Tableau 3**). Cette classification repose sur plusieurs critères : (i) le potentiel d'agglutination des érythrocytes de rat ou de singe, (ii) leur pouvoir oncogène, (iii) le pourcentage d'homologie de séquence et la teneur de leur génome en nucléotides G et C, (iv) le profil de restriction du génome viral ainsi que le profil polypeptidique du virion par SDS-PAGE et (v) la longueur de la fibre. La subdivision en sérotypes au sein d'un sous-groupe est basée sur la réactivité antigénique croisée (Kaier et Wigand 1986). Chez l'Homme, les adénovirus sont la cause de gastroentérites, d'infections oculaires ou d'infections respiratoires.

Les adénovirus de sérotypes 2 et 5 appartenant au sous-groupe C ont été les plus étudiés et correspondent aux adénovirus les plus utilisés en thérapie génique.

Sous-groupe	Sérotype			
A	12, 18, 31			
В	3, 7, 16, 21, 50, 11, 14, 34, 35			
С	1, 2, 5, 6			
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51			
E	4			
F	40, 41			
G	52			

Tableau 3 : Classification des adénovirus humain





Le virion est constitué d'un ADN génomique de 36kb, lié à des protéines basiques. Une capside protéique icosaédrique protège ce cœur nucléoprotéique. La protéine majoritaire de cette capside est l'hexon et à chaque sommet un complexe base de penton-fibre est présent. De nombreuses protéines secondaires mineures contribuent également à la formation de la capside et jouent un rôle dans l'assemblage de celle-ci et dans l'enpaquetage de l'ADN viral.

D'après (W C Russell 2000a)

## 2. Structure de l'Adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à capside icosaédrique de 70 à 90 nm de diamètre (**Figure 7**). Onze protéines constituent le virion (**Tableau 4**). Ces protéines ont été identifiées par migration en gel dénaturant SDS PAGE (Maizel JV, 1971). Elles sont numérotées de I à XII suivant leur ordre de migration. Sept protéines constituent la capside réparties en 3 protéines majoritaires : l'hexon (protéine II), la base de penton (pentamère de pIII) et la fibre (trimère de pIV) ; et 4 protéines mineures : pI, pVI, pVIII, pIX.

L'hexon (protéine II) est le constituant majoritaire de la capside. En effet, cette protéine constitue les faces de l'icosaèdre à raison de 240 trimères par particules virales (P A Boulanger et Puvion 1974). L'hexon est associé à la protéine IX (pIX). La pIX se localise entre les capsomères d'hexon et permet ainsi de stabiliser la capside (Ugai et al. 2010). Elle serait de plus impliquée dans l'encapsidation du génome viral (Ghosh-Choudhury, Haj-Ahmad, et F L Graham 1987). Les protéines pVI et pVIII formeraient des ponts entre la capside et le core du virion agissant ainsi sur la stabilité de la capside et du génome viral.

La base de penton (pentamère de pIII) et la fibre (trimère de pIV) forment le penton présent à chacun des 12 sommets de la particule virale. Ces protéines interviennent dans les étapes d'attachement (la fibre) et d'internalisation (la base de penton) du virus dans la cellule hôte. Lors du processus d'entrée du virus dans la cellule hôte, la base de penton, plus spécifiquement la séquence conservée Arg-Gly-Asp (RGD) présente dans une région variable accessible à la surface de la protéine, interagit avec les molécules d'intégrines  $\alpha$ v à la membrane cellulaire (Mathias et al. 1994). La structure de la base de penton de l'Ad5 (**Figure 8**) a été récemment résolue par cristallographie (Zubieta et al. 2005). Un tonneau constitué de 8 brins  $\beta$  forme la partie basale de la base de penton alors que sa partie supérieure est constituée d'hélice  $\alpha$  et de boucles lui donnant un aspect en tulipe. Les résidus Gln-482 et Ile-484 sont responsables de l'interaction avec la fibre. Suite à cette interaction, un réarrangement coopératif de la fibre a lieu. Le changement de la structure d'un monomère n'est possible dans l'environnement stérique que si l'ensemble des monomères change de configuration. Cependant, dans le contexte d'une particule virale, le mode de fixation de la fibre sur la base de penton n'est pas connu.

Polypeptide	Masse moléculaire du monomère (kDa)	Nombre de copie de protein par particules adénoviralel	
ll (hexon)	109	240 trimères (720)	
III (penton base)	63	12 pentamères (60)	
Illa	63	60 monomères	
IV (fibre)	62	12 trimères (36)	
V (core)	41	160 monomères	
TP (protein terminale, core)	55	2 monomères	
VI	22	60 hexamères (360)	
VII (core)	19	630 monomères	
VIII	15	-	
IX	14	80 trimères (240)	
μ (core)	± 4	100 monomères	

 Tableau 4 : Les onze protéines de structure de l'adénovirus





D'après (Zubieta et al. 2005). Deux boucles RGD sont visibles.



#### Figure 9 : 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  $\beta$  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.

La fibre, polypeptide de 582 acides aminés chez l'Ad2, est liée de façon non covalente par son extrémité N-terminale à la surface de la base de penton (Devaux et al. 1987; Zubieta et al. 2005). Trente six copies de cette protéine sont assemblées en trimère au niveau des 12 sommets de la capside. La séquence FNPVYPY, proche de son extrémité N-terminale, est hautement conservée entre les sérotypes (Zubieta et al. 2005). De nombreuses liaisons hydrogène et des ponts salins contribuent à la stabilité de l'interaction avec la base de penton. Cette fixation induit des modifications conformationnelles coopératives qui laissent uniquement de la place à un trimère de fibre. La trimérisation de la fibre dépend à la fois des séquences du domaine « knob » et de la tige (Jiali Li et al. 2006).

Classiquement, la fibre est composée de 3 domaines principaux :

- une queue flexible, en N-terminal, responsable de l'interaction avec la base de penton
- un domaine central, nommé "tige", de longueur variable en fonction du sérotype de l'adénovirus
- un domaine globulaire "knob", en C-terminal, qui permet l'interaction avec le récepteur primaire

La longueur de la fibre varie en fonction du nombre de motifs répétés qu'elle contient. Chacun de ces motifs structuraux est composé de 15 acides aminés où l'on retrouve invariablement un résidu proline ou glycine et des résidus hydrophobes (van Raaij et al. 1999). Le nombre de répétitions est différent selon le sérotype d'Ad considéré : 22 répétitions pour l'Ad5 et l'Ad2 (Green et al. 1983), 12 pour l'Ad4 et 6 pour l'Ad3 (Signäs, Akusjärvi, et U Pettersson 1985).

La tige expose le plus efficacement possible le domaine "knob", domaine responsable de l'attachement au récepteur primaire CAR (L J Henry et al. 1994). Ce domaine intervient également dans la trimérisation de la fibre (J S Hong et Engler 1996). Ce rôle structural est indispensable à la liaison de la fibre à la base de penton et donc à l'incorporation du complexe de penton à la particule virale (Novelli et P A Boulanger 1991).

La structure du "knob" a été déterminée par cristallographie aux rayonx X dès 1994 par Xia D. et ses collaborateurs (**Figure 9**) (Xia et al. 1994). La co-cristallisation du domaine "knob" avec le récepteur CAR a permis de localiser les régions impliquées dans cette interaction (Bewley 1999; Kirby et al. 2000). Le domaine globulaire est constitué d'une succession de feuillets  $\beta$  anti-parallèles nommés de A à J où les feuillets  $\beta$  A et B sont impliquées dans la reconnaissance du CAR. D'autres séquences présentes dans les feuillets  $\beta$  D, G et I ainsi que dans les boucles DG et HI semblent intervenir dans la trimérisation de la fibre (Santis et al. 1999).



Figure 10 : Schéma représentant l'organisation du génome des adénovirus de sérotype 2 et 5

Sur cette carte, les unités de transcription précoces sont indiquées en bleu, celles exprimées à temps intermédiaires en orange et celles exprimées à un stade tardif en trait noir fin. Chaque extrémité du génome est flanquée par des séquences inversées répétées ou ITR de 100 à 200 nucléotides (*Internal Terminal Repeat*). L'ITR 5' est suivie d'une séquence d'encapsidation du génome dans la particule virale : la séquence  $\Psi$ . VA RNA, Virus-associated RNA; ORF, Open Reading frame ; DBP, DNA Binding-protein ; pTP, preterminal protein ; Pol, adenovirus DNA-polymerase.

D'après (Flint S Jane 2001)

## 3. Le Génome viral

Le génome de l'adénovirus est constitué d'un ADN double brin linéaire de 36kb. Il présente une organisation en unités de transcription précoces (E1 à E4), intermédiaires (pIX et pIVa2) et tardives (L1 à L5) qui s'expriment de manière séquentielle (**Figure 10**).

Les gènes précoces codent des protéines régulatrices qui bloquent les mécanismes anti-viraux de la cellule hôte et préparent la réplication virale alors que les gènes tardifs codent des protéines de structure (W C Russell 2000b). La molécule d'ADN présente à ses extrémités des séquences inversées répétées (ITR pour *Inverted Terminal Repeat region*) de 100 à 200 nucléotides qui contiennent l'origine de réplication virale et interviennent donc dans la réplication du génome.

## 4. Le cycle viral

Le cycle viral complet dure de 30 à 36 heures et aboutit à la libération d'environ 10 000 néovirions après lyse de la cellule infectée. Le cycle se divise en trois étapes, une phase précoce, une phase de réplication de l'ADN viral et une phase tardive d'assemblage et de libération des virions.

## 4.1. Phase précoce

La phase précoce débute par l'attachement de la particule virale à la cellule cible et par son internalisation dans cette dernière.

4.1.1. Entrée

L'entrée des adénovirus a beaucoup été étudiée pour les adénovirus de sérotypes 2 et 5 appartenant à la famille C. Cette entrée est séquentielle et repose sur l'interaction avec des protéines cellulaires. L'attachement de la particule virale à la cellule cible est médiée par la fibre. La fibre des adénovirus de sérotypes 2 et 5 interagit avec le récepteur cellulaire CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*), récepteur commun aux virus Coxsackie B3 de la famille des *Picornaviridae* et aux adénovirus de la famille A, C, E, et éventuellement D (L J Henry et al. 1994; Louis et al. 1994). Ainsi, la tête de la fibre se lie au récepteur CAR via les boucles AB et DE ainsi que les feuillets  $\beta$  B, E et F et plus précisément par les résidus suivant : A405, S408, P409, K417, Y477, L485, Y491, 489-TAYT (Bewley 1999; Kirby et al. 2000).



**Figure 11: Description temporelle des étapes du cycle viral et de l'expression des gènes.** Cette étude a été réalisée sur cellules HeLa. D'après Gogev et Thiry, 1999. Ceci conduit à un changement de conformation permettant d'exposer le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) présent sur une boucle à la surface de chaque monomère de la base de penton. Il y aura alors interaction entre ce motif et les intégrines cellulaires  $\alpha_v \beta_1, \alpha_v \beta_3, \alpha_v \beta_5$  (Davison et al. 1997; Salone et al. 2003) et  $\alpha_5\beta_1, \alpha_3\beta_1$ . En l'absence de récepteur primaire CAR, les intégrines  $\alpha_v$  peuvent servir de récepteur de faible affinité. L'exposition de 5 motifs RGD portés par la base de penton permet l'association simultanée de plusieurs molécules d'intégrines (Chiu et al. 1999). Ce recrutement des intégrines permet l'entrée rapide de l'adénovirus par endocytose.

## 4.1.2. Trafic intracellulaire

Le virus est internalisé par la voie des vésicules à clathrine puis est ensuite retrouvé dans les endosomes (U F Greber et al. 1993). Les mécanismes qui sont à l'origine de la rupture des endosomes ne sont pas clairement élucidés. Suite à l'acidification des endosomes précoces, les protéines IIIa et VIII se dissocient. La sous-unité  $\beta_5$  des intégrines  $\alpha_v \beta_5$  porte au niveau de son domaine cytoplasmique le motif TVD (Thréonine-Valine-Acide aspartique). Ce motif serait impliqué dans l'initiation de l'endosomolyse (Campos et M. A Barry 2007). D'autres protéines virales et cellulaires seraient également impliquées dans ce processus. Les dernières étapes de dissociation des protéines virales semblent faire intervenir la protéase virale L3-23K, par digestion de la protéine VI, qui maintient la capside et le core viral (U F Greber et al. 1996; Wiethoff et al. 2005). Le core viral est alors transporté au noyau par un transport actif le long des microtubules par le couple dynéine/ dynactine. Les molécules d'hexon vont se fixer au complexe du port nucléaire puis l'ADN viral, protégé par les protéines TP, V, et VII pénètre dans le noyau (Trotman et al. 2001).

#### 4.1.3. Activation des gènes viraux

L'expression des premiers gènes viraux peut débuter une à deux heures après l'entrée du virus dans la cellule (**Figure 11**). Le virus va moduler l'environnement cellulaire afin de favoriser sa réplication. Ceci inclut une dérégulation du cycle cellulaire tout en contrôlant l'apoptose de la cellule infectée et son échappement au système immunitaire.

La transcription débute au niveau des gènes précoces E1 et E4 ; l'unité de transcription E1A aboutit à la synthèse d'une protéine de 243 acides aminés (243R) et une protéine de 289 acides aminés (289R). Ces deux protéines vont orienter le cycle cellulaire en phase S.



Figure 12 : Réplication du génome adénoviral

<u>1</u> : la réplication du génome adénoviral est initiée par la fixation au sein des ITR du complexe constitué de l'ADN polymérase virale (Pol) et de la protéine pTP associées aux activateurs de transcription cellulaires Nf1 (*Nuclear factor 1*) et Oct-1 (*Octamer Transcription factor binding protein-1*)

<u>2</u>: L'ADN polymérase synthétise le nouveau brin dans le sens 5'-3' par un processus continu de déplacement de brin. Le simple brin déplacé est recouvert de la protéine virale DBP qui stabilise la matrice.

<u>3</u> : Le brin d'ADN déplacé se circularise grâce à l'hybridation des 2 ITR complémentaires situées aux extrémités du brin.

4 : La réplication est initiée par le complexe ADN polymérase-pTP.

 $\underline{5}$ : Les deux brins néo-synthétisés s'associent en structure bicaténaire.

D'après (Flint S Jane 2001)

L'entrée en phase S active également la voie apoptotique p53 dépendante. Les protéines virales 19K et 55K synthétisées à partir de E1B contrebalancent cet effet (Ben-Israel et Kleinberger 2002).

L'unité de transcription E4 code au moins six polypeptides (ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF6, ORF6/7). Ces protéines sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle, le transport d'ARNm, la régulation de la transcription virale, l'expression des gènes tardifs, dans l'extinction des gènes cellulaires et apoptotiques.

La région E3 code 9 protéines désignées en fonction de leur masse moléculaire. Ces protéines interviennent dans la réplication virale, l'échappement à l'apoptose et la modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis de la cellule infectée.

Les régions E2A et E2B codent l'ADN polymérase adénovirale (AdPol), le précurseur de la protéine terminale (pTP) et la protéine de liaison à l'ADN (DBP pour *DNA Binding Protein*). Ces trois protéines sont indispensables à la réplication de l'ADN viral.

# 4.1.4. Réplication du génome viral

La réplication de l'ADN viral des Ad2 et Ad5 débute 5 à 8h après le début de l'infection. Ce temps correspond au temps nécessaire à l'expression des protéines DBP codée par la région E2A, pTP et l'ADN polymérase virale codées par la région E2B.

Ce mécanisme fait appel à un mécanisme de déplacement de brin continu semi conservatif (**Figure 12**). La réplication est initiée par la fixation de la protéine pTP sur les 51 premières bases de l'ITR 3' (de Jong, van der Vliet, et Brenkman 2003). Cette protéine reste liée à l'extrémité 5' du génome pendant le processus de réplication.

L'ADN polymérase virale synthétise la chaîne fille dans le sens 5'-3' par un mécanisme de déplacement de brin continu. Le brin déplacé se recouvre alors de la protéine virale DBP. Cette protéine agit comme un facteur de processivité pour le déplacement de l'ADN polymérase le long du génome viral et sur la stabilité de l'ADN simple brin libéré. Des protéines cellulaires sont également impliquées telles que des topoisomérases et des activateurs transcriptionnels. Une fois les nouveaux brins synthétisés, la protéase virale clive la protéine pTP pour donner la protéine 55K (nommée protéine terminale TP). Cette étape a lieu au cours de l'assemblage de la particule virale.



Figure 13 : Vecteurs utilisés en essais cliniques

## 4.2. Phase tardive

La phase tardive correspond à l'expression des protéines de structure et à l'assemblage des nouveaux virions. L'unité de transcription tardive est la dernière à être exprimée dans la cellule sous le contrôle du promoteur MLP. Ce promoteur est activé par les protéines précoces codées par la région E4 et les protéines intermédiaires IX et IVa2 (Lutz, Rosa-Calatrava, et Kedinger 1997). L'unité de transcription tardive code un transcrit primaire de 29kb à l'origine des 5 familles d'ARNm (L1 à L5) codant 13 protéines différentes. Tous les transcrits issus du promoteur MLP contiennent une séquence non codante de 200 nucléotides nommée *tripartite leader* (TPL), ainsi qu'une coiffe en 5' permettant leur polyadénylation et donc leur stabilité. La transcription virale tardive permet la synthèse de protéines de structure ainsi que quelques protéines accessoires impliquées dans l'assemblage comme 33K et p52/55K (Edvardsson et al. 1976).

L'assemblage des protéines de structure a lieu dans le noyau de la cellule hôte. Les trimères d'hexon et les oligomères de base de penton associés à la fibre se forment et sont transportés au noyau seuls ou guidés par des protéines chaperonnes. L'assemblage de l'hexon trimérique nécessite l'intervention de la protéine chaperonne 100K (Cepko et Sharp 1983; Hong et al. 2005) puis est acheminé dans le noyau par la protéine VI (Harald Wodrich et al. 2003). La trimérisation de la fibre ne nécessite pas de protéine chaperonne ; elle est dirigée par un signal situé dans la tête de la fibre (Novelli et P. A. Boulanger 1991). Son transport dans le compartiment nucléaire est initié par la séquence NLS (*Nuclear Localisation Signal*) situé dans son domaine tige (Hong et al., 1991). La protéine VII initie le transport de l'ADN génomique viral dans le compartiment nucléaire (Harald Wodrich et al. 2006).

Les particules virales dites « légères » sont composées des capsomères et des protéines précurseurs des protéines IIIa, VI et VIII mais sont dépourvues d'ADN génomique et des protéines du « core ». Ces particules sont converties en particules dites « lourdes » lors de l'incorporation polarisée du génome viral avec le concours de la séquence d'encapsidation  $\psi$  localisée à l'extrémité gauche du génome. Les particules virales infectieuses sont formées après maturation par clivage protéolytique de protéines de structure par la protéase virale p23.

Les virions nouvellement synthétisés sont libérés par lyse de la cellule. Ce mécanisme serait dépendant de la protéine ADP (*Adenovirus Death Particule*), protéine synthétisée lors de la phase tardive de l'infection virale sous le contrôle du promoteur MLP (Tollefson et al. 1996; Subramanian, Vijayalingam, et Chinnadurai 2006). La fibre serait également impliquée dans la libération des particules infectieuses. En effet, la fibre, produite en excès au cours du cycle viral, pourrait perturber localement la barrière épithéliale en se fixant à son récepteur primaire CAR. Ceci induirait une perturbation des jonctions serrées et aboutirait à une diffusion efficace des virions entre les cellules épithéliales (Walters et al. 2002; Trotman et al. 2001).

La production virale est très efficace car elle conduit à la formation de  $10^4$ - $10^5$  particules virales par cellule. Les adénovirus possèdent de nombreux avantages et représentent des candidats intéressants



#### Figure 14 : Représentation schématique du trafic intracellulaire des adénovirus des sous-groupes A et B.

Au cours du processus infectieux, un adénovirus peut emprunter une des cinq voies majoritairement décrites pour transiter dans la cellule jusqu'au noyau. Ces voies sont différenciées suivant le récepteur permettant l'attachement de la particule adénovirale et le devenir des protéines majoritaires de capside.

- <u>Attachement</u>: trois voies débutent par la fixation des adénovirus de sous-groupe C au récepteur CAR [(i): CAR/nuclear enveloppe; (ii) CAR/MTOC; (iii) CAR/late endosome]; les adénovirus de sous-groupe B se fixent au récepteur CD46 (v) et les protéines du sérum empruntent des récepteurs adéquats (vi).
- <u>Entrée</u>: les particules adénovirales sont endocytosées via des vésicules à manteau de clathrine. Ce sont les calvéoles qui permettent leur endocytose lors de l'infection de lymphocytes.
- <u>Lyse</u> : le mécanisme d'échappement de l'endosome est observé rapidement pour les adénovirus de sous-groupe C alors que les adénovirus de sous-groupe B s'accumulent dans les endosomes tardifs et les lysosomes.
- <u>Translocation jusqu'au noyau</u> : les particules adénovirales sont transportées jusqu'au noyau de la cellule via le système des microtubules

D'après (Leopold et Crystal 2007)

comme vecteurs pour la thérapie génique. Ils correspondent au système le plus utilisé en essais cliniques comptant pour 24,1 % des essais actuels (**Figure 13**).

## 4.3. Variations observées pour l'Ad5F35

Le vecteur chimérique Ad5F35 (vecteur adénoviral de sérotype 5 pseudotypé par la fibre du sérotype 35) présente le même cycle viral qu'un adénovirus de sous groupe B.

La comparaison des diverses phases du cycle viral des adénovirus de sous groupe C et B a permis de mettre en évidence plusieurs différences (Figure 14).

Une première différence a été observée au niveau de l'attachement et de l'entrée du virus dans la cellule hôte. La fibre des adénovirus de sérotype 35 interagit avec le récepteur cellulaire CD46, protéine exprimée de façon ubiquitaire à la surface de la majorité des cellules humaines (Anuj Gaggar, Dmitry M Shayakhmetov, et André Lieber 2003; A. Gaggar et al. 2005).

Une seconde variation est observée au cours du trafic intracellulaire du virus. Les adénovirus de sousgroupe B s'accumulent dans les endosomes tardifs et les lysosomes, contrairement aux adénovirus de sous groupe C qui sont rapidement transportés jusqu'au noyau (Defer et al. 1990; D. M Shayakhmetov et al. 2003; Dmitry M Shayakhmetov, Eberly, et al. 2005). Les particules virales de sous groupe B seront donc libérées plus tardivement dans le cytosol. En effet, les adénovirus de sous-groupe B lysent la membrane endosomale à un pH plus acide que les adénovirus de sous groupe C (Miyazawa et al. 1999). Il est important de noter que le trafic cellulaire via les compartiments tardifs ne conduit pas à une perte en ADN viral. Ces compartiments ne correspondent pas à une impasse pour le virus. Cette voie serait considérée comme une voie alternative permettant au virus d'être transporté au noyau sans utiliser les microtubules (Leopold et Crystal 2007).



Figure 15 : Représentation schématique des différents récepteurs cellulaires permettant l'attachement et l'entrée des adénovirus (Ad).

De gauche à droite : le domaine knob de la fibre (en jaune) des Ad de sous-groupe D se fixe à l'acide sialique ; le domaine knob des Ad de sous-groupe B se fixe au CD46 ou au CD80 / 86 ; la tige de la fibre (en trait noir) des Ad de sous-groupe C se fixe au héparanes sulfates ; le domaine knob des Ad de sous-groupe C se fixe à VCAM-1, au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) ou au Scavenger récepteur (SR) suivant un mécanisme inconnu ; le motif RGD de la base de penton (en rouge) des Ad de sous-groupe A-E se fixe aux intégrines ; le domaine knob des Ad de sous-groupe A, C et F se fixe au récepteur CAR. D'après (N. Arnberg 2009).

#### 5. Récepteurs cellulaires

L'adsorption des adénovirus à la surface de la cellule hôte se fait par l'intermédiaire d'une liaison de haute affinité entre le domaine knob de la fibre et son récepteur cellulaire. Plusieurs récepteurs primaires ont déjà été identifiés (**Figure 15, Tableau 5**).

#### 5.1. Le récepteur CAR « Coxsackie and Adenovirus Receptor »

Dès 1976, il est démontré que les adénovirus humains du sous-groupe C et les virus Coxsackie B3 de la famille des *Piconaviridae* (Lonberg-Holm, Crowell, et Philipson 1976) ont un récepteur commun. Ce récepteur a été identifié en 1997 (Bergelson 1997), il s'agit du récepteur CAR pour *Coxsackie and Adenovirus Receptor*. Les sérotypes d'adénovirus humains appartenant aux sousgroupes A, C, D et E se lient à CAR et l'utilisent comme récepteur primaire (Bergelson 1997; Howitt 2003). La protéine CAR est exprimée sur un large spectre de type cellulaire (Howitt 2003). On la retrouve notamment au niveau du cœur, du pancréas, du système nerveux, des poumons, du foie, etc. (Meier et Urs F Greber 2004). Au niveau des cellules épithéliales polarisées, CAR assure les jonctions intercellulaires au niveau de la surface basolatérale. Des études ont permis de localiser la protéine CAR au niveau des jonctions serrées des épithéliums (Cohen et al. 2001; Raschperger et al. 2006) où elle est associée à d'autres protéines telle que la protéine Zonula Occludens 1. La protéine CAR est donc impliquée dans l'interaction cellulaire homotypique, dans l'adhésion et la formation de tissus.

Le récepteur CAR est une glycoprotéine transmembranaire de 46 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Il est constitué d'un domaine extracellulaire et d'un domaine intracellulaire séparés par un domaine transmembranaire. Les domaines cytoplasmique et transmembranaire n'interviennent pas dans l'infection ; ils constituent le point d'ancrage de CAR dans les cellules (H. Wang et al. 2008). Le domaine extracellulaire est formé de 2 domaines Ig, D1 et D2, D1 étant le domaine de liaison à la particule virale via le domaine knob de la fibre. Des études de critallographie et de RMN ont montré que 2 domaines D1 interagissent avec une tête de fibre trimérique. Le site de liaison est localisé au niveau des boucles AB et DE du knob (Bewley 1999; Kirby et al. 2000; Law et Davidson 2005).

CAR aurait un rôle supplémentaire dans l'infection adénoviral (**Figure 16**). Il a été démontré que suite à l'infection d'un épithélium respiratoire humain par le pôle basolatéral par un adénovirus (Ad), les virus néo-synthétisés pouvaient se localiser au pôle apical de l'épithélium (Walters et al. 2002). Ces épithéliums présentent une forte étanchéité assurée par les jonctions cellulaires. Des études par cristallographie suggèrent que le knob de la fibre perturbe les interactions CAR-CAR et donc améliore la perméabilité de l'épithélium (van Raaij et al. 1999; Walters et al. 2002). Le knob permettrait donc de faciliter le passage des Ad au travers des barrières physiques existantes dans les tissus (Walters et al. 2002).

Sous-	Sérotype	Récepteur	Longueur	Tropisme	Référence
groupe			fibre		
A	12, 18, 31	CAR	28-31	Gastro-	(Bewley 1999)
				intestinal	(Roelvink et al. 1998)
	3, 7	CD46, CD80/86,		Respiratoire	(Christoph Fleischli et
B1		HSPG,			al. 2007)
		Desmoglein 2	9-11	Oculaire	(Dominique Sirena et
		(DSG-2)			al. 2004)
	16, 21, 50	CD46, CD80/86		Renale	(Sirena et al. 2004)
	11, 35	CD46, DSG-2			
B2	14	DSG-2			(Sebastian Tuve et al
	34	CD46, CD80/86			2008)
					(Hongjie Wang et al.
					2011)
	1, 2, 5, 6	CAR, HSPG,	23-31	Respiratoire	(Bergelson 1997)
С		CMH-I, VCAM-I,			(S S Hong et al. 1997)
		Intégrines			(Y Chu et al. 2001)
					(Dechecchi, Melotti,
					Bullizzalu, Santacatterina
					Chilosi, et Cabrini
					2001a)
	8, 9, 10, 13, 15, 17,	CAR, acide	12-13	Oculaire	(Roelvink et al. 1998)
D	19, 20, 22-30, 32,	scialique, CD46			(N Arnberg, Kidd, et
	33, 36-39, 42-49, 51				al. 2000)
E	4	CAR	17	Respiratoire	(Roelvink et al. 1998)
				Oculaire	
F	40, 41	CAR	28-33	Gastro-	(Roelvink et al. 1998)
	50	linté avia e e		Intestinal	(Marria Caffald Israa
G	52	Integrines		Gastro-	(IVIOITIS Sattold Jones
				intestinai	et al. 2007)

**Tableau 5: Récapitulatif des récepteurs connus pour les adénovirus humains.**Adapté de (A. Sharma et al. 2009)

La surface apicale



Le pôle basolatéral

# Figure 16: Modèle de mécanisme de passage des adénovirus vers la surface apicale de l'épithélium.

L'adénovirus entier ou les fibres de celui-ci pourraient rompre les contacts intercellulaires dus à la protéine CAR et ainsi diminuer l'étanchéité de la barrière épithéliale. D'après (Walters et al. 2002).

En effet, l'Ad37 utilise comme récepteur primaire le CD46 mais se fixe avec une forte affinité au CAR via le domaine knob de la fibre probablement pour permettre aux virus néo-synthétisés de franchir la barrière épithéliale pour infecter d'autres cellules (Seiradake et al. 2006).

# 5.2. CD46

Les adénovirus de sous-groupe B utilisent un récepteur cellulaire différent de CAR. En effet, ces adénovirus n'entrent pas en compétition avec les Ad du sous groupe C lors de l'attachement aux cellules (Defer et al. 1990; S. C Stevenson et al. 1995). En 2003, Gaggar et al , l'identifient comme étant la protéine CD46 (Anuj Gaggar, Dmitry M Shayakhmetov, et André Lieber 2003).

Le récepteur CD46, aussi connu sous le nom MCP «*Membrane cofactor protein* », est une glycoprotéine transmembranaire de type 1, exprimée de façon ubiquitaire à la surface de la plupart des cellules humaines à l'exception des érythrocytes.

Sa structure peut être divisée en plusieurs domaines (S. Russell 2004):

- un domaine extracellulaire constitué de 4 modules riches en cystéines dénommés *Short Concensus Repeats* (SCR) : SCR1, SCR2, SCR3 et SCR4
- une à trois régions riche en sérines, thréonines et prolines (régions STP)
- un domaine transmembranaire hydrophobe
- un domaine cytoplasmique en C-terminal

Les domaines SCR1 et SCR2 sont nécessaires et suffisants pour une liaison optimale des Ad 3, 7, 11, et 35 à la surface des cellules (C. Fleischli et al. 2005; A. Gaggar et al. 2005; Christoph Fleischli et al. 2007). L'interaction entre ces 2 domaines et la particule virale se fait via le domaine knob de la fibre, et plus précisément par 4 acides aminés situés au niveau des boucles HI et DG de ce dernier (Phe242, Arg279, Ser 292, Glu302). Une mutation ponctuelle au niveau d'un de ces acides aminés inhibe totalement l'interaction fibre/CD46 (Gustafsson et al. 2006).

La protéine CD46 est aussi connue pour réguler la cascade du complément. En effet, elle fixe les fractions C3b et C4b du complément et protège ainsi la cellule de la cytolyse.

De plus, elle a été identifiée comme récepteur de plusieurs pathogènes. Les virus qui l'utilisent comme récepteur sont principalement des virus enveloppés à ARN (virus de la rougeole) ou ADN (virus de l'Herpes) qui infectent la cellule par fusion avec la membrane plasmique (Dmitry M Shayakhmetov, Eberly, et al. 2005). Les sites d'interaction et de reconnaissance varient suivant le pathogène.

## 5.3. Les Héparanes Sulfates (HS)

Les HS sont des polysaccharides complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Ils sont exprimés en grande quantité à la surface des cellules de mammifères et dans les matrices extracellulaires. Ces molécules fixent de nombreuses protéines et modulent ainsi leurs activités biologiques. Ces molécules sont liées à un cœur protéique et forment alors des protéoglycanes (HSPGs). Différents virus utilisent les propriétés interactives des HS pour s'adsorber à la surface de leurs cibles cellulaires et ainsi faciliter leurs interactions avec leurs récepteurs d'entrée. L'Ad2 et l'Ad5 interagissent avec les HSPGs (Dechecchi, Melotti, Bonizzato, Santacatterina, Chilosi, et Cabrini 2001a; Gaden et al. 2004) via le motif KKTK situé dans la tige de la fibre (Cardin et al. 1989). L'étude menée par Smith et al en 2003, démontre que la mutation de ce motif modifie le tropisme des adénovirus *in vivo* ; une modification de la liaison du virus aux HSPGs n'a pas été montrée (Theodore A G Smith et al. 2003). Ce motif est conservé chez les adénovirus du sous-groupe C. L'Ad3 appartenant au sous-groupe B présente une particularité. En effet, bien que le virus complet ne se fixe pas aux HSPGs, des pseudos particules formées suite à l'auto-assemblage de 12 protéines penton dénommées « dodécaèdres » présentent une affinité très importante pour les HSPGs (Vivès et al. 2004; P. Fender et al. 2008). Ceci facilite la fixation aux intégrines cellulaires, étape indispensable à l'entrée des dodécaèdres dans la cellule. La fixation des pseudos particules aux HSPGs est médiée via la boucle RGD (Gout et al. 2010).

## 5.4. L'acide sialique

L'acide sialique est utilisé comme récepteur par plusieurs virus : les orthomyxovirus, paramyxovirus, picornavirus, papovavirus, coronavirus, réovirus et les parvovirus (Dormitzer et al. 2002; T Stehle et S C Harrison 1997; Weis et al. 1988). Plusieurs sérotypes d'adénovirus appartenant au sous groupe D (Ad8, Ad19a, Ad37) utilisent également cette molécule comme récepteur cellulaire. Ces adénovirus sont associés à des kératoconjonctivites épidémiques (N Arnberg, Edlund, et al. 2000; N Arnberg, Kidd, et al. 2000). Les domaines knob des fibres de l'Ad8, Ad19a et Ad37 sont caractérisés par des points isoélectriques élevés (pI=9.1) contrairement à celui de l'acide sialique qui est bas (pI=2.3). L'interaction entre ces deux partenaires est dépendante de la charge (N Arnberg, Y f Mei, et Wadell 1997).

## 5.5. Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I)

La région C-terminale du domaine α2 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I est présent au niveau de la majorité des tissus humains. Cette protéine est exprimée par les cellules HeLa et Daudi et est reconnue par l'Ad2 et l'Ad5 comme récepteur primaire permettant l'entrée dans ces cellules (S S Hong et al. 1997). Cependant, lorsque ce récepteur est coexprimé avec le récepteur CAR à la surface des cellules CHO, l'Ad5 se fixe majoritairement au CAR (Davison et al. 1999). Le CMH-I serait impliqué dans les étapes d'attachement et d'internalisation de l'Ad2 et de l'Ad5 uniquement si le récepteur CAR est absent. Des données complémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle joué par cette protéine dans l'infection adénovirale.

## 5.6. VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule -1)

Cette glycoprotéine, également connue sous le nom de CD106, appartient à la superfamille des immunoglobulines qui, comme le récepteur CAR, est reconnue par l'Ad5. Le domaine D7 de VCAM-1 présente une forte homologie avec le domaine D1 de CAR (Y Chu et al. 2001).

## 5.7. CD80/CD86

Les protéines CD80 et CD86 sont des glycoprotéines appartenant aussi à la superfamille des immunoglobulines. Elles participent à l'activation des lymphocytes T (Greenwald, Freeman, et Sharpe 2005). Certains adénovirus du sous-groupe B tel que l'Ad3 interagissent avec ces deux protéines (Joshua J Short et al. 2004) et non avec le récepteur CD46 (Joshua J Short et al. 2006).

Les adénovirus du sous-groupe B utilisent plusieurs récepteurs pour se fixer à la cellule cible et être internalisé. La majorité des Ad du sous groupe B utilisent le CD46 alors que d'autres vont se fixer aux CD80 / 86, ainsi qu'à un récepteur identifié récemment : la Desmogléine 2 (DSG-2).

#### 5.8. Desmogléine-2

La desmogléine-2 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des cadhérines. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Son domaine cytoplasmique interagit avec plusieurs protéines directement en contact avec des protéines régulatrices impliquées dans l'adhésion cellulaire et les jonctions intercellulaires. DSG-2 a récemment été identifié comme étant le récepteur de haute affinité des adénovirus appartenant au sous-groupe B2 (Ad3, Ad7, Ad11 et Ad14). L'interaction entre ces adénovirus et la DSG-2 conduit à l'ouverture des jonctions intercellulaires et permet ainsi aux particules adénovirales d'avoir accès à d'autres récepteurs piégés à ce niveau (Hongjie Wang et al. 2011).

## 5.9. GD1a glycane

Cette molécule correspond à un glycane désialylé trouvé au niveau du ganglioside GD1a. Le glycane GD1a a été identifié comme étant un récepteur cellulaire de l'Ad37, responsable d'épidémies de conjonctivites (Nilsson et al. 2011).



**Figure 17 : Représentation schématique de la séquence en acides aminés du FX.** D'après (Venkateswarlu et al. 2002).

## 6. Tropisme des vecteurs adénoviraux : rôle du facteur de coagulation X (FX)

## 6.1. Le Facteur X

#### 6.1.1. Historique

La première description du facteur X date des années 1950. En 1956, le Dr. Telfer rapporte le cas d'une jeune fille nommée Prower dont le temps de génération de thrombine est extrêmement long (TELFER, DENSON, et WRIGHT 1956). Un an plus tard, le Dr. Hougie décrit les paramètres anormaux de coagulation d'une patiente dénommée Stuart, qui peuvent être corrigés en mélangeant son sérum à celui d'un patient déficient en facteur VII (HOUGIE, BARROW, et GRAHAM 1957). La protéine déficiente fut initialement appelée « Facteur de Stuart-Prower » puis pris le nom de facteur X lors de la création de la nomenclature officielle des facteurs de coagulation en 1962 (Uprichard et Perry 2002). Généralement, il est abrégé sous la forme écrite FX pour le zymogène et FXa pour la forme active.

## 6.1.2. Le gène *F10*

Le gène codant pour le facteur X humain, nommé *F10*, est localisé sur le bras long du chromosome 13 dans la région q34-ter (Pfeiffer et al. 1982). Il s'étend sur 22 kb et comprend une région codante où 8 exons séparés par 7 introns ont été détectés et une région non codante située en 3' (Uprichard et Perry 2002). Il est transcrit en un ARNm de 1502pb et code une protéine mature de 488 acides aminés (Uprichard et Perry 2002).

## 6.1.2.1. Structure de la protéine FX

Le FX est une sérine protéase vitamine K-dépendante, synthétisée dans le foie et présent dans la circulation sanguine à une concentration de 8µg/mL. Ce facteur correspond à une glycoprotéine de 58 kDa (Kaul et al. 1986) constituée d'une chaîne légère de 139 acides aminés (16,9 kDa) et d'une chaîne lourde de 306 acides aminés (42,1 kDa) reliées de façon covalente par un pont disulfure (Leytus et al. 1986).

La chaîne légère est constituée de trois domaines structuraux (**Figure 17**), à savoir le domaine Gla, constitué de 11 acides  $\gamma$ -carboxyglutamiques et un acide  $\beta$ -hydroxyaspartique, une courte séquence hydrophobe et deux domaines similaires au facteur de croissance épidermique EGF1 (Asp 46-Phe 84) et EGF2 (Thr 85- Gly 128).

La chaîne lourde comprend le domaine sérine protéase et le peptide d'activation (52 acides aminés) glycosylé en Asn-181 et Asn 191. Ce peptide sera libéré suite au clivage du lien Arg 194- Ile 195, le FX sera alors activé (Venkateswarlu et al. 2002).


Figure 18: Représentation schématique des récepteurs cellulaires jouant un rôle direct ou indirect dans la liaison ou l'internalisation des particules adénovirales.

L'adénovirus se fixe à différents récepteurs tels que CAR, l'acide sialique, le CD86, le CD80, le CMH de classe I ainsi qu'aux héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG), ce dernier étant le récepteur principal de l'adénovirus après injection par voie intraveineuse en utilisant le facteur X comme pont entre le virus et le récepteur. Les lactoferrines agissent à l'instar du FX pour certains sérotypes sur des tissus spécifiques. D'après (Henaff et Eric J Kremer 2008).

# 6.1.3. Rôle des facteurs de coagulation et plus précisément du FX dans le tropisme *in vivo* des adénovirus

La biodistribution de l'Ad5 chez l'animal ne corrèle pas directement avec l'expression du récepteur CAR. Plusieurs laboratoires ont montré qu'une injection par voie intraveineuse de vecteurs Ad5 entraînait une excellente transduction des cellules du foie, plus spécifiquement des hépatocytes (Dmitry M Shayakhmetov, Anuj Gaggar, et al. 2005). Lorsque le site de liaison à CAR est muté sur la fibre, empêchant ainsi la fixation au récepteur, le vecteur administré par voie systémique continue à transduire efficacement le foie (Andrew H Baker et al. 2007).

Shayakhmetov et ses collègues ont démontré que l'Ad5 interagit avec le facteur de coagulation IX et la protéine C4b. L'équipe de Parker démontre que d'autres facteurs de coagulations tels que le facteur VII, le FX et la protéine C sont également impliqués dans la transduction efficace des hépatocytes par l'Ad5 (Alan L Parker et al. 2006). Andrew Baker et ses collaborateurs ont testé la liaison des adénovirus aux différents facteurs de coagulation ; ils ont trouvé une forte interaction avec le facteur X (Alan L Parker et al. 2006). La liaison entre le FX et l'Ad5 muté au niveau de la fibre reste possible, démontrant ainsi l'intervention d'une autre protéine de capside dans cette interaction. Il s'agit de la protéine hexon (S Waddington et al. 2008). Des analyses par cryo-électromicroscopie et par SPR (Résonnance Plasmonique de Surface) démontrent que les domaines Gla et sérine protéase du FX se fixent au centre des trimères d'hexon (1 molécule de FX par trimère d'hexon – 240 trimères au total) dans une région composée des boucles hypervariables entre les différents sérotypes. Cette étude révèle un niveau d'affinité différent suivant les sérotypes d'adénovirus considérés (**Figure 18**). Seule l'espèce D n'interagit pas avec le FX. Récemment, les acides aminés essentiels dans la région hypervariable de l'Ad5 ont été identifiés (Raul Alba et al. 2009).

# 7. Thérapie génique de la mucoviscidose et vecteurs adénoviraux

## 7.1. Vecteurs adénoviraux comme vecteurs de transfert de gène

Dans les années 1970, il a été démontré qu'au cours de leur production sur cellules eucaryotes, les adénovirus sont capables de se recombiner entre eux ou avec des plasmides. Cette observation a permis d'ouvrir la voie à la génération de vecteurs adénoviraux d'expression. Cependant, la fréquence de recombinaison en système eucaryote est faible. D'autres systèmes ont été développés afin d'obtenir des vecteurs recombinants plus rapidement tels que le système de recombinaison en système bactérien. Les premiers vecteurs adénoviraux ont été générés dans les années 1990 dans le but de réaliser un transfert de gène en thérapie génique principalement. Un essai de transfert du gène *CFTR* chez le rat du cotton a été réalisé dès l'année 1992 à l'aide d'un vecteur adénoviral défectif pour la réplication (M A Rosenfeld et al. 1992). Le transgène a pu être détecté jusqu'à 12 jours après administration du vecteur.



**Figure 19: Représentation schématique des trois générations de vecteurs dérivés de l'adénovirus humain.** Il existe trois principaux types de vecteurs adénoviraux :

- les vecteurs de première génération portant une délétion des régions E1 et E3.
- les vecteurs de seconde génération ne possédant plus les régions E1, E3, E2A et E4
- les vecteurs "gutless" dépourvus de génome viral à l'exception des extrémités ITR et de la séquence d'encapsidation Ψ.

D'après (R Alba, Bosch, et Chillon 2005)

Type de vecteurs	Délétions	Taille maximale de la	<b>Expression</b> / Application
adénoviraux		cassette d'insertion	potentielle
Première génération	E1 / E3	8,2 kb	Expression forte sur le court
			terme / Vaccination
Seconde génération	E1 / E3/ E2A / E4	14 kb	Expression forte sur le court
			terme / Vaccination
	Génome complet à		Expression forte sur le long
Gutless	l'exception des	36 kb	terme dans les cellules
	extrémités ITR et $\Psi$		quiescentes / Thérapie génique

Tableau 6: Caractéristiques et applications potentielles des vecteurs adénoviraux.

Des vecteurs d'abord réplicatifs ensuite non réplicatifs, ont été ainsi constuits. Nous nous interesserons spécifiquement aux vecteurs non réplicatifs.

# 7.1.1. Les vecteurs adénoviraux défectifs pour la réplication

Afin d'augmenter la sécurité biologique lors de l'administration de vecteurs adénoviraux et d'étendre ainsi leur champ d'application, des vecteurs défectifs pour la réplication dits de première et seconde génération ont été développés par excision des régions impliquées dans la réplication virale (**Figure 19**).

#### 7.1.1.1. Vecteurs adénoviraux de première génération

Les vecteurs défectifs pour la replication dits de première génération sont synthétisés suite à la délétion de la région E1. Cette région est impliquée dans la réplication virale. En effet, les deux protéines de la région E1A interviennent dans l'activation des promoteurs viraux. La suppression de la région E1 permet d'insérer un transgène d'une taille de 5,5 kb (Bett, Prevec, et F L Graham 1993). La production de ces vecteurs est aisée grâce à l'utilisation d'une lignée transcomplémentante, les cellules HEK-293, apportant en trans les produits des gènes de la région E1.

La majorité des vecteurs de première génération présente également une délétion de la région E3. Cette région n'est pas essentielle à la réplication virale et peut donc être supprimée. Ce type de vecteurs doublement délétés permet d'insérer des cassettes d'expression d'une taille de 8,2 kb (Danthinne et Imperiale 2000). (**Tableau 6**).

Cependant, une étude *in vivo*, sur modèle murin, menée par Bruder et al en 1997 a démontré l'importance de la protéine gp19K (produit du gène codé en E3) dans l'amélioration de l'expression du transgène dans le foie et le poumon des souris (Bruder et al. 1997). Ces résultats n'ont pas été confirmés par les travaux de Schowalter et al. Cette même protéine n'influencerait pas la durée d'expression du transgène *in vivo* (Schowalter et al. 1997).

Bien que ces vecteurs soient dans l'incapacité de se répliquer, leur administration est associée à une forte réponse immunitaire anti-virale et à une toxicité cellulaire. Il pré-existe dans notre organisme des anticorps neutralisants dirigés contre l'adénovirus de sérotype 5 qui limitent en grande partie l'action de ces vecteurs (Chirmule et al. 1999). Plusieurs travaux ont été menés afin d'améliorer le niveau d'expression du transgène et ainsi permettre de diminuer la dose virale à administrer. Ceci diminuerait par conséquent la toxicité cellulaire (Gerdes, Castro, et Löwenstein 2000). L'un de ces travaux démontre l'utilisation de promoteurs viraux tels que le promoteur du Cytomégalovirus (CMV) ou le promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV) afin d'obtenir une très forte expression du trangène dans une grande variété de tissus.



# Figure 20: Représentation schématique de la production de vecteur adénoviraux "gutless" via le système Cre/LoxP.

Les génomes des vecteurs auxiliaires "helper" et de  $3^{eme}$  génération "gutless" sont cotransfectés dans des cellules 293 exprimant la recombinase CRE. Les deux génomes sont amplifiés et les protéines virales produites. La séquence d'encapsidation  $\Psi$  du vecteur auxiliaire est exisée par la recombinase CRE empéchant ainsi son encapsidation dans la particule virale. Le vecteur "gutless" est pur à 90-99 %.

D'après (R Alba, Bosch, et Chillon 2005)

Les vecteurs adénoviraux de première génération sont largement utilisés. Ils sont produits à haut titre et permettent une expression maximale du transgène. Les vecteurs adénoviraux utilisés au cours de ma thèse correspondent à ce type de vecteur.

# 7.1.1.2. Vecteurs adénoviraux de seconde génération

Une nouvelle génération de vecteurs adénoviraux a été construite afin d'accroître la capacité d'insertion du transgène et de diminuer l'immunogénicité des vecteurs. Le principe est d'empêcher l'expression résiduelle de protéines virales tardives dans la cellule transduite (M Lusky et al. 1998). Les régions E2 et E4 ont alors été mutées ou délétées du génome viral afin de générer des vecteurs adénoviraux de seconde génération.

Les premières constructions de vecteurs adénoviraux de seconde génération comportaient des mutations thermosensibles dans la région E2A. Ces vecteurs ont été testés comme vecteurs de transfert du gène *CFTR* dans un essai pré-clinique sur babouins. Une comparaison avec un vecteur de première génération a été réalisée. Le vecteur de première génération était administré dans un lobe pulmonaire et le vecteur de seconde génération était administré dans l'autre lobe. Cette étude a démontré que l'administration de vecteur de seconde génération stable du transgène (Goldman et al. 1995). Une diminution de la synthèse de la protéine de capside hexon a également été notée.

Ces résultats prometteurs ont conduit à la construction de vecteurs totalement délétés de la région E2A permettant d'insérer un transgène d'une taille d'environ 9 kb. Une diminution des synthèses virales a également été observée mais aucune diminution de la réponse immunitaire de l'hôte n'a été obtenue (M Lusky et al. 1998).

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'absence de la protéine E2-DBP chez les vecteurs délétés de la région E2A. L'expression des protéines codées par la région E4 n'est plus régulée et influe sur la réponse immunitaire. Une délétion de la région E4 conduit à une diminution significative de l'expression des gènes viraux (M Lusky et al. 1998).

L'effet bénéfique sur la persistance du transgène reste cependant controversé. Une comparaison entre le niveau d'expression d'un même transgène délivré par un vecteur délété de la région E4 et par un vecteur de première génération a été établie. L'expression du transgène délivré par un vecteur délété d'E4 est beaucoup plus faible. Ceci peut s'expliquer du fait de la dépendance des promoteurs CMV ou RSV aux protéines codées par la région E4 (Brough et al. 1997). La conservation de certains Orf de la région E4 tels que l'Orf 3 et 4 ont permi d'améliorer l'expression du transgène (Grave et al. 2000).

Par étapes successives, les vecteurs de seconde génération ont été mis au point. Ces vecteurs présentent une capacité d'insertion d'un transgène d'une taille d'environ 14 kb (Danthinne et

Imperiale 2000). Le but d'utilisation de ces vecteurs était de diminuer l'immunogénicité tout en améliorant la durée d'expression du trangène.

# 7.1.1.3. Vecteurs "gutless"

Ces vecteurs sont dépourvus de l'ensemble des gènes viraux, ils ne conservent que les extrémités ITR du génome et la séquence d'encapsidation  $\Psi$  (Hardy et al. 1997). La taille du transgène pouvant être inséré est alors de 36 kb. Néanmoins, une taille minimale de l'insert est requise. En effet, afin d'être correctement encapsidé et produit, l'insert doit avoir une taille d'au minimum 28 kb soit 75 % du génome total (R J Parks et F L Graham 1997). Il est peu commun d'employer des constructions d'une telle taille, c'est pour cette raison que des séquences d'ADN de remplissage sont utilisées. Ces séquences se doivent d'être optimisées car elles influeraient sur la stabilité du génome viral et donc sur son encapsidation dans la particule virale (R J Parks et F L Graham 1997).

La création de lignées transcomplémentantes s'est révélée impossible dû à la toxicité et à la nécessité de produire de grande quantité de protéines virales. Il est indispensable d'ajouter, au cours de la production des vecteurs gutless, un vecteur auxiliaire dit "helper" (**Figure 20**). Ce vecteur apporte en *trans* les protéines nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules virales. Plusieurs systèmes ont été développés afin de diminuer la contamination du stock viral par le vecteur "helper" tels que les systèmes FLP/frt (Ng et al. 2001) et Cre/LoxP (R J Parks et al. 1996).

Les vecteurs "gutless" sont capables de transduire efficacement les cellules *in vivo* sans induire de toxicité cellulaire et de réponse anti-virale ce qui permet une expression stable du transgène sur le long terme dans les cellules quiescentes.

# III. Les vésicules membranaires : Microvésicules et Exosomes



Figure 21: Représentation schématique des différents compartiments endocytaires.

Suite à son internalisation dans la cellule (ici depuis un puits recouvert de clathrine), la protéine est envoyée à un endosome de tri (1). La protéine peut alors suivre différentes voies : elle peut être recyclée à la membrane plasmique directement (2) ou en passant par un endosome de recyclage (3). Si elle doit être dégradée, la protéine est reconnue par la machinerie de tri et de formation de l'endosome multivésiculaire (MVB) qui la séquestre dans les vésicules internes de ce compartiment (4). Cette machinerie reconnaît également les protéines issues de la voie de néosynthèse (5). Ce compartiment évolue/fusionne avec les endosomes tardifs (6) puis avec les lysosomes permetttant la dégradation de son contenu (7). Dans certains types cellulaires, l'endosome multivésiculaire fusionne avec la membrane plasmique, libérant ainsi des exosomes (8).

D'après (Camilla Raiborg, Rusten, et Harald Stenmark 2003).

## 1. Introduction générale

L'identification de petites vésicules libérées par un grand nombre, voir l'ensemble des cellules, permettant une communication intercellulaire a été proposée il y a environ une vingtaine d'année (Bastida et al. 1984). Il était admis que la communication entre cellules était médiée uniquement par des molécules, telles que les neurotransmetteurs ou les hormones, libérées par une cellule ou exposées à sa surface et reconnues par une autre cellule via son récepteur spécifique. De discrètes vésicules fréquemment observées en microscopie électronique au niveau de l'espace intercellulaire étaient d'après les scientifiques le résultat de dommages cellulaires (nécrose, apoptose, etc.). Une idée plus précise sur la nature de ces vésicules a émergé lorsque ces petites particules ont été associées à deux processus spécifiques de libération (Beaudoin et Grondin 1991; Lakkaraju et Rodriguezboulan 2008). Chacun des processus conduit à la sécrétion de types distincts de vésicules. Il s'agit de l'exocytose de corps multivésiculaires (*Multivesicular Bodies*; MVB) permettant la libération d'exosomes, et du bourgeonnement des vésicules directement à partir de la membrane plasmique appelées microvésicules (Mv). Dès leur libération, ces vésicules circulent dans l'espace extracellulaire proche de leur site de synthèse. Certaines se déplacent par diffusion passive et apparaissent dans les liquides biologiques alors que d'autres se décomposent en quelques minutes.

#### 2. La voie endocytaire

L'expression de protéines membranaires par une cellule résulte d'un équilibre entre les processus de synthèse/sécrétion et de dégradation de ces dernières. Le processus de dégradation est assuré par la voie endocytaire (**Figure 21**). La dégradation ciblée des protéines est un mécanisme fondamental indispensable au bon fonctionnement de la cellule. Ces mécanismes d'apport et de dégradation jouent un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques, en régulant les interactions de la cellule avec son environnement extérieur.

# 2.1. Endosomes de tri

Après traduction dans le réticulum endoplasmique et maturation dans l'appareil de Golgi, les protéines membranaires sont envoyées dans des vésicules de sécrétion qui fusionnent à la membrane plasmique. Les protéines sont alors ancrées à la surface cellulaire.

Ces protéines et les lipides membranaires subissent un renouvellement constant. Ils sont internalisés dans des vésicules d'endocytose et envoyés dans des endosomes précoces, compartiments dans lesquels s'effectuera un tri des protéines (H J Geuze, J W Slot, et Schwartz 1987). Elles peuvent être recyclées à la membrane plasmique. Elles se concentrent alors dans les parties tubulaires des endosomes précoces qui se détachent pour donner des endosomes de recyclage. Les protéines présentant un signal de dégradation vont elles s'accumuler dans la partie vacuolaire de l'endosome

Complexe	Protéines de levure	Homologues	Fonction proposée
		humains	
	Vps27	Hrs	Interaction avec PI3P
ESCRT-0	Hse 1	STAM 1, 2	Interaction avec Hua1 et Rsp5
ESCOTI	Vps23	Tsg 101	Interagit avec les cargos etVps27
ESCRI-I	Vps28	Vps28	Assemblage avec ESCRT- II (Vps36)
	Vps37	Vps37A, B, C, D	
	Vps22	EAP30, SNF8	Interagit avec les
			cargos et PI3P
ESCRT-II	Vps25	EAP20	Assemblage avec ESCRT-III (Vps20)
	Vps36	EAP45	Assemblage avec ESCRT-I (Vps28)
	Vps20	CHMP6	Assemblage avec
	Vps32/Snf7	CHMP4A, B, C	Déformation
ESCRT-III	Vps2/Did4	CHMP2A, B	membranaire,
	Vps24	CHMP3	vésicules
	Vps4	VPS4A, B/ SKD1	AAA-ATPase, Désassemblage et recyclage des ESCRT
Modulateurs /	Vps31/Bro1	Alix/AIP1	Recrute Doa4, interagit avec ESCRT I et III
adaptateurs	Vps60/Mos10	CHMP5	
	Vps46/Did2	CHMP1A, B	
	Vta1	LIP5	Régulateur positif de Vps4
Ubiquitine-ligase	Rsp5	Nedd4	Ubiquitinylation des cargos
Désubiquitinylases	Doa4	UBPY/USP8	Désubiquitinylation des cargos
	Ubp7	AMSH	Désubiquitinylation des cargos

Tableau 7: Protéines de classe E constitutives des complexes ESCRT chez la levure et leurs homologues chez l'Homme.

D'après (Saksena et al. 2007).

**AAA** : ATPases Associated with a variety of cellular Activities, **AIP**: Alg2 interacting protein 1, **AMSH**: Associated molecule with SH3 domain of STAM, **Bro**: BCK1-like resistance to osmotic shock protein 1, **CHMP**: Charged MVB proteins, or chromatin modifying protein, **Did**: Doa4 independant degradation, **Doa**: darkener of apricot, **EAP**: eIF4E associated protein, **HRS**: hepatocyte growth factor HGF) regulated tyrosine-kinase substrate, **PI3P** : Phosphatidyl Inositol 3-phosphate, **Rsp**: reverse SPT phenotype protein, **SNF**: sucrose non fermenting, **SKD**: Suppressor of K+ transport growth defect 1, **UBP**: Ubiquitin binding protein, **USP**: ubiquitin specific processing protease, **Vps**: Vacuolar protein Sorting. précoce. Elles sont regroupées dans des zones de membrane qui vont bourgeonner appelées ILV (*intraluminal vesicles*) qui se détachent dans le lumen de l'endosome. Cette partie vésiculaire donne naissance aux corps multivésiculaires (*MultiVesicular Body* ou MVB) contenant les exosomes (Gruenberg, Griffiths, et Howell 1989).

# 2.2. Les corps multivésiculaires (Multivesicular bodies ou MVBs)

Au cours des toutes premières analyses par microscopie électronique, il fut observé des structures intracellulaires riches en vésicules d'une taille comprise entre 200 et 500 nm de diamètre (PALADE 1955). Ces structures furent nommées « corps multivésiculaires ou MVB (*Multi Vésicular Bodies*) » ; les vésicules les constituant furent appelées vésicules intraluminales (*Intralumen vesicles* ILV). Suite à l'observation d'invaginations de la membrane limitante des MVBs, il a été suggéré que ces structures pouvaient représenter une forme d'autophagie (Hirsch, Fedorko, et Z A Cohn 1968). Il est désormais admis que ces structures sont impliquées dans la voie d'endocytose, les ILVs étant impliquées dans la voie de dégradation des protéines. Ces compartiments ne peuvent ni fusionner entre eux, ni avec les endosomes précoces, mais ont la capacité de fusionner avec les compartiments tardifs de façon dépendante des microtubules (van Deurs et al. 1993). Ces endosomes multivésiculaires se différencient des autres organites à membrane interne tels que les corps d'autophagie ou les lysosomes par l'expression de marqueurs de l'endocytose.

## 2.2.1. Lipides et protéines caractéristiques

Les corps multivésiculaires concentrent certains lipides par rapport aux autres membranes de la cellule. Il s'agit du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P), de sphingolipides (céramides et gangliosides) et du cholestérol. On note de plus la présence exclusive de LBPA (Lyso-bis-phosphatidic acid).

- *PI(3)P*: ce lipide est enrichi du côté cytosolique de la membrane endosomale. Il est associé directement aux ILVs et permet le recrutement de protéines impliquées dans le mécanisme de tri du MVB (Piper et Katzmann 2007). Il est observé à plus forte concentration dans les endosomes précoces en comparaison aux endosomes tardifs.
- Cholestérol : il est également impliqué dans la biogénèse des MVB de par son enrichissement dans ces structures. Il réside principalement dans les vésicules intraluminales (W Möbius et al. 2003). Le cholestérol peut faciliter le tri dans les MVB et la formation des ILV en créant à la surface de l'endosome un environnement favorable au recrutement de protéines telles que les tétraspanines et à l'invagination de la membrane.
- *LBPA* : ce lipide est enrichi dans les endosomes tardifs et les lysosomes mais est absent dans les endosomes précoces ou la formation active d'ILV a lieu.



# Figure 22: Tri des protéines et formation du MVB.

Les protéines de type GGA et Vps27/Hse1 reconnaissent les cargos ubiquitinés et les retiennent au niveau de microdomaines particuliers de l'endosome enrichis en clathrine. Vps27 recrute le complexe ESCRT-I depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane de l'endosome où il reconnaît à son tour le cargo ubiquitiné par l'intermédiaire de Vps23. ESCRT-I active ESCRT-II qui à son tour permet la formation du complexe ESCRT-III. ESCRT-III recrute des protéines accessoires comme Bro1 ou l'ATPase Vps4. Bro1 recrute l'enzyme de désubiquitination Doa4 qui enlève l'étiquette ubiquitine du cargo avant son entrée dans les vésicules internes du MVB. L'ATPase Vps4 catalyse la dissociation de la machinerie ESCRT et la libération des protéines de classe E pour qu'elles puissent participer de nouveau au tri d'un nouveau cargo. D'après (Markus Babst 2005).

#### 2.2.2. Les signaux de tri vers les MVBs

La dégradation ciblée des protéines est un mécanisme fondamental dans la régulation de la synthèse protéique ainsi que dans le contrôle qualité de la cellule. Les protéines solubles, destinées à être dégradées par le protéasome sont polyubiquitinées. Elles sont envoyées au niveau de la sous-unité catalytique du protéasome. Ce processus est parfaitement régulé et hautement spécifique (**Figure 22**). Un mécanisme différent est utilisé pour la dégradation des protéines transmembranaires. Ces protéines sont mono-ubiquitinylées et ainsi destinées à être dégradées par les lysosomes.

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, très conservée, qui peut être attachée covalemment à une autre protéine par un lien isopeptidique entre le groupement NH<sub>2</sub> de la chaîne latérale d'une lysine de la protéine cible et le groupement COOH de la glycine terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitination des protéines de surface cellulaire intervient au moins à deux endroits dans la voie endocytaire : à la membrane plasmique comme signal d'internalisation et au niveau de l'endosome de tri comme signal d'entrée dans les vésicules intraluminales du MVB. Le rôle de l'ubiquitine dans le tri a été initialement décrit par plusieurs études chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hicke et Dunn 2003). Ce processus est utilisé également par des virus bourgeonnant tel que le VIH-1 (Martin-Serrano et al. 2005).

2.2.2.1. Les complexes ESCRT (Endosomique Sorting Complexes required for transport ou complexe d'adressage endosomal requis pour le transport) dans la biogénèse des MVB.

Les acteurs de la machinerie de tri ont été mis en évidence chez *S.cerevisiae*, les homologues de ces protéines sont présentes chez les mammifères et leur étude indique que leurs fonctions sont conservées. Ces protéines appartiennent aux protéines Vps (*Vacuolar protein sorting*) de classe E (**Tableau 7**), groupe de protéines indispensables au trafic de certaines enzymes de la vacuole (Raymond et al. 1992) et de protéines destinées à la dégradation (Odorizzi, M Babst, et S D Emr 1998). L'essentiel des protéines Vps de classe E sont assemblées en complexe protéique hétéromérique, les complexes ESCRT (*Endosomique Sorting Complexes required for transport*).

# - ESCRT 0 :

Ce complexe est constitué de deux protéines. Il s'agit chez l'Homme de la protéine Hrs (*Hépatocyte Growth factor regulated tyrosine kinase substrate*, ou Vps27 chez la levure) et de la protéine STAM (*Signal transducing adaptator molecule* ou Hse1 chez la levure). ESCRT-0 permet une sélection initiale des protéines cargos mono-ubiquitynilées à la membrane endosomale. Ce complexe s'associe aux endosomes via l'interaction du domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 Early endosome Ag 1) de Hrs avec le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) (Raiborg et al., 2001).



# Figure 23: Représentation schématique de la biosynthèse des exosomes dans le MVB.

- A. Les ILV, précurseurs des exosomes, sont formés à partir de l'invagination de la membrane interne limitante du MVB.
- B. L'initiation de la formation des ILV débute par la formation d'un cluster de LBPA à pH acide (pH 5,5) créant ainsi un excès de lipides (SM) au niveau de la membrane interne du MVB. Les lipides chargés négativement (LPC et PA) permettent, grâce à leur domaine Bar, de rapprocher les extrémités de l'ILV.
- C. La fission de l'ILV se produit lorsque les lipides des deux extrémités de l'ILV sont assez proches pour se mélanger : PA et PC à une extrémité et LBPA à une autre extrémité. LBPA reste localisé au niveau de la membrane du MVB après séparation de l'ILV.

PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine, PE: phosphatidyléthanolamine, PS: phosphatidylsérine, PI: phosphatidylinositol, SM: sphingomyéline, LBPA: lyso-bisphosphatidic acid, PA: phosphatidic acid, MVB: multivesicular bodies, BAR: Bin/amphiphysin/Rvs.

Hrs/STAM se fixe alors à la clathrine et séquestre ainsi la protéine cargo ubiquitinylée dans des microdomaines couverts de clathrine qui formeront après invagination de la membrane les vésicules contenues dans les MVB (C Raiborg et al. 2001).

# - ESCRT-I :

Chez l'Homme, ce complexe est constitué des protéines Tsg101, Vps28 et d'un des quatre isotypes de Vps37 (A à D) (Bishop et Woodman 2001; Martin-Serrano et al. 2005). ESCRT-I se fixe directement aux protéines cargo monoubiquitinées par l'intermédiaire du domaine UEV (Ubiquitine E2 variant) situé en N terminal de Tsg101.

# - ESCRT-II :

Ce complexe, constitué de deux copies de protéine Vsp25, d'une protéine Vps22 et Vps36, intéragit avec les protéines cargo, la membrane endosomale et les complexes ESCRT-I et ESCRT-III (Markus Babst et al. 2002).

#### - ESCRT-III :

Ce complexe est constitué de quatre protéines : Vps2, Vps20, Vps24 et Snf7. La protéine Bro1 est associée aux complexes. Elle recrute l'enzyme Doa4 qui a pour rôle de désubiquitinyler les protéines cargos. Les cargos se regroupent dans les invaginations membranaires et forment ainsi les vésicules « ILV » (**Figure 23**). Parallèlement, la protéine Vsp4 (ATPase de type AAA : ATPase Associated with diverse cellular activities) s'associe à ESCRT-III et permet une dissociation des complexes ESCRT. Les composants des 4 complexes ESCRT sont ainsi recyclés dans le cytosol où ils pourront être utilisés au cours d'un nouveau cycle de bourgeonnement (M Babst et al. 1998).

# 3. Les microvésicules (Mv) 3.1. Biosynthèse

La structure des membranes cellulaires humaines repose essentiellement sur une bicouche de phospholipides ou s'enchâssent différents éléments dont de nombreuses protéines. Cette bicouche se compose de deux feuillets : un feuillet interne appelé cytoplasmique et un feuillet externe dit plasmatique. Les composés majoritaires de ces feuillets correspondent aux phospholipides.

Les cellules au repos présentent une asymétrie de distribution des phospholipides au niveau de leur membrane plasmique, les aminophospholipides (phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines) étant séquestrés dans le feuillet interne de la membrane. Cette asymétrie de répartition est un processus actif nécessitant la consommation d'énergie produite par l'ATP sous la dépendance de trois acteurs principaux : la « flippase », aminophospholipide translocase spécifique du transport des aminophospholipides vers le feuillet interne de la membrane plasmique, la « floppase » qui permet



# Figure 24: Fonctionnement de la flippase, de la floppase et de la scramblase.

Une inhibition de la flippase conjointement à une activation de la floppase et de la scramblase est observée à la suite de la destructuration de la membrane plasmique qui permet la formation des microvésicules. *PC, Phosphatidylcholine ; SM, Sshingomyéline ; PS, Phospatidylsérine ; PE, Phosphatidyléthanolamine.* D'après (R F A Zwaal, Comfurius, et Bevers 2005)



**Figure 25 : Rôle du calcium dans la genèse des microvésicules.** Adapté de (R F Zwaal et Schroit 1997)

leur externalisation, et la « scramblase » permettant un transport aspécifique bidirectionnel (**Figure**. **24**).

# 3.2. Composition

L'augmentation brutale du calcium cytosolique (Figure 25) en réponse à une stimulation s'accompagne d'une externalisation précoce des phosphatidylsérines consécutive à l'inhibition de l'activité « flippase » ainsi qu'à l'activation parallèle de la « floppase » et de la « scramblase ». Simultanément, une protéolyse calcium dépendante du cytosquelette est observée. En effet, l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique va activer une enzyme : la calpaïne. Cette enzyme va découper les filaments d'actine ou encore détruire la taline, autre constituant du cytosquelette. La calpaïne va ainsi faciliter la séparation des Mv depuis la membrane cellulaire. Sous l'effet combiné d'une surcharge lipidique transitoire et de la protéolyse du cytosquelette, la membrane plasmique bourgeonne et libère des microvésicules (Mv) caractéristiques de la cellule émettrice (J-M Freyssinet 2003; Muralidharan-Chari et al. 2010) (Figure 26). De par leur petite taille, les My diffusent rapidement dans les fluides biologiques, échappant ainsi en partie à la phagocytose. La quantité de My libérées peut être augmentée après stimulation des cellules par différents agents. En effet, après stimulation par le calcium ( $Ca^{2^+}$ ) de cellules dendritiques et de « microglia » une augmentation du nombre de My libérées est observées (J Ratajczak, Wysoczynski, et al. 2006). Un second stimulus correspond à l'ester de phorbol activateur de la protéine kinase C (Sidhu et al. 2004; Baj-Krzyworzeka et al. 2006). Les cellules PC12 sécrètent plus de Mv après application d'ester de phorbol et non d'ionophores de calcium (Cocucci et al. 2007). Suivant le stimulus utilisé, le temps de génération de Mv varie de quelques secondes à 1-2 minute. Bien que le principe de formation des Mv soit schématiquement identique quel que soit le type de cellule à l'origine de leur production, toutes les Mv ne présentent pas une composition et une structure identique (Figure 27).

La membrane des Mv est constituée d'une infime proportion de la membrane de la cellule dont elles sont issues (dite cellule « mère »). Une partie du cytoplasme de la cellule-mère est emporté par ces Mv. Lors de l'analyse des Mv, on y retrouve logiquement les protéines de surface et des constituants cytosoliques caractéristiques de la cellule-mère. Cependant, cette composition en protéines varie en fonction du type cellulaire et des conditions physio-pathologiques. Ainsi, pour un même type cellulaire, la composition lipido-protéique des Mv varie en fonction du stimulus à l'origine de leur synthèse. En effet, les Mv issues des cellules endothéliales seront enrichies en E-selectine suite à une stimulation inflammatoire alors qu'elles seront riches en CD31 suite à une stimulation apoptotique (Jimenez et al. 2003; Abid Hussein et al. 2003).

De plus, il a été démontré que les Mv issues d'un type cellulaire n'exprimaient pas obligatoirement tous les marqueurs spécifiques de leur cellule-mère y compris les plus abondants (Blanchard et al. 2002). A l'inverse, on peut observer, en surface des Mv, une concentration bien plus élevée de certaines protéines par rapport à la densité notée dans la population cellulaire « mère ».



Figure 26: Représentation schématique de la formation de microvésicules.

Les microvésicules sont formées à la suite du bourgeonnement de la membrane plasmique d'une cellule. Les protéines membranaires ne sont pas toutes incorporées dans ces vésicules. Différents types de protéines et des acides nucléiques ont été retrouvés dans ces vésicules. Elles sont enrichies en lipides tel que le cholestérol. D'après (Muralidharan-Chari et al. 2010).



**Figure 27: Représentation schématique d'une microvésicule et de ses principaux constituants.** Les microvésicules sont issues du bourgeonnement de la membrane plasmique d'une cellule émettrice. Elles contiennent des protéines cytoplasmiques ainsi que des lipides bioactifs impliqués dans de nombreux processus fondamentaux. Cette représentation n'est pas une représentation exhaustive des composants protéiques ou lipidiques possibles. D'après (Bénédicte Hugel et al. 2005).

*CMH*, *Complexe majeur d'histocompatibilité*, *GPI*, *glycosylphosphatidylinositol*.

(Sims et al. 1988). Il est important de noter que, suite à leur libération, les Mv sont à même de transmettre ou d'acquérir d'autres marqueurs dont certains n'existent pas sur la cellule mère (Scholz et al. 2002). La biosynthèse des Mv résulte donc d'un processus complexe très contrôlé aboutissant à des populations vésiculaires différentes. Cette hétérogénéité des Mv et leurs caractéristiques structurales ont deux implications pratiques principales. D'une part, par leurs composants lipidiques et protéiques, ces vésicules peuvent transmettre des messages complexes et variables à des cibles diverses. Ceci leur confère un rôle primordial de bio-effecteur aux conséquences physiopathologiques probablement majeures. D'autre part, par leurs caractéristiques antigéniques et leurs potentiels biologiques, ces Mv peuvent être isolées en laboratoire, analysées et quantifiées dans les liquides biologiques par des techniques enzymatiques et immunologiques.

En résumé, les Mv constituent un vecteur d'échange d'informations entre cellules de différentes origines. Elles sont capables de transférer des protéines (récepteurs,...), des organelles, des ARN dans la cellule cible (J Ratajczak, Miekus, et al. 2006). De par les interactions diverses, ces vésicules provoquent des modifications structurelles et fonctionnelles physiologiques ou pathologiques. Ces particules sont capables de moduler alors de nombreuses réponses vasculaires comme l'hémostase, l'inflammation, l'angiogenèse.

# 4. Les exosomes

D'un point de vue étymologique, le terme exosome vient du grec exô- qui signifie "hors de" et de – *sôma* signifiant "corps". Les exosomes sont de petites vésicules membranaires sécrétées dans le milieu extracellulaire par différents types de cellules. La composition moléculaire et la fonction de ces exosomes peuvent varier en fonction du type de cellules libérant ces vésicules. Les paramètres de morphologie et de taille restent quant à eux relativement constants : de forme sphérique, les exosomes ont un diamètre variant de 50 à 100 nm.

# 4.1. Historique

Le concept d'exosome est un concept récent, né dans les années 1980, lors de l'étude du trafic du récepteur de la transferrine (RTf) au cours de la maturation des réticulocytes. Considérés comme artéfacts expérimentaux par la communauté scientifique, ce concept fut validé par la suite grâce à la multiplicité des expériences et des modèles utilisés (Johnstone, Bianchini, et K Teng 1989). La sécrétion d'exosomes était envisagée comme un moyen mis en place par la cellule pour éliminer les protéines devenues inutiles telle que le RTf.



### Figure 28: Principales protéines présentes au sein des exosomes.

Les protéines listées ici ont été retrouvées dans environ 30% des exosomes répertoriés dans la littérature (sécrétés par des cellules en culture et retrouvés dans les fluides biologiques), celles marquées d'un astérisque dans 50% des exosomes répertoriés.

EEF: Eucaryotic Translation Elongation Factor, ERM: Ezrin, Radixin et Moesin, GAPDH: glyceraldéhyde 3phosphate dehydrogenase-activating protein, HSP: Heat shock protein, MFGE8: Milk fat globule EGF 8 protein, MVB: multivesicular body, MVP: Major Vault protein, RAP1b: RAS related protein 1b, Rho GDI: Rho GDP dissociation inhibitor, TSG101: tumour susceptibility gene 101. D'après (Mathivanan, Ji, et Simpson 2010) Depuis, les études sur les exosomes se sont multipliées. Ces vésicules membranaires ont été isolées dans le surnageant de culture de nombreux types cellulaires tels que les cellules impliquées dans la réponse immunitaire comme les lymphocytes B (G Raposo et al. 1996; Escola et al. 1998), les lymphocytes T (Peters et al. 1989; Blanchard et al. 2002) et les cellules dendritiques (Théry et al., 1999) ; mais aussi dans le surnageant de culture de cellules cancéreuses issus de mélanomes (Riteau et al. 2003) et d'adénocarcinomes mammaires (Wolfers et al., 2001), de cellules épithéliales (Utleg et al. 2003) et de plaquettes sanguines (H F Heijnen et al. 1998).

Les exosomes sont, de plus, présents dans les fluides corporels. Ils ont été mis en évidence dans l'urine (Pisitkun, Shen, et Knepper 2004), l'effusion pleurale (Bard 2004), le lait maternel (Admyre et al. 2007), le plasma (Caby et al. 2005).

### 4.2. Composition moléculaire

# 4.2.1. Composition protéique et lipidique

L'étude de la structure moléculaire des exosomes repose sur la qualité de purification de ces vésicules. Les exosomes peuvent être purifiés à partir de fluides biologiques ou de surnageant de culture cellulaire par ultracentrifugation différentielle (G Raposo et al. 1996). Une première centrifugation à faible vitesse permet l'élimination des débris cellulaires ; les exosomes sont collectés par ultracentrifugation à 100 000 g. Une étape supplémentaire de purification consiste à déposer sur le culot exosomal ainsi obtenu un gradient de sucrose (G Raposo et al. 1996). Les exosomes flottent à une densité comprise entre 1,12 g/ml et 1,19 g/ml en fonction des cellules utilisées et de la composition en vésicules.

#### 4.2.2. Protéines ubiquitaires

Un premier groupe de protéines exprimées de façon ubiquitaire correspond aux protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la tubuline (Théry et al. 1999). Ces protéines représentent une faible proportion des protéines exosomales et ne sont pas impliquées dans la biogenèse et le maintien des vésicules.

Les tétraspanines sont retrouvées constitutivement dans les exosomes. Elles constituent un réseau au niveau des membranes en s'associant entre elles ou à d'autres protéines comme les intégrines (Berditchevski 2001) ou au cholestérol (Charrin et al. 2003).

Des molécules d'adhésion comme les intégrines sont associées aux exosomes.

Plusieurs protéines de la famille des GTPases sont également présentes. Il s'agit par exemple de Rab11 et Rab7 présentes dans les vésicules issues de cellules dendritiques (Théry et al. 2001), de Rab 4 et Rab5 présentent dans les exosomes issues de réticulocytes.

Les exosomes contiennent également les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90, des molécules impliquées dans la présentation d'antigène : CMH de classe I (**Figure 28**).



# Figure 29: Représentation schématique des différents mécanismes éventuels utilisés par les exosomes pour permettre une communication intercellulaire.

A : Les protéines membranaires situées à la surface des exosomes pourraient interagir avec les récepteurs cellulaires appropriés et ainsi activer une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

B : Les protéines membranaires situées à la surface des exosomes pourraient être clivées par des protéases dans l'espace extracellulaire. Les produits de clivage pourraient agir comme des ligands solubles qui se fixeraient aux récepteurs cellulaires appropriés. Cette interaction permettrait d'activer des voies de signalisation intracellulaire.

C : Les exosomes pourraient fusionner avec la membrane de la cellule cible et délivrer leur contenu dans celle-ci (ARNm, protéines, miARN). La composition protéique et lipidique de la membrane plasmique de la cellule cible pourrait aussi être modifiée du fait de l'ajout de nouvelles protéines et de nouveaux lipides.

D'après (Mathivanan, Ji, et Simpson 2010)

# 4.2.3. Lipides

Peu de données existent sur la composition lipidique des exosomes. Quatre types d'exosomes ont été étudiés quant à leur composition lipidique : les exosomes issus de réticulocytes (M Vidal et al. 1989), d'une lignée cellulaire de lymphocytes B (Wubbolts et al. 2003), de mastocytes et de cellules dendritiques (Laulagnier et al. 2004). Ces études ont permis de mettre en évidence, quel que soit l'exosome étudié, un enrichissement en phospholipides (phospholipides saturés, glyco-phospholipides, et phosphatidyl-ethanolamine), en sphingolipides (sphingomyéline, céramide et ganglioside) et en cholestérol. Des différences sont à noter selon l'origine cellulaire de l'exosome (Subra et al. 2007).

# 4.3. Régulation de la sécrétion des exosomes

Peu d'informations sont connues sur la régulation de l'étape de fusion des MVB avec la membrane plasmique. Plusieurs études suggèrent l'implication du calcium ( $Ca^{2^+}$ ) intracellulaire au cours de cette étape. Tout comme la sécrétion lysosomale (Idone et al. 2008) les ionophores du  $Ca^{2^+}$  stimulent la libération d'exosomes par différents types cellulaires. L'étude menée par Savina et ses collaborateurs en 2005 sur la lignée K562 a montré qu'en présence d'ionophores du  $Ca^{2^+}$  (A23187 ou monensine) les cellules sécrètent une quantité plus importante d'exosomes. A l'inverse, en présence de chélateur du  $Ca^{2^+}$  intracellulaire (BAPTA-AM), la sécrétion d'exosomes est diminuée (Hoffman et al. 2009).

Le  $Ca^{2^+}$  présent dans le réticulum endoplasmique (RE) pourrait également intervenir. En bloquant la capture du  $Ca^{2^+}$  par le RE, on note une augmentation de la concentration en  $Ca^{2^+}$  dans le cytosol. La cellule libère alors plus d'exosomes (Savina et al. 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère une implication de  $Ca^{2^+}$  d'origine extra ou intracellulaire dans la production des exosomes. Le  $Ca^{2^+}$  pourrait jouer un rôle dans la genèse des ILV dans l'endosome et/ou dans l'étape de fusion des MVB avec la membrane plasmique.

#### 4.4. Fonctions

# 4.4.1. Les exosomes permettent une communication intercellulaire

L'interaction entre cellules est indispensable à la progression, à l'angiogenèse et à l'envahissement des tissus par les cellules tumorales. Ces interactions seraient régulées par des protéines de surface telle que l'EGFR, ou des molécules solubles telle que l'IL12, qui interagiraient avec les récepteurs cellulaires et activeraient ainsi la cellule. Un nouveau mode de communication intercellulaire a récemment été mis en évidence et intéresse vivement le monde scientifique. Il s'agit de la communication médiée par les exosomes.

Plusieurs mécanismes de communication médiés par les exosomes sont proposés (**Figure 28**). Le premier mécanisme correspond à la signalisation dite « juxtacrine ». Les protéines situées à la surface de l'exosome pourraient interagir avec leurs récepteurs spécifiques localisés à la surface de la cellule cible et activer ainsi les voies de signalisation intracellulaire. De plus, les protéines exosomales

pourraient être clivées par des protéases dans l'espace extracellulaire. Les fragments clivés agiraient comme des ligands solubles qui se fixeraient aux récepteurs cellulaires spécifiques. Il y aurait activation de différentes voies de signalisation. Enfin, le dernier mécanisme proposé correspond à la fusion de l'exosome à la cellule cible. Il y aurait ainsi un transfert non sélectif du contenu exosomal dans la cellule réceptrice (protéines, ARN, micro ARN,...). La surface de la cellule réceptrice pourrait être modifiée par l'addition de nouveaux récepteurs membranaires (issus de la membrane exosomale) et par une composition lipidique différente. L'équipe de Barry OP a montré le transfert d'acide arachidonique de microvésicules issues de plaquettes aux leucocytes et aux cellules endothéliales (O P Barry, Kazanietz, et al. 1999).

# 4.4.2. Transfert d'ARN

L'étude menée par Valadi H et ses collaborateurs en 2007 a montré que les exosomes sécrétés par les mastocytes contiennent des ARNs. Approximativement 1300 transcrits différents d'ARNm ont été détectés parmi lesquels 270 spécifiques aux exosomes. Ces ARNm sont fonctionnels et peuvent être traduits en protéines uniquement dans la cellule réceptrice, les exosomes ne possèdant pas la machinerie nécessaire à la synthèse de protéine. En effet, lorsque des exosomes sécrétés par des mastocytes murins sont incubés en présence de mastocytes humains en culture, les cellules humaines expriment des protéines murines codées par les ARNm issus des exosomes (Valadi et al. 2007).

### 4.4.3. Nouveau véhicule "contrôlé" de thérapie génique

Il est admis que les exosomes permettent le transfert de protéines et de matériel génétique (ARN, etc.) d'une cellule donneuse à une cellule réceptrice. Les scientifiques tentent désormais de charger ces vésicules en matériel spécifique qui délivreraient leurs contenus à un tissu ou une cellule cible déterminée.

Des scientifiques de l'université d'Oxford tentent actuellement d'utiliser les exosomes pour transporter du matériel génétique spécifique à travers la barrière hémato-encéphalique. La barrière hémato-encéphalique constitue un mécanisme de défense vital empêchant les agents contaminant du sang d'infecter le cerveau ce qui rend difficile l'acheminement de molécules thérapeutiques directement au cerveau par l'intermédiaire de vecteur viral.

L'équipe d'Oxford d'Alvarez-Erviti L. a reussi à fusionner à la membrane des exosomes des molécules présentant la capacité à se fixer aux cellules du système nerveux central et aux myocytes. Ces molécules permettent aux exosomes de cibler ainsi des tissus spécifiques et d'y délivrer leur contenu. Cette étude a démontré que les exosomes se lient aux cellules du système nerveux et y délivrent des siRNA spécifiques du gène *BACE1*, gène défectueux chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Aucune réponse immunitaire contre les cellules ainsi modifiées n'a été détectée.

Ces résultats prometteurs, obtenus *in vivo* en modèle murin, sont à confirmer sur cellules humaines de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Alvarez-Erviti et al. 2011).

Les exosomes peuvent donc être chargés de façon spécifique et ciblés à un tissu ou à un organe. Cette étude ouvre la voie à l'utilisation de ces vésicules membranaires comme agents spécifiques de transfert ciblé de matériel aussi bien génique que protéique.

### 5. Implications médicales des microvésicules et exosomes

Plusieurs équipes de recherche tentent de déterminer si des modifications perceptibles dans la répartition ou la quantité des MV et des exosomes peuvent être associées à certaines maladies. Les MV et les exosomes sont impliqués dans de multiples cadres pathologiques. Nous donnerons ici quelques exemples de pathologies associées à ces deux types de vésicules membranaires.

#### 5.1. Microvésicules et pathologies cardio-vasculaires

Plusieurs pathologies cardio-vasculaires sont associées à une augmentation de la quantité des MV sanguines circulantes (Z Mallat et al. 2000). Ceci est observé dans l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle (Amabile et al. 2008), l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux (Chironi et al. 2009), etc. On ne peut cependant pas affirmer que les variations observées au niveau des MV soient la cause ou la conséquence de la maladie.

Les MV sont capables de moduler le tonus vasculaire. La modulation de celui-ci constitue un phénomène homéostasique primordial dévolu à l'endothélium. On a montré que les MV purifiées du sang d'individus sains n'engendraient pas de dysfonctionnement endothélial (C M Boulanger et al. 2001; Amabile et al. 2005) alors que celles obtenues à partir de sang de patients atteints de pathologies aigües telles que les syndrômes coronariens ou chroniques (diabète, insuffisance rénale terminale) induisaient une relaxation vasculaire in vitro (Brodsky et al. 2004). Les MV ont également des activités pro-coagulantes et pro-inflammatoires.

# 5.2. Microvésicules et maladies auto-immunes

Il a été démontré que le taux de microvésicules circulantes d'origine plaquettaire et leucocytaire s'élevait au cours de maladies auto-immunes telles que le lupus systémique érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Gougerot-Sjögren (Sellam et al. 2009). Identifier et quantifier les MV permet ainsi d'obtenir des informations complémentaires, des marqueurs pronostics clinico-biologiques, mais aussi d'envisager des pistes de recherche et de nouvelles cibles thérapeutiques.

#### 5.3. Rôles des exosomes en oncologie

Les exosomes libérés par les cellules tumorales présentent plusieurs fonctions.

Ils sont capables de favoriser le processus tumoral via les molécules présentées à leur surface ou contenues à l'intérieur. En effet, les exosomes tumoraux sont endocytosés par les cellules environnantes où ils y délivrent leur matériel protéique et génétique (ARNm, miARN). Les ARNm exosomaux codent majoritairement des protéines (telle que le récepteur EGFRvIII) impliquées dans le processus oncogénique (en particulier la prolifération cellulaire et la néo-angiogénèse tumorale) (Skog et al. 2008). Ces ARNm détectables dans les exosomes isolés du sang des patients peuvent donc constituer d'excellents biomarqueurs sériques. Les exosomes présentent un intérêt biologique pour la cellule tumorale. Grâce à la libération de ces vésicules membranaires, la cellule tumorale peut détourner son micro-environnement à son profit et ainsi favoriser le développement tumoral. Le recueil des exosomes et l'analyse de leur contenu moléculaire constituerait donc une piste intéressante pour la surveillance biologique des patients atteints de cancer.

Cependant certaines cellules cancéreuses expriment des antigènes tumoraux qui, une fois associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), peuvent être reconnus par des lymphocytes T spécifiques ( $L_T$ ) de la tumeur. Néanmoins, cette reconnaissance ne conduit pas à la destruction de la tumeur (Ochsenbein 2002; Pardoll 2003). Les  $L_T$  naïfs ne reconnaissent pas le complexe CMH-peptide à la surface des tumeurs : ils doivent être en contact avec une cellule présentatrice d'antigène (CPA), la cellule dendritique, portant ce complexe CMH-peptide spécifique. Cette présentation dite croisée est possible par le transfert de molécules exprimées à la surface ou contenues dans les exosomes. Les exosomes sont utilisés ici comme source d'antigènes tumoraux pour la cellule dendritique (Wolfers et al. 2001; Blanc et Michel Vidal 2008). *In vivo*, la ou les cellules cancéreuses se multiplient, les exosomes sécrétés par ces dernières sont capturés par une cellule dendritique et utilisés pour former le complexe CMH-peptide tumoral. Celui-ci active alors les  $L_T$ ; une réponse immunitaire T spécifique de l'antigène tumoral est mise en place. Une régression tumorale, voire une destruction totale de la tumeur, est observée.

La sécrétion physiologique d'exosomes joue par conséquent un rôle dans les réponses immunitaires développées par l'organisme. Ceci permet d'envisager de nouvelles stratégies d'immunothérapies anticancéreuses.

Deux essais cliniques utilisant ces exosomes ont été menés sur des patients atteints de mélanome et de cancer du poumon (Lamparski et al. 2002; Escudier et al. 2005). Ces essais cliniques sont basés sur la méthode d'isolement et de purification d'exosomes issus de cellules dendritiques développée par l'équipe du Dr. Lamparski. Cette méthode consiste en une combinaison d'ultrafiltrations sur membrane 500K et d'ultracentrifugations sur coussin de sucrose 30 % et d'oxyde de deuterium 80 % du surnageant de culture de cellules dendritiques afin de purifier les exosomes. Les observations préliminaires démontrent que l'injection d'exosomes est sans danger pour les patients et est associée à une régression tumorale et à une stabilisation au long terme (Escudier et al. 2005).

VI. Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail de thèse ont été multiples et scindés en plusieurs parties.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation des vecteurs adénoviraux comme vecteurs de gène thérapeutique dans la lutte contre la mucoviscidose.

Ces vecteurs ont été les premiers à être utilisés en essais cliniques pour le transfert d'un gène de réparation contre la mucoviscidose chez l'Homme (J Zabner et al. 1993). Bien que décriée par la communauté scientifique, ces vecteurs sont jusqu'à présent les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gène dans le poumon humain. Ils restent des vecteurs candidats pour la mucoviscidose.

Nous disposons au laboratoire de deux vecteurs adénoviraux, le premier correspondant au vecteur adénoviral de sérotype 5 (Ad5) et le second correspondant au vecteur adénoviral chimérique exprimant la fibre du sérotype 35 sur une capside de sérotype 5 (Ad5F35). Nous avons voulu déterminer les mécanismes d'entrée et de trafic intracellulaire de ces deux vecteurs en présence ou non de facteur X de coagulation. L'Ad5 et l'Ad5F35 utilisent des voies d'entrée et de trafic cellulaire différentes pouvant expliquer les différences observées au niveau de leur efficacité de transduction respective. Le but de notre étude a été de caractériser et de développer un vecteur adénoviral présentant une efficacité de transduction d'épithélium respiratoire humain améliorée (l'Ad5F35) en comparaison au vecteur adénoviral le plus utilisé au cours des essais cliniques de la mucoviscidose (l'Ad5). Ce travail a fait l'objet du premier article décrit dans la première partie des résultats de cette thèse.

Une étude précédente menée au laboratoire (Granio et al. 2007) a démontré que l'utilisation de vecteurs adénoviraux exprimant la protéine CFTR sauvage fusionnée à la protéine fluorescente verte GFP permettait d'étudier la localisation et le trafic intracellulaire du canal chorure grâce à son étiquetage GFP dans des lignées cellulaires et dans des épithéliums reconstitués de voies aériennes humaines. Une restauration de l'activité canal chlorure du CFTR, proportionnelle à la dose virale, a été obtenue. Cependant, une inhibition de l'activité du CFTR à forte dose virale a été mise en évidence *in vitro*. Ce résultat intéressant a constitué le point de départ de notre seconde étude.

Nous avons recherché les causes de cette inhibition et avons trouvé qu'elle était liée à la protéine base de penton du vecteur adénoviral. L'utilisation du vecteur chimérique Ad5F35 mentionné précédement a permis de contourner ce problème. Une augmentation de l'efficacité de transduction des cellules épithéliales pulmonaires et du niveau d'expression du transgène ont été obtenues. Notre vecteur chimérique Ad5F35 est un vecteur potentiel de thérapie génique dans le cas de la mucoviscidose. Ce travail est décrit dans la seconde partie des résultats et fait l'objet d'un second article.

Dans un troisième temps, nous avons voulu utiliser un nouvel outil de transfert de matériel non génétique pour le traitement de la mucoviscidose. Il s'agit des vésicules membranaires (microvésicules

et exosomes) chargées en molécules bioactives CFTR ou en ARNm codant pour le CFTR. Ces vésicules pourraient constituer un nouvel agent de transfert du CFTR aux cellules CF. Dans ce travail nous démontrons que les cellules exprimant le CFTR émettent des vésicules membranaires exprimant à leur surface la protéine CFTR et contenant de l'ARNm CFTR. De plus, ces vésicules présentent la capacité de transférer à des cellules réceptrices leur contenu "cytoplasmique" ainsi que les protéines exprimées à leur surface.

La protéine CFTR ainsi transférée est exprimée à la surface des cellules réceptrices. Nous proposons cet outil comme nouvel agent de transfert "non génique" de la protéine CFTR pouvant être utilisé dans la majorité des modèles de laboratoire. Ces travaux sont développés dans la troisième partie des résultats de cette thèse et font l'objet d'un troisième article.
VII. Matériels et méthodes

#### 1. Culture cellulaire

#### 1.1. Les cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 sont une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines cultivées en milieu DMEM (*Dubelcco's modified Eagle's medium*) à haute teneur en glucose (4,5g/l) (Invitrogen, France) complémenté par 10% de sérum de veau fétal (SVF) (Invitrogen, France), de la pénicilline (200 U/ml) et de la streptomycine (200  $\mu$ g/ml) à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Ces cellules sont utilisées pour la production des stocks viraux et ont été obtenues de l'ATCC (*American Type Culture collection CRL-1573*). Elles expriment les protéines de la région E1 et apportent par transcomplémentation les protéines indispensables à la réplication des adénovirus de sérotype 5.

#### 1.2. Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary)

Les cellules CHO sont des cellules ovariennes de hamster chinois. Il s'agit de cellules adhérentes, à morphologie de type épithélial cultivées en milieu  $\alpha$ -MEM (*Minimum Essential Media alpha*) (Invitrogen, France) complémenté par 10 % de sérum de veau fétal (SVF) (Invitrogen, France), de la pénicilline (200 U/ml) et de la streptomycine (200 µg/ml) à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Ces cellules sont utilisées pour former un pool de microvésicules et exosomes témoin ne contenant pas la protéine GFP-CFTRwt. Elles sont également transfectées par le plasmide pCEP4-GFP-CFTRwt. La lignée stable CHO-GFP-CFTRwt est ainsi créée.

#### 1.3. Les cellules CHO -GFP-CFTR

Les cellules CHO sont des cellules ovariennes de hamster chinois exprimant la protéine GFP-CFTRwt suite à la transfection du plasmide épisomal pCEP4-GFP-CFTRwt. Les cellules expriment la protéine GFP-CFTRwt et sont maintenues en culture sous une pression de sélection à l'hygromycine (50 µg/mL).

#### 2. Virus

#### 2.1. Les vecteurs adénoviraux

Plusieurs vecteurs ont été utilisés dans cette étude. Le virus Ad5-GFP-CFTRwt, vecteur dérivé de l'Ad5 de première génération a été fourni par la société Transgène SA (Strasbourg).

Ce vecteur a été construit par recombinaison homologue dans la souche BJ 5183. L'insert se situe dans la région E1 du génome adénoviral. Les vecteurs Ad5Fi35-GFP et Ad5Fi35-GFP-CFTRwt ont été

construits respectivement à partir de l'Ad5-GFP et de l'Ad5-GFP-CFTRwt par substitution de la partie codant la fibre de sérotype 5 avec la fibre de sérotype 35. Ces deux vecteurs ont été synthétisés par la société Got-A-Gene (Suède).

#### 2.1.1. Production des stocks adénoviraux

#### 2.1.1.1. Amplification

L'amplification des stocks adénoviraux débute à partir d'une plage de lyse isolée. Cette dernière est utilisée pour infecter les cellules HEK-293 cultivées dans un puit d'une plaque 24 puits. L'infection est réalisée pendant 1h à 37°C dans un volume minimal afin d'optimiser les contacts cellules-virus. Une fois totalement lysées, les cellules et le milieu d'infection sont récoltés. Ils vont subir une lyse physique totale constituée de trois cycles de congélation-décongélation. Ces cycles successifs permettent la libération des particules adénovirales dans le surnageant. Le surnageant sera ensuite centrifugé 10 minutes à 30 000 tr/min et sera utilisé pour infecter des cellules HEK-293 disposées en un puit d'une plaque 6 puits. L'amplification est ainsi réalisée en augmentant à chaque étape le nombre de cellules HEK-293 infectées (1 flasque 25 cm<sup>2</sup> puis 1 flasque 75 cm<sup>2</sup> et 2 flasques 150 cm<sup>2</sup>). Le surnageant des 2 flasques 150 cm<sup>2</sup> sera utilisé pour infecter 60 boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant des cellules HEK-293. Ces boîtes constitueront les stocks viraux.

#### 2.1.1.2. Préparation des stocks viraux

Les stocks viraux ont été constitués comme décrit précédemment. Une fois l'effet cytophatogène observé (2 à 3 jours après infection), les cellules sont récoltées et centrifugées 10 minutes à 30 000 tr/min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 36 mL de milieu d'infection et subit 3 cycles de congélation décongélation. Après centrifugation à 30 000 tr/min pendant 10 min, le surnageant comportant les particules virales est déposé sur un gradient de chlorure de césium (CsCl) afin d'être purifié.

#### 2.1.1.3. Purification des stocks adénoviraux

La purification des particules virales se réalise par deux ultracentrigfugations successives sur gradient de CsCl. La première centrifugation permet d'isoler les particules virales ; la seconde permet de les concentrer et de les purifier. Le surnageant contenant les particules virales (6 mL/ tube) est délicatement déposé sur le gradient de CsCl de densité comprise entre 1.25 et 1.4 (2.5 mL de CsCl de densité 1.25 et 2.5 mL de CsCl de densité 1.4). Les tubes sont alors centrifugés 2h30 à 18°C à 30 000 tr/min. Les particules virales se disposent sous forme d'anneau récupéré à l'aide d'une seringue. Il est ensuite déposé dans un tube contenant du CsCl de densité 1.34. Le tube est centrifugé pendant 20h à 30 000 tr/min à 18°C. L'anneau viral est de nouveau récupéré à l'aide d'une seringue, mélangé à du glycérol stérile et conservé à -20°C.

2.1.1.4. Titration des stocks adénoviraux 2.1.1.4.1. Le titre viral infectieux

Une gamme de dilution du stock viral allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-11}$  est réalisée. Les dilutions  $10^{-7}$  à  $10^{-11}$  sont utilisées pour infecter des cellules HEK-293 cultivées en boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Chaque infection est réalisée en duplicat. Après 1h d'infection à  $37^{\circ}$ C, le milieu d'infection est remplacé par un mélange volume à volume de DMEM 2X supplémenté avec 2% de SVF final et d'agar. Les cellules sont incubées à  $37^{\circ}$ C en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5%). Chaque jour un dénombrement des plages de lyse est réalisé jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'apparition de nouvelles plages. Le titre infectieux (pfu pour *plaque forming unit*) est alors déterminé selon la formule suivante :

Titre (pfu/mL) = 
$$2.5x$$
 (Nb Plage de lyse 1+ Nb Plage de lyse 2) x Facteur de dilution  
2

#### 2.1.1.4.2. Le titre viral en particules physiques

Les particules virales sont lysées dans du SDS 1% sous forte agitation pendant 5 minutes. La mesure de la densité optique à 260 nm, correspondant à la détection de l'ADN viral permet de déterminer le nombre de particules physiques (pp) selon la formule suivante :

Titre (en pp/mL) =  $DO_{260nm}$  x Facteur de dilution x 1,1.10<sup>12</sup>

#### 2.2. Infection adénovirale

L'infection des cellules par un vecteur adénoviral est réalisée en diluant le stock d'adénovirus dans du milieu de culture contenant 5% de sérum de vœu fœtal afin d'obtenir un nombre précis de particules physiques par cellules dénommé MOI *(Multiplicity of infection)*. Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C dans un volume minimal afin de favoriser le contact entre cellules et virus. Après ce temps d'incubation, du milieu frais est ajouté aux cellules.

### 2.3. Marquage à l'Alexa 488 et à l'Alexa 555 respectivement des vecteurs adénoviraux et du FX.

Les vecteurs Ad5 et Ad5Fi35 (1.10<sup>12</sup> pp/cellule) sont marqués par l'Alexa 488 (tétrafluorophenyl ester ; Molecular probes ; Invitrogen) en tampon HEPES (0.05M, pH 7.2) pendant 2 heures à température ambiante en atmosphère argon. La réaction est stoppée suite à l'ajout d'une solution de

lysine concentrée (en tampon HEPES 0.05M, pH 7.2) pendant 1 heure à température ambiante. Les vecteurs marqués sont purifiés par filtration sur gel en colonne PD10.

Le FX (5 mg/mL) est marqué à l'Alexa 555 1mM (succinimidyl ester ; Molecular Probes ; Invitrogen) en tampon HEPES (0.05M, pH 7.2) pendant 1 heure à température ambiante. Le FX marqué est purifié par dialyse sur du PBS.

#### 3. Quantification des protéines par la technique de Bradford

Les échantillons à doser correspondent aux microvésicules et exosomes préalablement purifiés. Les échantillons (200  $\mu$ L) sont mis en contact avec le réactif de Bradford. Après un temps d'incubation de 5 min, la densité optique à 595 nm est mesurée. La quantité de protéine est obtenue après comparaison avec une gamme étalon de BSA réalisée au même moment.

#### 4. Détection des protéines par cytométrie en flux

Cette technique permet de quantifier le nombre de cellules exprimant le gène rapporteur GFP (*Green Fluorescent protein*) ainsi que le niveau d'expression du gène GFP. Ces cellules sont transduites à l'aide de vecteurs adénoviraux exprimant le gène rapporteur GFP ou de microvésicules ou d'exosomes portant la protéine GFP.

A un temps déterminé après transduction, les cellules sont lavées au PBS puis décollées de leur support à l'aide de PBS complémenté d'EDTA 5mM. Elles sont récoltées par centrifugation douce (2000 rpm pendant 5 min) et fixées dans une solution de PBS contenant 1 % de Paraformaldéhyde pendant 15 min minimum. Il est possible de conserver les cellules dans la solution de fixation à 4°C pendant plusieurs jours. Après fixation, les cellules sont centrifugées comme précédemment puis resuspendues dans 400 µL de PBS et analysées directement par cytométrie en flux.

#### 5. Techniques de biologie moléculaire

#### 5.1 Technique de clonage pour l'obtention du plasmide épisomal pCEP<sub>4</sub>-GFP-CFTR

Plasmides utilisés pour la réalisation du clonage :

- pCEP<sub>4</sub> (Invitrogen) : plasmide épisomal à réplication autonome contenant l'origine de réplication du virus Epstein Barr et le gène *EBNA-1*. Le plasmide contient le gène de résistance à l'hygromycine.

- peGFP-CFTRwt : plasmide construit au laboratoire contenant un gène de résistance à l'ampicilline.

#### 5.1.1. Digestion par des enzymes de restriction

Les enzymes de digestion correspondent à des endonucléases qui coupent l'ADN double brin au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques.

Environ 5  $\mu$ g de plasmide pCEP<sub>4</sub> ("plasmide vecteur") sont digérés par 50 unités d'enzyme de restriction dans un volume final de 100  $\mu$ L contenant du tampon spécifique de l'enzyme concentré fourni par le fabriquant. Environ 25  $\mu$ g de plasmide peGFP-CFTRwt (plasmide fournissant l'insert) sont digérés comme précédemment. La réaction se fait pendant 2 heures à la température préconisée pour une action optimale de l'enzyme (fourni par le fournisseur).

### 5.1.2. Purification des produits de digestion sur gel d'agarose : purification de l'insert "eGFP-CFTRwt"

Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 1% en tampon TAE 0,8%. La bande d'agarose contenant les fragments d'ADN d'intérêt est découpée puis l'ADN est purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract II (Macherey Nagel).

### 5.1.3. Purification des produits de digestion du plasmide "vecteur" par extraction phénol-chloroforme

Afin d'inactiver et d'éliminer les protéines de l'ADN, l'extraction est réalisée par phénol-chloroforme. Du phénol et du chloroforme volume à volume sont ajoutés à la solution d'ADN de plasmide digéré. Le mix est mélangé par retournement puis centrifugé à forte vitesse (10 000 rpm pendant 1 min à température ambiante). La phase organique contenant le plasmide est récupérée dans un nouveau tube eppendorf. Un volume identique de solution de chloroforme/isoamylalccol (24 :1) est ajouté. La solution obtenue est mélangée par retournement puis centrifugée à forte vitesse (10 000 rpm pendant 1 min à température ambiante). La phase organique est disposée dans un nouveau tube eppendorf puis l'ADN est précipité par ajout d'un volume d'acétate de sodium pH 5,2 et de deux volumes d'éthanol 100 %. La solution est incubée une nuit à -20°C puis centrifugée à température ambiante, 10 min à 10 000 rpm. Le culot d'ADN précipité est repris dans de l'éthanol 70 %. Le mix est centrifugé 5 min à 10 000 rpm. Le culot d'ADN est alors séché au bain sec puis repris dans de l'eau dépourvue de DNAses et de RNAses.

#### 5.1.4. Ligation

Classiquement, la ligation est effectuée selon un rapport insert sur vecteur de 5. La ligation est réalisée dans un volume de 30  $\mu$ L contenant la T4 DNA ligase en présence de son tampon à température ambiante pendant 2 heures.

#### 5.1.5. Transformation bactérienne par choc thermique

Les bactéries compétentes sont transformées avec le produit de ligation. Cette étape permet l'amplification de la construction réalisée précédemment. Environ 100  $\mu$ L de bactéries compétentes sont ajoutées au produit de ligation. Les cellules sont incubées 15 min dans la glace avant d'être soumises à un choc thermique de 5 min à 37°C. Les bactéries sont refroidies pendant 2 min dans la glace puis 150  $\mu$ L de LB contenant l'antibiotique de sélection sont ajoutés. La solution est alors incubée 30 min à 37°C au bain-marie avant d'être étalée sur des boîtes de Pétri comportant du milieu LB agar contenant l'antibiotique de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées la nuit à l'étuve à 37°C.

#### 5.1.6. "Mini-prep" d'ADN plasmidique

Chacune des colonies présentes sur la boîte de Pétri est prélevée stérilement et inoculée dans 2 mL de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection. La culture bactérienne est incubée sur la nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite purifié à l'aide du kit mini-prep de Macherey Nagel selon les instructions du fournisseur. Le culot d'ADN plasmidique est repris dans 50 µL d'eau dépourvue de DNAses et de RNAses.

#### 5.1.7. Digestion de l'ADN plasmidique pour vérifier la présence de l'insert eGFP-CFTRwt dans le plasmide vecteur.

#### 5.1.8. "Maxi prep" afin d'amplifier l'ADN plasmidique pCEP<sub>4</sub>-eGFP-CFTR

#### **5.2. Extraction ADN**

L'ADN est extrait de lignées cellulaires infectées par des vecteurs adénoviraux et de microvésicules ou exosomes purifiés dans le surnageant de culture de ces cellules à l'aide du kit « Quiagen DNA Blood mini kit » selon les instructions du fournisseur.

#### 5.3. Extraction ARN et Transcription inverse

Afin de détecter et quantifier la présence éventuelle d'ARNm codant la protéine CFTR taguée GFP dans les microvésicules et les exosomes préalablement purifiés, les ARN totaux contenus dans ces vésicules sont extraits à l'aide du kit « Nucleospin RNA II » (Macherey Nagel) selon les instructions du fournisseur.

Après extraction, 1 µg d'ARN est reverse transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit « SuperScript<sup>TM</sup> III first strand Synthesis SuperMix » (Invitrogen). Cet ADNc servira pour quantifier le nombre d'ARNm-GFP-CFTRwt par PCR quantitative en temps réel.

#### 5.4. PCR quantitative en temps réel

La technique de PCR quantitative en temps réel a permis de mesurer le niveau d'attachement et de translocation des vecteurs adénoviraux à travers un tapis cellulaire des CHO-K1 ou CHO 2241. Cette technique a également permis de déterminer la présence d'ADNc-GFP-CFTR obtenus après transcription inverse des ARN totaux extraits des microvésicules ou exosomes.

La quantification de l'amplicon synthétisé au cours de la PCR repose sur l'utilisation du Sybrgreen, molécule intercalante qui se positionne régulièrement le long de l'ADN double brin autorisant ainsi une émission détectable de fluorescence. L'intensité de fluorescence verte associée au SybrGreen est ainsi proportionnelle à la quantité d'amplicon présente dans le milieu réactionnel (**Figure 30**).

L'appareil Light Cycler (Roche Diagnostics) offre la possibilité d'une quantification en temps réel, par détection du niveau de fluorescence à l'issue de chaque cycle d'amplification. Des courbes d'amplification correspondant à la fluorescence détectée en fonction du temps sont ainsi obtenues. Plus la quantité de séquence cible est importante dans un échantillon, plus la fluorescence sera détectée tôt. En comparant les courbes obtenues pour chaque échantillon à celles d'une gamme étalon de concentration connue contenant la même séquence amplifiée, il est possible de déduire la quantité d'ADN initialement présente dans les échantillons. Le concept du « cycle seuil » (Ct) est à la base d'une quantification précise et reproductible.

L'utilisation de la molécule SybrGreen nous permet de vérifier, à l'issu de la réaction PCR, la spécificité de l'amplification par réalisation d'une courbe de fusion. En chauffant très lentement l'ADN double brin contenu dans la réaction, il est possible de déterminer une température ou la fluorescence chute subitement, correspondant à une dissociation des deux brins d'ADN. Cette température nommée température de fusion est spécifique du produit amplifiée. Elle dépend de la composition en bases G-C et de la longueur de l'amplicon.

La réaction est réalisée dans des capillaires en verre dans un volume final de 20  $\mu$ L, dont 10 $\mu$ L d'ADN de la gamme ou des échantillons. Le milieu réactionnel comporte de l'eau dépourvue de DNAses et RNases (3.6  $\mu$ L), du MgCl<sub>2</sub> 25 mM (2.4  $\mu$ L), 10  $\mu$ M d'amorce sens (1  $\mu$ L), 10  $\mu$ M d'amorce anti-sens (1  $\mu$ L) et un mix comportant la Taq polymérase, les dNTP, le SybrGreen et 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (2  $\mu$ L).



#### Figure 30: PCR quantitative en temps réel en présence de la molécule Sybr Green.

(a) Durant l'étape de dénaturation, le SybrGreen libre exhibe peu de fluorescence.

(b) A la température d'appariement, quelques molécules de Sybr Green se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation.

(c) Durant la phase d'élongation, de plus en plus de molécules de Sybr Green se lient au brin naissant : l'accroissement du niveau de fluorescence est suivi en temps réel.

Afin de normaliser le contenu cellulaire en ADN de chaque échantillon, le gène de ménage  $\beta$ -Actine est employé. Les amorces permettant de détecter le génome viral de l'Ad5-GFP et de l'Ad5F35-GFP sont situées dans le gène fibre des vecteurs adénoviraux. Celles permettant de détecter la présence d'ADNc-GFP-CFTR sont localisées en 3' du gène GFP (amorce sens) et en 5' du gène CFTRwt (amorce anti-sens). Le programme utilisé pour déterminer la valeur Ct est présenté en **Figure 31**. Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 8**.

Les valeurs de Ct obtenues pour le gène d'intérêt dans un échantillon donné sont normalisées par rapport aux valeurs de Ct obtenues pour le gène de ménage  $\beta$ -Actine. Le nombre de copies génome de vecteur adénoviral ou le nombre d'ARNm-GFP-CFTR sont déterminés à l'aide d'une gamme standard.

Nom de l'amorce	Séquence 5' – 3'
<b>B-Actine sens</b>	TGTCCCTGTATGCCTCTGGT
<b>B-Actine anti-sens</b>	GATGTCACGCACGATTTCC
Fibre de l'adénovirus de sérotype 5 sens	GCTACAGTTTCAGTTTTGGCTG
Fibre de l'adénovirus de sérotype 5 anti-sens	GTTGTGGCCAGACCAGTCCC
Fibre de l'adénovirus de sérotype 35 sens	GCTTCACACAAAGCCCAGACGGA
Fibre de l'adénovirus de sérotype 35 anti-sens	ACACGTAGCCATTAACAAGCCCTCC
Protéine GFP-CFTRwt sens	AACGAGAAGCGCGATCACATG
Protéine GFP-CFTRwt anti-sens	GCGCTGTCTGTATCCTTTCCTCAA

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel

Program Name	de	naturation							
Cycles	1 Analysis Mode None								
Target (°C)		Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s		Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	95 00:1		20		0	0	0	None	
Program Name	am	plification							
Cycles	40	Analysis Mode Quantification							
Target (°C)		Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)		Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95	00:00:10		20		0	0	0	None	
68	55	00:00:10	20		58	0.5	1	None	
72		00:00:16	20		0	0	0	Single	
Program Name	Me	lting							
Cycles	1	Analysis Mode Melting Curves							
Target (°C)		Hold (hh:mm:ss)	Slop (°C/s	e s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
95		00:00:00	20		0	0	0	None	
58		00:00:10	20		0	0	0	None	
95		00:00:00	0.1		0	0	0	Continuous	
Program Name	cod	oling							
Cycles	1	1 Analysis Mode None							
Target (°C)		Hold (hh:mm:ss)	Slop (°C/s	e s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
40		00:00:30	20		0	0	0	None	

**Figure 31: Programmes utilisés pour réaliser les expériences de PCR quantitative en temps réel.** Modification pour la détection de l'ADNc GFP-CFTRwt en bleu

#### 6. Purification des microvésicules et des exosomes contenant la protéine GFP-CFTRwt

La purification des vésicules est réalisée à partir du surnageant de culture des cellules CHO- GFP-CFTRwt. Le surnageant est récolté toutes les 24 heures et conservé à 4°C.

#### 6.1. Centrifugations différentielles

Le surnageant de culture est centrifugé une première fois 10 minutes à 2500 g afin d'éliminer les cellules mortes et les gros débris. Il est ensuite centrifugé 2 heures à 30 000 g afin de récolter les vésicules membranaires dont le diamètre est supérieur à 100 nm. Elles seront nommées « Microvésicules ». Le surnageant est enfin centrifugé 2h à 100 000 g. Le culot d'exosomes obtenu est soit repris dans 200 $\mu$ L de PBS contenant de la pénicilline (200U/ml) streptomycine (200 $\mu$ g/ml) soit repris dans une solution de sucrose à 2.5M pour réaliser un fractionnement sur gradient de sucrose.

#### 6.2. Fractionnement des exosomes et microvésicules sur gradient continu de sucrose

Un gradient continu de sucrose 0.25 M (en eau stérile) à 2 M (en eau lourde) est coulé en tube Beckman SW41 (volume total du gradient : 10 mL) sur le culot de microvésicules ou d'exosomes repris dans 200  $\mu$ L de sucrose 2.5M. Le gradient est centrifugé 18 h à 100 000 g. Des fractions de 500  $\mu$ L sont ensuite prélevées et pesées afin de déterminer la densité (en g/L). Chaque fraction est diluée dans 10 mL de PBS pénicilline/streptomycine puis centrifugées 2 h à 100 000 g. Le culot obtenu est repris dans 200  $\mu$ L de PBS pénicilline/streptomycine pour être analysé au niveau nucléique et protéique.

#### 6.3. Microscopie électronique

Le microscope utilisé pour toutes les observations est un microscope électronique à transmission (MET) Joel 1200-EX équipé de la caméra MégaView II high resolution TEM. Les données sont analysées grâce au logiciel Soft Imaging System of analyse (Eloïse, Roissy, France).

Après 1 heure de contact entre les exosomes ou les microvésicules et les cellules réceptrices, la préparation est fixée avec du glutharaldhéyde 2% en solution dans du tampon de cacodylate de sodium 0.1M pH 7.4. Les cellules sont ensuite récoltées et re-fixées par du tétroxyde d'osmium 1% dans du tampon cacodylate de sodium 0.1M pH 7.4. Les échantillons sont coupés à l'ultramicrotome puis les sections sont placées sur une grille de carbone afin d'être observées au MET.

#### 7. Tests d'efflux de radiotraceurs

La technique des efflux de radiotraceurs permet de mesurer l'activité de canaux ioniques à partir d'un tapis cellulaire. Il a été démontré que les 2 radiotraceurs <sup>125</sup>I et <sup>36</sup>Cl pouvaient être considérés comme équivalents pour la mesure de l'activité d'un canal chlorure. En effet, ces deux composés appartenant

à la famille chimique des halogénures se comportent de façon similaire au niveau des canaux chlorure. L'iodure radioactif a l'avantage d'avoir une courte durée de vie comparée à celle du chlorure radioactif.  $L'^{125}I$  a une demi-vie de 30 jours alors que celle du <sup>36</sup>Cl est de 300 000 ans.

#### 7.1. Principe

Cette technique repose sur la mesure des changements de concentration en radiotraceur de part et d'autre de la membrane plasmique au niveau du tapis cellulaire. L'iodure radioactif est mis en contact avec les cellules dans un tampon physiologique. L'<sup>125</sup>I va alors s'équilibrer de part et d'autre de la membrane cellulaire par osmolarité. La mesure de l'activité du canal choisi s'effectue en déterminant la quantité de radiotraceur qui sort de la cellule après ajout d'activateur(s) spécifique(s).

#### 7.2. Protocole standard

L'expérience est réalisée en utilisant un système robotisé (MultiPROBE IIex-Perkin Elmer life sciences, Coutaboeuf, France). Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits et analysées après transfert de la protéine GFP-CFTRwt via des microvésicules ou des exosomes à différents temps. Les cellules sont rincées avec du milieu d'efflux non radioactif (dit "froid") à 37°C. Cette étape permet d'éliminer les cellules mortes qui relargueraient le radiotraceur de façon anarchique. Le milieu est composé de NaCl : 136,9 mM ; KCl : 5,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,3 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.3 mM ; NaHCO<sub>3</sub> : 4,2 mM ; CaCl<sub>2</sub> : 1,3 mM ; MgCl<sub>2</sub> : 0,5 mM ; MgSO<sub>4</sub> : 0.4 mM ; D-Glucose : 5,6 mM ; HEPES pH 7,4 : 10 mM.

Un premier aliquot de 500  $\mu$ L est prélevé et servira du premier point de contrôle de la cinétique. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 37°C avec un milieu de charge (1 $\mu$ Ci/mL de <sup>125</sup>NaI). L'iodure s'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu d'efflux "froid" afin d'éliminer la radioactivité extracellulaire. Le surnageant est collecté à 3 reprises. Ces prélèvements permettent d'établir une ligne de base caractérisant la sortie passive des ions iodures.

La sortie progressive d'<sup>125</sup>I est déterminée en remplaçant le milieu par 500  $\mu$ L de milieu d'efflux froid contenant les activateurs du CFTR chaque minute pendant 10 minutes. Les activateurs de CFTR correspondent à la forskoline (10  $\mu$ M) et à la génistéine (30  $\mu$ M). Le surnageant est collecté en tube à hémolyse et permettra de déterminer par comptage la radioactivité de chaque fraction. En fin d'expérience, les cellules sont lysées par ajout de 500  $\mu$ L de SDS 0,1 % / 0,1 M NaOH. La lyse s'effectue sous agitation lente pendant 45 minutes. Elle permet d'obtenir la radioactivité résiduelle contenue dans les cellules.

La radioactivité contenue dans chaque fraction collectée est comptée grâce à un compteur  $\gamma$  (Cobra II, packard). L'activité du canal CFTR est déterminée dans les fractions collectées après ajout de la forskoline et de la génistéine.

#### 7.3. Analyse

La quantité totale d'ions <sup>125</sup>I d'un échantillon diminue avec le temps. En effet, l'<sup>125</sup>I contenu dans le compartiment intracellulaire est libéré dans le domaine extracellulaire due à l'activité du CFTR. La fraction d'<sup>125</sup>I perdu à chaque point de la cinétique peut être déterminée et le taux d'efflux d'<sup>125</sup>I(k) en fonction du temps peut être exprimé suivant la formule suivante :

$$k (min^{-1}) = ln (t_1^{125}I / t_2^{125}I) / (t_1 - t_2)$$

 $L'^{125}I$  correspond à la quantité d'<sup>125</sup>I intracellulaire mesurée à un temps t, t<sub>1</sub> et t<sub>2</sub> sont 2 points successifs de la cinétique.

#### 8. Mesure du potentiel de membrane par la sonde DiSBAC<sub>2</sub>(3)

#### 8.1. Principe

Cette technique repose sur la mesure du potential de membrane d'une cellule lorsque celle-ci est stimulée par un ou des activateurs du CFTR. En situation physiologique, il y a autant d'ions chlorure à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule ; il n'y a pas de mouvement de l'anion. Suite à l'ouverture des canaux à ions chlorure, une dépolarisation de la membrane est observée. La dépolarisation est potentialisée par un gradient d'ions chlorure favorable (intracellulaire/extracellulaire). La sonde DiSBAC2(3) témoigne de cet état par une émission importante de fluorescence. Cette sonde constitue un colorant sensible au potentiel de membrane. Elle suit l'équilibre de Nernst.

#### 8.2. Protocole standard

L'expérience est réalisée en utilisant le logiciel Ion vision (Impro Vision software, Coventry, UK) et le microscope à fluorescence Zaviovert 135 TV (Zeiss). Les cellules sont cultivées sur lamelles de 1 cm de diamètre disposées en plaque 24 puits et analysées après transfert des microvésicules et exosomes à 72 heures. Les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante avec du milieu de charge contenant 100 nm de sonde fluorescente DiSBAC2(3). Le milieu est composé de NaCL : 145 mM, KCl : 4 mM, CaCl2 : 1 mM, Glucose : 5 mM, sucrose : 50 mM, Hépes : 5 mM ph 7,4. Les cellules sont ensuite perfusées avec une solution faiblement concentrée en ions chlorure (8 mEq/L) et contenant des activateurs du CFTR, l'AMPc (500  $\mu$ M) et la Forskoline (10  $\mu$ M). Cette solution est composée de Na gluconate : 145 mM, KCl : 4 mM, CaCl2 : 1 mM, sucrose : 50 mM, tampon HEPES : 50 mM pH 7,4. Les changements d'intensité de fluorescence sont mesurés toutes les 5 à 7 secondes, sur des régions d'intérêt comprenant environ 10 cellules. Un enregistrement est réalisé et analysé à l'aide du logiciel Ion Vision.

#### 8.3. Analyse

Les changements d'intensité de fluorescence pour chaque cellule sont exprimés sous forme d'un rapport entre l'intensité de fluorescence mesuré à un instant t ( $F_t$ ) et l'intensité de fluorescence mesuré au moment de l'ajout de la solution contenant les activateurs du CFTR ( $F_0$ ).

#### 9. Techniques de microscopie 9.1. Microscopie électronique

Après 2 heures d'infection, les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde 4 % en solution dans le milieu de culture. Les cellules sont fixées de nouveau dans une solution de glutaraldéhyde 4 % en solution dans du tampon cacodylate 0,2 M pH 7,4. Les cellules sont récoltées et rinçées à 3 reprises à froid (4°C) dans du tampon cacodylate 0.2 M pH 7,4 en solution dans du tampon saccharose 0.4 M. Les cellules subissent ensuite une post-fixation dans une solution contenant volume à volume de l'osmium 2 % et du cacodylate 0.3 M pH 7,4. Les échantillons sont alors déshydratés dans des bains successifs d'éthanol à concentrations croissantes puis inclus dans une résine épone (Epon-812, Fulham, Lathman, NY). Ils sont coupés à l'ultramicrotome puis observés au microscope électronique Jeol JEM-1400 équipé d'une caméra ORIUS (Gatan, France) et analysé grâce au logiciel Soft Imaging System of Analysis (Eloise, Roissy, France).

#### 9.2. Microscopie confocale

La couche monocellulaire des CHO-K1 et des CHO 2241 a été infecté avec 35  $\mu$ L de baculovirus spécifique des endosomes tardifs couplé au fluorochrome RFP. Après 4 heures d'infection à température ambiante, le milieu est remplacé par du milieu complet frais contenant 10 % de sérum de veau fœtal. Les cellules sont incubées la nuit à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite transduites par les vecteurs adénoviraux couplés à l'Alexa 488 (MOI 10 000) pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont rincées trois fois au PBS froid puis du mileu frais froid est ajouté. Les échantillons sont conservés dans la glace jusqu'à ce qu'ils soient transférés dans la chambre d'incubation du microscope confocal. La chambre d'incubation présente une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> ainsi qu'une température appropriée à la culture cellulaire. Une fois transférées, les cellules sont observées toutes les 10 minutes pendant 3 heures à l'aide du microscope confocal LSM 510 Meta, Carl Zeiss en utilisant une lentille à immersion à l'huile 63X.

### **VIII. Résultats et Discussion**

### PARTIE I

6. Première partie : L'entrée et le trafic intracellulaire des adénovirus humains en présence du facteur X de coagulation sont déterminés par le sérotype de la fibre et non par l'interaction hexon-FX les héparanes sulfates.

Article en annexe

#### **6.1. Introduction**

L'adénovirus humain de sérotype 5 (HadV5) a fait l'objet de nombreuses études au cours de ces 20 dernières années. L'infection adénovirale induit l'activation d'une réponse immunitaire innée ainsi que des mécanismes inflammatoires. De ce fait, son utilisation en clinique est peu exploitée. En effet, il préexiste dans l'organisme des anticorps dirigés contre l'adénovirus qui neutralisent rapidement les vecteurs adénoviraux après leur administration *in vivo*. De plus, l'injection par voie intraveineuse de vecteurs Ad5 résulte en une absorption majoritaire des particules virales par le foie. Ces particules ne pourront donc pas atteindre leurs cellules ou tissus cibles. Plusieurs stratégies ont été envisagées afin de contourner ces inconvénients en créant des mutants des protéines de capsides ou des vecteurs chimériques. Les résultats obtenus ont été malheureusement décevants (Coughlan L et al. 2010).

De récentes études ont montré que l'accumulation des particules virales dans le foie est due à l'interaction entre le vecteur Ad5, via sa protéine hexon au facteur X de coagulation (FX). Le complexe Ad5-FX se fixe alors aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) présentes en forte proportion sur les cellules de Kupffer (Raul Alba et al. 2009; S Waddington et al. 2008; Simon N Waddington et al. 2007; Vigant et al. 2008; Dmitry M Shayakhmetov, Anuj Gaggar, et al. 2005).

Cependant, les vecteurs du sérotype 35 ainsi que les vecteurs chimériques, Ad5F35 et AdV5F2/BAd4, ont une transduction hépatique nettement inférieure par rapport aux vecteurs Ad5 (Jenny A Greig et al. 2009; Rogée et al. 2010). Ces observations suggèrent l'existence de facteurs supplémentaires impliqués dans l'absorption des particules d'Ad5 par le foie.

Nous avons voulu déterminer le rôle des autres protéines majoritaires de capside (la base de penton et la fibre) dans la voie d'entrée du complexe FX-Ad5 ainsi que dans la transduction du transgène.

La démarche expérimentale a consisté, *in vitro*, à comparer la fixation de l'Ad5, des mutants de l'Ad5 (au niveau de la base de penton et de la fibre) et du vecteur chimérique Ad5F35 aux héparanes sulfates en présence ou non de FX par résonance plasmonique de surface (SPR). Nous avons, par la suite, utilisé les vecteurs Ad5 et Ad5F35 pour étudier l'effet du FX sur la transduction de cellules exprimant les HSPG et les récepteurs spécifiques à l'Ad5 (CAR) ou à l'Ad5F35 (CD46) ou n'exprimant aucun de ces trois récepteurs.

#### (A) HS immobilisés/capsomères d'hexon d'Ad5vit +/- FX







#### (B) HS immobilisés / virions d'AdSwt +/- FX



### Figure 32: Analyse in vitro, par SPR, de la fixation des capsomères d'hexon de l'Ad5wt et de la fixation de vecteurs Ad5 mutés ou non sur des HS immobilisés en présence ou non de FX.

- (A) : Capsomères d'hexon d'Ad5wt en présence ou non de FX ou de FX tronqué (FXGL).
- (B) : Vecteur Ad5wt en présence ou non de FX.
- (C) : Vecteurs mutants : AdV5F<sup>TTAT</sup> et AdV5Pb<sup>EGD</sup> en présence ou non de FX.

#### 6.2. Résultats

## 6.2.1. Le FX se fixe à la protéine hexon des vecteurs adénoviraux de sérotype 5 (Ad5) via son domaine $\gamma$ carboxilique (Gla) et sert de "pont" pour l'attachement du vecteur aux héparanes sulfates (HS) ou aux molécules HSPG cellulaires.

Il a été démontré que le FX se lie aux HS ou aux HSPG par une séquence riche en résidus lysine situés en position Arg240, Lys236, Lys169, Arg165, Lys96, Arg93, and Arg125 (Rezaie 2000). Nous avons initialement confirmé que l'interaction entre les HS et la protéine hexon est améliorée en présence de FX intact. En effet, la forme tronquée du FX, nommée FXGL, dépourvue du domaine Gla, n'a pas d'effet sur l'attachement de l'hexon aux HS (Coughlan L et al. 2010). Les mêmes conclusions sont obtenues pour les virions complets d'Ad5wt (**Figure 32A et B**).

Nous avons alors analysé deux mutants vis-à-vis de leurs liaisons in vitro aux HS. Le premier est l'adénovirus Ad5V5F<sup>TTAT</sup> qui porte des mutations dans le tétrapeptide KKTK situé sur la fibre et identifié comme pouvant correspondre à un site de fixation des molécules HSPG (Dechecchi, Melotti, Bonizzato, Santacatterina, Chilosi, et Cabrini 2001b; Dechecchi et al. 2000; Bayo-Puxan et al. 2006). Le second vecteur est l'adénovirus Ad5-PbEGD-GFP qui porte la mutation R340E donnant un vecteur ou le motif RGD de la base de penton est muté en EGD. Le FX est utilisé à sa concentration physiologique de 8  $\mu$ g/mL. En présence de FX, la fixation des deux mutants aux HS est augmentée (**Figure 32 C**). Comme pour le vecteur Ad5wt, aucune amélioration dans l'attachement des particules virales mutantes aux HS n'a été obtenue en présence de FXGL. Ces résultats confirment des résultats antérieurs démontrant l'interaction entre le domaine Gla du FX et les capsomères d'hexon (Kalyuzhniy, N C Di Paolo, et al. 2008; S Waddington et al. 2008). Les mutations au niveau du domaine KKTK et du motif RGD n'altèrent pas cette interaction.

### 6.2.2. L'expression d'HSPG à la surface des cellules est nécessaire pour leur transduction par l'Ad5wt en présence de FX.

Afin d'évaluer le rôle des HSPG dans l'efficacité de transduction de l'HAdV5wt, nous utilisons deux lignées cellulaires. La première correspond aux CHO-K1 dépourvues du récepteur CAR mais qui expriment des HSPG à leur surface. La seconde correspond aux cellules CHO-2241 dépourvues du récepteur CAR et des HSPG. Sur cellules CHO-K1, le FX, mais pas le FXGL, améliore de façon dose-dépendante l'efficacité de transduction du vecteur Ad5wt (**Figure 33A**). Aucun effet n'est obtenu sur les cellules CHO-2241 (**Figure 33B**). La présence d'HSPG à la surface des cellules CAR- est donc indispensable la transduction de ces dernières par l'HAdV5wt en présence de FX (Jenny A Greig et al. 2009; Coughlan L et al. 2010).



Figure 33: Comparaison de l'efficacité de transduction des cellules CHO K1 et CHO-2241 par le vecteur Ad5wt-GFP, en présence ou non de FX.

(A) : Les cellules CHO K1 ont été infectées avec le vecteur Ad5wt-GFP en présence de doses croissantes de FX et FXGL. FXmax et FXGLmax correspondent à une concentration de 8 mg/mL.

(B) : Les cellules CHOK1 et CHO-2241 ont été transduites par le vecteur Ad5wt-GFP à MOI 2500et MOI 5000 en présence ou non de FX (8  $\mu$ g/mL).

L'efficacité de transduction du vecteur est définie comme le pourcentage de cellules GFP positives multiplié par l'intensité moyenne de fluorescence. L'efficacité relative de transduction (RTE) correspond à l'efficacité de transduction obtenue en présence de FX divisée par l'efficacité de transduction obtenue sans FX.



Figure 34 : Comparaison de l'efficacité de transduction des cellules CHOK1 et CHO-2241 par des vecteurs adénoviraux sauvage et mutants en présence ou non de FX.

(A) : Trois vecteurs adénoviraux : l'Ad5wt, l'AdV5F<sup>TTAT</sup> et l'AdV5Pb<sup>EGD</sup> sont utilisés à MOI 2500 pour réaliser l'infection ; l'efficacité de transduction (TE) est exprimée en unité arbitraire (AU)
(B) : Les cellules CHO K1 ont été transduites par le vecteur AdV5F<sup>TTAT</sup> en présence de doses croissantes de FX.

(B) : Les cellules CHO K1 ont été transduites par le vecteur AdV5F<sup>11A1</sup> en présence de doses croissantes de FX. Les résultats sont exprimés en efficacité relative de transduction (RTE).

#### 6.2.3. Les motifs KKTK (de la fibre) et RGD (de la base de penton) n'interviennent pas dans la transduction des cellules exprimant des molécules d'HSPG par l'Ad5wt en présence de FX.

Il est admis que des mutations au niveau du domaine KKTK situé sur la fibre de l'HAdV5wt interfèrent dans le transport des virions au noyau de la cellule hôte (Dechecchi, Melotti, Bonizzato, Santacatterina, Chilosi, et Cabrini 2001b; Kritz et al. 2007). De plus, une mutation au niveau du domaine RGD situé dans la base de penton affecte l'entrée de la particule virale dans la cellule hôte. En effet, le motif RGD interagit avec les intégrines cellulaires ce qui permet l'entrée du virus dans la cellule. L'efficacité de transduction des cellules CHO-K1 et CHO-2241 en présence de FX a été analysée en utilisant les vecteurs adénoviraux mutants AdV5F<sup>TTAT</sup> et Ad5-PbEGD-GFP.

L'efficacité de transduction des CHO-K1 et des CHO-2241 par les deux vecteurs est faible en l'absence de FX. En présence de doses croissantes de FX, l'efficacité de transduction des CHO-K1 augmente progressivement alors que celle des CHO-2241 n'est pas modifiée (**Figure 34**).

Le FX rétablit l'infectivité des vecteurs AdV5F<sup>TTAT</sup> et Ad5-PbEGD-GFP dans des cellules présentant des HSPG à leur surface. Les motifs KKTK et RGD n'ont aucun rôle dans la fixation du FX aux HSPG.

### 6.2.4. Mise en évidence d'un comportement paradoxal du vecteur chimérique Ad5F35 vis-à-vis du FX et des HSPG

Les travaux précédents ont permis de caractériser les capacités du vecteur chimérique Ad5F35. Ce vecteur présente une efficacité de transduction améliorée de 20 fois comparée au vecteur Ad5wt ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression du transgène de 5 fois. Il n'induit pas ou peu de réponse immune une fois introduit dans l'organisme.

Une analyse phylogénétique des fibres des adénovirus a révélé l'absence du domaine KKTK dans la plupart des sous-groupes adénoviraux à l'exception du sous-groupe C (Darr et al. 2009). Notre vecteur chimérique est donc dépourvu de ce motif, tout comme le vecteur AdV5F<sup>TTAT</sup>, et interagit avec les HSPG via des domaines de protéines de capsides autres que le knob de la fibre (Sebastian Tuve et al. 2008). Nous avons évalué la capacité du vecteur Ad5F35 à se fixer aux HS en présence ou non de FX. Nous avons tout d'abord validé l'interaction entre le FX et l'Ad5F35 par SPR. L'Ad5F35 se fixe fortement au FX en comparaison à l'Ad5wt et interagit avec les HS en présence de FX (**Figure 35**). L'efficacité de transduction des CHO-K1 par l'Ad5F35 en présence de FX a alors été déterminée et comparée à celle obtenue pour l'Ad5wt.



Figure 35 : Analyse par SPR de la fixation du vecteur chimérique AdV5F35 à la surface de FX immobilisé (A) et d'HS immobilisés (B, C) en présence de FX.

(A) : L'Ad5wt et l'AdV5F35 ont été injectés à deux concentrations : 2.10<sup>9</sup> pp/mL et 4.10<sup>9</sup> pp/mL.
(B) : Comparaison de la fixation des particules adénovirales d'Ad5wt et d'AdV5F35 (2.10<sup>9</sup> pp/mL) aux HS en

présence de FX ou FXGL (720 copies / pp).

(C): La fixation de l'AdV5F35 aux HS est dépendant de la concentration en FX utilisée.

Une nette diminution (d'un facteur 3 à 4) de celle-ci a été obtenue pour de fortes MOI (**Figure 36**). Ce résultat est paradoxal. En effet, les vecteurs Ad5wt et Ad5F35 possèdent les mêmes protéines d'hexon (de sérotype 5) et se fixent au FX. Le complexe FX-Ad5F35 interagit avec les HS immobilisés et les HSPG avec une meilleure affinité que l'Ad5wt.

La prochaine étape de notre étude a consisté à déterminer les raisons d'un tel paradoxe.

### 6.2.5. Fixation et internalisation du complexe FX-Ad5F35 dans les cellules CHO exprimant les molécules d'HSPG.

Nous avons alors comparé les étapes précoces du cycle viral des deux vecteurs en présence de FX. Pour cela, nous utilisons les cellules CHO-K1, cellules permettant d'étudier l'entrée des complexes via la fixation du FX aux HSPG uniquement.

#### 6.2.5.1. Fixation aux cellules

Les cellules CHO-K1 sont transduites par le complexe FX-vecteur adénoviral (MOI 5000) à froid (4°C) afin de permettre uniquement l'étape de fixation alors que les autres étapes du cycle viral sont bloquées à cette température (Gaden et al. 2004). Nous démontrons, par analyse qPCR, que le FX augmente la fixation de l'Ad5 d'un facteur 5 et celle de l'Ad5F35 d'un facteur 10 (**Figure 37 A**). Ces résultats confirment nos précédents résultats mais n'expliquent pas la faible efficacité de transduction du complexe FX-Ad5F35.

#### 6.2.5.2. Entrée dans la cellule

Les étapes d'endocytose, d'internalisation et d'échappement du complexe FX-vecteur adénoviral sont alors analysées par qPCR. On observe, en présence de FX, une augmentation de l'absorption des particules d'Ad5 et d'Ad5F35 respectivement d'un facteur 2 et d'un facteur 4 (**Figure 37 A**). Ces étapes ne sont pas impliquées.



Figure 36: Comparaison de l'efficacité de transduction et du niveau d'expression du transgène GFP entre les vecteurs adénoviraux Ad5wt, AdV5F35 à différentes MOI (200, 1000, et 5000) en présence ou non de FX.

Les cellules CHO K1 et CHO-CD46 ont été transduites aux différentes doses virales en présence ou non de FX puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules GFP positives (A) ou (B) en efficacité relative de transduction (RTE).



Figure 37: Comparaison de l'absorption cellulaire (A) et de la libération cellulaire (B) des vecteurs Ad5wt et AdV5F35 par les cellules CHO K1.

(A) La fixation des particules adénovirales (MOI 5000) aux cellules CHO K1 est réalisée pendant 1h à 4°C puis l'étape d'internalisation est réalisée à 37°C pendant 1h en présence ou non de FX. Une analyse par qPCR permet de déterminer le nombre de copie génome d'Ad par cellule.

(B) La présence de vecteurs adénoviraux associés aux exosomes ou microvésicules présents dans le milieu extracellulaire récolté 72h post-infection est déterminé par qPCR.

#### 6.2.5.3. Libération extracellulaire

La voie d'exocytose a alors été étudiée. L'Ad5F35 peut être libéré dans le milieu extracellulaire via des vésicules membranaires bourgeonnant de la membrane plasmique, les microvésicules, ou via les exosomes libérés après exocytose des corps multivésiculaires (Cocucci et al. 2007). Les microvésicules et exosomes sont purifiés à partir du surnageant de culture des cellules infectées par les 2 vecteurs adénoviraux en présence ou non de FX pendant 2 heures et 48 heures. L'ADN des populations vésiculaires est extrait et analysé par qPCR (**Figure 37 B**). En l'absence de FX, d'importantes quantités de génome d'Ad5 sont détectées dans les microvésicules et les exosomes. Ces quantités diminuent lorsque la transduction est réalisée en présence de FX. Concernant l'Ad5F35, aucun génome n'est détecté dans les vésicules en l'absence de FX. En revanche, le nombre de génomes d'Ad5F35 augmente drastiquement en présence de FX et cette observation s'observe majoritairement dans les exosomes. Le trafic intracellulaire du vecteur Ad5F35 est donc responsable de la faible efficacité de transduction des cellules CHO-K1. La suite de notre étude consiste à déterminer quel compartiment cellulaire est impliqué.

### 6.2.6. Trafic intracellulaire et compartimentalisation du complexe FX-Ad5F35 dans les cellules CHO K1

#### 6.2.6.1. Imagerie cellulaire en temps réel

Afin de visualiser le trafic intracellulaire des deux vecteurs Ad5 et Ad5F35 complexés au FX au cours des 4 premières heures de l'infection, les capsides de l'Ad5 et de l'Ad5F35 ont été marquées à l'Alexa 488. Dès 20 à 30 minutes post-infection, la majorité des particules d'Ad5 sont observées à proximité ou à l'intérieur du noyau (**Figure 38** A). Cette observation confirme le processus rapide d'endocytose, d'échappement de l'endosome et du trafic intracellulaire des vecteurs Ad5wt décrit par Greber (U F Greber et al. 1993; U F Greber et al. 1996). Nos données suggèrent que le FX n'a aucun effet sur les particules d'Ad5wt internalisées et sur la cinétique de leur transport dans la cellule. Le FX agit donc au cours des étapes précoces de l'infection, l'attachement et l'entrée cellulaire.

Le profil obtenu pour l'Ad5F35 est différent. Les particules sont observées uniquement dans le cytoplasme de la cellule jusqu'à 3h post-infection. Aucune d'entre elles n'est retrouvée au niveau du noyau. (**Figure 38 B**). L'Ad5F35 présente un trafic intracellulaire ralenti.

# (A) FX-HAdV5wt / CHO-K1 (i) (B) FX-HAdV5F35 / CHO-K1 (i) đ (111) (C) FX-HAdV5F35 / Lamp1-CHO-K1 (İİ) (i) (iiii) (iv)

Figure 38: Clichés de microscopie confocale sur les cellules CHO K1 transduites par différents vecteurs adénoviraux.

Les cellules CHO K1 ont été transduites avec le vecteur Ad5wt (A) et le vecteur AdV5F35 (B, C). L'observation a été réalisée respectivement 30 min post-infection (A) et 3h post-infection (B, C). Concernant le cliché C, les cellules CHO K1 ont été transduites avec un vecteur baculoviral exprimant le marqueur des endosomes tardifs, lamp1 couplé à la rhodamine (signal orange, C (iii) 24 heures avant l'infection adénovirale. Les vecteurs adénoviraux sont marqués à l'Alexa 488 (signal vert, i). Les images (ii) correspondent à l'observation en contraste de phase. La superposition des signaux sont visibles en (A, B iii et en C iv).

#### 6.2.6.2. Rétention de l'Ad5F35 dans le compartiment endosomal tardif.

Afin de déterminer dans quel compartiment l'Ad5F35 est séquestré, nous avons transduit les cellules CHO à l'aide du vecteur adénoviral Ad5F35 et de vecteurs baculoriraux exprimant des marqueurs spécifiques des différents compartiments cellulaires. Une colocalisation entre les particules adénovirales et le baculovirus exprimant le marqueur Lamp-1 couplé au fluorochrome RFP est observé. LAMP-1 est un marqueur du compartiment endosomal tardif / lysosome (**Figure 38 C**). L'Ad5F35 serait donc séquestré dans le compartiment endosomal tardif, ce qui expliquerait le retard observé lors de son trafic intracellulaire.

### 6.2.7. Observation des particules d'Ad5wt et d'Ad5F35 internalisées dans les cellules en présence ou non de FX par microscopie électronique.

En l'absence de FX, comme attendu, peu de particules d'Ad5wt sont observées dans les vésicules ou le cytoplasme des cellules CHO-K1 dépourvues de CAR (**Figure 39 A**). L'Ad5 se fixe à un récepteur alternatif exprimé par les CHO-K1.

En présence de FX, les quelques virions d'Ad5wt retrouvés dans des vésicules semblent être associés à du matériel peu dense aux électrons. Très peu de particules sont retrouvées dans les cellules 24h postinfection (**Figure 39 B**). Ceci concorde avec le transport rapide des particules d'Ad5wt au noyau.

Le profil obtenu est différent pour les cellules CHO K1 infectées par l'Ad5F35 pendant 2h en présence de FX. Nous observons uniquement de larges vésicules contenant en quantité importante du matériel dense aux électrons (**Figure 40**). Ces observations confirment nos résultats obtenus en microscopie confocale démontrant l'accumulation d'Ad5F35 dans les lysosomes. Ce vecteur se fixe à la surface des cellules par l'intermédiaire d'un « pont » correspondant à du matériel filamenteux (**Figure 40 b à d**). La taille du « pont » varie de 80 à 140 nm, valeur pouvant correspondre à l'épaisseur de la couche microfibrilaire du glycocalix.

Sur CHO-CD46 en absence de FX, l'Ad5F35 est observé à une distance d'environ 13 nm de la membrane plasmique. Cette distance correspond à la longueur de sa fibre lui permettant de se fixer au récepteur CD46. Un agrandissement au niveau du site de fixation des particules permet d'observer du matériel flou décorant la capside (**Figure 40 d**). Ceci confère au complexe Ad5F35-FX un plus grand diamètre (soit 107 nm +/- 6 nm). Nous supposons que le matériel émanant de la cellule correspond aux HSPG constitutifs du glycocalix alors que le matériel décorant la capside virale correspond au FX fixé aux protéines hexon.



**Figure 39: Clichés de microscopie électronique des cellules CHO K1 transduites par le vecteur Ad5wt.** Les cellules CHO K1 ont été infectées par le vecteur Ad5wt à une dose virale de 10 000 pp/cellules en absence de FX (A) ou en présence de FX (B). Les clichés (A, i) et (A, ii) montrent une vue d'ensemble d'une cellule ou des particules adénovirales intravésiculaires (i) et cytoplasmiques (ii) sont observées. Les clichés (A, iii) et (A, iv) montrent une particule adénovirale dans une vésicule à clathrine (CCV).

En présence de FX (B), les particules adénovirales sont endocytosées dans une vésicule située à proximité de pores nucléaires (B, i), ou sont en train de franchir le pore nucléaire (B, ii). *NPC, Nuclear Pore Complex* 

### 6.2.8. Absorption cellulaire et rétention du FX en présence ou non des particules adénovirales.

Il était important de connaître le devenir du FX après la fixation du complexe Ad-FX à la cellule. Etait-il coendocytosé avec les particules virales ou restait-il à l'extérieur de la cellule ?

Nous avons réalisé alors plusieurs marquages fluorescents. Le FX a été marqué à l'Alexa 555 et les particules adénovirales ont été marquées à l'Alexa 488. Une co-incubation est alors réalisée. Le FX couplé aux particules adénovirales est utilisé pour réaliser l'infection des cellules CHO K1. Le FX seul, utilisé comme contrôle, a été incubé aux cellules CHO K1.

Le FX seul se fixe aux CHO K1 et pénètre rapidement par endocytose dans les cellules en 15 à 20 minutes. Les cellules transduites par le complexe Ad5-FX ou Ad5F35-FX émettent le double signal fluorescent dès 15 à 20 min post infection. Les 2 signaux colocalisent dans le cytoplasme des cellules (**Figure 41**). Après 45 à 60 min d'infection, les particules d'Ad5 sont localisées dans le noyau (moins de colocalisation avec le FX est observée). Les particules d'Ad5F35 et le FX restent colocalisés dans le cytoplasme. Ces résultats confirment nos précédentes données. L'Ad5 transite rapidement dans la cellule alors que l'Ad5F35 est retenu dans des vésicules.

Nous nous sommes intéressés aux conditions de rétention de l'Ad5F35 complexé au FX dans les endosomes tardifs dont le contenu est plus acide (pH 5,7) que celui des endosomes précoces (pH 6,3). Nous avons analysé, par SPR, l'affinité entre le FX et les capsomères d'hexon de sérotype 5 communs aux deux vecteurs adénoviraux. Le FX est immobilisé sur la puce, les protéines d'hexon sont diluées dans un tampon de pH variable. A pH acide (pH 5,7) l'affinité apparente de l'hexon pour le FX est supérieure à celle obtenue à pH 6,3 ou à pH neutre (**Figure 42**). La rétention des particules dans ces compartiments serait la conséquence d'une forte affinité entre le FX et ces dernières à pH acide.


**Figure 40: Clichés de microscopie électronique des cellules CHO K1 transduites par le vecteur AdV5F35.** Les cellules CHO K1 et CHO-CD46 ont été transduites avec le vecteur AdV5F35 à une dose virale de 10 000 pp/cellules en présence de FX (8 µg/mL).

Dans les cellules CHO K1, des vésicules contenant du matériel dense aux électrons sont observées (a). Une comparaison de la fixation des particules adénovirales à la surface des cellules CHO K1et CHO-CD46 est montrée dans les clichés (b-d, e). Une différence de taille et de netteté du contour de la particule virale est observée suivant le type cellulaire considéré.

#### 6.3. Conclusions et perspectives

Dans cette étude nous avons mis en évidence certains indices pouvant expliquer pourquoi les Ads de sous-groupe B tel que l'Ad35 ou le vecteur chimérique Ad5F35 présentent un tropisme hépatique diminué.

Bien que le facteur X de coagulation améliore l'interaction entre l'Ad5F35 et les HS *in vitro*, ainsi que l'interaction entre l'Ad5F35 et les HSPG *in vivo*, ce dernier inhibe la transduction des cellules CHO CAR (-), CD46 (-), HSPG (+) par l'Ad5F35.

Nous avons analysé les voies d'entrée et de trafic intracellulaire de l'Ad5F35 complexé au facteur X. L'étape d'attachement n'est pas impliquée. Le facteur X (FX) interviendrait au niveau du trafic intracellulaire de la particule dans la cellule cible (Greig et al., 2009). La protéine fibre 35 s'est révélée déterminante dans l'internalisation et le transit intracellulaire du vecteur chimérique. En effet, cette protéine adresse les particules aénovirales aux compartiments endosomales tardifs et/ou lysosomales. En présence du FX, l'Ad5F35 est séquestré dans ces compartiments et atteindra le noyau de la cellule plus tardivement. Nous avons montré que les complexes FX-Ad5F35 sont éliminés par de petites vésicules membranaires libérées par exocytose, les exosomes. Ce mécanisme n'est pas observé pour les particules d'Ad5 complexées ou non au FX. Le FX a donc un effet inhibiteur sur l'infection adénovirale médiée par les Ad de sous-groupe B ou apparentés.

Nous avons ainsi démontré que la protéine fibre a un effet prédominant sur le trafic intracellulaire des particules adénovirales même en absence du récepteur cellulaire primaire. L'endocytose et la séquestration du complexe FX-Ad5F35 dans le compartiment endosomal tardif sont caractéristiques d'un effet prépondérant de la fibre par rapport à l'interaction de haute affinité entre le FX et la protéine hexon de l'Ad5. Il serait intéressant de déterminer les mécanismes moléculaires et les facteurs impliqués dans ce déterminisme cellulaire.



Figure 41 : Clichés de microscopie confocale de cellules CHO K1 incubées avec du FX seul ou des vecteurs adénoviraux.

Les cellules CHO K1 ont été transduites avec le FX seul ou couplé avec le vecteur Ad5wt (B, C), ou le vecteur AdV5F35 (D). Les vecteurs adénoviraux sont marqués à l'Alexa 488 (signal vert, iii), le FX est marqué à l'Alexa-555 (signal orange, ii). Les images ont été réalisées toutes les 10 minutes jusqu'à 3h post-infection.



**Figure 42 : Analyse par SPR de l'interaction entre le FX et la protéine hexon en fonction du pH.** Le FX est immobilisé sur les puces. Plusieurs solutions de protéine hexon à différents pH sont testées (pH 5.7, 6.3, et 7).

# PARTIE II



#### (a) Microscopie confocale (CF-KM4 / Ad5-GFP-CFTR)



**Figure 43 : Mise en évidence de l'effet négatif d'un vecteur adénoviral sur l'activité CFTR.** (a) Les cellules CF-KM4 ont été transduites par le vecteur Ad5-GFP-CFTR à différentes doses virales comprises entre 500 et 2500 pp/cellule pendant 48 et 96 heures.

(b) Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression du transgène GFP-CFTR dans les cellules CF-KM4 et MM39 transduites par le vecteur Ad5-GFP-CFTR à des doses virales comprises entre 500 et 2000 pp/cellule.
(c) Clichés de microscopie confocale sur les cellules CF-KM4 transduites par le vecteur Ad5-GFP-CFTR à MOI 1250 et 2500 et fixées à 48h après infection.

#### 7. Deuxième partie : Le vecteur chimérique Ad5F35-GFP-CFTR permet de restaurer l'activité CFTR après transduction par le pôle apical d'épithéliums respiratoires reconstitués de patients atteints de mucoviscidose et sans effets cytotoxiques apparentés. Article en annexe

#### 7.1. Introduction

La mucoviscidose est une maladie génétique causée par des mutations dans le gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). L'objectif de cette étude a été de caractériser et comparer les vecteurs Ad5-GFP-CFTR et Ad5F35-GFP-CFTR en termes d'efficacité de transduction et de restauration de l'activité canal à ions chlorure du CFTR au sein d'épithéliums pulmonaires reconstitué. Un phénomène de toxicité cellulaire, caractérisé par l'inhibition de l'activité canal à chlorure du CFTR, après transduction à hautes doses virales d'Ad5-GFP-CFTR sur les cellules CF-KM4 et MM39 a été mis en évidence précédemment au laboratoire (Granio et al. 2007).

Notre démarche expérimentale a été tout d'abord de déterminer quelle pouvait être la cause de cet effet négatif sur l'activité canal à chlorure du CFTR. Est-ce dû au transgène lui-même, à l'expression des gènes viraux ou à une/des protéines virales de la capside ?

Nous avons adapté le vecteur chimérique Ad5F35-GFP développé au laboratoire dans l'optique d'une application en thérapie génique de la mucoviscidose, et construisant le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR. Nous l'avons caractérisé en termes d'amélioration d'efficacité de transduction et de correction de l'activité canal à chlorure CFTR.

#### 7.2. Résultats et discussion

### 7.2.1. Mise en évidence d'un effet inhibiteur sur l'activité canal à chlorure du CFTR après transduction par le vecteur Ad5-GFP-CFTR.

Il a précédemment été démontré que le vecteur Ad5-GFP-CFTR est capable de restaurer l'activité canal à ions chlorure CFTR dans les cellules CF-KM4 et dans les cellules constitutives d'épithéliums primaires pulmonaires reconstitués (HAE) (Granio et al. 2007). Cependant, une relative inhibition de l'activité canal à chlorure a été observée à la suite de la transduction, à hautes doses virales, de deux lignées cellulaires : CF-KM4 et MM39. La lignée CF-KM4 est déficiente en CFTR (mutation  $\Delta$ F508) et la lignée MM39 possède un CFTR normal. Le phénomène d'inhibiton du CFTR agit donc au niveau du CFTR exogène (apporté par le vecteur) et du CFTR endogène présent dans les cellules MM39 (**Figure 44 a**). Afin de déterminer si cet effet inhibiteur survenait à l'étape transcriptionnelle, les cellules MM39 ont été transduites avec des doses croissantes de vecteur Ad5-GFP-CFTR. L'effet inhibiteur est retrouvé à la dose de 2500 particules physiques / cellules, dose considérée comme toxique pour l'Ad5-GFP-CFTR. L'analyse par PCR quantitative du niveau d'expression de l'ARNm



Figure 44 : Mise en évidence de l'effet négatif d'un vecteur adénoviral sur l'activité CFTR.

Les cellules MM39 ont été transduites par des doses croissantes de vecteurs adénoviraux Ad5-GFP-CFTR ou Ad5-GFP (de 250 à 2500 pp/cellule) ou de particules vides dépourvues de génome adénoviral.

(a) Les cellules MM39 ont été transduites par des doses croissantes de vecteur Ad5-GFP-CFTR puis analysées en efflux d'iode 48h après infection.

(b) Les cellules MM39 ont été transduites par des doses croissantes de vecteur Ad5-GFP puis analysées en efflux d'iode 48h après infection.

(c) Les cellules MM39 ont été incubées pendant 1h à 37°C avec des particules adénovirales dites « vides » dépourvues de génome viral.



Figure 45 : L'effet inhibiteur sur le CFTR est dû aux protéines de la capside adénovirale (a-d), et cartographie de l'activité inhibitrice sur la molécule de base de penton (e-g).

Les cellules MM39 ont été mises en contact avec des quantités de protéines adénovirales équivalentes aux protéines contenues dans des particules physiques adénovirales (equivalent pp/cell) allant de 1000 à 25 000 pendant 1h à 37°C. L'activité canal à ions chlorure a été analysée en test d'efflux d'iode.

(a) Les cellules MM39 ont été incubées avec des particules adénovirales traitées au désoxycolate.

Les protéines adénovirales testées sont : (b) la protéine hexon ; (c) la protéine fibre ; (d) la protéine penton (constituée de la base de penton et de la fibre) ; (e-h) mutants de la base de penton recombinante.

GFP-CFTR à haute dose virale n'indique pas de diminution de ce dernier pour les MOI utilisées (MOI 500 à 2000). L'inhibition de l'activité canal à chlorure du CFTR n'est donc pas liée au niveau de transcription de l'ARNm GFP-CFTR (**Figure 43 b**).

### 7.2.2. L'inhibition de l'activité canal à ions chlorure est due aux protéines virales de capsides

L'effet négatif du vecteur Ad5 sur le CFTR pourrait être (1) liée au transgène CFTR, (2) être la conséquence de l'expression de certains gènes viraux ou (3) être liée aux protéines adénovirales ellesmêmes.

Nous avons tout d'abord analysé l'effet du vecteur Ad5-GFP-CFTR sur l'activité de canal à chlorure du CFTR endogène des cellules MM39 par test d'efflux d'iode. Une inhibition à haute dose virale (2500 pp/cellule) est observée (**Figure 44 a**). L'effet négatif du vecteur survient donc au niveau du CFTR endogène (MM39) et exogène (CF-KM4). Afin de déterminer si cette inhibition est liée à la cytotoxicité de la GFP utilisée dans la fusion GFP-CFTR, les cellules MM39 ont été transduites par des doses croissantes de vecteur Ad5-GFP. L'effet inhibiteur est retrouvé avec ce vecteur à une dose virale équivalente à celle déterminée comme toxique pour le vecteur Ad5-GFP-CFTR soit 2500 pp/cellules (**Figure 44 b**). L'effet négatif du vecteur sur le CFTR n'est pas lié au transgène CFTR, mais pourrait être lié à l'expression du transgène GFP.

Cependant, lorsque des particules vides d'Ad5 dépourvues de génome viral sont incubées avec les cellules MM39, on observe une inhibition du CFTR endogène à haute dose virale (2500 pp/cellule) (**Figure 44 c**). L'effet négatif sur le CFTR n'est donc pas lié à l'expression du transgène ou des gènes viraux. Le même effet est observé lorsque les cellules MM39 sont mises en contact avec des particules adénovirales lysées au desoxycholate. Une ou plusieurs protéines de la capside virale sont donc responsables de l'inhibition de l'activité de canal à chlorure du CFTR (**Figure 45 a**).

#### 7.2.3. L'effet négatif sur le CFTR est dû à la protéine de capside base de penton.

Les trois protéines majoritaires de capside (hexon, fibre et penton) ont été analysées séparément sur les cellules MM39. Chacune des protéines a été mise en contact avec les cellules MM39 à des doses correspondant à celles contenues dans des particules virales complètes soient des doses comprises entre 1000 et 2500 pp/cellule. Aucun effet inhibiteur n'est obtenu avec les protéines hexon et fibre à 2500 pp/cellule (**Figure 45 b et c**). Un effet négatif sévère est obtenu en présence de penton. Cette protéine est constituée de la base de penton associée à la fibre (**Figure 45 d**). L'inhibition de l'activité de canal à chlorure du CFTR est associée à la protéine base de penton car la fibre seule ne présente aucun effet.

Deux mutants de la protéine base de penton recombinante ont alors été testés. Le premier correspond au mutant ponctuel PbY553F qui a perdu la capacité de former des pentamères et se trouve sous forme monomérique soluble (Karayan et al., 1994).



Figure 46 : Analyse par test d'efflux d'iode de l'activité CFTR en présence des vecteurs adénoviraux Ad5Pb<sup>EGD</sup>GFP, Ad5GFPΔknob et Ad5GFP-R7-RGD4C

Les cellules MM39 ont été analysées en test d'efflux d'iode après transduction par :

(a) le vecteur Ad5Pb<sup>EGD</sup>GFP

(b) le vecteur Ad5GFP $\Delta$ knob

(c) le vecteur Ad5GFP-R7-RGD4C





(a) Les cellules MM39 ont été transduites avec des doses croissantes de vecteurs Ad5F35-GFP (0 à 5000 pp/cellule) puis analysées en test d'efflux d'iode à 48h post-infection.

(b) Les cellules MM39 ont été incubées avec les protéines adénovirales base de penton sauvage (WT Pb, barre grise), base de penton EGD (Pb-EGD, barre noire) et knob (barre blanche) puis transduites par les vecteurs Ad5-GFP et Ad5F35-GFP à MOI 50. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP par rapport aux cellules transduites sans protéines compétitrice

Le second correspond au mutant PbAt69 délété des 68 résidus N-terminaux de la base de penton. Le domaine N-terminal de la base de penton porte plusieurs motifs WW cibles de l'ubiquitine-ligase Nedd4. Il a récemment été démontré que la modification de la base de penton par ubiquitination serait responsable de l'adressage des composants de la capside au protéasome et de la décapsidation adénovirale (Wodrich et al., 2010). Le rôle du domaine cible de l'ubiquitination dans l'effet négatif de la base de penton sur le CFTR a été analysée avec le mutant PbAt69. Un effet négatif important sur le CFTR est observé avec ces deux vecteurs (**Figure 45 f et g**).L'effet négatif sur le CFTR n'est donc pas dépendant de la pentamérisation de la base de penton et du signal WW de reconnaisance de l'ubiquitine-ligase Nedd4.

Le rôle de la séquence RGD vis-à-vis de la fonction canal à ions chlorure du CFTR a été analysée par l'analyse phénotypique du vecteur viral Ad5Pb<sup>EGD</sup>GFP.

### 7.2.4. Le motif RGD de la base de penton est responsable de l'effet négatif observé sur l'activité du CFTR.

Seul le penton complet a un effet négatif sur les cellules suggérant l'implication d'un motif unique présent sur cette protéine. La base de penton correspond à une protéine pentamérique qui porte cinq motifs RGD. Ces motifs sont impliqués dans l'endocytose des vecteurs Ad5. En effet, ils permettent la fixation des particules adénovirales de sérotype 5 aux intégrines cellulaires médiant ainsi l'endocytose de ces dernières dans la cellule-cible. Afin de déterminer le rôle éventuel de ce motif dans le phénomène de toxicité cellulaire observé après transduction à hautes doses virales de vecteurs Ad5, le vecteur mutatnt Ad5Pb<sup>EGD</sup> a été utilisé. Ce vecteur porte la mutation R340E et les motifs RGD de la base de penton sont mutés en EGD. Aucun effet n'est observé avec ce vecteur à hautes doses virales (**Figure 46 a**).

Deux autres mutants ont été testés. Le premier est l'Ad5GFP $\Delta$ knob qui présente une délétion du domaine knob et d'une partie du domaine tige de la fibre. Ainsi ce vecteur a une fibre plus courte et une base de penton « sauvage » plus accessible aux ligands cellulaires. Le second vecteur est l'Ad5-GFP-R7-RGD4C qui porte des motifs RGD cycliques en C-terminal de la fibre. Un effet négatif important sur le CFTR directement corrélé à la dose virale est observé avec ces deux vecteurs (**Figure 46 b, c et d**). La fibre n'a aucun effet sur le CFTR.

Il apparaît clairement que l'effet négatif sur l'activité CFTR est dû au motif RGD de la base de penton, responsable de l'internalisation des vecteurs adénoviraux après interaction avec les intégrines cellulaires.



Figure 48 : Analyse en microscopie à fluorescence de trois lignées cellulaires (CF-KM4, MM39 et A549) transduites par l'Ad5F35-GFP et l'Ad5-GFP.

Les cellules ont été transduites avec le vecteur Ad5F35-GFP (a) et l'Ad5-GFP (b) à différentes doses virales (comprises entre 0 et 1000 pp/cellule) puis fixées 48h après infection.



### Figure 49 : Analyse en test d'efflux d'iode de l'activité CFTR des cellules CF-KM4 transduites par le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR.

Les cellules CF-KM4 ont été transduites par le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR à différentes doses virales (de 0 à 2000 pp/cellule) puis l'analyse en test d'efflux d'iode a été réalisée après 48h d'infection.

(a) Représentation graphique des résultats de test d'efflux d'iode obtenus après transduction des cellules CF-KM4 par l'Ad5F35-GFP-CFTR (\*) P<0,005 ; (\*\*) P<0,01 ; (\*\*\*) P<0,001 ; ns : non significatif.

(b) Représentattion graphique du pourcentage d'activation du canal CFTR en fonction de la dose virale testée (MOI). Le maximum d'activation est obtenu pour une dose virale de 2000 pp/cellule.

#### 7.2.5. Développement d'un vecteur chimérique : l'Ad5Fi35-GFP-CFTR

Les expériences précédentes nous permettent d'associer le phénomène d'inhibition de l'activité à canal chlorure du CFTR aux motifs RGD de la base de penton impliqué dans l'internalisation des particules d'Ad5 dans la cellule.

Une étude précédente menée au laboratoire a montré que le vecteur chimérique Ad5F35-GFP présentait une efficacité de transduction améliorée de 20% comparée au vecteur Ad5-GFP ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression du transgène de cinq fois (Granio et al. 2007). Ce vecteur utilise une voie d'entrée cellulaire indépendante des intégrines cellulaires. Il se lie au récepteur CD46 et pénètre dans la cellule par la voie des endosomes tardifs et des lysosomes. Nous avons analysé le vecteur Ad5F35-GFP en test d'efflux d'iode afin de déterminer s'il présentait un effet négatif éventuel sur le CFTR des cellules MM39. Aucune diminution de l'activité CFTR endogène n'a été détectée suite à l'application de doses croissantes de vecteur (jusqu'à 5000 pp/cellule). Le vecteur chimérique ne présente pas de toxicité cellulaire (**Figure 47 a**).

Afin de valider l'hypothèse selon laquelle l'Ad5F35-GFP utilise une voie d'entrée indépendante du motif RGD, une expérience de compétition entre l'Ad5F35-GFP ou l'Ad5-GFP et les protéines de capsides (fibre et base de penton) a été réalisée. Les résultats obtenus confirment bien une différence dans l'attachement des deux vecteurs à la cellule cible (**Figure 47 b**).

L'efficacité de transduction des vecteurs Ad5F35-GFP et Ad5-GFP a été comparée sur trois lignées cellulaires (MM39, CF-KM4 et A549). Dans les trois cas, l'Ad5F35-GFP montre une meilleure efficacité de transduction que l'Ad5-GFP. La voie d'entrée de ce vecteur est plus efficace que celle empruntée par l'Ad5-GFP (**Figure 48**)

#### 7.2.6. Restauration de l'activité CFTR après transduction par l'Ad5F35-GFP-CFTR à faibles MOI.

Afin de tester la capacité du vecteur chimérique à restaurer l'activité CFTR des cellules CF, des cellules CF-KM4 ont été transduites par des doses croissantes de ce vecteur (MOI 50 à 200 pp/cellule) puis analysées en efflux d'iode. Dès la dose la plus faible (50 pp/cellule), on obtient une activation de 25 % du canal CFTR (**Figure 49 a**). En comparaison, un résultat identique a été obtenu pour l'Ad5-GFP à partir de 800 pp/cellule. Pour l'Ad5-GFP-CFTR la correction maximale du CFTR est obtenue à 1250 pp/cellule, avec un effet négatif dès 1600 pp/cellule. Pour l'Ad5F35-GFP-CFTR, le maximum de correction de CFTR est obtenu à partir de 1000 pp/cellule pour l'Ad5Fi35-GFP. Aucun effet négatif n'est observé même à hautes doses du vecteur Ad5F35-GFP-CFTR (**Figure 49b**).



### Figure 50 : Mise en évidence de l'efficacité de transduction du vecteur Ad5F35-GFP-CFTR via le pôle apical d'épithéliums reconstitués de patients mucoviscidosiques (CF-HAE).

(A) Clichés de microscopie à fluorescence de CF-HAE transduits via le pôle apical par l'Ad5GFP-CFTR (a) et l'Ad5F35-GFP-CFTR (b) à MOI 200 puis fixées 96h après infection.

(B) Représentation graphique du pourcentage de cellules constitutives du CF-HAE exprimant la protéine GFP-CFTR après transduction par l'Ad5GFP-CFTR (barre grise) et l'Ad5F35-GFP-CFTR (barre noire). Les cellules sont fixées et analysées par FACS 4 jours après l'infection.



### Figure 51 : Clichés de microscopie confocale d'épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose (CF-HAE) transduits via le pôle apical par l'Ad5F35-GFP-CFTR.

Les CF-HAE ont été transduits par le pôle apical, avec l'Ad5F35-GFP-CFTR à MOI 20 (A) et 200 (B) puis fixés et observés 3 jours après l'infection. Des coupes en x-y montrent le pôle apical des cellules (b) et des coupes en x-z ont été réalisées dans les préparations (a). Les protéines GFP-CFTR sont détectables par leur signal de fluorescence vert, les noyaux ont été marqués au DAPI et les jonctions serrées apicales (signal rouge) ont été marquées par un anticorps anti-ZO-1 révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa568.

### 7.2.7. L'Ad5Fi35-GFP-CFTR transduit de façon efficace par le pôle apical les épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose.

Les épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose ont été transduits par l'Ad5-GFP-CFTR ou l'Ad5F35-GFP-CFTR via le pôle apical à faibles doses virales (MOI 2 et 20). Aucune cellule exprimant la protéine GFP-CFTR n'a été détectée à ces deux MOI après transduction par l'Ad5-GFP-CFTR, contrairement aux cellules transduites par l'Ad5F35-GFP-CFTR, pour lesquelles 8 à 12 % expriment la protéine GFP-CFTR (**Figure 50**). Une transduction d'épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose via le pôle apical par les deux vecteurs adénoviraux a été réalisée afin de localiser la protéine GFP-CFTR. La protéine GFP-CFTR se localise de façon prédominante au pôle apical de l'épithélium comme le montre la colocalisation avec la protéine ZO-1 (**Figure 51**).

#### 7.2.8. Restauration de l'activité CFTR après transduction par l'Ad5F35-GFP-CFTR d'épithélium de patients mucoviscidosiques.

La capacité du vecteur chimérique à restaurer l'activité CFTR a été évaluée par test mesure du courant transépithélial dû au transport d'ions chlorure en chambre d'Ussing. Les épithéliums ont été transduits avec l'Ad5F35-GFP-CFTR à une dose virale de 200 pp/cellule. A 72h post-infection, l'analyse en chambre d'Ussing a été réalisée (**Figure 52 a**).

Notre vecteur chimérique restaure la fonction du CFTR en comparaison à l'Ad5-GFP-CFTR inoculé de façon identique.

Le vecteur chimérique Ad5F35-GFP-CFTR est donc capable de transduire efficacement des épithéliums reconstitués de patients atteints de mucoviscidose par le pôle apical et restaure l'activité canal chlore du CFTR. L'Ad5F35-GFP-CFTR présente une efficacité de transduction augmentée d'un facteur 30 comparée à celle de l'Ad5-GFP-CFTR (**Figure 52 b**).

### 7.2.9. Durée d'expression du transgène GFP-CFTR au sein d'épithéliums reconstitués transduits par le pôle apical.

La protéine GFP-CFTR est exprimée de façon stable jusqu'à cinq semaines au moins après transduction par le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR à la surface d'épithéliums reconstitués de patients CF. Avec le vecteur Ad5-GFP-CFTR, le nombre de cellules exprimant la protéine GFP-CFTR décroit très rapidement avec le temps.

Le vecteur chimérique Ad5F35-GFP-CFTR permet une expression durable du produit de son transgène GFP-CFTR après transduction via le pôle apical d'épithéliums reconstitués (**Figure 53**).



### Figure 52 : Mise en évidence de la restauration de l'activité CFTR dans des CF-HAE après transduction par l'Ad5F35-GFP-CFTR.

Des CF-HAE ont été transduits avec l'Ad5F35-GFP-CFTR à MOI 200 puis la mesure du courant transépithélial a été faite en chambre d'Ussing après 3 jours d'infection.

(A) Représentation schématique des résultats de test d'efflux d'iode obtenu après transduction de 3 CF-HAE par l'Ad5F35-GFP-CFTR. Symbole : (\*\*\*) P<0,001.

(B) Représentation graphique de la différence de restauration de l'activité CFTR obtenue après transduction des CF-HAE par l'Ad5F35-GFP-CFTR et l'Ad5GFP-CFTR à MOI 200 (a).



Figure 53 : Durée d'expression de la protéine GFP-CFTR au sein d'épithéliums reconstitués de patients sains (HAE) transduits par le pôle apical avec l'Ad5GFP-CFTR et l'Ad5F35-GFP-CFTR.

Des épithéliums reconstitués de patients sains ont été infectés par le pôle apical avec l'Ad5GFP-CFTR et l'Ad5F35-GFP-CFTR à MOI 200 (a) et MOI 600 (b). L'expression de la protéine GFP-CFTR a été suivie pendant 5 semaines. Aux temps indiqués, les cellules exprimant le signal GFP sont dénombrées dans une "millicells" contenant chacune  $5x10^5$  cellules épithéliales.

#### **7.3.** Conclusions et perspectives

Nous avons démontré dans cette étude qu'un phénomène de toxicité cellulaire, caractérisé par l'inhibition du canal à ions chlorure CFTR, était associé au motif RGD de la protéine adénovirale base de penton impliqué dans l'endocytose des particules adénovirales dans la cellule cible. Il serait intéressant de déterminer par quel(s) mécanisme(s) une protéine virale peut interférer avec la fonction d'une protéine cellulaire bioactive telle que le CFTR. Ceci nous permettrait de comprendre et appréhender plus facilement les différents aspects de la pathogénèse des vecteurs adénoviraux.

Le vecteur chimérique Ad5F35 exprimant la fusion GFP-CFTR est dépourvu de cytotoxicité, transduit efficacement les cellules épithéliales pulmonaires par voie apicale, et restore l'activité de canal à chlorure dans les cellules CFTR(-).

Le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR représente donc un vecteur de transfert du gène *CFTR* potentiellement utilisable en thérapie génique de la mucoviscidose. Il serait intéressant de tester ce vecteur *in vivo*, plus précisément *in utero*, afin de savoir si un bénéfice clinique pour le patient est observé (Buckley et al., 2008 ; Davies et al., 2008).

# PARTIE III

# 8. Troisième partie : Transfert intercellulaire du CFTR par trogocytose : microvésicules et exosomes

Le manuscrit présentant ces résultats est en cours de rédaction.

#### 8.1. Introduction

Au cours des deux dernières années de notre programme de thèse, nous avons mis en évidence des effets inattendus et indésirables des vecteurs adénoviraux sur l'épithélium pulmonaire (Granio et al. 2007). Les effets négatifs obtenus sur l'activité canal à chlorure du CFTR observés à hautes doses virales de vecteur Ad5 s'ajoutent aux inconvénients déjà connus des adénovirus en tant que vecteur de gène (immunogénicité, préexistence d'anticorps neutralisants, absence de récepteur CAR au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires).

Nous avons alors exploré une stratégie alternative qui évite la transduction aux tissus-cibles, de matériel génique par l'intermédiaire d'ADN encombrant adénovirus-CFTR. Celle-ci implique le transfert direct de la protéine mature CFTR par l'intermédiaire de microparticules membranaires (MP), microvésicules (Mv) ou exosomes (ExoS). Ce transfert est basé sur un processus physiologique nommé "trogocytose". La trogocytose correspond à un processus physiologique de transfert intercellulaire rapide et unidirectionnel entre une cellule émettrice et une cellule réceptrice. Ce mode de communication permet l'échange de protéines membranaires intrinsèques ou extrinsèques et de matériel cytoplasmique à la cellule émettrice.

Ce processus est analogue au « pseudotypage » de particules virales ou pseudo-virales qui consiste à faire exprimer de nouvelles protéines à la membrane cellulaire afin de modifier les caractéristiques physiologiques des cellules. L'objectif de notre étude est d'évaluer la capacité et l'efficacité des MPs "pseudotypées" par la protéine CFTR à transférer aux cellules cibles CFTR(-) des canaux à ions chlorure fonctionnels.

# 8.2. Preuve de concept et faisabilité du transfert intercellulaire de molécules bioactives par les MPs: modèle expérimental de la glycoprotéine membranaire CD46

Ce modèle inclus le couple vecteur / cellule suivant : Ad5F35-GFP / CHO-CD46. Les cellules CHO-K1 n'expriment pas le CD46 à leur surface et sont réfractaires à l'infection par l'Ad5F35-GFP. En revanche, la lignée dérivée CHO-CD46 ingéniérée pour exprimer constitutivement la glycoprotéine humaine CD46 est permissive à l'Ad5F35-GFP.



Figure 54 : Schéma représentant la purification et le fractionnement des populations de MP



**Figure 55 : Clichés de microscopie élctronique de différentescellules réceptrices après transfert de MP.** (a) Ce cliché montre le bourgeonnement des MP à la membrane plamique des cellules CHO-CD46. La fixation et l'entrée des MP dans les cellules humaines MSC sont observées après 30 min de contact (b) et 1 heure de contact (c-d).

Les MP correspondent à une population de vésicules membranaires hétérogènes en taille, émanant de la membrane cellulaire et libérées dans le milieu de culture. Les MP regroupent les microvésicules membranaires (Mv) libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique et les exosomes (ExoS) libérés par exocytose des corps multivésiculaires. Nous ne disposons pas actuellement de marqueurs spécifiques et d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces populations vésiculaires emmanant de cellules de hamster.

Nous avons alors préparé des MP à partir des surnageants de culture des cellules CHO-CD46 par ultracentrifugations différentielles (**Figure 54**). Nous avons ainsi obtenu deux populations de vésicules membranaires principalement séparées selon leur taille. Il s'agit des MP<sub>30</sub> correspondant à de larges vésicules hétérogènes en taille et libérées par bourgeonement à la membrane plasmique des cellules (Mv) et des MP<sub>100</sub> correspondant à des vésicules sphériques, homogènes, de petites tailles caratéristiques des exosomes.

La quantité de MP dans chacune des populations a été analysée par cytométrie en flux et un dosage protéique a été réalisé. Nous avons alors déterminé, en homologie au titre viral infectieux, un "titre physique de MP" ainsi que la concentration protéique des deux populations. Le titre physique de MP est compris entre 4 x  $10^7$  et 7 x  $10^7$  MP /mL et la concentration protéique est comprise entre 700 et 850 ng/mL respectivement pour les MP<sub>30</sub> et les MP<sub>100</sub>.

# 8.2.1. Production de microparticules membranaires (MP) pseudotypées CD46.

Le nombre de MP pseudotypées CD46 a ensuite été déterminé par cytométrie en flux et par immunoélectromicroscopie. Nous pouvons ainsi calculer le nombre de MP-CD46 bioactives présent parmi la totalité des MP isolées. Ceci nous permet d'obtenir le « titre bioactif des MP » en homologie au titre viral infectieux.

Nous avons obtenu un titre bioactif de MP-CD46 de 7,5  $\pm$  1,5 % pour les MP<sub>30</sub> et de 2,2  $\pm$  1,3 % pour les MP<sub>100</sub>. Pour la suite de l'étude, seules les MP<sub>30</sub> ont été utilisées ; leur titre bioactif étant de 5 à 10 MP-CD46 / cellule réceptrice.

Une analyse des  $MP_{30}$  par immuno-électromicroscopie nous a permis de mettre en évidence la glycoprotéine CD46 à la surface de particules sphériques irrégulières enveloppées dont la taille est comprise entre 50 et 200 nm de diamètre (**Figure 55**). Une analyse statistique nous permet d'affirmer qu'environ 3 % des MP sont marquées par l'anticorps dirigé contre le CD46. Ces résultats confirment les résultats précédents obtenus par cytométrie en flux.



Figure 56 : Clichés de microscopie électronique de MP pseudotypées CD46.

Les MP-CD46 ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine CD46 et révélées à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à des billes d'or de 10 nm (A). Le cliché (a) permet d'avoir une vue d'ensemble du marquage réalisé. Un grossissement permet de visualiser une (b) ou deux (c) billes d'or fixées à la surface des MP-CD46. (B) Les MP-CD46 sont compléxées au vecteur chimérique adénoviral Ad5F35. Plusieurs complexes MP/vecteur viral sont observés (a-c)



**Figure 57 : Analyse de l'expression et de la fonctionnalité des molécules CD46 transférées par les MP.** (A) Durée d'expression du CD46 transféré aux cellules CHO via les MP, (B) Test de fonctionnalité de la molécule CD46, protéine régulant la cascade du complément.

### 8.2.2. Fonctionnalité des molécules CD46 exprimées à la surface des MP évaluée par fixation du vecteur adénoviral Ad5F35.

Les molécules CD46 exprimées à la surface des MP sont fonctionnelles et jouent leur rôle de récepteur adénoviral. Lorsqu'elles sont incubées en présence d'Ad5F35, des complexes MP / vecteur adénoviral sont observés en microscopie électronique à transmission (**Figure 56**)

#### 8.2.3. Efficacité du transfert des molécules CD46 par les MP.

Nous avons déterminé la capacité des  $MP_{30}$ -CD46 à transférer la protéine CD46 aux cellules réceptrices CHO (Figure 57). Le pourcentage de cellules CHO présentant à leur surface la protéine CD46 après 6 h de transfert est d'environ 3 %. Ce pourcentage augmente légèrement après 24 à 48 h de transfert (6-7 %) puis disparaît après 5 jours de transfert. Cependant, une détection de la protéine CD46 est de nouveau observée après 6 jours de transfert ; 6-7 % des cellules CHOK1 expriment le CD46. Ceci peut s'expliquer par la néosynthèse de protéine CD46 exprimée à la membrane des cellules réceptrices. La protéine CD46 serait alors transférée sous forme d'ARNm codant pour la molécule CD46.

# 8.2.4. Fonctionnalité des molécules CD46 après transfert aux cellules réceptrices via les MP<sub>30</sub>-CD46.

8.2.4.1. Test de fonctionnalité de la protéine CD46 comme protéine régulatrice de la cascade du complément.

La protéine CD46 participe à la régulation de la cascade du complément. En fixant les fractions C3 et C4 le CD46 permet aux cellules d'être protégées de la dégradation médiée par la voie du complément. Après transfert des MP<sub>30</sub>-CD46 sur cellules CHO, la protéine CD46 est exprimée et empêche la lyse cellulaire médiée par la fraction C3 du complément. La protéine transférée est par concéquent fonctionnelle (**Figure 57**).



Figure 58 : Analyse de la fonctionnalité de la protéine CD46 transférée aux cellules CHO comme récepteur cellulaire du vecteur adénoviral Ad5F35.

(A) La molécule CD46 correspond au récepteur cellulaire du vecteur adénoviral Ad5F35. La permissivité des cellules CHO, réfractaires à l'infection adénovirale, a été estimée après transfert du CD46 par l'intermédiaire des MP<sub>30</sub>-CD46. (B) Effet de la protéine de fusion VSV-G sur l'efficacité de transfert du CD46 aux cellules CHO.



### Figure 59 : Analyse de l'expression, de la réactivité immunologique et de la fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR exprimée dans les cellules CHO-GFP-CFTR.

(A) Analyse en microscopie à fluorescence de l'expression membranaire et cytoplasmique de la protéine GFP-CFTR exprimée par les cellules CHO-GFP-CFTR (a-b) ou exprimée suite à l'infection des CHO pendant 48 heures par l'Ad5F35-GFP-CFTR à une dose virale de 200 pp/cellules (c).

**(B)** Mise en évidence de l'insertion correcte à la membrane plasmique des cellules CHO-GFP-CFTR du canal CFTR par immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la première boucle extracellulaire de la protéine CFTR.

(C) Mesure de l'activité canal à ions chlorure de la protéine GFP-CFTR par test d'efflux d'iode. Les cellules CHO et CHO-GFP-CFTR ont été traitées avec deux activateurs du canal CFTR, la forskoline (Fsk) à 10  $\mu$ M et la génistéine (Gst) à 30 $\mu$ M.

8.2.4.2. La protéine CD46 est fonctionnelle en tant que récepteur cellulaire au vecteur adénoviral Ad5F35.

La protéine CD46 est le récepteur cellulaire au vecteur adénoviral Ad5F35. Nous avons analysé, après transfert dose dépendant de MP<sub>30</sub>-CD46 (0 à 30 MP/ cellule), la capacité du CD46 à rendre permissive les cellules CHO au vecteur adénoviral Ad5F35 (**Figure 58**). Après transfert de 20 à 30 MP/cellule, environ 25 % des cellules CHO sont transduites par l'Ad5F35-GFP. Nous notons une augmentation de l'infection adénovirale d'un facteur 2 par rapport aux cellules CHO ne présentant pas le récepteur CD46 ou infectées par l'Ad5-GFP. La protéine CD46 a donc conservé sa fonctionnalité et sa spécificité en tant que récepteur adénoviral.

La capacité de la glycoprotéine G d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) à améliorer le transfert des MP<sub>30</sub>-CD46 aux cellules CHO a ensuite été analysé. Cette protéine présente une forte activité fusogénique utilisée depuis des années dans le pseudotypage de virus ou de particules similaires à des virus (*Virus Like particles, VLP*). Or, la présence de la protéine VSV-G sur les MP<sub>30</sub>-CD46 n'améliore pas de façon significative l'infection adénovirael par l'Ad5F35. Pour la suite de notre étude sur le transfert de la protéine CFTR, la protéine VSV-G ne sera pas utilisée.

#### 8.3. Application à la glycoprotéine CFTR

Les résultats précédents nous permettent d'envisager le transfert de la protéine CFTR, glycoprotéine membranaire plus complexe, à activité canal à ions chlorure.

### 8.3.1. Création d'une lignée stable CHO exprimant la protéine CFTR étiquetée GFP (CHO-GFP-CFTR)

Les cellules CHO n'expriment pas de protéine homologue au CFTR humain. Les MP-CFTR ont alors été produites à partir d'une lignée CHO transfectée à l'aide du plasmide épisomal pCEP4-GFP-CFTR (CHO-GFP-CFTR) qui exprime de façon stable la protéine GFP-CFTR sous pression de sélection à l'hygromycine. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression et la localisation du signal GFP-CFTR. Les cellules CHO-GFP-CFTR expriment la protéine GFP-CFTR à la membrane plasmique ainsi que dans des vésicules cytoplasmiques (**Figure 59 A**). La protéine GFP-CFTR est correctement insérée à la membrane plamisque des cellules, comme le montre les résulats obtenus après marquage des cellules à l'aide d'un anticorps dirigé contre la première boucle extracellulaire du CFTR (**Figure 59 B**).

Density	GFP(+) MP <sub>30</sub>	GFP(+) MP <sub>100</sub>	RNA content	RNA content $(ng/10^7 MP_{100})$
subclass	(% total MP)	(% total MP)	(ng/107 MP <sub>30</sub> )	
LD ( $\rho_m = 1.10$ )	$6.2 \pm 2.5$	$1.4 \pm 0.4$	$82.5 \pm 14.3$	$97.7 \pm 77.0$
ID ( $\rho_m = 1.16$ )	$10.4 \pm 1.7$	$1.2 \pm 1.2$	$61.6 \pm 35.2$	$44.0 \pm 32.3$
HD ( $\rho_m = 1.21$ )	$14.5 \pm 3.2$	$8.3 \pm 2.1$	$51.3 \pm 30.7$	$60.5 \pm 22.5$

Tableau 9 : Analyse par cytométrie en flux du nombre de MP exprimant la protéine GFP-CFTR dans lesdifférentes sous-populations de MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>at analyse par qPCR du contenu en ARN de ces MP.Les resultats correspondent à la valeur moyenne obtenue sur 3 expériences  $\pm$  l'écart type. LD : Low density,ID : Intermediate density, HD : High density.



### Figure 60 : Cinétique d'expression de la protéine GFP-CFTR à la membrane des cellules réceptrices CHO après transfert via les MP.

Le nombre de cellules CHO exprimant la protéine GFP-CFTR transférées via les  $MP_{30}$  et les  $MP_{100}$  pendant différents temps (2, 4, 6, 8, 24, 48h, 5 et 6 jours) a été déterminé par cytométrie en flux (**A**, **B**). LD : *Low density*, ID : *Intermediate density*, HD : *High density*.

L'activité canal à ions chlorure de la protéine GFP-CFTR a ensuite été déterminée par test d'efflux d'iode (**Figure 59 C**). Les cellules CHO-GFP-CFTR expriment une protéine CFTR présentant une activité canal à ions chlorure attendue identique à celle obtenue dans notre précédente étude (Granio et al., 2010). La protéine de fusion GFP-CFTR permet de suivre le trafic intracellulaire de la molécule CFTR dans les différents compartiments cellulaires mais également, permet de détecter les MP l'ayant incorporée. Comme pour les MP-CD46, nous obtenons un rendement total de MP-CFTR de 1 x 10<sup>7</sup> à 5 x 10<sup>7</sup> obtenue à partir de 10<sup>7</sup> cellules CHO-GFP-CFTR. Une analyse par cytométrie en flux nous permet d'affirmer que le signal GFP-CFTR est détecté dans les populations MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>, respectivement 10,3 ± 3,3 % et 3,6 ± 3,3 % de MP-GFP-CFTR.

# 8.3.2. Fractionnement des populations $MP_{30}$ et $MP_{100}$ sur gradient continu de sucrose et efficacité relative de l'incorporation de la protéine GFP-CFTR dans chacune des fractions.

A ce stade de l'étude, il est important de déterminer quelle(s) fraction(s) de MP incorpore(nt) le mieux la protéine GFP-CFTR afin d'optimiser le transfert de notre protéine d'intérêt sur des cellules CHO CFTR(-). Les populations MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub> ont été fractionnées selon leur densité sur gradient continu de sucrose (D<sub>2</sub>-O) par ultracentrifugations différentielles. Trois pools de MP (MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>) ont ainsi été obtenus : les MP de faible densité (densité moyenne de 1.10 g/mL), de densité intermédiaire (densité moyenne de 1.16 g/mL) et de haute densité (densité moyenne de 1.21 g/mL). L'analyse par cytométrie en flux nous permet d'affirmer que la protéine GFP-CFTR est détectée dans les trois pools de MP (**Tableau 1**). Les populations de MP<sub>30</sub>ID et MP<sub>30</sub>HD expriment le plus la protéine GFP-CFTR à leur surface. Ce résultat nous permet de suggérer que la protéine CFTR est associée aux vésicules libérées après bourgeonnement de la membrane plasmique.

### **8.3.3.** Les MP permettent un transfert de la protéine GFP-CFTR aux cellules CHO CFTR(-).

Les trois pools de  $MP_{30}$  et  $MP_{100}$  sont déposés sur les cellules réceptrices CHO à une concentration de 5 MP bioactives/ cellule pendant différents temps (2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h, 5 jours et 6 jours). Aux temps indiqués, les cellules sont analysées au FACS.

Les profils d'expression de la protéine GFP-CFTR obtenus pour les trois populations de  $MP_{30}$  sont assez similaires (**Figure 60**). A 2 h post-transfert, 3.8 à 4.4 % des cellules réceptrices expriment la protéine GFP-CFTR. Ce pourcentage augmente légèrement après 4 heures de transfert (5.6 à 6.6%) puis décroit après 6 à 8 h de transfert.



Figure 61 : Clichés de microscopie confocale de cellules CHO K1 après transfert de  $MP_{30}$  pendant 5 jours. Les cellules CHOK1 ont été mises en contact de  $MP_{30}$  L'observation a été réalisée après 5 jours de transfert. Le signal GFP-CFTR est observé en vert (a et d), les noyaux sont marqués au DAPI (b et e).



Figure 62 : Cinétique d'expression de la protéine GFP-CFTR à la surface des cellules CHO K1 après transfert des MP.

Les cellules ont été mises en contact avec les différentes sous populations de MP30 (A) et MP100 (B) pendant différents temps. Un immunomarquage à l'aide de l'anticorps monoclonal dirigé contre la première boucle de l'ectodomaine du CFTR permet de quantifier par FACS le nombre de protéine CFTR correctement insérée à la membrane plasmique des CHO K1. LD: *Low density*, ID: *Intermediate density*, HD: *High density*, D: day.

Une augmentation progressive du nombre de cellules CHO exprimant la protéine GFP-CFTR est alors observée jusqu'à 5 jours de transfert (73-83 % de CHO exprimant la protéine GFP-CFTR). Un profil similaire est obtenu pour les MP<sub>100</sub> avec 57-73 % des cellules CHO exprimant la proteine GFP-CFTR après 5 jours de transfert (**Figure 60**).

Une observation du signal GFP, à 5 jours post-transfert, par microscopie confocale confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux. La protéine GFP-CFTR est exprimée dans 70 à 80 % des cellules CHO et se localise à la membrane plasmique ainsi que dans des vésicules cytoplasmiques (**Figure 61**). Afin de déterminer si la protéine GFP-CFTR exprimée par les cellules CHO K1 après transfert des MP est correctement insérée à la membrane plasmique, nous avons réalisé un immunomarquage à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la première boucle de l'ectodomaine du CFTR. Après 48 h à 72 h de transfert des MP<sub>30</sub> et des MP<sub>100</sub> sur les cellules CHO K1, respectivement, 50 à 60 % et 55 à 70 % des cellules expriment la protéine CFTR correctement insérée à la membrane plasmique (**Figure 62**). Ce pourcentage décroit par la suite. Seulement 10 à 15 % et 25 à 30 % des cellules CHO K1 expriment le CFTR après transfert respectivement des MP<sub>30</sub> et des MP<sub>100</sub> (**Figure 62**). La différence observée entre les résultats de cet immunomarquage et l'évolution du signal GFP au cours du temps suggère une régulation du trafic cellulaire de la protéine GFP-CFTR afin de réguler le nombre de canaux à ions chlorure exprimés à la membrane des cellules.

# 8.3.4. Les MP permettent un transfert d'ARNm codant pour la protéine GFP-CFTR dans les cellules réceptrices CHO.

Les résultats précédents laissent à supposer que le transfert de la protéine GFP-CFTR se réalise en deux étapes. Lors des premières heures de contact entre les  $MP_{30}$  et  $MP_{100}$  et les cellules réceptrices, la protéine GFP-CFTR mature serait transférée à moins de 10 % de cellules CHO alors que lors des temps tardifs de transfert, il y aurait à la fois transfert de la protéine GFP-CFTR mature et de molécules d'ARNm-GFP-CFTR. Afin de confirmer cette hypothèse, une extraction d'ARN totaux a été réalisée sur les différentes populations de  $MP_{30}$  et  $MP_{100}$  ainsi que sur les cellules réceptrices après transfert des différents pools de MP. Chacune des populations de  $MP_{30}$  et  $MP_{100}$  contient des ARN totaux (**Tableau 9**). De plus, toutes les populations ont la capacité de transférer les ARNm-GFP-CFTR aux cellules réceptrices (**Figure 63**).

#### 8.3.5. Les protéines GFP-CFTR transférées par des MP sont fonctionnelles

Cette analyse nous permet de déterminer quel type de protéines GFP-CFTR confère la meilleure activité canal à ions chlorure aux cellules CHO K1 après transduction des MP. S'agit-il des protéines GFP-CFTR matures, insérées à la membrane plasmique et transférées au cours des premières heures ou s'agit-il des protéines GFP-CFTR néosynthétisées plus tardivement à partir des ARNm-GFP-CFTR

transférés dans les cellules CHO K1? Afin de répondre à cette question, l'activité canal à ions chlorure des protéines GFP-CFTR transférées par les MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub> a été déterminée en utilisant la sonde fluorescente DiSBAC2(3) (Coclet-Ninin et al., 2002). Les cellules CHO K1 transduites par le vecteur adénoviral Ad5F35-GFP-CFTR à une dose virale de 200 pp/cellule correspondent au contrôle positif. Ces cellules répondent à un changement de potentiel de membrane induit par l'ajout d'AMPc (activateur du CFTR) dans une solution pauvre en ions chlorure par une augmentation de fluorescence de la sonde DiSBAC2(3) qui pénètre dans la cellule (**Figure 64 A**). Une faible entrée de la sonde et donc une faible mais positive augmentation de fluorescence est observée pour les cellules CHO transduites par les MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>-GFP-CFTR (**Figure 64 B, C**).

#### **8.4.** Conclusions et Perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un nouveau mode de thérapie non-génique permettant le transfert de protéines bioactives par l'intermédiaire de microparticules membranaires MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>. Nous avons ainsi démontré le transfert de la glycoprotéine CD46, protéine impliquée dans la régulation de la voie du complément et identifiée comme récepteur cellulaire aux vecteurs adénoviraux de sérotype 35, via des MP à des cellules CD46(-). La protéine CD46 ainsi transférée aux cellules cibles conserve ses propriétés bioactives : elle protège les cellules de la lyse médiée par la fraction C3 du complément et permet à l'Ad5F35 d'infecter les cellules CHO K1, initialement réfractaires à l'infection adénovirale. Il serait intéressant d'utiliser ce mode de transfert du CD46 sur des cellules réfractaires à l'infection par les vecteurs adénoviraux de sérotype 35 pour des applications thérapeutiques en thérapie génique et/ou en vaccinologie. Les MP pseudotypée CD46 pourraient également être employées afin d'inhiber les rejets de greffes.

Nous avons également démontré le transfert du canal à ions chlorure CFTR via des microparticules membranaires MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub>. La protéine GFP-CFTR peut-être tranférée directement sous forme mature et insérée à la membrane des cellules CFTR(-), et/ou transférée sous forme d'ARNm-GFP-CFTR (simple ou polysomal) qui une fois dans la cellule cible, sera traduit en protéine GFP-CFTR. Seule la protéine CFTR néosynthétisée dans les cellules CFTR(-) présente une activité canal à ions chlorure. Les microparticules membranaires correspondent donc à des vecteurs biologiques intéressants pour l'expression de protéines thérapeutiques dans des cellules déficientes après transfert d'ARNm dans cette dernière. Les microparticules membranaires pseudotypées CFTR représentent donc des vecteurs non géniques potentiellement utilisables en thérapie de la mucoviscidose. Il serait intéressant de tester ces microparticules membranaires, *ex-vivo*, sur cellules humaines de patients atteints de mucoviscidose (cellules CF) puis à plus long terme envisager une étude *in vivo* chez des patients CF.



Figure 63 : Détection d'ARNm-GFP-CFTR dans les différentes populations de MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub> ainsi que dans les cellules CHO après transfert des MP.

Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression du transgène GFP-CFTR dans les sous-populations (LD, ID et HD) de  $MP_{30}$  (A) et  $MP_{100}$  (B).

Analyse par PCR (a) et RT-PCR (b) quantitative de l'expression du transgène GFP-CFTR dans les cellules CHO après transfert des sous populations (LD, ID et HD) de  $MP_{30}$  (C) et  $MP_{100}$  (D).



(A) Positive control: HAdV5F35-GFP-CFTR-transduced CHO cells

#### (B) MP<sub>30</sub>LD-GFP-CFTR-transduced CHO cells



(C) MP<sub>30</sub>HD-GFP-CFTR-transduced CHO cells





Les changements d'intensité de fluorescence de la sonde DiSBAC<sub>2</sub>(3) ont été mesurés sur cellules CHO K1 individualisées après 72 h de transfert de MP. Des régions de 9 à 10 cellules ont été analysées, des photos étant réalisées toutes les 5 à 7 secondes à l'aide du logiciel Ion Vision (Impro Vision Software). Les changements d'intensité de fluorescence sont exprimés sous forme d'un ratio  $F_t/F_0$  où  $F_t$  et  $F_0$  correspondent respectivement aux valeurs de fluorescence mesurée à un instant t et au moment où le cocktail d'AMPc a été ajouté à la préparation. (A) Contrôle positif : les cellules CHO K1 ont été transduites par le vecteur Ad5F35-GFP-CFTR à une dose virale de 200 pp/cellule ; (B) Cellules CHO K1 transduites par les MP<sub>30</sub> et par les MP<sub>100</sub> (C). Le contrôle négatif interne indiqué par un astérisque(\*) correspond à une cellule non transduite.

# **IX. Conclusions et Perspectives**
Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation de vecteurs viraux et non viraux comme agents de transfert du CFTR dans le contexte d'une maladie, la mucoviscidose.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux vecteurs adénoviraux comme vecteurs de gène thérapeutique dans la mucoviscidose. Ces vecteurs ont été les premiers vecteurs viraux à être utilisés en essais cliniques pour le transfert d'un gène de réparation contre la mucoviscidose chez l'Homme (Zabner et al., 1993). Ils présentent plusieurs avantages comparés aux autres vecteurs viraux. Ces vecteurs sont peu pathogènes et ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte. Il est possible d'insérer un transgène dont la taille est comprise entre 5 et 8 kb. Les vecteurs adénoviraux sont facilement manipulables et sont produits à haut titre (Hong et al., 2003 ; Magnusson et al., 2007 ; Magnusson et al., 2001). De plus, l'efficacité de transduction et l'analyse de la fonctionnalité du transgène ont pu être déterminées *in vitro*, sur lignée cellulaire ; *ex-vivo* sur tissus et *in vivo* sur modèle animal (Henning et al., 2002 ; Gaden et al., 2004 ; Toh et al., 2005).

Bien que les adénovirus soient des vecteurs intéressants, de nombreux problèmes persistent pour une utilisation en clinique. En effet, il préexiste dans l'organisme des anticorps dirigés contre l'Adénovirus qui neutralisent rapidement les vecteurs adénoviraux après leur administration *in vivo*. De plus, suite à une injection par voie intraveineuse, les vecteurs adénoviraux de sérotype 5 s'accumulent dans le foie. Ceci est dû à l'interaction entre les capsomères d'hexon de l'Ad5 et le facteur X de coagulation. Le complexe intéragit alors avec les molécules d'HSPGs fortement retrouvées à la surface des cellules hépatiques (Greig et al., 2009 ; Rogée et al., 2010 ; Alba et al., 2009). Cette découverte est essentielle en thérapie génique car il est nécessaire de décibler les vecteurs adénoviraux du foie afin qu'ils atteignent leurs cellules ou tissus cibles. Il est également intéressant de noter que les vecteurs de sérotype 35, tel que le vecteur chimérique Ad5F35, et l'AdV5F21/Bad4, ont une transduction hépatique nettement inférieure aux Ad5.

Nous avons voulu déterminé pourquoi un tel paradoxe était observé et avons émis l'hypothèse que d'autres protéines de capside pouvaient également être impliquées dans la voie d'entrée et dans le transit intracellulaire du complexe Ad-FX.

Nous avons démontré le rôle prépondérant de la protéine fibre de sérotype 35 dans l'entrée et le transit intracellulaire du vecteur chimérique Ad5F35 en présence du facteur X de coagulation (FX).

Bien que le FX améliore l'interaction entre l'Ad5F35 et les HS *in vitro*, ainsi que l'interaction entre l'Ad5F35 et les HSPG *in vivo*, ce dernier inhibe la transduction des cellules CHO CAR (-), CD46 (-), HSPG (+) par l'Ad5F35. Le FX interviendrait au cours du transit de la particule virale. La protéine fibre 35 adresse les particules d'Ad5F35 aux compartiments endosomales tardifs et lysosomales ou elles seront séquestrées. En effet, nous avons mis en évidence l'absence de particules virales au niveau du noyau de la cellule hôte après 3 heures d'infection. Les complexes Ad5F35-FX sont retrouvés dans

les endosomes tardifs/ lysosomes ou l'interaction entre les deux acteurs du complexes est renforcée à pH acide. Les complexes Ad-FX seront ensuite éliminés par exocytose.

Ainsi, en dépit de la forte interaction entre le complexe, constitué de la protéine hexon et du FX, et les molécules d'HSPG, la protéine fibre est la protéine de capside majoritairement, voir l'unique protéine, impliquée dans l'internalisation et le transit intracellulaire de l'Ad5F35. Il serait intéressant de déterminer les mécanismes moléculaires et les facteurs cellulaires impliqués dans ce déterminisme afin de pouvoir concevoir des expériences en thérapie génique utilisant les propriétés de la fibre des Adénovirus de sous-groupe B.

Nous disposons ainsi de deux vecteurs adénoviraux (Ad5 et Ad5F35) utilisant des voies d'entrée et de trafic intracellulaire différentes.

La seconde partie de notre étude a consisté à développer un vecteur adénoviral présentant une efficacité de transduction d'épithélium respiratoire humain améliorée (l'Ad5F35) en comparaison à l'Ad5, vecteur le plus utilisé au cours des essais cliniques de la mucoviscidose. A ce jour, dix essais cliniques impliquant des vecteurs adénoviraux ont été menés entre 1993 et 2001 (disponible sur le site : http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/). Une des difficultés majeure révélée par ces essais correspond à l'inefficacité de transfert du gène *CFTR* au niveau de l'épithélium pulmonaire des patients CF (Perricone et al., 2001). Plusieurs raisons expliquent ceci : (i) la mise en place par l'organisme receveur d'une réponse inflammatoire (Otake et al., 1998) et d'une réponse immunitaire dirigée contre les vecteurs adénoviraux (Piedra et al., 1998), (ii) l'absence du récepteur CAR au pôle apical des épithéliums respiratoires (Zabner et al., 1997; Walters et al., 1999), (iii) l'éffet de facteur mécaniques tels que le mucus (Hida et al., 2001) et les infections bactériennes sur la fixation des particules adénovirales à la surface des cellules épithéliales; (iv) les propriétés intrinsèques des cellules épithéliales pulmonaires différenciées. De plus, une expression transitoire du transgène CFTR a été mise en évidence avec aucun bénéfice clinique pour le patient.

Une étude précédente menée au laboratoire (Granio et al., 2007) a démontré que l'utilisation de vecteurs adénoviraux exprimant la protéine CFTR fusionnée à la protéine fluorescente GFP permettait d'étudier la localisation et le trafic intracellulaire du canal à ions chlorure dans des lignées de cellules épithéliales trachéales pulmonaires et dans des épithéliums pulmonaires reconstitués des voies aériennes humaines. Une restauration de l'activité canal à ions chlorure du CFTR proportionnelle à la dose virale a été obtenue. Cependant, une inhibition de l'activité du CFTR à forte dose virale a été observée *in vitro*.

Nous avons démontré que cet effet était associé au motif RGD de la protéine adénovirale base de penton impliqué dans l'endocytose des particules dans la cellule cible. Le motif RGD interagit avec les intégrines cellulaires  $\alpha V$  et permet l'endocytose des particules adénovirales Ad5 dans la cellule hôte. Il a été démontré que cette interaction va activer certaines voies de signalisation cellulaire telle que la voie du phosphoinositide 3 OH phosphate (Philpott et al., 2004) et induire l'expression de la molécule

RANTES impliquée dans le processus inflammatoire dirigé contre les vecteur adénoviraux de sérotype 5 (Bowen et al. 2002). La voie des Toll-like recepteur (TLR) est également activée suite à l'infection adénovirale des cellules épithéliales (Hartman et al., 2007 : Hensley et Amalfino et al., 2007) faisant intervenir les molécules TLR4 et TLR9. Notre étude a permis d'identifier un nouvel aspect de l'effet cytopathique du motif RGD de la protéine base de penton. L'inhibition de l'activité du CFTR devra être donc prise en considération dans les futurs protocoles de thérapie génique utilisant les vecteurs adénoviraux de sérotype 5 comme agent de transfert de gène thérapeutique. Cependant, cet aspect ne devrait pas poser problème lorsque les vecteurs adénoviraux sont utilisés comme vecteurs oncolytiques où la destruction d'un tissus cible est souhaité.

Dans le but de développer un vecteur adénoviral plus efficace en terme de transduction et dépourvu d'effet délétère sur l'activité canal à ions chlorure du CFTR, nous avons étudié les propriétés de notre vecteur chimérique Ad5F35-GFP. Nous savons que ce vecteur utilise comme récepteur cellulaire la glycoprotéine membranaire CD46 et emprunte la voie des endosomes tardifs et des lysosomes pour infecter les cellules (Tuve et al., 2008). Nous avons démontré que l'Ad5F35-GFP transduit efficacement différentes lignées cellulaires telles que les MM39, les CF-KM4 et a aucun effet négatif sur l'activité CFTR comparé à l'Ad5-GFP.

Nous avons alors construit l'Ad5F35-GFP-CFTR. Ce vecteur est capable de restaurer l'activité CFTR dans des cellules CFTR(-) à une faible dose virale de 50 pp/cellule. En comparaison, la restauration de l'activité CFTR est obtenue pour une dose de vecteur supérieure à 1500 pp/cellule lorsque les cellules sont transduites par l'Ad5-GFP-CFTR.

Nous avons également démontré que l'Ad5F35-GFP-CFTR est capable de transduire, via le pôle apical, les épithéliums pulmonaires reconstitués de patients CF et restaure l'activité CFTR à faible dose virale (MOI 200). De plus, l'expression de la protéine GFP-CFTR est restée stable pendant au moins 5 semaines. Cette voie d'entrée du vecteur est un paramètre essentiel pour le transfert de gène thérapeutique aux tissus des voies respiratoires *ex-vivo* et *in vivo*.

Le vecteur chimérique Ad5F35 est donc un vecteur plus efficace que l'Ad5 en termes d'efficacité de transfert du gène *CFTR*, d'expression de la protéine GFP-CFTR et de restauration de son activité canal à ions chlorure. Il ne présente aucun effet négatif sur la fonction du canal CFTR. Une étude récente a mis en évidence qu'aucun bénéfice en termes de survie n'a été obtenu après administration du vecteur Ad5-GFP *in utero* chez des fœtus de souris CFTR-KO (Barkley et al., 2008). Il serait intéressant de tester notre vecteur Ad5F35-CFTR dans un protocole similaire *in vivo*. Il serait également intéressant de tester, *in vivo*, l'immunogénicité de ce vecteur en cas d'administrations répétées.

Dans le contexte actuel des biothérapies, la communauté scientifique dispose de deux grandes méthodes pour introduire des gènes thérapeutiques dans les cellules humaines. Il s'agit des vecteurs viraux intégratifs (AAV, rétrovirus) ou non intégratifs (adénovirus, virus de l'Herpès) et des vecteurs

synthétiques tel que les liposomes. Des limitations sont à noter quant à l'utilisation de ces outils. En effet, (i) l'efficacité de transfert des vecteurs synthétiques est faible comparée à celle obtenue avec les vecteurs viraux. (ii) L'utilisation de vecteurs rétroviraux peut entraîner l'expression d'oncogènes par insertion non contrôlée des vecteurs au niveau d'un gène oncogénique (Fischer et al., 2004) alors que (iii) les vecteurs non intégratifs permettent d'obtenir une expression transitoire du transgène sans bénéfice clinique pour le patient. Toutes ces approches utilisent le transfert de matériel génique, des risques potentiels en terme de biosécurité sont à concevoir. Plusieurs alternatives sont envisagées afin de (i) développer un vecteur synthétique efficace pour le transfert d'ADN, (ii) d'améliorer l'utilisation des vecteurs intégratifs en contrôlant le site d'insertion de leur génome, (iii) d'utiliser l'ingénieurie des cellules souches mésenchymateuses combinée à la thérapie génique *ex-vivo*. Une quatrième alternative, entreprise dans la troisième partie de ce travail de thèse, consiste au transfert de glycoprotéines membranaires par l'intermédiaire de vésicules (microparticules membranaires, MP) libérées par la cellule dans le mileu extracellulaire.

Nous avons premièrement étudié le transfert de la glycoprotéine membranaire CD46, récepteur cellulaire de l'Ad5F35.

Nous avons ainsi purifié des MP pseudotypées CD46 à partir du surnageant de culture de la lignée CHO-CD46 qui exprime constitutivement la protéine. Nous avons démontré que le transfert de cette glycoprotéine sur cellules CHO dites réceptrices est possible et que les protéines ainsi transférées sont fonctionnelles. Le CD46 (i) protège les cellules de l'apoptose médiée par la voie du complément et (ii) rend permissible les cellules CHO initialement réfractaires à l'infection adénovirale par l'Ad5F35-GFP. Ce dernier résultat permet d'envisager d'éventuelles applications en thérapie génique et/ou vaccinologie. En effet, nous avons démontré dans les premières parties de ce travail de thèse que l'Ad5F35-GFP est un vecteur potentiellement utilisable en thérapie génique. L'utilisation de MP-CD46 sur des cellules peu transductibles par les vecteurs adénoviraux permettrait d'utiliser notre vecteur chimérique pour délivrer un transgène d'intérêt. Nous pouvons également envisager des applications dans le contrôle de rejet de greffes.

Afin d'accroître la production de MP et/ou favoriser la fusion des MP à la membrane de la cellule réceptrice, nous avons testé l'effet de la protéine de fusion VSV-G. Cette glycoprotéine est connue pour sa haut activité fusogénique (Roche et al., 2008). Elle est utilisée depuis plus d'une dizaine d'années pour favoriser la formation des VLP (*Virus Like Particles*) à partir de la membrane plasmique des cellules (Farley et al., 2007 ; Okimoto et al., 2001). Nous avons montré que la présence de la VSV-G à la surface des MP-CD46 n'a pas d'effet sur le transfert de CD46.

Le transfert du CD46 a été utilisé comme preuve de concept pour le transfert d'une glycoprotéine membranaire plus complexe : le CFTR.

Les cellules productrices de MP pseudotypées GFP-CFTR correspondent à des cellules CHO qui expriment de façon constitutive la protéine CFTR fusionnée à la protéine GFP en N-terminal. Les MP-

GFP-CFTR ont été isolées du surnageant de culture de ces cellules par ultracentrigugation selon leur taille. Nous avons ainsi obtenu deux populations de MP : la première, nommée MP<sub>30</sub>, correspondant aux vésicules de plus grande taille et libérées par bourgeonnement de la membrane plasmique ; la seconde, MP<sub>100</sub>, correspondant aux exosomes libérés par exocytose des corps multivésiculaires. Chaque population a été fractionnée selon leur densité sur gradient continu de sucrose. Nous avons ainsi obtenu 3 sous-populations de MP<sub>30</sub> et MP<sub>100</sub> exprimant à leur surface la protéine GFP-CFTR et ayant incorporé l'ARNm-GFP-CFTR. Elles sont également capable de transférer la protéine mature GFP-CFTR et son ARNm aux cellules réceptrices CHO CFTR(-). L'ARNm GFP-CFTR sera alors traduit en protéine qui sera exprimée plus tardivement à la membrane plasmique des cellules réceptrices. Les protéines GFP-CFTR sont correctement insérées à la membrane plasmique comme le montre le marquage réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la première boucle extracellulaire de l'ectodomaine du CFTR.

L'expression de la protéine GFP-CFTR par les cellules réceptrices CHO après transfert des MP peut être le résultat de plusieurs mécanismes. Le plus simple à envisager correspond au mécanisme de fusion entre la membrane des MP et la membrane plasmiques des cellules suivie par l'endocytose des MP et le recyclage de la protéine à la surface de la cellule. Une autre possibilité correspond au transfert de matériel cytoplasmique provenant de la cellule productrice des MP. Il pourrait s'agir d'ARNm-GFP-CFTR ou d'ARNm polysomales GFP-CFTR. Une troisième possibilité combinerait les deux premières explications. La protéine mature GFP-CFTR transférée suite à la fusion des MP à la cellule cible serait exprimée précocement. L'ARNm GFP-CFTR également transféré serait pris en charge par la machinerie traductionnelle de la cellule réceptrice et serait alors traduit en protéine GFP-CFTR exprimé à la surface cellulaire plus tardivement.

Nous avons démontré que la protéine GFP-CFTR est présente à la surface des cellules CHO entre 2 h et 6 h post-transfert, prête à fonctionner en tant que canal à ions chlorure. Cependant, le test de fonctionnalité permettant de mesurer le potentiel de membrane à l'aide de la sonde oxonol, révèlent que seules les protéines exprimées tardivement, résultant donc de la traduction de l'ARNm GFP-CFTR, sont fonctionnelles. Le fractionnement des populations MP30 et MP100 ne nous a pas permis de différencier les sous-populations en terme d'efficacité. Quelques soient les sous-populations testées nous avons obtenu un profil similaire pour l'expression de la protéine GFP-CFTR après transfert sur cellules CHO.

Le transfert de la protéine mature GFP-CFTR après absorption des MP par les cellules réceptrices conduit à un rapide turn-over de la protéine et à une absence d'expression de la protéine alors que le transfert d'ARNm GFP-CFTR conduit à l'expression retardée mais prolongée de la protéine GFP-CFTR. Nous pouvons également supposer que les cellules réceptrices exprimant la protéine GFP-CFTR peuvent elles aussi émettre des MP pseudotypées GFP-CFTR qui transfèrent aux cellules CFTR(-) la protéine d'intérêt.

Les vésicules membranaires  $MP_{30}$  (essentiellement constituées d'ectosomes) et  $MP_{100}$  (essentiellement constituées d'exosomes) peuvent donc être considérées comme des vecteurs biologiques, non géniques, prometteurs pour le transfert de protéine thérapeutique sous forme d'ARNm. Dans le cas de notre étude, ces vésicules peuvent transférer la protéine CFTR fonctionnelles en tant que canal à ions chlorure.

Il est désormais important de développer ce modèle *ex-vivo* sur cellules épithéliales pulmonaires humaines. L'expression de la protéine CFTR pourrait être améliorée grâce à l'utilisation d'un épisome circulaire autoréplicatif dépendant d'EBNA-1. A plus long terme, il serait intéressant de réaliser des tests *in-vivo* sur modèle porcin CF, modèle animal se rapprochant le plus du modèle humain, afin de tester les aspects pharmaceutiques des MP (spécificité, voie d'administration, …). Il est important désormais d'étudier les aspects qualitatifs et quantitatifs d'utilisation de ces MP, le but final étant l'utilisation des MP-CFTR en essais cliniques sur des patients atteints de mucoviscidose.

En conclusion, mon travail de thèse s'inscrit dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à traiter la mucoviscidose à sa racine même c'est-à-dire au niveau génique ou protéique. Les résultats obtenus avec notre vecteur chimérique Ad5F35 pourraient amener à reconsidérer la place des vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique de la mucoviscidose. La mise en évidence du transfert du CFTR par l'intermédiaire de vésicules membranaires ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques. Les perspectives de ce travail feront l'objet d'une poursuite des travaux au sein du laboratoire sous forme d'une nouvelle thèse de doctorat menée par Mlle Cyrielle Vituret.

### X. Annexes

# ARTICLE I

## ARTICLE II

# ARTICLE III

### **Publications**

#### Publications incluses dans ce manuscrit :

- Granio, O., Ashbourne Excoffon, K.J.D., Henning, P., Melin, P., Norez, C., <u>Gonzalez, G.</u>, Karp, P.H., Magnusson, M.K., Habib,N., Lindholm, L., Becq, F., Boulanger, P., Zabner, J., and Hong, S.S. *Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the CFTR defect in cystic fibrosis primary airway epithelia.* Human Gene Therapy, 21, 2010, 1-19.
- <u>Gonzalez, G</u>\*., Corjon, S\*., Henning, P., Grichine, A., Lindholm, L., Boulanger, P., Fender, P., and Hong, S.S. *Cell entry and traficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction.* PLoS ONE, 2011 May 26; 6(5).
- **Gonzalez, G.,** Boulanger, P., Hong, S.S. *Chapter X, CFTR gene transfer and tracking the CFTR protein in the airway.* **"Cystic fibrosis"**, Publisher: **InTech**, In press.
- **Gonzalez, G.,** Vituret, C., Norez, C., Di Pietro, A.D., Boulanger, P. and Hong, S.S. *Membrane-derived microparticle (MP)-mediated delivery of cell plasma membrane glycoproteins with single (CD46) or multiple (CFTR) membrane spanning domains.* In preparation.

#### Publications associées à des projets parallèles:

- Toh, M.L., <u>Gonzalez, G</u>., Koenders, M., Tournadre, A., Boyle, D.L., Lubberts, E., Zhou, Y., Firestein, G.S., van Den Berg, W.B., and Miossec, P. *Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression*. **PLoS ONE**, 2010 Oct 15; 5(10).
- Kitidee, K., Nangola, S., <u>Gonzalez, G</u>., Boulanger, P. Tayapiwatana, C. & Hong, S.S. *Baculovirus display of single chain antibody (scFv) using a pseudotyping signal peptide*. **BMC Biotechnology**, 2010 Nov 19; 10:80.
- **Gonzalez, G\*.**, DaFonseca, S.\*, Errazuriz, E., Coric, P., Souquet, S., Turcaud, S., Boulanger, P., Bouaziz, S., Hong, S.S. *Quantification of HIV-1 virus particle assembly and egress using a luciferase Vpr packaging-based assay: characterization of a novel type of assembly inhibitor*, **PLoS ONE**, In press.

#### Poster: 11ème colloque des jeunes chercheurs de "Vaincre la Mucoviscidose" Paris, Mars 2010



#### Poster : Journée scientifique du département animal de l'INRA 22-25 mai 2011, Fréjus



ACKNOWLEUGEMENTS We thank Elisabeth Errazuriz for her technical expertise (CeCiL) in electron microscopy. This work was financially supported by Cluster 10 Infectiologie (Region Rhone-Alpes) and the Merlion 2009 Program (French-Singapore collaborative program). GG is supported by a fellowhship from VLM. SSH is an INSERM Chargée de Recherche.

### Communications orales

- 10<sup>ème</sup> colloque des jeunes chercheurs de "Vaincre la Mucoviscidose", Paris, Mars 2009
 Vecteur adénoviral efficace pour le transfert du gène CFTR par voie apicale dans les cellules respiratoires.

### - 32<sup>nde</sup> European Cystic Fibrosis conference, Brest, Juin 2009

The Adenovirus chimeric vector Ad5F35-GFP-CFTR efficiently restores the CFTR deficiency in human airway epithelia via apical surface transduction

- 12<sup>ème</sup> colloque des jeunes chercheurs de "Vaincre la Mucoviscidose", Paris, Mars 2011 Transfert intercellulaire du CFTRwt via des microparticules membranaires

## **XI. Références bibliographiques**

- Abid Hussein, M N, E W Meesters, N Osmanovic, F P H Th M Romijn, R Nieuwland, et A Sturk. 2003. «Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo». Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH 1 (11) (novembre): 2434-2443.
- Accurso, Frank J, Steven M Rowe, J P Clancy, Michael P Boyle, Jordan M Dunitz, Peter R Durie, Scott D Sagel, et al. 2010. «Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation ». *The New England Journal of Medicine* 363 (21) (novembre 18): 1991-2003. doi:10.1056/NEJMoa0909825.
- Admyre, Charlotte, Sara M Johansson, Khaleda Rahman Qazi, Jan-Jonas Filén, Riitta Lahesmaa, Mikael Norman, Etienne P A Neve, Annika Scheynius, et Susanne Gabrielsson. 2007. « Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk ». Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 179 (3) (août 1): 1969-1978.
- Alba, R, A Bosch, et M Chillon. 2005. « Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy ». *Gene Therapy* 12 Suppl 1 (octobre): S18-27. doi:10.1038/sj.gt.3302612.
- Alba, Raul, Angela C Bradshaw, Alan L Parker, David Bhella, Simon N Waddington, Stuart A Nicklin, Nico van Rooijen, et al. 2009. « Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer ». Blood 114 (5) (juillet 30): 965-971. doi:10.1182/blood-2009-03-208835.
- Alvarez-Erviti, Lydia, Yiqi Seow, Haifang Yin, Corinne Betts, Samira Lakhal, et Matthew J A Wood. 2011. « Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes ». *Nature Biotechnology* (mars 20). doi:10.1038/nbt.1807. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423189.
- Amabile, Nicolas, Alain P Guérin, Aurélie Leroyer, Ziad Mallat, Clément Nguyen, Jacques Boddaert, Gérard M London, Alain Tedgui, et Chantal M Boulanger. 2005. « Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure ». Journal of the American Society of Nephrology: JASN 16 (11) (novembre): 3381-3388. doi:10.1681/ASN.2005050535.
- Amabile, Nicolas, Christian Heiss, Wendy May Real, Petros Minasi, Dana McGlothlin, Eduardo J Rame, William Grossman, Teresa De Marco, et Yerem Yeghiazarians. 2008. « Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension ». American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 177 (11) (juin 1): 1268-1275. doi:10.1164/rccm.200710-1458OC.
- Amaral, Margarida D. 2005. « Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? » *Pediatric Pulmonology* 39 (6) (juin): 479-491. doi:10.1002/ppul.20168.
- Ameen, Nadia, Mark Silvis, et Neil A Bradbury. 2007. « Endocytic traficking of CFTR in health and disease ». Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society 6 (1) (janvier): 1-14. doi:10.1016/j.jcf.2006.09.002.
- Anderson, M P, D P Rich, R J Gregory, A E Smith, et M J Welsh. 1991. « Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR ». *Science (New York, N.Y.)* 251 (4994) (février 8): 679-682.
- Andersson, C, et G M Roomans. 2000. « Activation of deltaF508 CFTR in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX ». *The European Respiratory Journal:* Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 15 (5) (mai): 937-941.
- Aridor, M, S I Bannykh, T Rowe, et W E Balch. 1995. « Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport ». *The Journal of Cell Biology* 131 (4) (novembre): 875-893.
- Arispe, N, J Ma, K A Jacobson, et H B Pollard. 1998. « Direct activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) and 1,3-diallyl-8cyclohexylxanthine (DAX) ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10) (mars 6): 5727-5734.
- Arnberg, N, K Edlund, A H Kidd, et G Wadell. 2000. «Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor ». *Journal of Virology* 74 (1) (janvier): 42-48.

- Arnberg, N, A H Kidd, K Edlund, F Olfat, et G Wadell. 2000. «Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus alpha(v) integrins ». *Journal of Virology* 74 (16) (août): 7691-7693.
- Arnberg, N, Y f Mei, et G Wadell. 1997. « Fiber genes of adenoviruses with tropism for the eye and the genital tract ». *Virology* 227 (1) (janvier 6): 239-244.
- Arnberg, N. 2009. « Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting ». *Reviews in Medical Virology* 19 (3): 165–178.
- Babst, M, B Wendland, E J Estepa, et S D Emr. 1998. « The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function ». *The EMBO Journal* 17 (11) (juin 1): 2982-2993. doi:10.1093/emboj/17.11.2982.
- Babst, Markus. 2005. « A protein's final ESCRT ». *trafic (Copenhagen, Denmark)* 6 (1) (janvier): 2-9. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00246.x.
- Babst, Markus, David J Katzmann, William B Snyder, Beverly Wendland, et Scott D Emr. 2002. «Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body ». *Developmental Cell* 3 (2) (août): 283-289.
- Baj-Krzyworzeka, Monika, Rafał Szatanek, Kazimierz Weglarczyk, Jarosław Baran, Barbara Urbanowicz, Piotr Brański, Mariusz Z Ratajczak, et Marek Zembala. 2006. «Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 55 (7) (juillet): 808-818. doi:10.1007/s00262-005-0075-9.
- Baker, Andrew H, John H Mcvey, Simon N Waddington, Nelson C Di Paolo, et Dmitry M Shayakhmetov. 2007. « The Influence of Blood on In Vivo Adenovirus Bio-distribution and Transduction ». *Molecular Therapy* 15 (8) (mai): 1410-1416. doi:10.1038/sj.mt.6300206.
- Bard, M. P. 2004. « Proteomic Analysis of Exosomes Isolated from Human Malignant Pleural Effusions ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31 (1) (février): 114-121. doi:10.1165/rcmb.2003-0238OC.
- Barry, O P, M G Kazanietz, D Praticò, et G A FitzGerald. 1999. «Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (11) (mars 12): 7545-7556.
- Bastida, E, A Ordinas, G Escolar, et G A Jamieson. 1984. « Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis ». *Blood* 64 (1) (juillet): 177-184.
- Bayo-Puxan, Neus, Manel Cascallo, Alena Gros, Meritxell Huch, Cristina Fillat, et Ramon Alemany. 2006. « Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting ». *The Journal of General Virology* 87 (Pt 9) (septembre): 2487-2495. doi:10.1099/vir.0.81889-0.
- Bear, C E, F Duguay, A L Naismith, N Kartner, J W Hanrahan, et J R Riordan. 1991. «Cl- channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (29) (octobre 15): 19142-19145.
- Beaudoin, A R, et G Grondin. 1991. « Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1071 (3) (novembre 13): 203-219.
- Becq, F. 2003. « [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis] ». Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Sociéte Française De Pédiatrie 10 Suppl 2 (septembre): 325s-332s.
- Becq, F, M Fanjul, M Merten, C Figarella, E Hollande, et M Gola. 1993. « Possible regulation of CFTRchloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells ». FEBS Letters 327 (3) (août 2): 337-342.
- Bedwell, D M, A Kaenjak, D J Benos, Z Bebok, J K Bubien, J Hong, A Tousson, J P Clancy, et E J Sorscher. 1997. « Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line ». Nature Medicine 3 (11) (novembre): 1280-1284.

- Bellon, G, L Calmard, D Thouvenot, H Levrey, V Jagneaux, F Poitevin, C Malcus, et al. 1996. « [Aerosol administration of a replication defective recombinant adenovirus expressing normal human cDNA-CFTR in the respiratory tractus in patients with cystic fibrosis] ». Comptes Rendus Des Séances De La Société De Biologie Et De Ses Filiales 190 (1): 109-142.
- Benharouga, Mohamed, Manu Sharma, Jeffry So, Martin Haardt, Luke Drzymala, Milka Popov, Blanche Schwapach, Sergio Grinstein, Kai Du, et Gergely L Lukacs. 2003. « The role of the C terminus and Na+/H+ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (24) (juin 13): 22079-22089. doi:10.1074/jbc.M301030200.
- Ben-Israel, Haggit, et Tamar Kleinberger. 2002. «Adenovirus and cell cycle control». Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library 7 (mai 1): d1369-1395.
- Berdiev, Bakhrom K, Yawar J Qadri, et Dale J Benos. 2009. «Assessment of the CFTR and ENaC association ». *Molecular bioSystems* 5 (2) (février): 123-127. doi:10.1039/b810471a.
- Berditchevski, F. 2001. « Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 23) (décembre): 4143-4151.
- Bergelson, J. M. 1997. « Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5 ». *Science* 275 (5304) (février): 1320-1323. doi:10.1126/science.275.5304.1320.
- Berger, H A, et M J Welsh. 1991. « Electrolyte transport in the lungs ». *Hospital Practice (Office Ed.)* 26 (3) (mars 15): 53-59.
- Bertrand, Carol A, et Raymond A Frizzell. 2003. « The role of regulated CFTR traficking in epithelial secretion ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (1) (juillet): C1-18. doi:10.1152/ajpcell.00554.2002.
- Bett, A J, L Prevec, et F L Graham. 1993. « Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors ». *Journal of Virology* 67 (10) (octobre): 5911-5921.
- Bewley, M. C. 1999. « Structural Analysis of the Mechanism of Adenovirus Binding to Its Human Cellular Receptor, CAR ». *Science* 286 (5444) (novembre): 1579-1583. doi:10.1126/science.286.5444.1579.
- Bishop, N, et P Woodman. 2001. « TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (15) (avril 13): 11735-11742. doi:10.1074/jbc.M009863200.
- Blanc, Lionel, et Michel Vidal. 2008. « [Secreted exosomes from reticulocytes express an eat-me signal] ». *Médecine Sciences: M/S* 24 (5) (mai): 462-463. doi:10.1051/medsci/2008245462.
- Blanchard, Nicolas, Danielle Lankar, Florence Faure, Armelle Regnault, Céline Dumont, Graça Raposo, et Claire Hivroz. 2002. « TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (7) (avril 1): 3235-3241.
- Borgo, G, G Mastella, P Gasparini, A Zorzanello, R Doro, et P F Pignatti. 1990. « Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis ». *Journal of Medical Genetics* 27 (11) (novembre): 665-669.
- Boucher, R C. 1999. « Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (4) (février): 441-445. doi:10.1172/JCI6330.
- Boucher, R C, M R Knowles, L G Johnson, J C Olsen, R Pickles, J M Wilson, J Engelhardt, Y Yang, et M Grossman. 1994. « Gene therapy for cystic fibrosis using E1-deleted adenovirus: a phase I trial in the nasal cavity. The University of North Carolina at Chapel Hill ». *Human Gene Therapy* 5 (5) (mai): 615-639. doi:10.1089/hum.1994.5.5-615.
- Boulanger, C M, A Scoazec, T Ebrahimian, P Henry, E Mathieu, A Tedgui, et Z Mallat. 2001. «Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction ». *Circulation* 104 (22) (novembre 27): 2649-2652.
- Boulanger, P A, et F Puvion. 1974. « Adenovirus assembly. Cross-linking of adenovirus type-2 hexons in vitro ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 43 (3) (avril 16): 465-470.
- Bowen, G.P., Borgland, S.L., Lam, M., Libermann, T.A., Wong, N.C., and Muruve, D.A. (2002). Adenovirus vector-induced inflammation: Capsid-dependent induction of the C-C chemokine RANTES requires NF-kB. Hum. Gene Ther. 13, 367–379.

- Bradbury, N A, J A Cohn, C J Venglarik, et R J Bridges. 1994. «Biochemical and biophysical identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels as components of endocytic clathrin-coated vesicles ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (11) (mars 18): 8296-8302.
- Brodsky, Sergey V, Fan Zhang, Alberto Nasjletti, et Michael S Goligorsky. 2004. « Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro ». American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 286 (5) (mai): H1910-1915. doi:10.1152/ajpheart.01172.2003.
- Brough, D E, C Hsu, V A Kulesa, G M Lee, L J Cantolupo, A Lizonova, et I Kovesdi. 1997. « Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors in vivo ». *Journal of Virology* 71 (12) (décembre): 9206-9213.
- Bruder, J T, T Jie, D L McVey, et I Kovesdi. 1997. « Expression of gp19K increases the persistence of transgene expression from an adenovirus vector in the mouse lung and liver ». *Journal of Virology* 71 (10) (octobre): 7623-7628.
- Buckley, S.M., Waddington, S.N., Jezzard, S., Bergau, A., Themis, M., Macvinish, L.J., Cuthbert, A.W., Colledge, W.H., and Coutelle, C., (2008). Intra-amniotic delivery of CFTR-expressing adenovirus does not reverse cystic fibrosis phenotype in inbred CFTR-knockout mice. Mol. Ther. 15, 378-385.
- Caby, Marie-Pierre, Danielle Lankar, Claude Vincendeau-Scherrer, Graça Raposo, et Christian Bonnerot. 2005. «Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma». *International Immunology* 17 (7) (juillet): 879-887. doi:10.1093/intimm/dxh267.
- Campos, S. K, et M. A Barry. 2007. « Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting ». *Current gene therapy* 7 (3): 189.
- Cardin, A D, R L Jackson, D A Sparrow, et J T Sparrow. 1989. «Interaction of glycosaminoglycans with lipoproteins ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 556: 186-193.
- Cepko, C L, et P A Sharp. 1983. « Analysis of Ad5 hexon and 100K ts mutants using conformation-specific monoclonal antibodies ». *Virology* 129 (1) (août): 137-154.
- Charrin, Stéphanie, Serge Manié, Christoph Thiele, Martine Billard, Denis Gerlier, Claude Boucheix, et Eric Rubinstein. 2003. « A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins ». *European Journal of Immunology* 33 (9) (septembre): 2479-2489. doi:10.1002/eji.200323884.
- Chen, Eva Y, M Claire Bartlett, Tip W Loo, et David M Clarke. 2004. « The DeltaF508 mutation disrupts packing of the transmembrane segments of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (38) (septembre 17): 39620-39627. doi:10.1074/jbc.M407887200.
- Chen, Eva Y.-J., M. Claire Bartlett, et David M. Clarke. 2000. « <title> Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Has an Altered Structure When Its Maturation Is Inhibited <sup>1</sup></title> ». *Biochemistry* 39 (13) (avril): 3797-3803. doi:10.1021/bi992620m.
- Cheng, Jie, Hua Wang, et William B Guggino. 2004. «Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (3) (janvier 16): 1892-1898. doi:10.1074/jbc.M308640200.
- Cheng, S H, R J Gregory, J Marshall, S Paul, D W Souza, G A White, C R O'Riordan, et A E Smith. 1990. « Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis ». *Cell* 63 (4) (novembre 16): 827-834.
- Chiba-Falek, O, E Kerem, T Shoshani, M Aviram, A Augarten, L Bentur, A Tal, E Tullis, A Rahat, et B Kerem. 1998. « The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C-->T mutation ». *Genomics* 53 (3) (novembre 1): 276-283. doi:10.1006/geno.1998.5517.
- Chirmule, N, K Propert, S Magosin, Y Qian, R Qian, et J Wilson. 1999. «Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans ». *Gene Therapy* 6 (9) (septembre): 1574-1583. doi:10.1038/sj.gt.3300994.
- Chironi, Gilles N, Chantal M Boulanger, Alain Simon, Françoise Dignat-George, Jean-Marie Freyssinet, et Alain Tedgui. 2009. « Endothelial microparticles in diseases ». *Cell and Tissue Research* 335 (1) (janvier): 143-151. doi:10.1007/s00441-008-0710-9.

- Chiu, C Y, P Mathias, G R Nemerow, et P L Stewart. 1999. « Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin ». *Journal of Virology* 73 (8) (août): 6759-6768.
- Chu, Y, D Heistad, M I Cybulsky, et B L Davidson. 2001. « Vascular cell adhesion molecule-1 augments adenovirus-mediated gene transfer ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (2) (février): 238-242.
- Cocucci, Emanuele, Gabriella Racchetti, Paola Podini, et Jacopo Meldolesi. 2007. « Enlargeosome trafic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both ». trafic (Copenhagen, Denmark) 8 (6) (juin): 742-757. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00566.x.
- Cohen, C. J, J. T.C Shieh, R. J Pickles, T. Okegawa, J. T Hsieh, et J. M Bergelson. 2001. «The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15191.
- Cotten, J F, et M J Welsh. 1997. « Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41) (octobre 10): 25617-25622.
- Coughlan L, Alba R, Parker AL, Bradshaw AC, et McNeish IA. 2010. « Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors ». *Viruses 2: 2290-2355*.
- Crystal, R G, N G McElvaney, M A Rosenfeld, C S Chu, A Mastrangeli, J G Hay, S L Brody, H A Jaffe, N T Eissa, et C Danel. 1994. « Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis ». *Nature Genetics* 8 (1) (septembre): 42-51. doi:10.1038/ng0994-42.
- Danthinne, X, et M J Imperiale. 2000. « Production of first generation adenovirus vectors: a review ». *Gene Therapy* 7 (20) (octobre): 1707-1714. doi:10.1038/sj.gt.3301301.
- Darr, Sebastian, Ijad Madisch, Sören Hofmayer, Fabienne Rehren, et Albert Heim. 2009. « Phylogeny and primary structure analysis of fiber shafts of all human adenovirus types for rational design of adenoviral gene-therapy vectors ». *The Journal of General Virology* 90 (Pt 12) (décembre): 2849-2854. doi:10.1099/vir.0.014514-0.
- Davies, L.A, Varathalingam, A., Painter, H., Lawton, A.E., Summer-Jones, S.G., Nunez Alonso, G.A., Chan, M., Munkonge, F., Alton, E.W., Hyde, S.C., and Gill, D.R. (2008). Adenovirus-mediated in utero expression of CFTR does improve survival of CFTR knockout mice. Mol. Ther. 16, 812-818.
- Davison, E, R M Diaz, I R Hart, G Santis, et J F Marshall. 1997. «Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16 ». Journal of Virology 71 (8) (août): 6204-6207.
- Davison, E, I Kirby, T Elliott, et G Santis. 1999. « The human HLA-A\*0201 allele, expressed in hamster cells, is not a high-affinity receptor for adenovirus type 5 fiber ». *Journal of Virology* 73 (5) (mai): 4513-4517.
- Dechecchi, M C, P Melotti, A Bonizzato, M Santacatterina, M Chilosi, et G Cabrini. 2001a. «Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5 ». *Journal of Virology* 75 (18) (septembre): 8772-8780.
- Dechecchi, M C, A Tamanini, A Bonizzato, et G Cabrini. 2000. « Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions ». *Virology* 268 (2) (mars 15): 382-390. doi:10.1006/viro.1999.0171.
- Defer, C., M. T. Belin, M. L. Caillet-Boudin, et P. Boulanger. 1990. «Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. » *Journal of virology* 64 (8): 3661.
- van Deurs, B, P K Holm, L Kayser, K Sandvig, et S H Hansen. 1993. «Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes ». *European Journal of Cell Biology* 61 (2) (août): 208-224.
- Devaux, C, M L Caillet-Boudin, B Jacrot, et P Boulanger. 1987. « Crystallization, enzymatic cleavage, and the polarity of the adenovirus type 2 fiber ». *Virology* 161 (1) (novembre): 121-128.
- Devidas, S, et W B Guggino. 1997. « CFTR: domains, structure, and function ». Journal of Bioenergetics and Biomembranes 29 (5) (octobre): 443-451.

- Dormitzer, Philip R, Zhen-Yu J Sun, Gerhard Wagner, et Stephen C Harrison. 2002. «The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site ». *The EMBO Journal* 21 (5) (mars 1): 885-897. doi:10.1093/emboj/21.5.885.
- Douglas, J T, B E Rogers, M E Rosenfeld, S I Michael, M Feng, et D T Curiel. 1996. « Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors ». *Nature Biotechnology* 14 (11) (novembre): 1574-1578. doi:10.1038/nbt1196-1574.
- Du, Kai, Manu Sharma, et Gergely L Lukacs. 2005. « The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (1) (janvier): 17-25. doi:10.1038/nsmb882.
- Edvardsson, B, E Everitt, H Jörnvall, L Prage, et L Philipson. 1976. «Intermediates in adenovirus assembly ». *Journal of Virology* 19 (2) (août): 533-547.
- Egan, M, T Flotte, S Afione, R Solow, P L Zeitlin, B J Carter, et W B Guggino. 1992. «Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR ». *Nature* 358 (6387) (août 13): 581-584. doi:10.1038/358581a0.
- Escola, J M, M J Kleijmeer, W Stoorvogel, J M Griffith, O Yoshie, et H J Geuze. 1998. «Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (32) (août 7): 20121-20127.
- Escudier, Bernard, Thierry Dorval, Nathalie Chaput, Fabrice André, Marie-Pierre Caby, Sophie Novault, Caroline Flament, et al. 2005. «Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of thefirst phase I clinical trial». *Journal of Translational Medicine* 3 (1) (mars 2): 10. doi:10.1186/1479-5876-3-10.
- Farley, D. C., Iqball, S., Smith, J. C., Miskin, J. E., Kingsman, S. M., and Mitrophanous, K. A. (2007). Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors – in vitro and in vivo implications. J. Gene Med., 9, 345-356.
- Fender, P., G. Schoehn, F. Perron-Sierra, G. C Tucker, et H. Lortat-Jacob. 2008. «Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle ». *Virology* 371 (1): 155–164.
- Fleischli, C., S. Verhaagh, M. Havenga, D. Sirena, W. Schaffner, R. Cattaneo, U. F Greber, et S. Hemmi. 2005. « The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35 ». Journal of virology 79 (15): 10013.
- Fleischli, Christoph, Dominique Sirena, Guillaume Lesage, Menzo J E Havenga, Roberto Cattaneo, Urs F Greber, et Silvio Hemmi. 2007. « Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor ». *The Journal of General Virology* 88 (Pt 11) (novembre): 2925-2934. doi:10.1099/vir.0.83142-0.
- Flint S Jane. 2001. «Adenoviruses», In encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing group/ www.els.net, pp 1-14 édition. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000409/pdf.
- Foskett, J K. 1998. « CIC and CFTR chloride channel gating ». *Annual Review of Physiology* 60: 689-717. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.689.
- Freyssinet, J-M. 2003. « Cellular microparticles: what are they bad or good for? » Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH 1 (7) (juillet): 1655-1662.
- Gabriel, S E, L L Clarke, R C Boucher, et M J Stutts. 1993. « CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship ». *Nature* 363 (6426) (mai 20): 263-268. doi:10.1038/363263a0.
- Gaden, Florence, Laure Franqueville, Maria K Magnusson, Saw See Hong, Marc D Merten, Leif Lindholm, et Pierre Boulanger. 2004a. «Gene transduction and cell entry pathway of fibermodified adenovirus type 5 vectors carrying novel endocytic peptide ligands selected on human tracheal glandular cells ». *Journal of Virology* 78 (13) (juillet): 7227-7247. doi:10.1128/JVI.78.13.7227-7247.2004.
- Gadsby, D C, et A C Nairn. 1999. « Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis ». *Physiological Reviews* 79 (1 Suppl) (janvier): S77-S107.

- Gadsby, David C, Paola Vergani, et László Csanády. 2006. « The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis ». *Nature* 440 (7083) (mars 23): 477-483. doi:10.1038/nature04712.
- Gaggar, A., D. M Shayakhmetov, M. K Liszewski, J. P Atkinson, et A. Lieber. 2005. « Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus ». *Journal of virology* 79 (12): 7503.
- Gaggar, Anuj, Dmitry M Shayakhmetov, et André Lieber. 2003. « CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses ». *Nature Medicine* 9 (11) (novembre): 1408-1412. doi:10.1038/nm952.
- Gentzsch, Martina, Xiu-Bao Chang, Liying Cui, Yufeng Wu, Victor V Ozols, Amit Choudhury, Richard E Pagano, et John R Riordan. 2004. « Endocytic traficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (6) (juin): 2684-2696. doi:10.1091/mbc.E04-03-0176.
- Gerdes, C A, M G Castro, et P R Löwenstein. 2000. «Strong promoters are the key to highly efficient, noninflammatory and noncytotoxic adenoviral-mediated transgene delivery into the brain in vivo ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2 (4) (octobre): 330-338. doi:10.1006/mthe.2000.0140.
- Geuze, H J, J W Slot, et A L Schwartz. 1987. «Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution ». *The Journal of Cell Biology* 104 (6) (juin): 1715-1723.
- Ghosh-Choudhury, G, Y Haj-Ahmad, et F L Graham. 1987. « Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes ». *The EMBO Journal* 6 (6) (juin): 1733-1739.
- Goldman, M J, L A Litzky, J F Engelhardt, et J M Wilson. 1995. « Transfer of the CFTR gene to the lung of nonhuman primates with E1-deleted, E2a-defective recombinant adenoviruses: a preclinical toxicology study ». *Human Gene Therapy* 6 (7) (juillet): 839-851. doi:10.1089/hum.1995.6.7-839.
- Van Goor, Fredrick, Sabine Hadida, Peter D J Grootenhuis, Bill Burton, Dong Cao, Tim Neuberger, Amanda Turnbull, et al. 2009. « Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44) (novembre 3): 18825-18830. doi:10.1073/pnas.0904709106.
- Van Goor, Fredrick, Kimberly S Straley, Dong Cao, Jesús González, Sabine Hadida, Anna Hazlewood, John Joubran, et al. 2006. « Rescue of DeltaF508-CFTR traficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (6) (juin): L1117-1130. doi:10.1152/ajplung.00169.2005.
- Gout, E., G. Schoehn, D. Fenel, H. Lortat-Jacob, et P. Fender. 2010. «The Adenovirus Type 3 Dodecahedron's RGD Loop Comprises an HSPG Binding Site That Influences Integrin Binding » 2010. doi:10.1155/2010/541939.
- Granio, Ophélia, Caroline Norez, Katherine J D Ashbourne Excoffon, Philip H Karp, Monika Lusky, Frédéric Becq, Pierre Boulanger, Joseph Zabner, et Saw-See Hong. 2007. « Cellular localization and activity of Ad-delivered GFP-CFTR in airway epithelial and tracheal cells ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37 (6) (décembre): 631-639. doi:10.1165/rcmb.2007-0026TE.
- Grave, L, D Dreyer, A Dieterle, P Leroy, A I Michou, C Doderer, A Pavirani, M Lusky, et M Mehtali. 2000. « Differential influence of the E4 adenoviral genes on viral and cellular promoters ». *The Journal of Gene Medicine* 2 (6) (décembre): 433-443. doi:10.1002/1521-2254(200011/12)2:6<433::AID-JGM143>3.0.CO;2-1.
- Greber, U F, P Webster, J Weber, et A Helenius. 1996. « The role of the adenovirus protease on virus entry into cells ». *The EMBO Journal* 15 (8) (avril 15): 1766-1777.
- Greber, U F, M Willetts, P Webster, et A Helenius. 1993. « Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells ». *Cell* 75 (3) (novembre 5): 477-486.
- Green, N M, N G Wrigley, W C Russell, S R Martin, et A D McLachlan. 1983. « Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre ». *The EMBO Journal* 2 (8): 1357-1365.
- Greenwald, Rebecca J, Gordon J Freeman, et Arlene H Sharpe. 2005. « The B7 family revisited ». *Annual Review of Immunology* 23: 515-548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.

- Greig, Jenny A, Suzanne Mk Buckley, Simon N Waddington, Alan L Parker, David Bhella, Rebecca Pink, Ahad A Rahim, et al. 2009. « Influence of coagulation factor x on in vitro and in vivo gene delivery by adenovirus (Ad) 5, Ad35, and chimeric Ad5/Ad35 vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (10) (octobre): 1683-1691. doi:10.1038/mt.2009.152.
- Gruenberg, J, G Griffiths, et K E Howell. 1989. « Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro ». *The Journal of Cell Biology* 108 (4) (avril): 1301-1316.
- Gustafsson, D. J, A. Segerman, K. Lindman, Y. F Mei, et G. Wadell. 2006. « The Arg279Glu Substitution in the Adenovirus Type 11p (Ad11p) Fiber Knob Abolishes EDTA-Resistant Binding to A549 and CHO-CD46 Cells, Converting the Phenotype to That of Ad7p ». *Journal of Virology* 80 (4): 1897.
- Haardt, M, M Benharouga, D Lechardeur, N Kartner, et G L Lukacs. 1999. «C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (31) (juillet 30): 21873-21877.
- Halbert, C L, J M Allen, et A D Miller. 2001. « Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors ». *Journal of Virology* 75 (14) (juillet): 6615-6624. doi:10.1128/JVI.75.14.6615-6624.2001.
- Hallberg, K, A Grzegorczyk, G Larson, et B Strandvik. 1997. « Intestinal permeability in cystic fibrosis in relation to genotype ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 25 (3) (septembre): 290-295.
- Hamosh, A, B J Rosenstein, et G R Cutting. 1992. « CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells ». *Human Molecular Genetics* 1 (7) (octobre): 542-544.
- Hardy, S, M Kitamura, T Harris-Stansil, Y Dai, et M L Phipps. 1997. «Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination ». *Journal of Virology* 71 (3) (mars): 1842-1849.
- Hartman, Z.C., Black, E.P., and Amalfitano, A. (2007). Adenoviral infection induces a multi-faceted innate cellular immune response that is mediated by the Toll-like receptor pathway in A549 cells. Virology 358, 357–372.
- Harvey, B G, P L Leopold, N R Hackett, T M Grasso, P M Williams, A L Tucker, R J Kaner, et al. 1999. «Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus». *The Journal of Clinical Investigation* 104 (9) (novembre): 1245-1255. doi:10.1172/JCI7935.
- Heijnen, H F, N Debili, W Vainchencker, J Breton-Gorius, H J Geuze, et J J Sixma. 1998. « Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules ». *Blood* 91 (7) (avril 1): 2313-2325.
- Henaff, Daniel, et Eric J Kremer. 2008. « [Adenovirus hexon mediates liver gene transfer] ». *Médecine Sciences: M/S* 24 (8-9) (septembre): 673-675.
- Henning, P., Magnusson, M.K., Gunneriusson, E., Hong, S.S., Boulanger, P., Nygren, P. A., & Lindholm, L. (2002). Genetic modification of Ad5 tropism by a novel class of ligands based on a three-helix bundle scaffold derived from staphylococcal protein A. *Hum. Gene Ther.* 13, 1427-1439.
- Henry, L J, D Xia, M E Wilke, J Deisenhofer, et R D Gerard. 1994. «Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli ». Journal of Virology 68 (8) (août): 5239-5246.
- Hensley, S.E., and Amalfitano, A. (2007). Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors. Mol. Ther. 15, 1417–1422.
- Hicke, Linda, et Rebecca Dunn. 2003. «Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins». Annual Review of Cell and Developmental Biology 19: 141-172. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617.
- Hida, K., Lai, S. K., Suk, J.S., Won, S.Y., Boyle, M.P., & Hanes, J. (2011). Common gene therapy viral vectors do not efficiently penetrate sputum from cystic fibrosis patients. *PLoS One* 6(5), e19919.

- Higgins, C F. 1992. « ABC transporters: from microorganisms to man ». *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113. doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
- Hirsch, J G, M E Fedorko, et Z A Cohn. 1968. « Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytic vacuoles in macrophages ». *The Journal of Cell Biology* 38 (3) (septembre): 629-632.
- Hoffman, Emely A, Kristin M Perkumas, Lindsey M Highstrom, et W Daniel Stamer. 2009. «Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (3) (mars): 1313-1318. doi:10.1167/iovs.08-2326.
- Hong, J S, et J A Engler. 1996. « Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers ». *Journal of Virology* 70 (10) (octobre): 7071-7078.
- Hong, S S, L Karayan, J Tournier, D T Curiel, et P A Boulanger. 1997. « Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells ». *The EMBO Journal* 16 (9) (mai 1): 2294-2306. doi:10.1093/emboj/16.9.2294.
- Hong, S.S., Magnusson, M.K., Henning, P., Lindholm, L., & Boulanger, P.(2003). Adenovirus (Ad) stripping: a novel method to generateliganded Ad vectors with new cell target specificity. *Mol. Ther.* 7, 692-699.
- Hong, Saw See, Ewa Szolajska, Guy Schoehn, Laure Franqueville, Susanna Myhre, Leif Lindholm, Rob W H Ruigrok, Pierre Boulanger, et Jadwiga Chroboczek. 2005. « The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses ». *Journal of Molecular Biology* 352 (1) (septembre 9): 125-138. doi:10.1016/j.jmb.2005.06.070.
- HOUGIE, C, E M BARROW, et J B GRAHAM. 1957. «Stuart clotting defect. I. Segregation of an hereditary hemorrhagic state from the heterogeneous group heretofore called stable factor (SPCA, proconvertin, factor VII) deficiency ». *The Journal of Clinical Investigation* 36 (3) (mars): 485-496. doi:10.1172/JCI103446.
- Howard, M, R A Frizzell, et D M Bedwell. 1996. « Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations ». *Nature Medicine* 2 (4) (avril): 467-469.
- Howitt, J. 2003. « Structural Basis for Variation in Adenovirus Affinity for the Cellular Coxsackievirus and Adenovirus Receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (28) (mai): 26208-26215. doi:10.1074/jbc.M301492200.
- Hu, W, M Howard, et G L Lukacs. 2001. « Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *The Biochemical Journal* 354 (Pt 3) (mars 15): 561-572.
- Hugel, Bénédicte, M Carmen Martínez, Corinne Kunzelmann, et Jean-Marie Freyssinet. 2005. « Membrane microparticles: two sides of the coin ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (février): 22-27. doi:10.1152/physiol.00029.2004.
- Hwang, T C, G Nagel, A C Nairn, et D C Gadsby. 1994. «Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 (11) (mai 24): 4698-4702.
- Idone, Vincent, Christina Tam, John W Goss, Derek Toomre, Marc Pypaert, et Norma W Andrews. 2008. « Repair of injured plasma membrane by rapid Ca2+-dependent endocytosis ». *The Journal of Cell Biology* 180 (5) (mars 10): 905-914. doi:10.1083/jcb.200708010.
- Imren, Suzan, Emmanuel Payen, Karen A Westerman, Robert Pawliuk, Mary E Fabry, Connie J Eaves, Benjamin Cavilla, et al. 2002. «Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22) (octobre 29): 14380-14385. doi:10.1073/pnas.212507099.
- Jimenez, Joaquin J, Wenche Jy, Lucia M Mauro, Lawrence L Horstman, Carl Soderland, et Yeon S Ahn. 2003. « Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation ». *British Journal of Haematology* 123 (5) (décembre): 896-902.

- Johnson, L G, J C Olsen, L Naldini, et R C Boucher. 2000. « Pseudotyped human lentiviral vectormediated gene transfer to airway epithelia in vivo». *Gene Therapy* 7 (7) (avril): 568-574. doi:10.1038/sj.gt.3301138.
- Johnstone, R M, A Bianchini, et K Teng. 1989. «Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions ». *Blood* 74 (5) (octobre): 1844-1851.
- Jones, Morris Saffold, Balázs Harrach, Robert D. Ganac, Mary M. A. Gozum, Wilfred P. dela Cruz, Brian Riedel, Chao Pan, Eric L. Delwart, et David P. Schnurr. 2007. « New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis ». *Journal of Virology* 81 (11) (juin): 5978-5984. doi:10.1128/JVI.02650-06.
- de Jong, R N, P C van der Vliet, et A B Brenkman. 2003. « Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 272: 187-211.
- Joseph, P M, B P O'Sullivan, A Lapey, H Dorkin, J Oren, R Balfour, M A Perricone, et al. 2001. « Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications ». *Human Gene Therapy* 12 (11) (juillet 20): 1369-1382. doi:10.1089/104303401750298535.
- Kaier, B, et R Wigand. 1986. «Antigenic homogeneity of adenovirus types 1, 2, 5, and 6». *Journal of Medical Virology* 18 (3) (mars): 283-287.
- Kalyuzhniy, O, N C Di Paolo, M Silvestry, S E Hofherr, M A Barry, P L Stewart, et D M Shayakhmetov.
  2008. «Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo».
  Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (14) (avril 8): 5483-5488. doi:10.1073/pnas.0711757105.
- Kaul, R K, B Hildebrand, S Roberts, et P Jagadeeswaran. 1986. « Isolation and characterization of human blood-coagulation factor X cDNA ». *Gene* 41 (2-3): 311-314.
- Karayan, L., Gay, B., Gerfaux, J. et Boulanger, PA. 1994. "Oligomerization of recombinant penton base of adenovirus type 2 and its assembly with fiber in bacculovirus-infected cells. Virology 202(2): 782-95.
- Kerem, E, M Corey, B S Kerem, J Rommens, D Markiewicz, H Levison, L C Tsui, et P Durie. 1990. « The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508) ». *The New England Journal of Medicine* 323 (22) (novembre 29): 1517-1522. doi:10.1056/NEJM199011293232203.
- Kerem, E, et B Kerem. 1995. « The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1 (6) (novembre): 450-456.
- Kirby, I., E. Davison, A. J Beavil, C. P.C Soh, T. J Wickham, P. W Roelvink, I. Kovesdi, B. J Sutton, et G. Santis. 2000. « Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein ». *Journal of virology* 74 (6): 2804.
- Knowles, M R, J L Carson, A M Collier, J T Gatzy, et R C Boucher. 1981. «Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo». *The American Review of Respiratory Disease* 124 (4) (octobre): 484-490.
- Knowles, M R, K W Hohneker, Z Zhou, J C Olsen, T L Noah, P C Hu, M W Leigh, J F Engelhardt, L J Edwards, et K R Jones. 1995. « A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis ». *The New England Journal of Medicine* 333 (13) (septembre 28): 823-831. doi:10.1056/NEJM199509283331302.
- Konstas, Angelos-Aristeidis, Jan-Peter Koch, Stephen J Tucker, et Christoph Korbmacher. 2002. « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K+ channels by the epithelial sodium channel». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (28) (juillet 12): 25377-25384. doi:10.1074/jbc.M201925200.
- Kristidis, P, D Bozon, M Corey, D Markiewicz, J Rommens, L C Tsui, et P Durie. 1992. «Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis ». American Journal of Human Genetics 50 (6) (juin): 1178-1184.

- Kritz, Angelika B, Campbell G Nicol, Kate L Dishart, Ruth Nelson, Susan Holbeck, Dan J Von Seggern, Lorraine M Work, John H McVey, Stuart A Nicklin, et Andrew H Baker. 2007. « Adenovirus 5 fibers mutated at the putative HSPG-binding site show restricted retargeting with targeting peptides in the HI loop ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (4) (avril): 741-749. doi:10.1038/sj.mt.6300094.
- Kuehn, M J, et R Schekman. 1997. « COPII and secretory cargo capture into transport vesicles ». *Current Opinion in Cell Biology* 9 (4) (août): 477-483.
- Kunzelmann, K, et R Schreiber. 1999. «CFTR, a regulator of channels». *The Journal of Membrane Biology* 168 (1) (mars 1): 1-8.
- Lakkaraju, A, et E Rodriguezboulan. 2008. «Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity ». *Trends in Cell Biology* 18 (5) (mai): 199-209. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.002.
- Lamparski, Henry G, Anita Metha-Damani, Jenq-Yuan Yao, Sanjay Patel, Di-Hwei Hsu, Curtis Ruegg, et Jean-Bernard Le Pecq. 2002. « Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells ». *Journal of Immunological Methods* 270 (2) (décembre 15): 211-226.
- Laulagnier, Karine, Claude Motta, Safouane Hamdi, Sébastien Roy, Florence Fauvelle, Jean-François Pageaux, Toshihide Kobayashi, et al. 2004. «Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization ». *The Biochemical Journal* 380 (Pt 1) (mai 15): 161-171. doi:10.1042/BJ20031594.
- Law, Lane K, et Beverly L Davidson. 2005. « What does it take to bind CAR? » *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 12 (4) (octobre): 599-609. doi:10.1016/j.ymthe.2005.05.017.
- Leopold, P. L, et R. G Crystal. 2007. « Intracellular traficking of adenovirus: many means to many ends ». Advanced drug delivery reviews 59 (8): 810–821.
- Leytus, S P, D C Foster, K Kurachi, et E W Davie. 1986. « Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C ». *Biochemistry* 25 (18) (septembre 9): 5098-5102.
- Li, Jiali, Sonya Lad, Guang Yang, Yunping Luo, Milena Iacobelli-Martinez, F James Primus, Ralph A Reisfeld, et Erguang Li. 2006. « Adenovirus fiber shaft contains a trimerization element that supports peptide fusion for targeted gene delivery ». *Journal of Virology* 80 (24) (décembre): 12324-12331. doi:10.1128/JVI.01331-06.
- Lonberg-Holm, K, R L Crowell, et L Philipson. 1976. « Unrelated animal viruses share receptors ». *Nature* 259 (5545) (février 26): 679-681.
- Louis, N., P. Fender, A. Barge, P. Kitts, et J. Chroboczek. 1994. «Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. » *Journal of virology* 68 (6): 4104.
- Loussouarn, G, S Demolombe, R Mohammad-Panah, D Escande, et I Baró. 1996. « Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K+ currents ». *The American Journal of Physiology* 271 (5 Pt 1) (novembre): C1565-1573.
- Lubamba, Bob, Jean Lebacq, Patrick Lebecque, Rita Vanbever, Anissa Leonard, Pierre Wallemacq, et Teresinha Leal. 2009. «Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (11) (juin 1): 1022-1028. doi:10.1164/rccm.200901-0049OC.
- Lukacs, G L, G Segal, N Kartner, S Grinstein, et F Zhang. 1997. « Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation ». *The Biochemical Journal* 328 (Pt 2) (décembre 1): 353-361.
- Lusky, M, M Christ, K Rittner, A Dieterle, D Dreyer, B Mourot, H Schultz, F Stoeckel, A Pavirani, et M Mehtali. 1998. « In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted ». *Journal of Virology* 72 (3) (mars): 2022-2032.
- Lutz, P, M Rosa-Calatrava, et C Kedinger. 1997. « The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator ». *Journal of Virology* 71 (7) (juillet): 5102-5109.
- Magnusson, M.K., Henning, P., Myhre, S., Wikman, M., Uil, T. G., Friedman, M., Andersson, K.M.E., Hong, S.S., Hoeben, R.C., Habib, N.A., Stahl, S., Boulanger, P., & Lindholm, L. (2007). An Ad5

vector genetically re-targeted by an AffibodyTM molecule with specificity for tumor antigen HER2/neu. *Cancer Gene Ther.* 14, 468-479.

- Magnusson, M.K., Hong, S.S., Boulanger, P., & Lindholm, L. (2001). Genetic 18 re-targeting of adenovirus: a novel strategy employing 'de-knobbing' of the fiber. J. Virol. 75, 7280-7289.
- Mallat, Z, H Benamer, B Hugel, J Benessiano, P G Steg, J M Freyssinet, et A Tedgui. 2000. « Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes ». *Circulation* 101 (8) (février 29): 841-843.
- Martin-Serrano, Juan, Scott W Eastman, Wayne Chung, et Paul D Bieniasz. 2005. «HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway ». *The Journal of Cell Biology* 168 (1) (janvier 3): 89-101. doi:10.1083/jcb.200408155.
- Mathews, C J, J A Tabcharani, X B Chang, T J Jensen, J R Riordan, et J W Hanrahan. 1998. « Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel ». *The Journal of Physiology* 508 (Pt 2) (avril 15): 365-377.
- Mathias, P, T Wickham, M Moore, et G Nemerow. 1994. «Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection ». *Journal of Virology* 68 (10) (octobre): 6811-6814.
- Mathivanan, Suresh, Hong Ji, et Richard J. Simpson. 2010. « Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication ». *Journal of Proteomics* 73 (10) (septembre): 1907-1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- Meier, Oliver, et Urs F Greber. 2004. « Adenovirus endocytosis ». *The Journal of Gene Medicine* 6 Suppl 1 (février): S152-163. doi:10.1002/jgm.553.
- Miyazawa, N., P. L Leopold, N. R Hackett, B. Ferris, S. Worgall, E. Falck-Pedersen, et R. G Crystal. 1999. « Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular traficking of adenovirus gene transfer vectors ». *Journal of virology* 73 (7): 6056.
- Möbius, W, E van Donselaar, Y Ohno-Iwashita, Y Shimada, H F G Heijnen, J W Slot, et H J Geuze. 2003. «Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway ». *trafic (Copenhagen, Denmark)* 4 (4) (avril): 222-231.
- Mornon JP, Lehn P, Callebaut I (2009) Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. Cell Mol Life Sci 66: 3469–3486.
- Moss, Richard B, David Rodman, L Terry Spencer, Moira L Aitken, Pamela L Zeitlin, David Waltz, Carlos Milla, et al. 2004. «Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial ». *Chest* 125 (2) (février): 509-521.
- Mukherjee, S, R N Ghosh, et F R Maxfield. 1997. « Endocytosis ». *Physiological Reviews* 77 (3) (juillet): 759-803.
- Muralidharan-Chari, Vandhana, James W Clancy, Alanna Sedgwick, et Crislyn D'Souza-Schorey. 2010. « Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression ». *Journal* of Cell Science 123 (Pt 10) (mai 15): 1603-1611. doi:10.1242/jcs.064386.
- Ng, P, C Beauchamp, C Evelegh, R Parks, et F L Graham. 2001. « Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 3 (5 Pt 1) (mai): 809-815. doi:10.1006/mthe.2001.0323.
- Nienhuis, Arthur W, Cynthia E Dunbar, et Brian P Sorrentino. 2006. «Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (6) (juin): 1031-1049. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.001.
- Nilsson, Emma C, Rickard J Storm, Johannes Bauer, Susanne M C Johansson, Aivar Lookene, Jonas Ångström, Mattias Hedenström, et al. 2011. «The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis». *Nature Medicine* 17 (1) (janvier): 105-109. doi:10.1038/nm.2267.
- Norez, Caroline, Fabrice Antigny, Sabrina Noel, Clarisse Vandebrouck, et Frédéric Becq. 2009. « A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosislike phenotype ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41 (2) (août): 217-225. doi:10.1165/rcmb.2008-0285OC.

- Norez, Caroline, Sabrina Noel, Martina Wilke, Marcel Bijvelds, Huub Jorna, Patricia Melin, Hugo DeJonge, et Frederic Becq. 2006. « Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat ». *FEBS Letters* 580 (8) (avril 3): 2081-2086. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.010.
- Novelli, A, et P A Boulanger. 1991. «Assembly of adenovirus type 2 fiber synthesized in cell-free translation system ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (14) (mai 15): 9299-9303.
- Novelli, A., et P. A. Boulanger. 1991. «Assembly of adenovirus type 2 fiber synthesized in cell-free translation system. » Journal of Biological Chemistry 266 (14): 9299.
- Ochsenbein, Adrian F. 2002. « Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy ». *Cancer Gene Therapy* 9 (12) (décembre): 1043-1055. doi:10.1038/sj.cgt.7700540.
- Odorizzi, G, M Babst, et S D Emr. 1998. « Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body ». *Cell* 95 (6) (décembre 11): 847-858.
- Okimoto, T., Friedmann, T., and Miyanohara, A. (2001). VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Mol. Ther.* 4, 232-238.
- Okiyoneda, Tsukasa, Kazutsune Harada, Kaori Yamahira, Ikuo Wada, Yasuaki Hashimoto, Keiko Ueno, Mary Ann Suico, Tsuyoshi Shuto, et Hirofumi Kai. 2004. « Characterization of the traficking pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in baby hamster kidney cells ». *Journal of Pharmacological Sciences* 95 (4) (août): 471-475.
- Ostedgaard, Lynda S, Christoph Randak, Tatiana Rokhlina, Philip Karp, Daniel Vermeer, Katherine J Ashbourne Excoffon, et Michael J Welsh. 2003. « Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia ». *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (4) (février 18): 1937-1942. doi:10.1073/pnas.2627982100.
- Otake, K., Ennist, D.L., Harrod, K., & Trapnell, B.C. (1998). Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. *Hum. Gene Ther.* 9, 2207-2222.
- PALADE, G E. 1955. « A small particulate component of the cytoplasm ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1 (1) (janvier): 59-68.
- Pardoll, Drew. 2003. «Does the immune system see tumors as foreign or self?» Annual Review of Immunology 21: 807-839. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141135.
- Parker, Alan L, Simon N Waddington, Campbell G Nicol, Dmitry M Shayakhmetov, Suzanne M Buckley, Laura Denby, Geoffrey Kemball-Cook, et al. 2006. « Multiple vitamin K-dependent coagulation zymogens promote adenovirus-mediated gene delivery to hepatocytes ». *Blood* 108 (8) (octobre 15): 2554-2561. doi:10.1182/blood-2006-04-008532.
- Parks, R J, L Chen, M Anton, U Sankar, M A Rudnicki, et F L Graham. 1996. «A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93 (24) (novembre 26): 13565-13570.
- Parks, R J, et F L Graham. 1997. « A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging ». *Journal of Virology* 71 (4) (avril): 3293-3298.
- Pedemonte, Nicoletta, Davide Boido, Oscar Moran, Michele Giampieri, Mauro Mazzei, Roberto Ravazzolo, et Luis J V Galietta. 2007. « Structure-activity relationship of 1,4-dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel ». *Molecular Pharmacology* 72 (1) (juillet): 197-207. doi:10.1124/mol.107.034702.
- Perricone, M A, J E Morris, K Pavelka, M S Plog, B P O'Sullivan, P M Joseph, H Dorkin, et al. 2001. «Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium ». *Human Gene Therapy* 12 (11) (juillet 20): 1383-1394. doi:10.1089/104303401750298544.
- Peters, P J, H J Geuze, H A Van der Donk, J W Slot, J M Griffith, N J Stam, H C Clevers, et J Borst. 1989. «Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of
human T lymphocytes». *European Journal of Immunology* 19 (8) (août): 1469-1475. doi:10.1002/eji.1830190819.

- Pfeiffer, R A, R Ott, S Gilgenkrantz, et P Alexandre. 1982. « Deficiency of coagulation factors VII and X associated with deletion of a chromosome 13 (q34). Evidence from two cases with 46,XY,t(13;Y)(q11;q34) ». *Human Genetics* 62 (4): 358-360.
- Philpott, N.J., Nociari, M., Elkon, K.B., and Falck-Pedersen, E. (2004). Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-a induction pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 6200–6205
- Picciano, John A, Nadia Ameen, Barth D Grant, et Neil A Bradbury. 2003. «Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (5) (novembre): C1009-1018. doi:10.1152/ajpcell.00140.2003.
- Piedra, P.A., Poveda, G.A., Ramsey, B., McCoy, K., & Hiatt, P.W. (1998). Incidence and prevalence of neutralizing antibodies to the common adenoviruses in children with cystic fibrosis: implication for gene therapy with adenovirus vectors. *Pediatrics* 101, 1013-1019.
- Pind, S, J R Riordan, et D B Williams. 1994. « Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (17) (avril 29): 12784-12788.
- Piper, Robert C, et David J Katzmann. 2007. « Biogenesis and function of multivesicular bodies ». Annual Review of Cell and Developmental Biology 23: 519-547. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319.
- Pisitkun, Trairak, Rong-Fong Shen, et Mark A Knepper. 2004. « Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36) (septembre 7): 13368-13373. doi:10.1073/pnas.0403453101.
- Prince, L S, K Peter, S R Hatton, L Zaliauskiene, L F Cotlin, J P Clancy, R B Marchase, et J F Collawn. 1999. « Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (6) (février 5): 3602-3609.
- Prince, L S, R B Workman Jr, et R B Marchase. 1994. «Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (11) (mai 24): 5192-5196.
- Quinton, P M. 1983. « Chloride impermeability in cystic fibrosis ». Nature 301 (5899) (février 3): 421-422.
- van Raaij, M J, A Mitraki, G Lavigne, et S Cusack. 1999. «A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein ». *Nature* 401 (6756) (octobre 28): 935-938. doi:10.1038/44880.
- Raiborg, C, B Bremnes, A Mehlum, D J Gillooly, A D'Arrigo, E Stang, et H Stenmark. 2001. « FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 12) (juin): 2255-2263.
- Raiborg, Camilla, Tor Erik Rusten, et Harald Stenmark. 2003. « Protein sorting into multivesicular endosomes ». *Current Opinion in Cell Biology* 15 (4) (août): 446-455.
- Raposo, G, H W Nijman, W Stoorvogel, R Liejendekker, C V Harding, C J Melief, et H J Geuze. 1996. « B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles ». *The Journal of Experimental Medicine* 183 (3) (mars 1): 1161-1172.
- Raschperger, E., J. Thyberg, S. Pettersson, L. Philipson, J. Fuxe, et R. F Pettersson. 2006. «The coxsackie-and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis ». *Experimental cell research* 312 (9): 1566–1580.
- Ratajczak, J, K Miekus, M Kucia, J Zhang, R Reca, P Dvorak, et M Z Ratajczak. 2006. « Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery ». *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20 (5) (mai): 847-856. doi:10.1038/sj.leu.2404132.
- Ratajczak, J, M Wysoczynski, F Hayek, A Janowska-Wieczorek, et M Z Ratajczak. 2006. «Membranederived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell

communication ». Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K 20 (9) (septembre): 1487-1495. doi:10.1038/sj.leu.2404296.

- Raymond, C K, I Howald-Stevenson, C A Vater, et T H Stevens. 1992. «Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants ». *Molecular Biology of the Cell* 3 (12) (décembre): 1389-1402.
- Rezaie, A R. 2000. « Identification of basic residues in the heparin-binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (5) (février 4): 3320-3327.
- Riordan, J R, J M Rommens, B Kerem, N Alon, R Rozmahel, Z Grzelczak, J Zielenski, S Lok, N Plavsic, et J L Chou. 1989. « Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA ». Science (New York, N.Y.) 245 (4922) (septembre 8): 1066-1073.
- Riteau, Béatrice, Florence Faure, Catherine Menier, Sophie Viel, Edgardo D Carosella, Sèbastian Amigorena, et Nathalie Rouas-Freiss. 2003. « Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells ». *Human Immunology* 64 (11) (novembre): 1064-1072.
- Roelvink, P W, A Lizonova, J G Lee, Y Li, J M Bergelson, R W Finberg, D E Brough, I Kovesdi, et T J Wickham. 1998. «The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F ». Journal of Virology 72 (10) (octobre): 7909-7915.
- Rogée, S, E Grellier, C Bernard, N Jouy, A Loyens, J C Beauvillain, P Fender, et al. 2010. « Influence of chimeric human-bovine fibers on adenoviral uptake by liver cells and the antiviral immune response ». *Gene Therapy* 17 (7) (juillet): 880-891. doi:10.1038/gt.2010.37.
- Rosenberg, M.F., O'Ryan, L.P., Hughes, G, Zhao, Z, Aleksandrov, L.A., Riordan, J.R. & Ford, R.C. 2011 The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR):3D structure and localisation of a channel gate. *J Biol Chem.* 2011 Sep 19. Epub ahead of print
- Rosenfeld, M A, K Yoshimura, B C Trapnell, K Yoneyama, E R Rosenthal, W Dalemans, M Fukayama, J Bargon, L E Stier, et L Stratford-Perricaudet. 1992. « In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium ». *Cell* 68 (1) (janvier 10): 143-155.
- Rubenstein, R C, et P L Zeitlin. 1998. « A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function ». American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 157 (2) (février): 484-490.
- Russell, S. 2004. « CD46: A complement regulator and pathogen receptor that mediates links between innate and acquired immune function ». *Tissue Antigens* 64 (2) (août): 111-118. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00277.x.
- Russell, W C. 2000a. « Update on adenovirus and its vectors ». *The Journal of General Virology* 81 (Pt 11) (novembre): 2573-2604.
- Sadlish, H, et W R Skach. 2004. « Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex ». *The Journal of Membrane Biology* 202 (3) (décembre): 115-126. doi:10.1007/s00232-004-0715-6.
- Saksena, Suraj, Ji Sun, Tony Chu, et Scott D Emr. 2007. « ESCRTing proteins in the endocytic pathway ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (12) (décembre): 561-573. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.010.
- Salone, Barbara, Yuri Martina, Stefania Piersanti, Enrico Cundari, Gioia Cherubini, Laure Franqueville, Cristina M Failla, Pierre Boulanger, et Isabella Saggio. 2003. «Integrin alpha3beta1 is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5 ». *Journal of Virology* 77 (24) (décembre): 13448-13454.
- Santis, G, V Legrand, S S Hong, E Davison, I Kirby, J L Imler, R W Finberg, J M Bergelson, M Mehtali, et P Boulanger. 1999. «Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR ». *The Journal of General Virology* 80 (Pt 6) (juin): 1519-1527.
- Santis, G, L Osborne, R A Knight, et M E Hodson. 1990. «Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis ». *Lancet* 336 (8723) (novembre 3): 1081-1084.

- Savina, Ariel, Marcelo Furlán, Michel Vidal, et Maria I Colombo. 2003. « Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (22) (mai 30): 20083-20090. doi:10.1074/jbc.M301642200.
- Scholz, Thomas, Uta Temmler, Siegfried Krause, Stan Heptinstall, et Wolfgang Lösche. 2002. « Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P ». *Thrombosis and Haemostasis* 88 (6) (décembre): 1033-1038. doi:10.1267/th02121033.
- Schowalter, D B, J C Tubb, M Liu, C B Wilson, et M A Kay. 1997. «Heterologous expression of adenovirus E3-gp19K in an E1a-deleted adenovirus vector inhibits MHC I expression in vitro, but does not prolong transgene expression in vivo». Gene Therapy 4 (4) (avril): 351-360. doi:10.1038/sj.gt.3300398.
- Schwiebert, E M, D J Benos, M E Egan, M J Stutts, et W B Guggino. 1999. « CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel ». *Physiological Reviews* 79 (1 Suppl) (janvier): S145-166.
- Seibert, F S, T W Loo, D M Clarke, et J R Riordan. 1997. « Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29 (5) (octobre): 429-442.
- Seiradake, E., H. Lortat-Jacob, O. Billet, E. J. Kremer, et S. Cusack. 2006. « Structural and Mutational Analysis of Human Ad37 and Canine Adenovirus 2 Fiber Heads in Complex with the D1 Domain of Coxsackie and Adenovirus Receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (44) (septembre): 33704-33716. doi:10.1074/jbc.M605316200.
- Sellam, Jérémie, Valérie Proulle, Astrid Jüngel, Marc Ittah, Corinne Miceli Richard, Jacques-Eric Gottenberg, Florence Toti, et al. 2009. « Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity ». *Arthritis Research & Therapy* 11 (5): R156. doi:10.1186/ar2833.
- Sharma, A., X. Li, D. S Bangari, et S. K Mittal. 2009. «Adenovirus receptors and their implications in gene delivery ». *Virus research* 143 (2): 184–194.
- Sharma, Manu, Francesca Pampinella, Csilla Nemes, Mohamed Benharouga, Jeffrey So, Kai Du, Kristi G Bache, et al. 2004. « Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes ». *The Journal of Cell Biology* 164 (6) (mars 15): 923-933. doi:10.1083/jcb.200312018.
- Shayakhmetov, D. M, Z. Y Li, V. Ternovoi, A. Gaggar, H. Gharwan, et A. Lieber. 2003. « The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular traficking route of adenoviruses ». *Journal of virology* 77 (6): 3712.
- Shayakhmetov, Dmitry M, Andrea M Eberly, Zong-Yi Li, et André Lieber. 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 ». *Journal of Virology* 79 (2) (janvier): 1053-1061. doi:10.1128/JVI.79.2.1053-1061.2005.
- Shayakhmetov, Dmitry M, Anuj Gaggar, Shaoheng Ni, Zong-Yi Li, et André Lieber. 2005. « Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity ». *Journal of Virology* 79 (12) (juin): 7478-7491. doi:10.1128/JVI.79.12.7478-7491.2005.
- Sheppard, D N, et M J Welsh. 1993. «Inhibition of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by ATP-sensitive K+ channel regulators ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 707 (décembre 20): 275-284.
- ------. 1999. « Structure and function of the CFTR chloride channel ». *Physiological Reviews* 79 (1 Suppl) (janvier): S23-45.
- Short, D B, K W Trotter, D Reczek, S M Kreda, A Bretscher, R C Boucher, M J Stutts, et S L Milgram. 1998. « An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (31) (juillet 31): 19797-19801.
- Short, Joshua J, Alexander V Pereboev, Yosuke Kawakami, Chenthamarakshan Vasu, Mark J Holterman, et David T Curiel. 2004. «Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors». *Virology* 322 (2) (mai 1): 349-359. doi:10.1016/j.virol.2004.02.016.

- Short, Joshua J, Chenthamarakshan Vasu, Mark J Holterman, David T Curiel, et Alexander Pereboev. 2006. « Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors ». *Virus Research* 122 (1-2) (décembre): 144-153. doi:10.1016/j.virusres.2006.07.009.
- Sidhu, Sukhvinder S, Aklilu T Mengistab, Andrew N Tauscher, Jennifer LaVail, et Carol Basbaum. 2004. « The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions ». Oncogene 23 (4) (janvier 29): 956-963. doi:10.1038/sj.onc.1207070.
- Signäs, C, G Akusjärvi, et U Pettersson. 1985. « Adenovirus 3 fiber polypeptide gene: implications for the structure of the fiber protein ». *Journal of Virology* 53 (2) (février): 672-678.
- Simon, R H, J F Engelhardt, Y Yang, M Zepeda, S Weber-Pendleton, M Grossman, et J M Wilson. 1993. «Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study ». *Human Gene Therapy* 4 (6) (décembre): 771-780. doi:10.1089/hum.1993.4.6-771.
- Sims, P J, E M Faioni, T Wiedmer, et S J Shattil. 1988. « Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (34) (décembre 5): 18205-18212.
- Sinn, Patrick L, Erin R Burnight, Melissa A Hickey, Gary W Blissard, et Paul B McCray Jr. 2005. « Persistent gene expression in mouse nasal epithelia following feline immunodeficiency virusbased vector gene transfer ». *Journal of Virology* 79 (20) (octobre): 12818-12827. doi:10.1128/JVI.79.20.12818-12827.2005.
- Sirena, Dominique, Benjamin Lilienfeld, Markus Eisenhut, Stefan Kälin, Karin Boucke, Roger R Beerli, Lorenz Vogt, et al. 2004. « The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3 ». *Journal of Virology* 78 (9) (mai): 4454-4462.
- Skog, Johan, Tom Würdinger, Sjoerd van Rijn, Dimphna H Meijer, Laura Gainche, Miguel Sena-Esteves, William T Curry Jr, Bob S Carter, Anna M Krichevsky, et Xandra O Breakefield. 2008.
  « Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers ». *Nature Cell Biology* 10 (12) (décembre): 1470-1476. doi:10.1038/ncb1800.
- Smith, Theodore A G, Neeraja Idamakanti, Jennifer Marshall-Neff, Michele L Rollence, Patrick Wright, Michele Kaloss, Laura King, et al. 2003. « Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates ». *Human Gene Therapy* 14 (17) (novembre 20): 1595-1604. doi:10.1089/104303403322542248.
- Stehle, T, et S C Harrison. 1997. «High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding ». *The EMBO Journal* 16 (16) (août 15): 5139-5148. doi:10.1093/emboj/16.16.5139.
- Stevenson, S. C, M. Rollence, B. White, L. Weaver, et A. McClelland. 1995. «Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain ». *Journal of virology* 69 (5): 2850.
- Subra, Caroline, Karine Laulagnier, Bertrand Perret, et Michel Record. 2007. «Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies ». *Biochimie* 89 (2) (février): 205-212. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.014.
- Subramanian, T, S Vijayalingam, et G Chinnadurai. 2006. «Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread». *Journal of Virology* 80 (4) (février): 2000-2012. doi:10.1128/JVI.80.4.2000-2012.2006.
- Swiatecka-Urban, Agnieszka, Marc Duhaime, Bonita Coutermarsh, Katherine H Karlson, James Collawn, Michal Milewski, Garry R Cutting, William B Guggino, George Langford, et Bruce A Stanton. 2002. « PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (42) (octobre 18): 40099-40105. doi:10.1074/jbc.M206964200.
- TELFER, T P, K W DENSON, et D R WRIGHT. 1956. «A new coagulation defect ». *British Journal of Haematology* 2 (3) (juillet): 308-316.
- Théry, C, M Boussac, P Véron, P Ricciardi-Castagnoli, G Raposo, J Garin, et S Amigorena. 2001. « Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment

distinct from apoptotic vesicles ». Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 166 (12) (juin 15): 7309-7318.

- Théry, C, A Regnault, J Garin, J Wolfers, L Zitvogel, P Ricciardi-Castagnoli, G Raposo, et S Amigorena. 1999. « Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73 ». *The Journal of Cell Biology* 147 (3) (novembre 1): 599-610.
- Toh, M.L., Hong, S.S., van de Loo, F., Franqueville, L., Lindholm, L., van den Berg, W., Boulanger, P., & Miossec, P. (2005). Enhancement of Admediated gene delivery to rheumatoid arthritis synoviocytes and synovium by fiber modifications: role of RGD and non-RGD-binding integrins. J. Immunol. 175, 7687-7698.
- Tollefson, A E, J S Ryerse, A Scaria, T W Hermiston, et W S Wold. 1996. « The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants ». *Virology* 220 (1) (juin 1): 152-162. doi:10.1006/viro.1996.0295.
- Trotman, L C, N Mosberger, M Fornerod, R P Stidwill, et U F Greber. 2001. « Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1 ». *Nature Cell Biology* 3 (12) (décembre): 1092-1100. doi:10.1038/ncb1201-1092.
- Tsui, L C, M Buchwald, D Barker, J C Braman, R Knowlton, J W Schumm, H Eiberg, J Mohr, D Kennedy, et N Plavsic. 1985. « Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker ». *Science (New York, N.Y.)* 230 (4729) (novembre 29): 1054-1057.
- Tuve, Sebastian, Hongjie Wang, Jeffrey D. Jacobs, Roma C. Yumul, David F. Smith, et André Lieber. 2008. «Role of Cellular Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection of Human Adenovirus Serotype 3 and 35». Éd par. William Wold. *PLoS Pathogens* 4 (10) (octobre): e1000189. doi:10.1371/journal.ppat.1000189.
- Ugai, Hideyo, Minghui Wang, Long P Le, David A Matthews, Masato Yamamoto, et David T Curiel. 2010. « In vitro dynamic visualization analysis of fluorescently labeled minor capsid protein IX and core protein V by simultaneous detection ». *Journal of Molecular Biology* 395 (1) (janvier 8): 55-78. doi:10.1016/j.jmb.2009.10.034.
- Uprichard, James, et David J Perry. 2002. « Factor X deficiency ». Blood Reviews 16 (2) (juin): 97-110.
- Utleg, Angelita G, Eugene C Yi, Tao Xie, Paul Shannon, James T White, David R Goodlett, Leroy Hood, et Biaoyang Lin. 2003. « Proteomic analysis of human prostasomes ». *The Prostate* 56 (2) (juillet 1): 150-161. doi:10.1002/pros.10255.
- Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J Lee, et Jan O Lötvall. 2007. « Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells ». *Nature Cell Biology* 9 (6) (juin): 654-659. doi:10.1038/ncb1596.
- Vankeerberghen, A, L Wei, H Teng, M Jaspers, J J Cassiman, B Nilius, et H Cuppens. 1998. « Characterization of mutations located in exon 18 of the CFTR gene ». *FEBS Letters* 437 (1-2) (octobre 16): 1-4.
- Venkateswarlu, Divi, Lalith Perera, Tom Darden, et Lee G Pedersen. 2002. « Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X ». *Biophysical Journal* 82 (3) (mars): 1190-1206. doi:10.1016/S0006-3495(02)75476-3.
- Vidal, M, J Sainte-Marie, J R Philippot, et A Bienvenue. 1989. « Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase" ». *Journal of Cellular Physiology* 140 (3) (septembre): 455-462. doi:10.1002/jcp.1041400308.
- Vigant, Frédéric, Delphyne Descamps, Betsy Jullienne, Stéphanie Esselin, Elisabeth Connault, Paule Opolon, Thierry Tordjmann, Emmanuelle Vigne, Michel Perricaudet, et Karim Benihoud. 2008. « Substitution of Hexon Hypervariable Region 5 of Adenovirus Serotype 5 Abrogates Blood Factor Binding and Limits Gene Transfer to Liver ». *Molecular Therapy* 16 (8) (juin): 1474-1480. doi:10.1038/mt.2008.132.
- Vivès, R. R, H. Lortat-Jacob, J. Chroboczek, et P. Fender. 2004. « Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron ». *Virology* 321 (2): 332–340.

- Waddington, S, J Mcvey, D Bhella, A Parker, K Barker, H Atoda, R Pink, S Buckley, J Greig, et L Denby. 2008. « Adenovirus Serotype 5 Hexon Mediates Liver Gene Transfer ». *Cell* 132 (3) (février): 397-409. doi:10.1016/j.cell.2008.01.016.
- Waddington, Simon N, Alan L Parker, Menzo Havenga, Stuart A Nicklin, Suzanne M K Buckley, John H McVey, et Andrew H Baker. 2007. «Targeting of adenovirus serotype 5 (Ad5) and 5/47 pseudotyped vectors in vivo: fundamental involvement of coagulation factors and redundancy of CAR binding by Ad5». *Journal of Virology* 81 (17) (septembre): 9568-9571. doi:10.1128/JVI.00663-07.
- Wagner, John A, Ilynn B Nepomuceno, Anna H Messner, Mary Lynn Moran, Eric P Batson, Sue Dimiceli, Byron W Brown, et al. 2002. « A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies ». Human Gene Therapy 13 (11) (juillet 20): 1349-1359. doi:10.1089/104303402760128577.
- Walters, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M., Finberg, W., Welsh, M.J., & Zabner, J. (1999). Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. J. Biol. Chem. 274, 10219-10226.
- Walters, R. W, P. Freimuth, T. O Moninger, I. Ganske, J. Zabner, et M. J Welsh. 2002. «Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape ». *Cell* 110 (6): 789– 799.
- Wang, H., Y. Liu, Z. Li, S. Tuve, D. Stone, O. Kalyushniy, D. Shayakhmetov, et al. 2008. « In Vitro and In Vivo Properties of Adenovirus Vectors with Increased Affinity to CD46 ». *Journal of Virology* 82 (21) (août): 10567-10579. doi:10.1128/JVI.01308-08.
- Wang, Hongjie, Zong-Yi Li, Ying Liu, Jonas Persson, Ines Beyer, Thomas Möller, Dilara Koyuncu, et al. 2011. « Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14 ». *Nature Medicine* 17 (1) (janvier): 96-104. doi:10.1038/nm.2270.
- Wang, Xiaodong, Jeanne Matteson, Yu An, Bryan Moyer, Jin-San Yoo, Sergei Bannykh, Ian A Wilson, John R Riordan, et William E Balch. 2004. «COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code ». *The Journal of Cell Biology* 167 (1) (octobre 11): 65-74. doi:10.1083/jcb.200401035.
- Ward, C L, et R R Kopito. 1994. « Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (41) (octobre 14): 25710-25718.
- Weis, W, J H Brown, S Cusack, J C Paulson, J J Skehel, et D C Wiley. 1988. « Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid ». *Nature* 333 (6172) (juin 2): 426-431. doi:10.1038/333426a0.
- Weixel, K M, et N A Bradbury. 2000. « The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (5) (février 4): 3655-3660.
- Welsh, M J, J Zabner, S M Graham, A E Smith, R Moscicki, et S Wadsworth. 1995. «Adenovirusmediated gene transfer for cystic fibrosis: Part A. Safety of dose and repeat administration in the nasal epithelium. Part B. Clinical efficacy in the maxillary sinus ». *Human Gene Therapy* 6 (2) (février): 205-218. doi:10.1089/hum.1995.6.2-205.
- Wiethoff, C. M, H. Wodrich, L. Gerace, et G. R Nemerow. 2005. «Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly ». *Journal of virology* 79 (4): 1992.
- Wilschanski, Michael, Yaacov Yahav, Yasmin Yaacov, Hannah Blau, Lea Bentur, Joseph Rivlin, Micha Aviram, et al. 2003. « Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations ». *The New England Journal of Medicine* 349 (15) (octobre 9): 1433-1441. doi:10.1056/NEJMoa022170.
- Wodrich, Harald, Aurelia Cassany, Maximiliano A D'Angelo, Tinglu Guan, Glen Nemerow, et Larry Gerace. 2006. « Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways ». *Journal of Virology* 80 (19) (octobre): 9608-9618. doi:10.1128/JVI.00850-06.
- Wodrich, Harald, Tinglu Guan, Gino Cingolani, Dan Von Seggern, Glen Nemerow, et Larry Gerace. 2003. «Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear

transport signals ». *The EMBO Journal* 22 (23) (décembre 1): 6245-6255. doi:10.1093/emboj/cdg614.

- Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-Morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C.M. et Kremer EJ. 2010. "A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry". PLoS Pathog. 2010 Mar 19;6(3):e1000808.
- Wolfers, J, A Lozier, G Raposo, A Regnault, C Théry, C Masurier, C Flament, et al. 2001. «Tumorderived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming». *Nature Medicine* 7 (3) (mars): 297-303. doi:10.1038/85438.
- Wubbolts, Richard, Rachel S Leckie, Peter T M Veenhuizen, Guenter Schwarzmann, Wiebke Möbius, Joerg Hoernschemeyer, Jan-Willem Slot, Hans J Geuze, et Willem Stoorvogel. 2003. « Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (13) (mars 28): 10963-10972. doi:10.1074/jbc.M207550200.
- Xia, D, L J Henry, R D Gerard, et J Deisenhofer. 1994. « Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 A resolution ». *Structure (London, England: 1993)* 2 (12) (décembre 15): 1259-1270.
- Yoo, Jin-San, Bryan D Moyer, Sergei Bannykh, Hyeon-Mi Yoo, John R Riordan, et William E Balch. 2002. « Non-conventional traficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13) (mars 29): 11401-11409. doi:10.1074/jbc.M110263200.
- Yurko-Mauro, K A, et W W Reenstra. 1998. « Prostaglandin F2alpha stimulates CFTR activity by PKAand PKC-dependent phosphorylation ». *The American Journal of Physiology* 275 (3 Pt 1) (septembre): C653-660.
- Zabner, J, L A Couture, R J Gregory, S M Graham, A E Smith, et M J Welsh. 1993. «Adenovirusmediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis ». *Cell* 75 (2) (octobre 22): 207-216.
- Zabner, J, B W Ramsey, D P Meeker, M L Aitken, R P Balfour, R L Gibson, J Launspach, R A Moscicki, S M Richards, et T A Standaert. 1996. « Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (6) (mars 15): 1504-1511. doi:10.1172/JCI118573.
- Zhang, F, N Kartner, et G L Lukacs. 1998. « Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR ». *Nature Structural Biology* 5 (3) (mars): 180-183.
- Zielenski, J, D Bozon, B Kerem, D Markiewicz, P Durie, J M Rommens, et L C Tsui. 1991. « Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene ». *Genomics* 10 (1) (mai): 229-235.
- Zubieta, Chloe, Guy Schoehn, Jadwiga Chroboczek, et Stephen Cusack. 2005. « The structure of the human adenovirus 2 penton ». *Molecular Cell* 17 (1) (janvier 7): 121-135. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.041.
- Zwaal, R F A, P Comfurius, et E M Bevers. 2005. « Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (9) (mai): 971-988. doi:10.1007/s00018-005-4527-3.
- Zwaal, R F, et A J Schroit. 1997. « Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells ». *Blood* 89 (4) (février 15): 1121-1132.

## RESUME

La mucoviscidose est une maladie génétique due à des mutations du gène CFTR, conduisant à une altération de la fonction de canal à ions chlorure de la glycoprotéine transmembranaire CFTR associée à une atteinte pulmonaire sévère. Plusieurs études récentes ont amené à reconsidérer l'utilisation des vecteurs adénoviraux (Ad) de sérotype 5 (Ad5) dans la mucoviscidose, lesquels induisent non seulement des réactions immunes antiadénovirales mais aussi des effets cytopathiques indésirables. (1) Dans une première partie de notre étude, nous avons étudié l'entrée et le transit intracellulaire de l'Ad5/F35, vecteur chimérique portant les fibres de l'Ad sérotype 35 sur une capside de sérotype 5. Nous avons montré que la protéine fibre est déterminante dans l'internalisation et le trafic intracellulaire de ce vecteur. Le vecteur Ad5/F35 exprimant la fusion GFP-CFTR s'est révélé (i) être dépourvu de cytotoxicité, (ii) transduire efficacement les cellules épithéliales pulmonaires par voie apicale, et (iii) restorer l'activité de canal à chlorure dans les cellules CFTR(-). Il constitue donc un vecteur de transfert du gène CFTR potentiellement utilisable en thérapie génique de la mucoviscidose. (2) Dans une seconde partie, nous avons exploré une stratégie alternative de transfert de la protéine CFTR par trogocytose. Nous avons fait l'hypothèse que le canal CFTR pouvait être véhiculé par des microvésicules ou microparticules membranaires (MP) émanant de la membrane cellulaire et libérées dans le milieu de culture. En utilisant un système d'expression stable de la protéine CFTR étiquetée par la protéine fluorescente GFP (GFP-CFTR) dans des cellules donneuses, nous avons pu démontrer que les MP sont capables de prendre en charge et délivrer la protéine GFP-CFTR à des cellules réceptrices, mais ce transfert n'est assuré que par une population réduite de MP ( $\leq 8$  %), et la durée de vie du GFP-CFTR n'est que transitoire ( $\leq 24h$ ). En fait, la majorité des MP transfèrent des molécules d'ARN messager ou polysomal GFP-CFTR. La protéine GFP-CFTR néosynthétisée à partir de ces ARNm est exprimée plus tardivement (> 48h) mais de façon prolongée (≥ 10 jours). La fonctionnalité du canal CFTR ainsi néosynthétisé est en cours d'évaluation. Les MP constituent donc un nouveau type de vecteurs de transfert non génique du CFTR qui pourraient être employés en thérapie de la mucoviscidose.

TITLE: Transfer of CFTR by gene tranfer vectors derived from adenoviruses or by trogocytosis of membrane-derived microparticle: molecular mechanisms and applications in cystic fibrosis.

## SUMMARY

The cystic fibrosis (CF) is a genetic disease due to mutations of the CFTR gene, resulting in the alteration of the Cl channel function carried by the transmembranal glycoprotein CFTR, and associated with severe pulmonary complications. Several recent studies led the medical and scientific community to reconsider the use of adenovirus serotype 5 (Ad5)-based vectors as CFTR gene transfer vectors in CF gene therapy. Not only immune response against the vector itself and the transduced cells have been observed, but also Ad5-induced nondesired cytopathic effects. (1) In the first part of our study, we analyzed the cell entry and traficking of Ad5/F35, a chimeric vector consisting of serotype 5 capsid carrying serotype 35 fibers. We showed that the fibre protein is the major, if not only, determinant of the internalisation and entry pathway of Ad5/F35. Ad5/F35-GFP-CFTR, expressing the fusin protein GF-CFTR, was found (i) to be devoid of detectable cytopathic effect, (ii) efficiently transduced airway epithélial cells via the apical pole, and (iii) restore the Cl channel function in CF cells. Ad5/F35 therefore represents a CFTR gene transfer vector with a great potential for gene therapy of CF. (2) In the second part of our study, we have investigated an alternative strategy based on the transfer of the mature CFTR protein via trogocytosis. We hypothesized that microvesicles or microparticules (MP) issued from the cell membranes and released into the culture medium could transport and achieve the cell-to-cell transfer of CFTR channel cargo. We engineered donor cells for stable expression of GFP-tagged CFTR protein (GFP-CFTR), and showed that donor cell-issued MP were capable of delivering GFP-CFTR protein to recipient cell. However, the GFP-CFTR protein was only transferred by a limited population of MP ( $\leq 8$  %), and was only transient ( $\leq 24h$ ). In fact, the major population of MP transferred mRNA<sup>GFP-CFTR</sup> or polysomal thereof. Interestingly, the GFP-CFTR protein newly synthesized from this mRNA<sup>GFP-CFTR</sup> was expressed at late times after transfer ( $\geq$  48 h) but in a prolonged manner ( $\geq 10$  jours). The Cl canal function after MP-mediated CFTR transfer is being evaluated. MP represent a novel type of CFTR vectors which can be produced by specifically designed autologous donor cells, and which would overcome most of the inconveniences of gene therapy using viral or nonviral vectors.

DISCIPLINES : Biologie cellulaire et virologie

MOTS-CLES : Adénovirus, microparticule membranaire, GFP-CFTR, trogocytose.

UMR 754 "Rétrovirus et Pathologie Comparée", Equipe du Dr Saw-See Hong et du Pr Pierre Boulanger, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon cedex 07