HAL
open science

Exploration de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus : approche combinée par adénovirus et ARN interférence

Anaëlle Bonetta

To cite this version:

Anaëlle Bonetta. Exploration de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus : approche combinée par adénovirus et ARN interférence. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ003 . tel-00870000

HAL Id: tel-00870000

https://theses.hal.science/tel-00870000

Submitted on 4 Oct 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE ED 414

IREBS – UMR 7242 – Equipe Oncoprotéines

THÈSE présentée par :

Anaëlle BONETTA

soutenue le : **16 Janvier 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Exploration de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus : approche combinée par adénovirus et ARN interférence

THÈSE dirigée par :

Dr DERYCKERE François	Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr PRETET Jean-Luc	Maître de conférences, Université de Franche-Comté
Dr TOMMASINO Massimo	Directeur de recherche, IARC, Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr CHATTON Bruno	Professeur, Université de Strasbourg

« Que de fois il arrive qu'en croyant expérimenter sur autrui nous expérimentons en réalité sur nous-mêmes »

Oscar Wilde

A mon Papa Jean-Paul,

A mon Papapa Joseph,

A Denise et à Francis,

A tous mes proches

Mes trois années de thèse se sont déroulées au sein de l'Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, à la suite de mes années à l'ESBS. Je souhaiterai tout d'abord remercier la région Alsace, qui a financé mes 3 années de thèse, ainsi que tous nos organismes sponsors. En tant qu'ancienne étudiante de notre belle ESBS, je tiens également à remercier tous mes professeurs, m'ayant permis de m'ouvrir à tant de disciplines diverses, que je n'aurai sans doute pas pu approfondir dans le cursus auquel je me prédestinai au début de mes études.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse : **Dr Jean-Luc Prétet, Dr Massimo Tommasino** et le **Pr Bruno Chatton**, d'avoir accepté de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je remercie particulièrement **Dr Jean-Luc Galzi**, directeur de l'IREBS, UMR 7242, Biotechnologie et signalisation cellulaire, de m'avoir accueilli au sein de l'Institut et d'encourager une telle diversité de thèmes de recherche au sein de l'unité, permettant ainsi de nombreux échanges productifs et motivants. Cet environnement de travail est idéal pour la recherche et la genèse de nouvelles vocations.

Je remercie également les deux directeurs de l'ESBS que j'ai connu durant mon cursus ici, **Pr Claude Kédinger,** qui fut tout d'abord mon professeur, merci pour ces cours de BM2, nous ouvrant à de nombreuses disciplines et thèmes de recherche. Et **Dr Georges Orfanoudakis**, encadrant de travaux pratiques lors de ma 2ème année à l'ESBS, pour cette première expérience de mise au point de protocole, et de réflexion scientifique, l'un des meilleurs TP auquel j'ai pu assister et le plus formateur.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, le **Dr François Deryckère** de m'avoir accordé sa confiance et confié un projet dès mon stage volontaire en 2ème année à l'ESBS. Ce fameux cours sur les adéno que tu donnes toujours avant les TP m'avait tout de suite convaincu de l'utilité de ces gentils virus pour de nombreuses applications. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance dans la rédaction de la publi. Merci pour ta bonne humeur et tes blagues, mais aussi pour les covoiturages à mon époque «chez papa-maman», j'espère que tu arriveras toujours à placer tes nombreux «bébés-chats trop mignons» à génération spontanée, je garde dans un coin de ma tête l'idée des chatons GFP ! Merci aussi de m'avoir «initié/forcé» à apprendre à jouer au tarot. Maintenant que le cercle est brisé, je pense que tu n'auras plus de thésarde enceinte ;)

Je remercie le **Dr Murielle Masson**, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils toujours les bienvenus dans les périodes difficiles.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe oncoprotéines pour les excellentes conditions de travail qui règnent ici et biensur tous les occupants successifs du fameux bureau D-350 ! **Anissa** (*master*), merci pour les franches parties de rigolade et de m'avoir montré que la détermination est la clef ! **Anne** (*maman du labo*), merci pour ton soutien et tes conseils, de m'avoir si gentiment guidé dès mon arrivée. **Charlotte**, merci de m'avoir transmis le flambeau et les joies des expérimentations avec nos petits virus fait-maison, je tente toujours de m'inspirer de ta zen-attitude légendaire. **Clémence**, thanks de m'avoir accompagné lors de ma 2ème année et pour nos collaborations, je te souhaite une merveilleuse thèse in the UK, enjoy! **Gilles Travé** et **Katia Zanier**, merci pour leurs conseils pour ces fameux westerns E6 qui m'auront causé tellement de souci ! Mais aussi **Juan** et **Khaled**. **Katja Luck**, merci pour tes précieux conseils lors de ces derniers mois, ils m'ont permis de prendre les bonnes décisions. Merci à mes «petits» stagiaires **Juline** et **Maxime**, qui ont comblé le vide du bureau durant ma dernière année de thèse, grâce à vous j'ai découvert les joies de la transmission du savoir et des conseils, comme d'autres l'ont fait pour moi auparavant. Et qui sont devenus bien plus que des collègues ! **Marie-Laure**, pour son soutien et son aide dans les dernières semaines de manips. **Sadek**, tes tirades sur Dexter et les théories dont toi seul à le secret m'ont toujours beaucoup faites rire. **Sebastian**, merci pour nos nombreuses discussions très enrichissantes et pleines de bons conseils avisés, ainsi que pour les « chear-up ». **Xav'**, merci pour les discussions « animées » que nous avons eu ! Pour tes conseils de rédaction de thèse et pour la suite de ma carrière, enjoy in the USA et beaucoup de bonheur à ta petite famille. **Yves Nominé**, tout d'abord mon professeur de mathématiques à l'ESBS, qui m'a donné le gout des chiffres mais aussi appris l'importance de la notion d'écart-type et de barres d'erreurs.

Merci également à nos amis migrants d'étages en étages, **Audrey**, confidente, bien plus qu'une simple collègue, et toujours disponible, merci pour ta joie de vivre et ton enthousiasme sans faille. **Guigui**, merci pour nos nombreux délires et nos parties de TLMVPSP en mode champion or. **Anne-Sophie**, de m'avoir initié à la manipulation correcte du microscope « de l'espace ».

Et je remercie également tous nos voisins d'étage. **Annie-Paule Sib**ler, pour les travaux pratiques lors de mes années à l'ESBS, qui m'ont familiarisé avec les bases du clonage, merci également pour les nombreux et précieux conseils de qRT-PCR. Le **Dr Dominique Desplanque**, que j'ai si souvent embêté avec mes PCR par 35°C. Le **Pr Etienne Weiss**, qui fut en premier lieu mon professeur à l'ESBS, m'ayant fait découvrir les joies de la lecture critique d'articles scientifiques et aussi à son microscope, grâce à qui j'ai pu réaliser mes figures d'IF, et que j'ai si souvent monopolisé. Ainsi que l'ensemble de l'équipe MPTC, qui

m'a bien souvent dépanné grâce à leur machine PCR de secours, **Etienne, Dr Mariel Donzeau, Dr Marc Vigneron, Kambiz, Jessica, Barbara**.

Je tiens également à remercier nos collaborateurs de l'Institut de Virologie, **Eric Robinet** et **Laurent Mailly** pour leur collaboration lors des phases de tests sur modèle animal souris.

Un grand merci à mes amis de toujours, qui ont toujours cru en moi, notamment **Laurence** et **Myriam**, qui me suivent années après années depuis le lycée et nos folles années post-bac. Merci à ma **Juju**, mon associée de galère, pour nos nombreuses journées shopping ou wii-party pendant l'absence de nos hommes. Avec toi l'amitié et le soutien n'auront jamais de limites géographiques ! Merci à **Del**, qui a toujours su trouver les mots justes et me rassurer quand à l'avenir, je vous souhaite pleins de bonheur avec ton petit mari et votre magnifique princesse. **Pauline**, toujours disponible pour mes moindres plaintes ou coup de gueule dans notre belle ville garnison, je me rappellerai toujours de notre première Saint-Momo, qui a forgé notre amitié ! Ainsi qu'à toutes celles qui se reconnaitront ! A mon **Bibi Julien** également, binôme d'ESBS, avec qui j'ai partagé de nombreuses soirées sans sommeil pour finir rapports, comptes-rendus ou encore pour des journées détentes ou pétages de câbles ! Ou encore de longues discussions manips en temps réel sur ce merveilleux outil google-chat. Et merci de partager cette passion pour la culture nipponne, j'ai attendu de nombreuses années pour enfin monter à Paris ^_^. Merci à **Laura**, mon double de toujours, qui me suit depuis la fac, intégrer toutes les deux l'ESBS était une vraie chance !

Puis enfin, je souhaite tout particulièrement remercier mes parents et mes proches pour leur soutien à toutes épreuves et leur confiance en moi. A toi **Papa**, mon moteur inconditionnel dans cette lutte contre le cancer, ton courage, ta force et ta persévérance sont simplement surhumains, tu es et sera toujours mon modèle ! A toi **Maman**, mon soutien sans failles, dans les bons comme les mauvais moments, « le roseau plie mais ne rompt pas » est la meilleure citation qui te corresponde, quelques soient les circonstances ! A ma seconde maman, **Marinou**, ma bonne fée attitrée, qui m'a si souvent aidé et remonté le moral dans les moments les plus difficiles, tes conseils ont toujours été avisés et précieux.

Et biensur je garde le meilleur pour la fin, merci à toi **Gérald**, ma grande force, grâce à toi je me sens maintenant capable de soulever des montagnes et je sais que rien n'est impossible peu importe le temps ou la distance.

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus fréquent chez la femme, dont l'agent étiologique majeur est l'infection par les virus du papillome humain (HPV principalement des types 16 et 18), qui sont de petits virus infectant les épithéliums muqueux et cutanés, et pouvant induire la formation de tumeurs.

L'inducteur majeur du processus oncogène est le processus d'intégration des régions codantes pour les oncoprotéines E6 et E7, au sein de la cellule hôte suite à l'infection. Elles interfèrent avec le cycle cellulaire et induisent notamment l'immortalisation, voire la transformation des cellules. Les fonctions les plus connue de ces deux oncoprotéines sont la dégradation des suppresseurs de tumeur p53 et pRb, respectivement. Le ciblage de p53 se fait via formation d'un complexe trimérique E6/E6AP et p53 et sa dégradation par le protéasome 26S. Le ciblage des oncoprotéines E6 et E7 représente une alternative thérapeutique prometteuse. En effet, la restauration des points de contrôles du cycle cellulaire, via l'augmentation du niveau d'expression de p53, permet l'induction de la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses traitées.

En poursuivant ce but, mon travail a consisté à développer de nouvelles alternatives thérapeutiques aux thérapies actuelles, relativement lourdes et traumatisantes. Ceci par le développement d'un protocole de clonage et de production de vecteurs adénoviraux à haut-titre infectieux. Il s'est donc déroulé en quatre phases, la construction des plasmides adénoviraux par clonage, la production des vecteurs adénoviraux en système cellulaire adapté, les tests in vitro sur cellules HPV-positives HeLa, SiHa et CasKi, puis enfin les tests in vivo sur modèle murin. En parallèle, nous avons initié la construction de nouveaux vecteurs adénoviraux permettant l'expression de miARN ciblant également la protéine E7, et multivalents (exprimant des miARN ciblant E6 et E7).

A l'issue de ce travail, nous avons pu montrer l'efficacité d'inhibition d'E6 des miARN artificiels exprimés par les vecteurs adénovirus, induisant ainsi une augmentation du niveau d'expression de la protéine p53, et de manière ultime l'induction de la mort cellulaire par apoptose via l'activation de la voie de caspases. Au vu des résultats très encourageants obtenus, nous avons entrepris la mise au point d'un protocole in vivo sur modèle de souris nude xenogreffées. Cette étape a permis de montrer le potentiel thérapeutique des adénovirus recombinants développés. En effet, suite à leurs injections intratumorales, les tumeurs traitées présentent un arrêt de croissance, en comparaison avec celles non traitées.

MOTS CLES : Papillomavirus, cancer du col de l'utérus, adénovirus, ARN interférence, oncoprotéines E6, thérapie génique, phase préclinique, knockdown

A

AAV : Adenovirus-Associated Virus

Ad 5 : Adénovirus de type 5

Ad X : Adénovirus de type X

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : adenovirus death protein

ADP : Adénosine DiPhosphate

Ago : Argonaute

Amp : Ampicilline

AP1 : Activating Protein 1

ARF : Alternative Reading Frame

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : ARN interférence

ARNm : ARN messager

ATP : Adenosine Triphosphate

B

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

Bak : Bcl-2-homologous Antagonist Killer

Bax : Bcl-2 activated X

Bcl-2 : B-cell lymphoma leukemia type 2

BET : Bromure d'Ethidium

Pb : Paire de bases

BPV : Bovine PapillomaVirus

C

CA : Protéine de capside

CAR: Coxsackie and Adenovirus Receptor

ccdB : control cell death B

CD : cytosine désaminase de levure

CD46 : Cluster of Differentiation 46

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia

CIP : cdk-interacting protein

CK II : Caséine Kinase II

CKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

ClCs : Chlorure de Césium

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMR1 : Chromosome Maintenance Region 1

CMV : CytoMegaloVirus

CR : Conserved Region

CRAD : Conditionally Replicating Adenoviruses

CRPV : Cottontail Rabbit Papillomavirus

CSDC2 : Cold-Shock Domain-Containing protein 2

CT : *Chlamydia trachomatis*

D

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

DBD : DNA Binding Domain

DBP : single stranded DNA Binding Protein

DD : Death Domain

DI : Dihydrotanshinone I

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMethylSulfOxide

dNTP : desoxyriboNucleotideTriPhosphate

DPPC: DiPalmitoyle PhosphatidylCholine

DPPD : DiPalmitoyl PhosphatidylCholine

DSG2 : desmoglein-2

E

E6AP : E6 Associated Protein

E6BP : E6 Binding Protein

E6TP1 : E6-Targeted Protein 1

ECM : Matrice Extracellulaire

EDTA : Ethylendiamintetra acetic acid

EGF : Epidermal growth factor

eIF-2a : eukaryotic Initiation Factor-2a

EKC : KératoConjonctivite Epidermique

EmGFP: Emerald Green Fluorescent Protein
EMT : Transition Epithélium – Mésenchyme
ERC 55 : Expressed in Renal Carcinoma
ESBS : Ecole Supérieure de Biotechnologie
EV : Epidermodysplasia Verruciformis

F

FADD : Fas associated death domain
FCS : Fetal Calf Serum
FDA : Food and Drug Administration
FGF : Fibroblast Growth Factor
FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique
FIX/FX : coagulation factor IX et X

G

GAP : GTPase Associated Protein
gD : glycoproteine D
Gps2 : G Protein Pathway Suppressor 2
GST : Glutathion S-transférase.
GTPase : Guanosine TriPhosphate

H

Had : Human Adenovirus
HAT : Histones AcétylTransférases
HDAC : Histones DeAcétylases
hDlg : human Drosophila Large Homologue 1
HECT : Homology to E6AP C-Terminus
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIV : virus de l'immunodéficience humaine
hMCM7 : Human MimiChromosome Maintenance 7
HPV : Papillomavirus Humain
HRP : HorseRadish Peroxidase
hScrib: human homologue of Drosophila
HSGAG: Héparane Sulfate
HSIL : High grade squamous intraepithelial lesion
HSPG : Héparanes Sulfate ProtéoGlycanes
HSV-2 : virus de l'herpès simplex de type 2
HSV-I: Herpès Simplex Virus de type I
hTERT : télomerase reverse transcriptase humaine

I

IAP : Inhibiteur des Protéines
IARC : International Agency for Research on Cancer
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN-1 : Interféron 1
IFN-α : Interféron alpha
IL10 : Interleukine 10
IN: intégrase
IP : Injection intrapéritonéale
IP : Iodure de Propidium
IPS-1 : IFN-beta Promoter Stimulator-1
IRF : Interferon Regulatory Factors
IRF-3 : Interferon Regulatory Factor-3
ITR : Inverted Terminal Repeat region
IV : Injection intraveineuse

K

Kan : Kanamycine
Kbp : Kilo paire de bases

L

LB : Luria Bertani
LCR : Long Control Region
LSIL : Low grade squamous intraepithelial lesion

LTc : lymphocyte T cytotoxique CD8+

M

MA : protéine de la matrice

MAGI : Membrane Associated Guanylate kinase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCM7 : MultiCopy Maintenance protein 7

MDM2 : Murine Double Minute 2

miARN : micro ARN

MLP : Major Late Promoter

MOI : Multiplicity Of Infection

MoMLV : virus de la leucémie murine

MT : MitoTracker

MTOC : Centre Organisateur Des Microtubules

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

MUPP : Multi-PDZ domain Protein

N

NC : protéine de la nucléocapside

NCR : Non-Coding Region

NIH : National Institute of Health

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localisation Signal

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORF : Open Reading Frame

ORI : Origin of replication

P

PA: site de polyadénylation

PAE : PolyAdenylation Early

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PAL : PolyAdenylation Late

PARP : PolyADP-Ribose Polymerase

pb: paire de bases

PBS: Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDX-1 : Pancreatic Duodenal homebox-1

PDZ : PSD-95, Dlg, ZO1

PDZ: PSD-95, Dlg, ZO1

PEG : PolyEthylène Glycol

PEI : PolyEthylénimine

PFU : Plaques Forming Units

PI 3 : PhosphatidylInositol 3

PI3K : phosphatidylinositol-3-OH kinase

PKA: Protéine Kinase dépendant de l'AMPc

PKR : double-stranded RNA dependant protein kinase

PML : *ProMyelocytic Leukemia*

PML : ProMyelocytic Leukaemia

pRb : protéine du rétinoblastome

PSD 95 : PostSynapic Density protein 95

PV : PapillomaVirus

R

RCA : Replication competent adenovirus

RGD : arginine-glycine-aspartate

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

RITA : Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

RT : Reverse Transcriptase

RT : reverse transcriptase

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis

shARN : short hairpin RNA

siARN : small interfering RNA

SV40 : Simian virus 40

SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TADD : TNFR-associated death domain

TAP1 : Antigen peptide transporter 1

TBP : TATA-binding protein

TBS: Tris Buffered Saline

TE : Tris-EDTA

TGF-β : Transforming growth factor β

TK : thymidine kinase

TLR9 : Toll-Like Receptor 9

TLS : Tripartite Leader Sequence

TM : composants transmembranaires

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP : Protéine Terminale

TRADD: TNFR-associated death domain

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRBP : Trans activating Response RNA-Binding Protein

Treg : Cellules T Régulatrices

U

Ub: Ubiquitine

URR : Upstream Regulatory Region

UTR : UnTranslated Region

V

VA : virus-associated

VADS : voies aérodigestives supérieures

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Protein 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VGF : vaccinia growth factor

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLP : pseudo-particules virales, Virus Like Particles

XRCC1 : X-ray repair cross-complementing protein 1

W. X. Y. Z

WHO : World Health Organisation

XRCC1 : x-ray repair cross-complementing group 1

YAC: Yeast Artificial Chromosome

ZD : Zinc Domain

SOMMAIRE

Introduction générale 1

I. Papillomavirus humain et cancer du col de l'utérus 1
1. Le col de l'utérus 1
2. Incidence 1
3. Les facteurs étiologiques 4
   a. L'infection par le papillomavirus humain 4
   b. Les cofacteurs 5
4. Le cancer du col de l'utérus 6
5. Prévention, dépistage et thérapies 7
   a. La détection des lésions précancéreuses 7
   b. La vaccination 8
      i. Prophylactique 8
      ii. Thérapeutique 9
   c. Les thérapies 10

II. De l'infection par les virus du papillome humain au cancer 10
1. Génotypes et pathologies 10
2. La particule virale : organisation structurale et génomique 12
3. Le cycle viral 14
   a. Infection de l'épithélium, attachement et endocytose 15
   b. Maintenance du génome et latence de l'infection 16
   c. Prolifération des cellules 17
   d. Amplification du génome 18
   e. Assemblage des particules virales et libération des virions 19
4. Carcinogenèse 20

III. Implication des oncoprotéines virales dans l'oncogenèse 21
1. Rôle de l'oncoprotéine E7 21
   a. Structure 21
   b. Activités biologiques 24
      i. Dégradation de pRb 24
      ii. E7 et p53 25
      iii. E7 et le cycle cellulaire 25
      iv. E7 et le système immunitaire 26
      v. E7 et la reprogrammation épigénétique 26
      vi. E7 et le métabolisme cellulaire 26
      vii. E7 et l'instabilité génomique 27
2. Rôle de l'oncoprotéine E6 27
   a. Structure 27
   b. E6 protéine multifonctionnelle 29

i. Inactivation de p53 30
ii. Effet anti-apoptotique 33
iii. Activation de la télomérase 35
iv. Action sur la signalisation des protéines G 36
v. Système immunitaire 36
vi. Instabilité génomique 37
vii. Différenciation et adhésion cellulaire 38
viii. Relation avec les protéines à domaine PDZ 38
3. La transformation cellulaire induite par E6 et E7 41
4. Inhibition des oncoprotéines E6 et E7 42

IV. Adénovirus 45
1. Généralités 45
a. Classification 45
b. Structure du virion 48
c. Organisation génomique 50
d. Les récepteurs de l'adénovirus 51
i. CAR : Coxsackievirus and adenovirus receptor 52
ii. Intégrines 53
2. Le cycle viral 54
a. Liaison des adénovirus aux cellules 54
b. Entrée 55
c. Libération dans le cytosol 55
d. Translocation nucléaire 56
e. Réplication de l'ADN viral 57
i. Phase précoce 57
ii. Phase intermédiaire 59
iii. Phase tardive 60
iv. Phase de production et de libération des particules virales 60

V. Thérapie génique et adénovirus 61
1. Introduction à la thérapie génique 61
2. Méthodes et état des thérapies 62
a. Les adéno-associated virus (AAV) 63
b. Les rétrovirus 65
i. Les gammarétrovirus 65
ii. Les lentivirus 66
c. Les poxvirus ou virus de la vaccine 67
d. Virus de l'herpès simplex (HSV) 67
3. Méthodes non virales 68
4. Adénovirus et thérapie génique 70
a. Avantages et inconvénients des vecteurs adénoviraux 71
b. Les thérapies adénovirales 71

i. Vecteurs de première génération 72
ii. Les vecteurs de seconde génération 73
iii. Vecteurs de troisième génération ou « gutted » 74
iv. Les adénovirus oncolytiques 75

VI. L'ARN interférence 76
1. Généralités 76
2. Mécanisme 77
3. Les petits ARN interférents 80
a. Les miARNs 80
b. Les miARNs artificiels 81
c. Les siARN 82
d. Les shARN 82
4. Applications et challenges 83
5. Utilisation des l'ARN interférence pour les thérapies anticancéreuses 84

VII. Introduction au projet de thèse 85

Matériel et Méthodes 88

I. Matériel 88
1. Lignées cellulaires 88
2. Plasmides 88
3. Anticorps 89

II. Méthodes 90
1. Introduction au clonage par la méthode gateway 90
2. Techniques de biologie moléculaire appliquées à la construction des plasmides recombinants 91
a. Modifications du plasmide pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR 91
i. Design des séquences codantes des miARN artificiels simples brins 91
ii. Caractéristiques requises du pré-miARN 92
iii. Réaction d'appariement des deux brins 93
iv. Construction du vecteur pcDNA-BsaI 94
b. Génération d'un plasmide d'entrée par recombinaison BP : 95
i. Protocole de la recombinaison BP 96
ii. Sélection et amplification du vecteur d'entrée pEXP-BP-BsaI 96
iii. Préparation du plasmide pEXP-BP pour les clonages suivants 97
c. Clonages des séquences codantes des miARN double brin 97
i. Ligation des séquences codantes des miARN double brin 98
d. Génération du plasmide adénoviral final par recombinaison LR 99
i. Protocole de recombinaison LR 99

3. Production et amplification des particules virales recombinantes 100
a. Amplification 100
b. Purification des particules virales 102
c. Vérification de l'ADN viral 102
d. Titration 103
i. Par la méthode des plaques 103
ii. Détermination de la concentration en protéines 104
e. Détermination de la multiplicité d'infection (MOI) optimale..... 104
4. Utilisation des adénovirus *in vitro* sur cellules cancéreuses 105
a. Conditions de culture, de transduction et de récolte des cellules 105
b. Protocole de transfection des cellules au jetPEI..... 105
c. Quantification des mARNs par PCR quantitative en temps réel..... 106
d. Analyse des niveaux d'expression des protéines par western blot 107
e. Analyse indirecte des niveaux d'expression par immunofluorescence107
f. Test de survie cellulaire ou test MTT..... 108
g. Induction de l'apoptose 109
h. Cytométrie en flux et quantification des cellules en Sub-G_1 109
i. Blocage de la voie de signalisation des caspases et de leurs activités .. 109
5. Utilisation des adénovirus *in vivo* sur modèle murin..... 110

Résultats 112

I. Publication n°1 112
1. Introduction au manuscrit 112
2. Figures 130
3. Conclusion 137

II. Résultats non publiés..... 139
1. Mise au point préalable des expérimentations..... 139
a. Détermination de la multiplicité d'infection (MOI) optimale..... 139
b. Calcul de l'efficacité des couples de primers de qRT-PCR..... 141
2. Action des adénovirus recombinants sur différents types cellulaires..... 142
a. Effets des miARN sur les niveaux d'expression protéiques 142
b. Contenu en ADN et quantification des cellules en sub-G1..... 143
c. Induction de la mort cellulaire: clivage des caspases et de la PARP... 144
3. Potentiel thérapeutique des adénovirus sur d'autres types de cancers ... 148
a. Effets des adénovirus recombinants sur les cellules SQ20B 148
b. Etude des effets des adénovirus recombinants sur les cellules SCC90 149
4. Nouvelles stratégies de ciblage par vecteur adénoviral..... 150
a. Knockdown des kinases impliquées dans la voie de signalisation de p53 150
b. Construction des adénovirus recombinants pAd 18 E7 et pAd 16 E7 152

Conclusion générale 154

Références Bibliographiques 158

Annexes 179

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma de l'appareil reproducteur féminin. 1
Figure 2 : Estimation des nouveaux cas de cancers et des décès dans le monde en 2008. 2
Figure 3 : Incidence mondiale du cancer du col de l'utérus et taux de mortalité. 3
Figure 4 : Pourcentages mondiaux de cancer du col de l'utérus en fonction des types d'HPV 4
Figure 5 : Récapitulatif des facteurs étiologiques influençant l'apparition du cancer. 6
Figure 6 : Groupes d'évolution des papillomavirus humains 10
Figure 7 : La classification des principaux HPV et les pathologies humaines. 11
Figure 8 : Structure de la capside des Papillomavirus 12
Figure 9 : Organisation du génome d'HPV-16 13
Figure 10 : Le cycle infectieux d'HPV-16 14
Figure 11 : Modèle des événements infectieux suite à l'infection par HPV-16 15
Figure 12 : Modèle de latence et réactivation du cycle du papillomavirus humain 17
Figure 13 : Processus de développement des lésions précancéreuses de l'épithélium cervical. 20
Figure 14 : Représentation schématique de l'intégration du génome viral HPV 21
Figure 15 : Représentation schématique d'E7 HPV-16 22
Figure 16 : Structure du dimère d'E7 du génotype 1A 23
Figure 17 : Représentation schématique d'E7 HPV-16 et des principales activités biologiques 23
Figure 18 : Implication de l'oncoprotéine E7 dans la régulation du cycle cellulaire 24
Figure 19 : Représentation schématique d'E6 HPV-16 28
Figure 20 : Structure cristallographique d'E6 HPV-16 liée au peptide E6AP 29
Figure 21 : Cibles et partenaires d'E6 des HPV de haut-risque 30
Figure 22 : Influence d'E6 sur le cycle cellulaire 31
Figure 23 : Rôle de l'oncoprotéine E6 dans l'apoptose 34
Figure 24 : Contributions des oncoprotéines E6 et E7 dans le développement du cancer. 39
Figure 25 : Tableau récapitulatif des cibles à domaines PDZ de l'oncoprotéine E6 40
Figure 26 : Récapitulatif des mécanismes de carcinogenèse induite par les HPV 41
Figure 27 : Classification de la famille des *Adenoviridae* 46
Figure 28 : Classification des *Mastadenovirus* humains 47
Figure 29 : Capside de l'adénovirus 48

Figure 30 : Structure de l'adénovirus 49
Figure 31 : Transcription du génome de l'adénovirus 50
Figure 32 : Illustrations des récepteurs de l'adénovirus humain 51
Figure 33 : Voie d'infection *in vitro* de l'adénovirus de type 5 54
Figure 34: Répartition des essais cliniques en thérapie génique en fonction des pathologies ciblées 62
Figure 35 : Comparaison des vecteurs les plus utilisés en thérapie génique 63
Figure 36 : Représentation de la particule rétrovirale 65
Figure 37 : Utilisation des vecteurs lors des essais cliniques de thérapie génique 70
Figure 38 : Construction et production d'un vecteur adénoviral helper dépendant 74
Figure 39 : Modèle de reconnaissance et dégradation de l'ARNm cible via AGO2 78
Figure 40 : Schéma de l'extinction des gènes post-transcriptionnelle 79
Figure 41 : Représentation schématique d'un miARN artificiel 81
Figure 42 : Schéma récapitulatif du clonage gateway 90
Figure 43 : Représentation schématique de la réaction d'appariement du miARN 18_1 92
Figure 44 : Représentation du miARN LacZ optimisé. 93
Figure 45 : Séquence de l'oligo BsaI ajouté. 94
Figure 46 : Carte du plasmide pcDNA-BsaI modifié. 94
Figure 47 : Schéma des premières étapes du protocole Gateway modifié. 95
Figure 48 : Carte du produit de la recombinaison BP : pEXP-BP-BsaI. 97
Figure 49 : Schéma de la simplification du protocole gateway. 97
Figure 50 : Représentation des ORF des gènes cibles et de sites de ciblage des miARN. 98
Figure 51 : Construction des plasmides adénoviraux par recombinaison LR. 99
Figure 52 : Carte du produit de la recombinaison LR : pAd E6. 100
Figure 53 : Schéma de production des adénovirus recombinants 101
Figure 54 : Liste des primers de vérification de l'ADN viral 103
Figure 55 : Représentation schématique de la titration par la méthode des plaques 104
Figure 56 : Liste des primers de PCR quantitative en temps réel 106
Figure 57 : Représentation de la voie de signalisation des caspases et des blocages réalisés. 110
Figure 58 : Protocole d'expérimentation *in vivo* 111
Figure 59 : Tableau des conditions testées pour la détermination de la MOI optimale à 3 et 6 jours. 139
Figure 60 : Courbes d'étalonnage des différents couples de primers. 141

Figure 61 : Marquage de la protéine p53 en immunofluorescence 142
Figure 62 : Marquage de la protéine p53 par western blot et immunofluorescence 143
Figure 63 : Analyse du cycle cellulaire et pourcentage de cellules en sub-G1 143
Figure 64 : Marquage de la PARP clivée par immunofluorescence 144
Figure 65 : Marquage des caspase 3 et 7 clivées par immunofluorescence 145
Figure 66 : Marquage de la caspase 7 et de la PARP clivées par western blot et immunofluorescence 146
Figure 67 : Expression et clivage des caspases 3, 7, 9 et de la PARP 147
Figure 68 : Marquage de la protéine p53 en immunofluorescence 148
Figure 69 : Marquage de p53, de la caspase 7 et de la PARP clivées en immunofluorescence 149
Figure 70 : Tableau récapitulatif des séquences des différents miARN dirigés contre les kinases 150
Figure 71 : Graphiques des expressions résultantes des messagers NRBP, NTRK et PANK 151
Figure 72 : Tableau récapitulatif des séquences des miARNs ciblant la protéine E7..... 152
Figure 73 : Schéma récapitulatif de localisation des miARNs au sein des ORF E7..... 152

Introduction générale

I. Papillomavirus humain et cancer du col de l'utérus

1. Le col de l'utérus

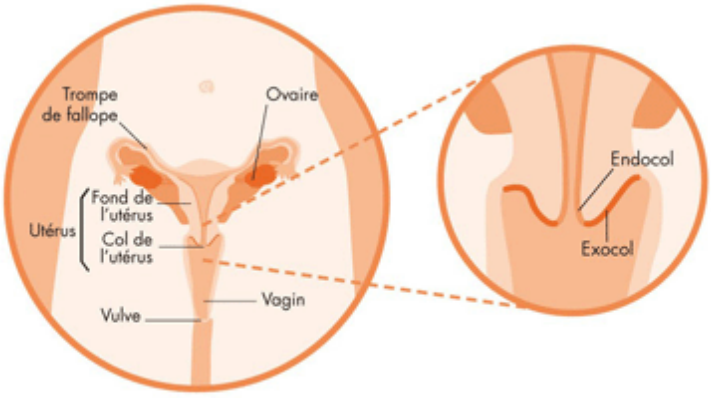


Figure 1 : Schéma de l'appareil reproducteur féminin.
Le col de l'utérus est situé entre le vagin et l'utérus et fait la jonction entre les deux.

L'organe reproducteur féminin, se compose d'une partie basse, le vagin, et d'une partie haute, l'utérus, qui possède deux prolongements latéraux, les cornes, débouchant sur les trompes de Fallope, puis les ovaires **(Figure 1)**. L'endomètre (muqueuse interne de l'utérus) permet la nidation et le développement d'un œuf fécondé.

Ces deux parties sont reliées entre elles par le col de l'utérus, lui-même composé de plusieurs parties : l'exocol, recouvert de cellules malpighiennes, plates, semblables à celles de la couche externe de la peau, et est le lieu de développement des carcinomes malpighiens. Puis l'endocol, revêtu de cellules glandulaires produisant du mucus, dont la croissance anormale peut donner lieu à un adénocarcinome.

2. Incidence

Le cancer est une pathologie à incidence grandissante, selon l'estimation de l'étude GLOBOCAN de 2008, 12,7 millions de cas de cancers et 7,6 millions de décès ont été recensés pour l'année 2008, dont 56% des cas et 64% des décès se sont produits dans les pays en voie de développement **(Jemal et al., 2011)**.

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus diagnostiqué chez la femme et la quatrième cause de décès par cancer chez la femme dans le monde **(Siegel et al., 2012)**, représentant 9% (529 000) des nouveaux cas de cancers et 8% (275 100) des cancers totaux chez les femmes en 2008 **(Figure 2)**.

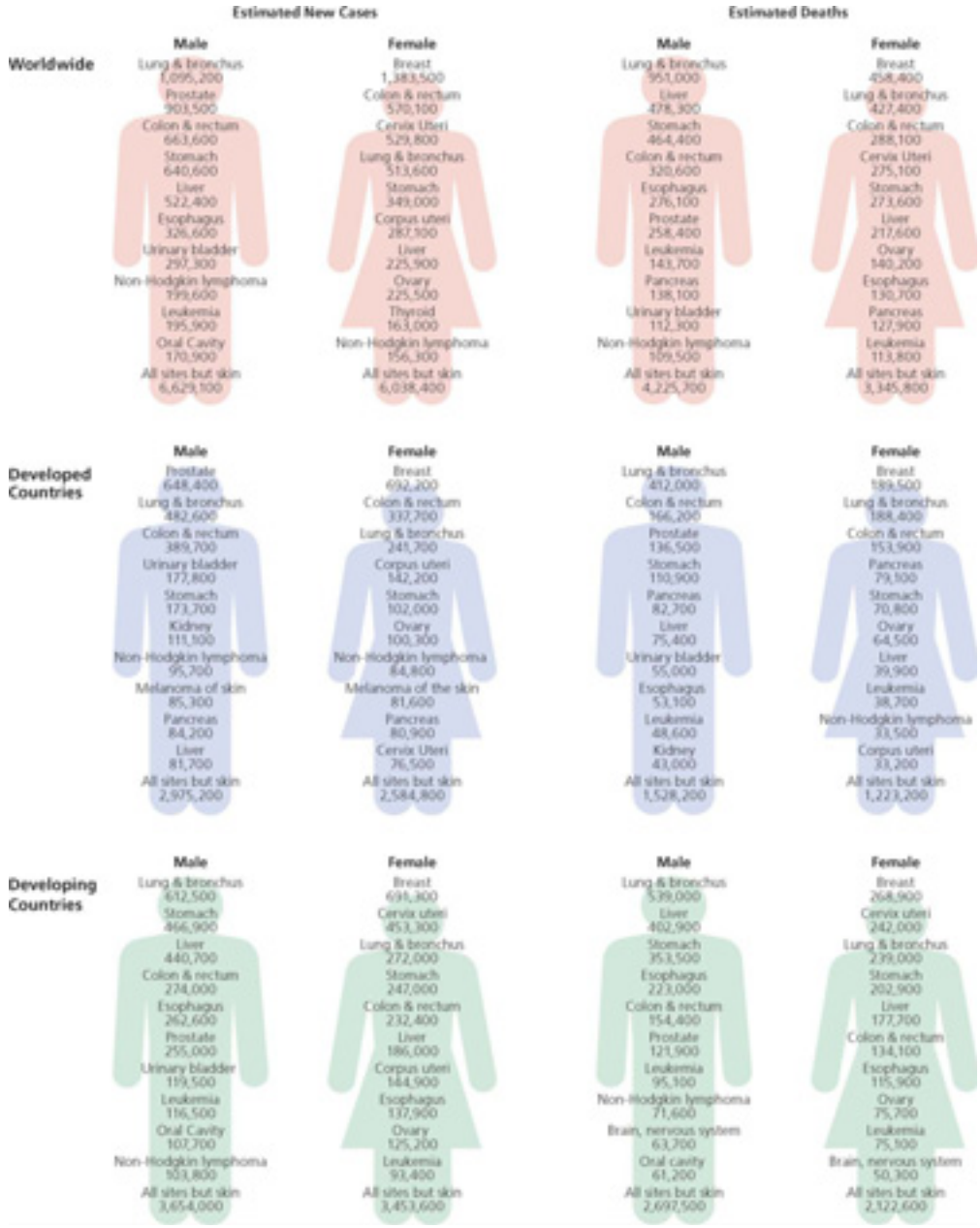


Figure 2 : Estimation des nouveaux cas de cancers et des décès dans le monde en 2008.

Classement réalisé par types de cancers et par niveau de développement économique. Source :**(Jemal et al., 2011)**

Dans les pays en voie de développement sont recensés plus de 85% des nouveaux cas de cancer et de décès. Les incidences les plus fortes sont globalement retrouvées en Afrique, en Asie Centrale du Sud et en Amérique du Sud **(Figure 3)**.

Ces grandes différences d'incidence entre les pays développés et non développés s'expliquent par le manque de campagnes de dépistage, permettant la détection des stades précancéreux et précoces de cancer du col de l'utérus **(Denny, 2012)**. En effet, dans la plupart de ces pays, les tests Papanicolaou **(Papanicolaou, 1949)** ne sont pas généralisés, et les méthodes utilisées sont celles représentant le coût le plus faible, entre autres l'inspection visuelle en utilisant l'acide acétique ou une solution de lugol. Ces tests permettent de vérifier la présence de cellules anormales (dysplasies).

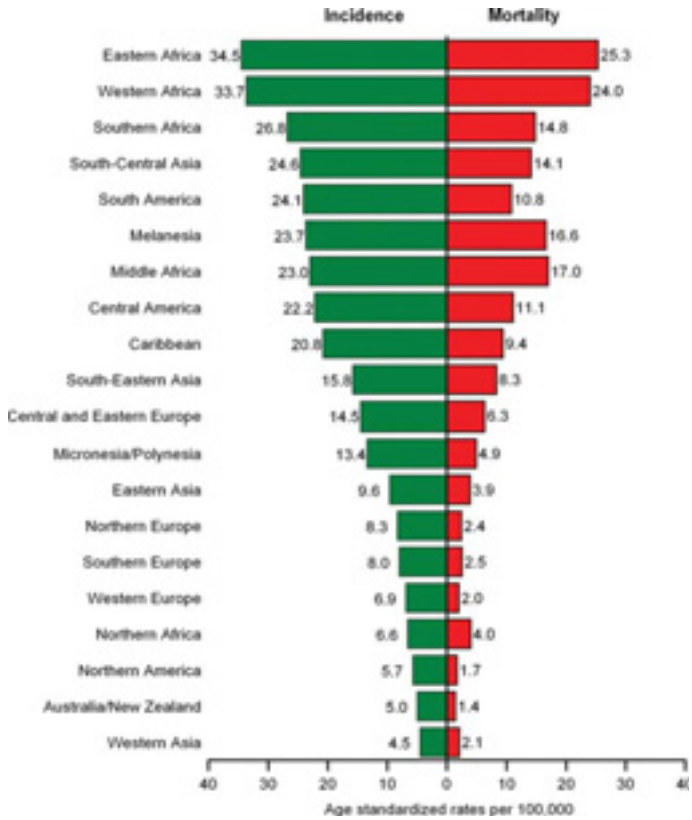


Figure 3 : Incidence mondiale du cancer du col de l'utérus et taux de mortalité.

Classement réalisé en fonction des zones géographiques et standardisé par âge pour 100 000 individus.
Source : GLOBOCAN 2008, **(Jemal et al., 2011)**

En 2010, aux Etats-Unis, 12 200 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus ont été diagnostiqués, correspondant à une incidence de 7,9 femmes sur 100 000. Et à l'heure actuelle, les cancers de type squameux représentent 75% des cancers invasifs, les 25% restants résultants d'adénocarcinomes **(Adegoke et al., 2012)**.

Les risques d'infection par HPV sont particulièrement élevés pour les jeunes adultes sexuellement actifs. Cependant l'infection par HPV semble également être assez courante chez les hommes, mais beaucoup moins étudiée **(Baseman and Koutsky, 2005)**. Grâce à l'analyse d'échantillons par PCR, il a été montré sur un groupe de 285 hommes finlandais que

16,5% d'entre eux étaient HPV positifs **(Hippelainen et al., 1993)** et sur un groupe de 318 d'étudiants américains, 32,7% d'HPV positifs **(Weaver et al., 2004)**.

De plus, l'étude internationale cordonnée par l'IARC (International Agency fo Research on Cancer) à permis de recueillir des données de 15 zones des 4 continents concernant des femmes âgées de 15 à 74 ans et les prévalences standardisées sont comprises entre moins de 5% pour les pays Méditerranéens et l'Asie du Sud-Est, et plus de 15% pour les pays d'Amérique Latine et certains pays Africains **(Bosch et al., 2006)**.

3. Les facteurs étiologiques

a. L'infection par le papillomavirus humain

L'infection par le papillomavirus humain (HPV), dits à haut-risque oncogène, est l'agent étiologique majeur dans le développement du cancer du col de l'utérus. Dans les biopsies réalisées, l'ADN viral est retrouvé à hauteur de 99,7% de celles-ci **(Walboomers et al., 1999)**. Pour la première fois entre 1974 et 1976 la recherche d'ADN viral à permis de mettre en évidence la présence d'ADN d'HPV dans des lésions **(zur Hausen, 1976; zur Hausen et al., 1974)**. Puis le lien entre le développement du cancer du col de l'utérus et l'infection par les HPV à été établi par plusieurs études **(Boshart et al., 1984; Durst et al., 1983; Schwarz et al., 1985)**.

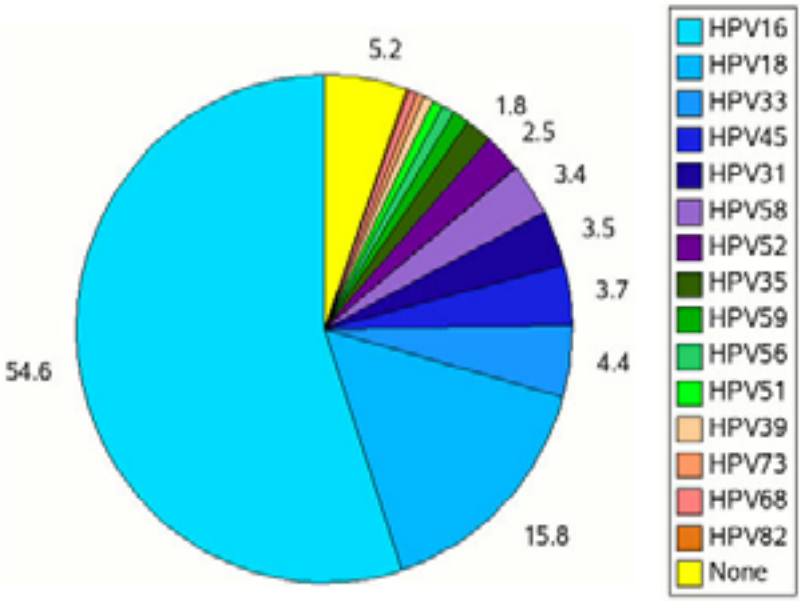


Figure 4 : Pourcentages mondiaux de cancer du col de l'utérus en fonction des types d'HPV.
Source : Adaptation de **(Munoz et al., 2003)**

Parmi les 35 types d'HPV trouvés dans les biopsies génitales, HPV-16 représente entre 50 à 60% de tous les cas de cancer cervicaux mondiaux, suivi par HPV-18 (10 à 20%), HPV-45 (4 à 8%) et HPV-31 (1 à 5%) **(Figure 4)**. Les 5 types d'HPV les plus communs (16, 18, 45, 31 et 33) sont retrouvés dans 80% des carcinomes squameux et 94% des adénocarcinomes **(Bosch et al., 2006)**.

Suite à l'infection par HPV, la majorité des femmes infectées éliminent naturellement le virus dans un délai maximal de 2 ans **(Franco et al., 1999)**. L'infection est en effet transitoire et asymptomatique pour une grande majorité des individus infectés. Les données épidémiologiques du U.S National Health and Nutrition Examination Survey ont permis de déterminer que la prévalence des femmes âgées de 20 à 24 ans est de 44,8%, et largement supérieure à celles des autres classes d'âges **(Steben and Duarte-Franco, 2007)**.

La persistance de l'infection est donc un facteur déterminant dans la suite du processus cancéreux **(Schlecht et al., 2001)**. Le papillomavirus humain étant sexuellement transmissible, l'un des facteurs de risque déterminant l'infection, est le nombre de partenaires sexuels **(Bosch et al., 2006)**. La charge virale est également un facteur aggravant dans la progression vers les lésions cervicales **(Dalstein et al., 2003)**, celle-ci dépend du type d'HPV et permettrait également de présager de la sévérité des lésions cervicales observées. De plus, l'infection par de multiples types d'HPV simultanément influence également la progression cancéreuse **(Sundstrom et al., 2010)**.

Il existe cependant d'autres modes non-sexuels de transmission d'HPV, par exemple les infections génitales incluant les verrues génitales, au sein de populations sexuellement inactives, comme les nourrissons, les enfants et les jeunes adolescents, dont la transmission d'HPV de bas risque se fait horizontalement, verticalement ou de manière prénatale, par passage de la mère à l'enfant.

b. Les cofacteurs

L'infection par les HPV à haut-risque oncogène est l'agent étiologique majeur dans l'induction du processus de carcinogenèse. Cependant, un ensemble de facteurs sont également impliqués et peuvent être classés soit en facteurs environnementaux, soit en cofacteurs propre à l'hôte **(Castellsague and Munoz, 2003; Munoz et al., 2006).** Ces facteurs ont été reconnus lors d'études pilotées par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) **(Figure 5)**.

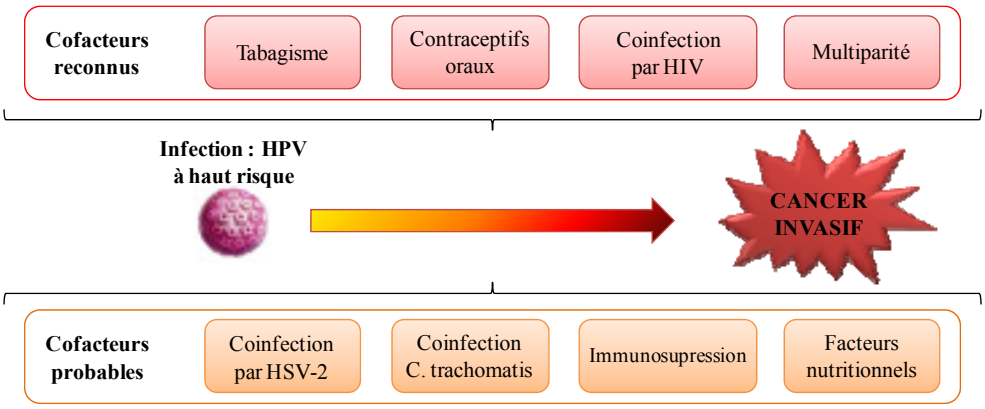


Figure 5 : Récapitulatif des facteurs étiologiques influençant l'apparition du cancer.

L'infection par le papillomavirus humain est nécessaire mais pas suffisante à la transformation cancéreuse, un ensemble de cofacteurs contribuent au processus. D'après **(Munoz et al., 2006)**.

L'utilisation de contraceptifs hormonaux à long terme induit la prise continue d'œstrogènes ou de progestérones. L'activation des récepteurs à progestérone favoriserait l'intégration de l'ADN viral HPV dans le génome de la cellule hôte et la dérégulation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7 **(Bosch and de Sanjose, 2007)**.

Le second facteur influençant le processus de carcinogenèse est la consommation de tabac. Son impact est dépendant de l'intensité, de la durée et du nombre de paquets consommés par an. Le tabac conduit en effet à une réduction de la réponse immunitaire dans le col de l'utérus **(Castellsague and Munoz, 2003)**.

D'autres agents infectieux sexuellement transmissibles participent au développement du cancer du col de l'utérus, tels que *Chlamydia trachomatis* (CT), le virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2) et le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) **(Bosch et al., 2006; Denny, 2012)**. Ils agissent notamment sur la persistance virale et plus particulièrement sur la capacité de l'organisme à éliminer l'infection HPV **(Franco and Harper, 2005)**.

Des facteurs nutritionnels liés à des régimes alimentaires riches en fruits, légumes et vitamines pourraient quant à eux avoir un rôle du la persistance d'HPV **(Munoz et al., 2006)**.

4. Le cancer du col de l'utérus

Les HPV oncogéniques et non-oncogéniques sont impliqués dans le développement de lésions intraépithéliales squameuses de bas risque (LSIL) au niveau du col de l'utérus, alors que la plupart des lésions cervicales classifiées de haut grade (HSIL) (carcinome in situ ou cancer invasif) sont positives à un type d'HPV à haut risque oncogénique.

HPV-16 et/ou HPV-18 sont notamment responsables de 70% des cancers cervicaux invasifs et les types HPV-6 ou HPV-11 causent environ 90% des verrues génitales **(Munoz et al., 2003)**. La plupart des infections par HPV se résorbent spontanément, cependant, dans les cas d'infection persistantes, un cancer du col de l'utérus peut se développer dans un délai d'environ 12 à 15 ans, passant par une série de stades : LSIL, HSIL ou CIN 1 à 3, classés en fonction des anomalies cytologiques observées.

5. Prévention, dépistage et thérapies

Dans les pays développés, la prévention du cancer du col de l'utérus passe actuellement par deux niveaux de vigilance. En premier lieu, par des campagnes de détection et de tests permettant la détection précoce des anomalies cervicales par examens cytologiques et histologiques. Le second niveau de prévention est basé sur des campagnes de vaccination des populations les plus à risque avant tout contact avec l'agent viral.

a. La détection des lésions précancéreuses

Largement développées dans les pays développés, les techniques permettant l'identification des lésions précoces précancéreuses sont malheureusement très peu répandues dans les pays en voie de développement.

Le frottis cervico-utérin permet d'analyser les cellules en les recueillant par deux prélèvements au niveau de l'exocol et de l'endocol. Une fois le prélèvement étalé et fixé sur lame, celle-ci est colorée par la technique de Papanicolaou **(Papanicolaou, 1949)** introduite en 1949, puis examinée au microscope. Actuellement, selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé, il est conseillé d'effectuer des frottis tous les 3 ans pour les femmes entre 25 et 65 ans, suite à deux frottis négatifs effectués à intervalle d'un an. Cette technique a cependant ses limites, le risque de faux négatifs dans les cas de cancers invasifs étant important **(Carcopino et al., 2011)**. L'anatomie du col de l'utérus rend les prélèvements endocervicaux plus difficiles a réaliser que pour l'exocol **(Adegoke et al., 2012)**.

En complément, un examen histologique par colposcopie est réalisé en cas de découverte d'un frottis cervico-utérin anormal. L'utilisation d'un microscope binoculaire stéréoscopique, permet une estimation de la taille et la sévérité des lésions observées.

Récemment la présence de séquences d'ADN ou d'ARN viraux dans les prélèvements à pu être mise en évidence par génotypages PCR des HPV. Ces test utilisent le gène L1 comme séquence cible et permettent de différencier les génotypes entre eux.

Enfin, la classification des lésions après biopsie cervicale à la suite d'une analyse histopathologique permet ensuite de poser un diagnostic et d'adapter la méthode thérapeutique.

b. La vaccination

i. Prophylactique

Les papillomavirus humains ayant été identifiés comme agents étiologiques majeurs dans le développement du cancer du col de l'utérus **(Walboomers et al., 1999)**, des vaccins prophylactiques ont été mis au point. Ils sont composés de pseudo-particules virales (VLP, Virus Like Particles) sans ADN, sont produits à partir de la protéine de capside L1, capable de s'autoassembler. Une fois injectées ces VLP permettent d'induire une forte réponse humorale et la production d'un grand nombre d'anticorps neutralisant IgG, permettant ainsi de prévenir l'infection.

Depuis 2007, deux vaccins prophylactiques ont été mis sur le marché. En 2007, le Gardasil (Merck) quadrivalent, protège contre HPV-6, -11, -16 et -18, dont les protéines L1 sont produites dans la levure S*accharomyces cerevisiae* **(Lexchin et al., 2010; Monroy-Garcia et al., 2011)**. Le vaccin est délivré par 3 injections intramusculaires successives, à 0, 2 et 6 mois. De par sa protection supplémentaire contre HPV-6 et -11, Gardasil prévient également l'apparition de lésions bénignes associées à 90% à ces deux derniers génotypes **(Gravitt, 2011)**.

Le second, en 2008, Cervarix (GlaxoSmithKline) bivalent, protège contre HPV-16 et -18, dont les protéines L1 sont produites via un vecteur baculovirus **(Harper and Vierthaler, 2011; Monie et al., 2008)**. Le vaccin est également délivré par 3 injections intramusculaires à 0, 1 et 6 mois.

Ces deux vaccins doivent cependant être administrés avant toute infection, et de manière optimale, aux jeunes filles avant le début de toute activité sexuelle, âge variant selon les pays et les cultures. Actuellement, les recommandations du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) sont de procéder à la vaccination des jeunes filles entre 14 à 23 ans.

Il a été montré que la vaccination présente une efficacité de protection supérieure à 95% après plus de 4 ans **(Roden and Wu, 2006)**. La vaccination des hommes, ayant un rôle clef dans la transmission virale, est également en cours d'évaluation. Elle démonterait une forte efficacité prophylactique dans le cas de condylomes et de néoplasie intraépithéliale du pénis **(Joura, 2009)**.

Dans les pays en voie de développement et aux faibles ressources, l'introduction de la vaccination est d'intérêt publique mais pose de nombreux problèmes d'accessibilité. En effet la principale limite étant le coût des trois injections nécessaires, mais qui permettrait de considérablement réduire l'incidence du cancer du col de l'utérus dans ces pays **(Wamai et al., 2012)**.

ii. Thérapeutique

A l'inverse des vaccins prophylactiques, les vaccins thérapeutiques visent à induire la réponse immunitaire via les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et les lymphocytes T helper (CD4+). Cette réponse immunitaire est dirigée contre des antigènes HPV, comme les oncoprotéines E6 et E7, qui contrairement aux protéines de capside, L1 et L2, sont exprimées dans les lésions précancéreuses et mais également cancéreuses **(Stanley, 2012b)**. L'élimination des cellules touchées se fait généralement par l'intermédiaire des cellules T cytotoxiques, et via la présentation de peptides dérivés de protéines virales par les molécules du CMH de classe I **(Frazer, 2006)**.

De nombreuses formes de vaccins thérapeutiques HPV existent, parmi lesquelles des formes vectorisées, peptidiques, protéiques, à ADN, et chimériques. Ils sont pour la plupart composés de sous-unité de vaccins synthétiques ou recombinants connus et contrôlés, les rendant plus sûrs que les vaccins classiques par leur mode de production. Les vaccins peptidiques prennent de l'ampleur, du fait de leur simplicité, sécurité, efficacité et des administrations répétées. Les peptides, dérivés des antigènes d'intérêts, sont particulièrement adaptés à la formation de complexes avec les molécules du CMH **(Qian et al., 2006)**.

Etant donné le risque d'infection persistante et sa progression vers le cancer, le développement de thérapies augmentant la réponse immunitaire contre une infection HPV déjà installée, est plus que jamais d'actualité.

c. Les thérapies

Après diagnostic, la stratégie de traitement du cancer du col de l'utérus sera adaptée en fonction du stade d'évolution de la maladie, de la taille et de la localisation de la tumeur, ainsi que de l'état de santé général du patient. La classification de la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO) (http://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php?lang=2) permet de subdiviser les cancers invasifs du col de l'utérus en différents stades.

Plusieurs types de thérapies sont alors mis en place, les traitements locaux sont notamment utilisés pour les stades précoces de cancer du col, et les traitements globaux, pour les cancers plus avancés. Ils sont majoritairement basés sur l'utilisation de la radiothérapie, de la chimiothérapie ou encore de la chirurgie.

II. De l'infection par les virus du papillome humain au cancer

1. Génotypes et pathologies

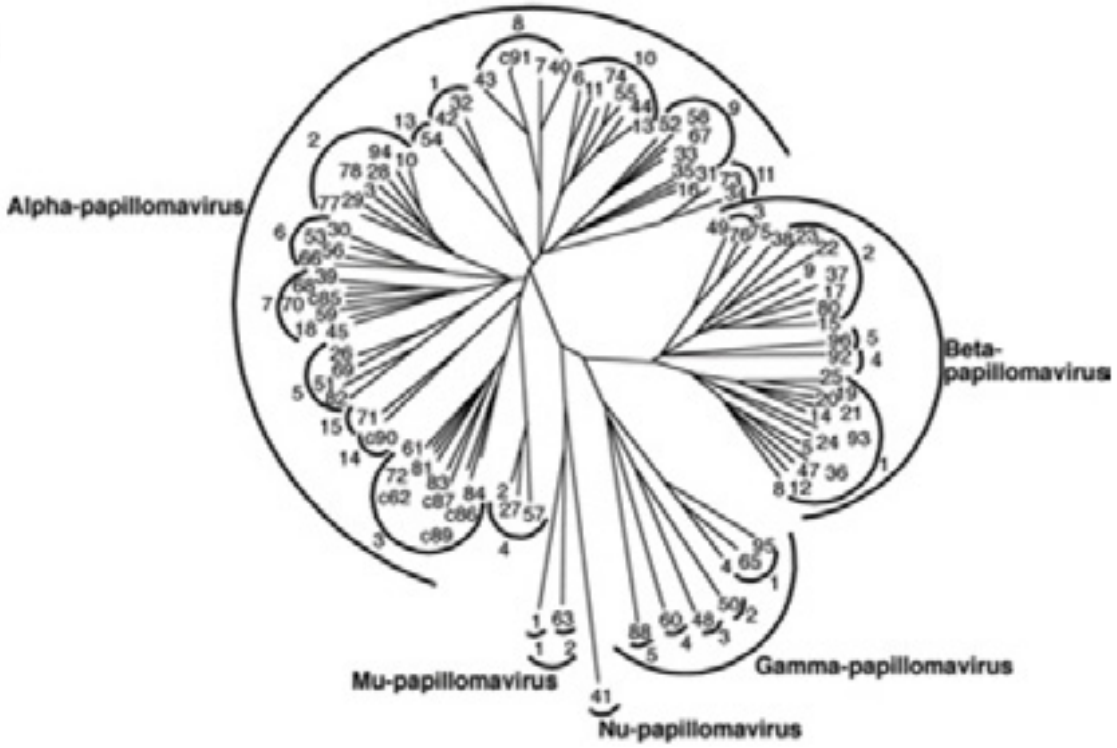


Figure 6 : Groupes d'évolution des papillomavirus humains

Les HPV- du genre Alpha sont principalement associés aux infections des muqueuses génitales, et les HPV des genres béta, gamma, mu et nu sont eux majoritairement associés aux infections cutanées. D'après **(de Villiers et al., 2004)**.

Les papillomavirus (PV) font partie de la famille des *Papillomaviridae* et infectent plus de 20 espèces de mammifères différentes, mais également les oiseaux et les reptiles **(Doorbar,**

2007). Actuellement plus de 200 types de papillomavirus ont été identifiés **(Bernard et al., 2010)** et une classification a été établie se basant sur les homologies de séquences nucléotidiques **(de Villiers et al., 2004)**. Ainsi, les virus au sein d'un même genre partagent entre 60 et 70% d'homologies entre eux. Deux types de PV sont considérés comme différents s'ils présentent au moins 10% de diversité de séquence dans le gène de la protéine majeure de capside L1. De la même manière deux PV sont de sous-types différents si cette diversité de séquence est comprise entre 2 et 10%. Les variants quant à eux présentent une différence d'environ 2% entre eux.

Genre	Espèce(s)	Type(s)	Propriétés
Alpha-papillomavirus	4	HPV-2, HPV-27, HPV-57	Verrues **cutanées** classiques, fréquents pour les verrues génitales.
	5	HPV-26, HPV-51, HPV-69, HPV-82,	Lésions bénignes et malignes des **muqueuses**
	6	HPV-53, HPV-30, HPV-56, HPV-66,	Lésions bénignes et malignes des **muqueuses**
	7	HPV-18, HPV-39, HPV-45, HPV-59, HPV-68, HPV-70	Lésions des **muqueuses**, plus fréquent dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes squameux du col de l'utérus
	8	HPV-7, HPV-40, HPV-67	Lésions bénignes **cutanées** et des **muqueuses**
	9	HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58, HPV- 67	Lésions de haut risque des **muqueuses**, plus fréquent dans les carcinomes squameux que dans les adénocarcinomes du col de l'utérus
	10	HPV-6, HPV-11, HPV-13, HPV-44, HPV-74	Lésions bénignes des **muqueuses**, HPV-6 et 11 dans les verrues génitales, condylomes acuminés, papillomes du larynx. Certaines lésions peuvent progresser vers des cancers
Beta-papillomavirus	1	HPV-5, HPV-8, autres	Lésions cutanées bénignes et malines dans les Epidermodysplasies Verruciformes et chez les patients immunodéprimés
Gamma-papillomavirus	1	HPV-4, HPV-65, autres	Lésions cutanées bénignes, verrues communes
Mu-papillomavirus	1, 2	HPV-1, HPV-63	Lésions cutanées, type verrues plantaires
Nu-papillomavirus	1	HPV-41	Lésions cutanées (kystes épidermoïdes, verrues)

Figure 7 : La classification des principaux HPV et les pathologies humaines.

La classification phylogénétique des différents types d'HPV a été réalisée grâce à l'étude des identités de séquences. Le genre Alpha regroupe principalement les HPV infectant les muqueuses génitales. D'après **(Bernard, 2005; de Villiers et al., 2004)**

Les papillomavirus sont subdivisés en genres, identifiés par des lettres grecques (**Figure 6**). Le genre ayant la plus grande importance clinique est le genre alpha-papillomavirus,

contenant les types d'HPV majoritairement associés aux lésions des muqueuses, et notamment les HPV à haut risque comme HPV-16 et -18, ou encore des HPV de bas risque comme HPV-6 et -11. Cependant, il comprend également des HPV cutanés (HPV-2, -27 et -57) (**Figure 7**).

Le genre béta, regroupe les HPV associés aux infections cutanées, et impliqués dans le développement de cancer de la peau. Ils ont été isolés à partir de patients présentant une maladie génétique rare autosomale récessive provoquant une sensibilité accrue aux infections par les virus du genre beta **(Doorbar, 2005)**. Les deux genres principaux Alpha et Beta regroupent 90% des HPV caractérisés. Les genres gamma, nu et mu comprennent l'ensemble des lésions cutanées de types verrues communes, plantaires, ou kystes épidermoïdes **(Leto et al., 2011)**.

2. La particule virale : organisation structurale et génomique

Les papillomavirus sont des virus à ADN double brin circulaire d'environ 7900 bp, non enveloppés à symétrie icosaédrique, dont la réplication est totalement dépendante de la différenciation du tissu épidermique qu'ils infectent. Ils font partie de la famille des *Papillomaviridae* pouvant infecter un grand nombre d'espèces animales.

La capside icosaédrique de 55 nm de diamètre est composée de 360 molécules de la protéine majeure de capside, L1, et peut contenir jusqu'à 72 molécules de la protéine mineure de capside, L2, qui sont organisées en 72 unités morphologiques appelées capsomères **(Figure 8)**. Chaque capsomère est constitué d'un pentamère de L1, dont 12 pentavalents et 60 hexavalents **(Sapp and Day, 2009)**.

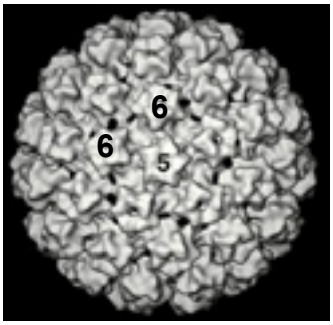


Figure 8 : Structure de la capside des Papillomavirus

Dans la particule virale d'HPV, 360 protéines L1 sont assemblées en 72 pentamères. 12 pentamères sont situés sur un axe de symétrie 5 (chiffre 5 noir) et 60 pentamères sont centrés sur un axe de symétrie 6 (chiffre 6 noir). D'après **(Trus et al., 1997)**

Le génome des papillomavirus est divisé en trois régions: les régions précoces (E) et tardives (L) et la région LCR (Long Control Region) appelée également NCR (non-coding region ou encore URR (upstream regulatory region).

La région précoce d'HPV-16 (**Figure 9**) code pour 6 gènes (de E1 à E7), impliqués dans la réplication des papillomavirus (E1 et E2), la transcription (E2), la maturation et la libération des particules virales (E4), la transformation cellulaire (E5, E6 et E7) et l'immortalisation (E6 et E7).

La région tardive code pour les protéines majeures et mineures de capside, respectivement L1 et L2. Le gène tardif L1 est le plus conservé parmi les HPV, et sert notamment au génotypage. La protéine L1 représente 80% des protéines de capside et est hautement immunogénique. La protéine L2 associée à L1 permet l'incorporation de l'ADN viral au virion lors de l'assemblage des nouvelles particules virales.

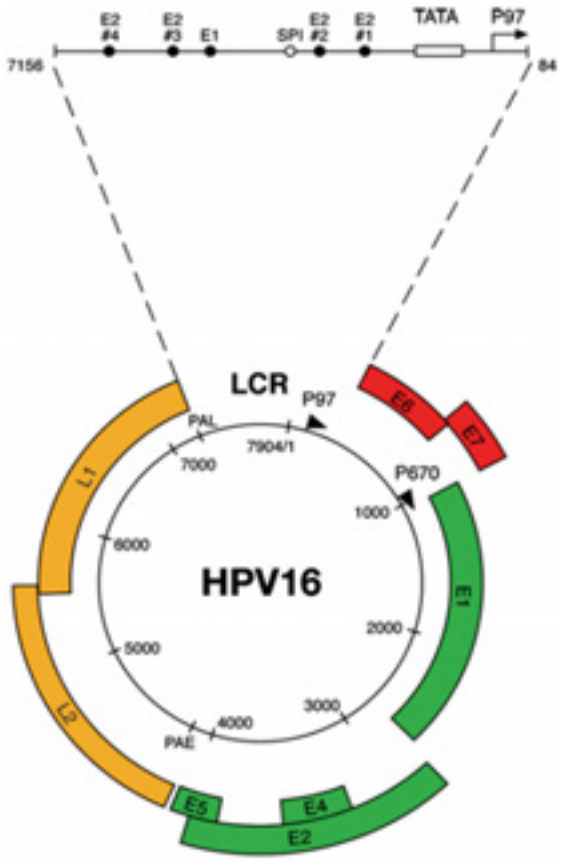


Figure 9 : Organisation du génome d'HPV-16

Le génome d'HPV est composé d'une molécule d'ADN circulaire double brin de 7 906 pb. Il est constitué d'une région de régulation (LCR, Long Control Region) contenant les éléments de contrôle de la transcription et de la réplication et les cadres ouverts de lecture des gènes précoces (E) et tardifs (L). La région LCR agrandie fait apparaitre les sites de fixation d'E2, E1 et Sp1, ainsi que le motif TATA du promoteur p97. (PAE : PolyAdenylation Early, PAL : PolyAdenylation Late). Les six protéines précoces sont exprimées soit à partir de p97 (précoce) ou de p670 (tardif) à différentes étapes durant la différenciation cellulaire épithéliale. Les

protéines tardives sont également exprimées à partir de p670, après un shift du site PAE vers le site PAL. D'après **(Doorbar, 2006)**

La région LCR, représentant entre 500 et 1 000 pb, est comprise entre L1 et E6, peu conservée parmi les HPV, est impliquée dans l'expression des gènes et la réplication virale dans le noyau des cellules hôtes. Elle contient notamment les promoteurs des gènes précoces (p97 pour HPV-16 et p105 pour HPV-18) et tardifs (p670 pour HPV-16 et HPV-18). Le promoteur précoce est actif constitutivement, alors que le promoteur tardif s'active en fonction du degré de différenciation de la cellule hôte **(Leto et al., 2011)**.

3. Le cycle viral

Les papillomavirus infectent la lame basale des épithéliums muqueux ou cutanés, et leur cycle viral est lié à la différenciation des cellules hôtes. L'expression des protéines virales est alors coordonnée avec la migration et la différenciation des cellules vers les couches supérieures de l'épithélium **(Bodily and Laimins, 2011)**. Le cycle viral peut alors être découpé en cinq phases **(Figure 10)**.

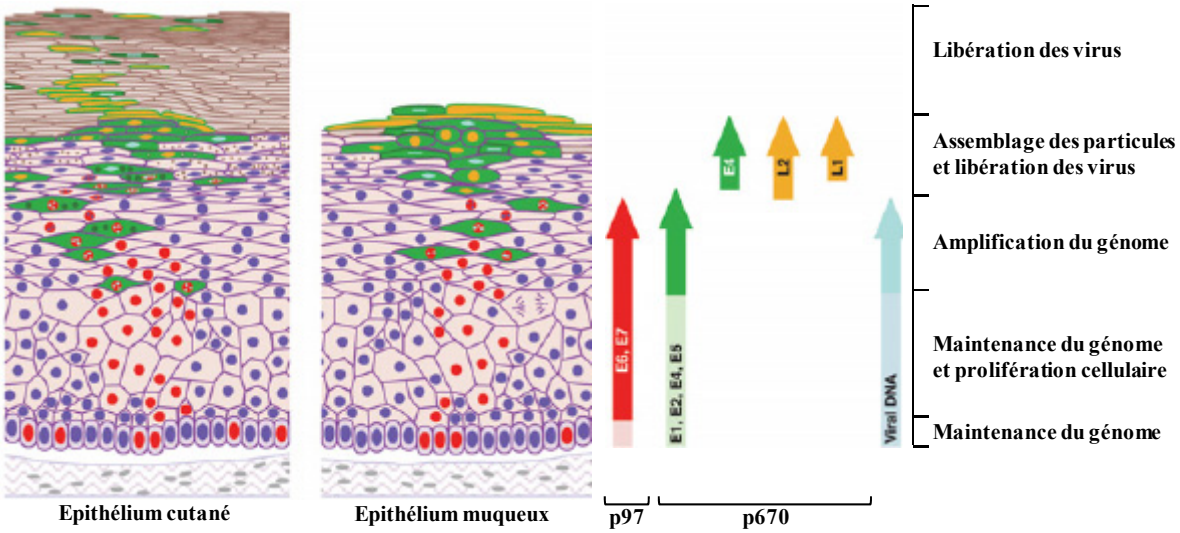


Figure 10 : Le cycle infectieux d'HPV-16

Suite à une microlésion, le virus infecte les cellules de la lame basale de l'épithélium. Les cellules de l'épiderme exprimant des marqueurs du cycle cellulaire présentent des noyaux rouges. L'expression des protéines virales nécessaires à la réplication du génome se fait dans les cellules exprimant E6 et E7, après activation de p670 dans les couches supérieures de l'épiderme (cellules vertes à noyaux rouges). Les gènes L1 et L2 (en jaune) sont exprimés dans les cellules contenant l'ADN viral amplifié au niveau des couches épithéliales supérieures. Les cellules contenant des particules infectieuses desquament de la surface épithéliale (cellules vertes à noyaux jaunes), libérant les particules virales à la surface. D'après **(Doorbar, 2006)**

a. Infection de l'épithélium, attachement et endocytose

Afin de permettre l'infection, les microlésions de l'épithélium permettent l'accès des particules virales aux cellules de la lame basale de l'épithélium. Ce procédé suggère que la maintenance des lésions implique l'infection des cellules souches épithéliales **(Bodily and Laimins, 2011)**.

Actuellement, une controverse existe entre la nature du récepteur à la surface de la cellule qui permet l'attachement du virus, mais la plupart des études suggèrent une dépendance à la présence d'héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG) jouant un rôle dans l'attachement et l'entrée du virus **(Doorbar, 2005)**. Et la majorité des papillomavirus utilisent des héparanes sulfate protéoglycanes comme récepteur d'attachement primaire (HSPG1). Les deux familles majeures d'HSPG de surface sont les syndécanes et les glypicanes (**Sapp and Bienkowska-Haba, 2009)**. L'internalisation des virus liés est un processus lent avec une demi-vie de l'ordre de quelques heures, et qui se fait par endocytose **(Figure 11, étape 1)**.

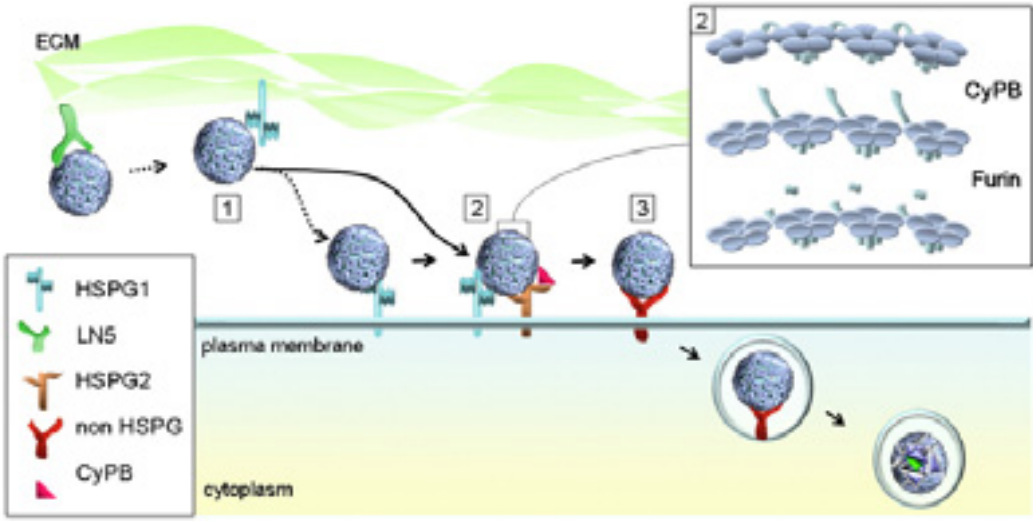


Figure 11 : Modèle des événements infectieux suite à l'infection par HPV-16

Etape 1 : Les virions HPV-16 se lient à leur récepteur primaire d'attachement, les héparanes sulfates protéoglycanes de type 1 (HSPG1), situés sur la matrice extracellulaire ou à la surface de la cellule. **Etape 2 :** Les capsides sont transférées à un second récepteur (HSPG2) à la surface cellulaire. L'interaction avec le second récepteur induit un changement conformationnel exposant la partie N-terminale de la protéine L2 et provoque le clivage de la furine. Processus favorisé par la cyclophiline B. **Etape 3 :** Ces changements semblent induire d'autres changements conformationnels réduisant l'affinité des capsides pour les HSPG et conduisant à l'endocytose. D'après **(Sapp and Day, 2009)**

Afin de permettre l'entrée des virus au sein de la cellule et une infection efficace, des récepteurs secondaires (HSPG2) seraient également impliqués, comme pour d'autres virus, suggérant le rôle des intégrines α6 **(Figure 11, étape 2)**. Les particules virales HPV sont prises en charge d'une manière relativement lente après attachement à la cellule hôte, et se fait

via l'endocytose par des vésicules à clathrine pour HPV-16 **(Culp et al., 2007) (Figure 11, étape 3)**. Ce mode d'entrée n'est cependant pas conservé parmi les différents types d'HPV **(Sapp and Bienkowska-Haba, 2009)**.

Les particules virales se désassemblent dans les endosomes tardifs ou les lysosomes, avec transfert de l'ADN viral au noyau facilité par la protéine mineure de capside L2. L'infection mène à la production du génome viral sous forme d'épisome stable (sans intégration dans les cellules hôtes) dans les cellules des couches épithéliales basales. Ce processus est favorisé par l'expression des protéines virales E1 et E2 **(Doorbar, 2006)**.

La libération de l'ADN viral peut être facilitée par la protéine majeure de capside L2 et par la disruption des ponts disulfures entre les capsomères dans l'environnement réducteur de la cellule **(Li et al., 1998b)**, permettant le transport de l'ADN viral vers le noyau.

b. Maintenance du génome et latence de l'infection

Des études récentes ont permis de montrer l'établissement d'une latence et de l'induction d'une réactivation à partir de celle-ci. La persistance virale est fréquente après élimination de l'infection, mais avec un nombre de copies d'ADN viral très faible (1 copie pour 40 à 1000 cellules). Cette infection latente est donc caractérisée par le faible nombre de copies d'ADN viral détecté dans les biopsies des tissus histologiquement normaux **(Gravitt, 2011)**.

Les modèles expérimentaux d'infection animale montrent que l'ADN des papillomavirus persiste au site d'infection, avec une charge virale faible. L'ARN messager CRPV dans les infections latentes est caractérisé par E1 et non E6/E7. Ces infections latentes peuvent être réactivées après irradiation ou lumière UV, et permettre la production de particules virales. De plus, sans induction, une petite proportion des papillomavirus peut être produite naturellement, de par la localisation du site de latence dans les cellules souches épidermiques.

Des modèles de latence des papillomavirus cervicaux basés sur les études sur le CRPV ont été proposés en 2011 **(Maglennon et al., 2011)**. Les cellules infectées quiescentes maintiennent le génome viral sous forme d'épisome. Elles sont réactivées suite à des stimuli de différenciation tels que la réparation de l'épithélium suite à des microlésions et qui favorise ainsi l'induction d'une infection active des papillomavirus (**Figure 12**). Cependant, la réactivation de l'infection après une période de latence induit l'intervention immédiate du système immunitaire. En effet, le contrôle par les cellules mémoires, permet de limiter la

durée de l'infection active **(Figure 12)**. Cette hypothèse s'appuie sur la présence de cellules T mémoire effectrices résidentes dans les tissus périphériques **(Purwar et al., 2011).**

Durant cette phase, les niveaux d'expression des protéines virales précoces (E1, E2, E6 et E7) sont très faibles. Ce phénomène de maintenance est cependant majoritairement contrôlé par les gènes viraux E1 et E2 **(Doorbar, 2005)**.

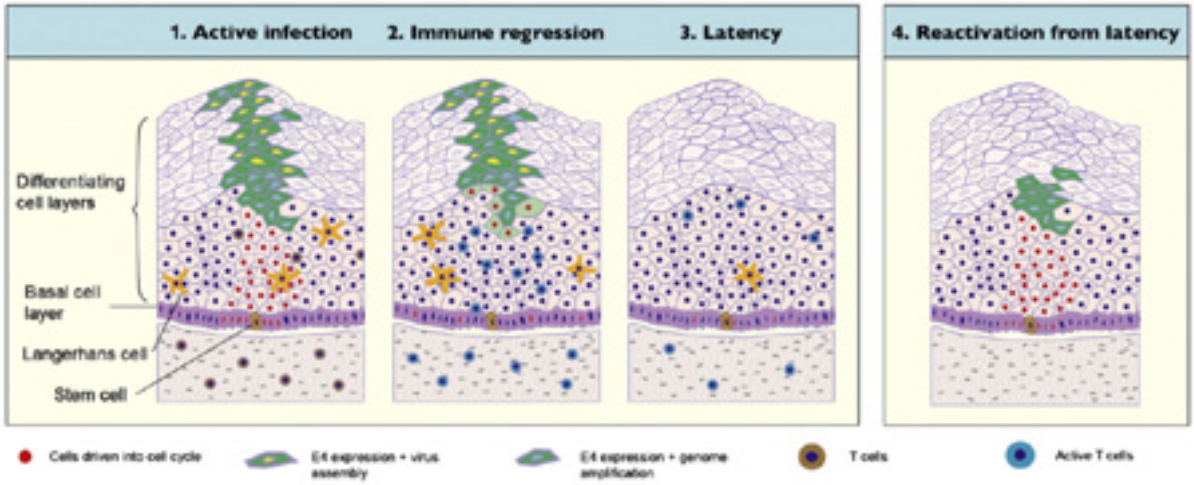


Figure 12 : Modèle de latence et réactivation du cycle du papillomavirus humain

L'infection active permet l'amplification du génome et la production de nouvelles particules virales, par le biais des cellules des couches basales de l'épithélium infecté. La stratégie virale de faible production de protéines permet au virus d'échapper au système immunitaire. Cependant, la réaction immunitaire induit la régression, grâce aux infiltrations des cellules T majoritairement. L'expression des gènes viraux est éteinte et les lésions régressent. La latence virale restreint le génome viral aux cellules souches de la couche basale de l'épithélium. Les microlésions peuvent stimuler la division des cellules basales en latence et permettre la réactivation et la stimulation des cellules T mémoires localisées dans cxles tissus. D'après **(Maglennon et al., 2011)**

c. Prolifération des cellules

La croissance augmentée des cellules suite à l'infection par les papillomavirus fait suite à l'expression des oncoprotéines E6 et E7. E7 s'associe notamment avec des membres de la famille pRb, dont la fonction est d'agir comme régulateur négatif du cycle cellulaire, prévenant l'entrée en phase S en s'associant avec la famille des facteurs de transcription E2F. Une fois E7 lié à pRb, E2F est libéré, menant à l'expression de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN, telle que la cycline E. E7 peut également s'associer à d'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, incluant les histones deacétylases, les inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines p21 et p27 et le complexe de transcription AP1 (Activating Protein 1). L'effet stimulateur d'E7 est cependant limité à certaines cellules en différenciation présentant de faibles niveaux d'expression de p21/p27. En effet, à hauts

niveaux d'expression de p21 et p27, un complexe inactif E7 - cycline E se forme **(Funk et al., 1997)**.

De plus, l'action de prévention de l'induction de l'apoptose d'E7, en réponse à l'entrée en phase S, est complétée par l'intervention de la protéine virale E6. La fonction anti-apoptotique la plus connue d'E6 est sa liaison avec le suppresseur de tumeur p53 et sa dégradation par le protéasome 26S. L'oncoprotéine E6 est une protéine multifonctionnelle qui s'associe également avec d'autres protéines pro-apoptotiques **(Thomas and Banks, 1998)**, comme Bak (Bcl-2-homologous Antagonist Killer) et Bax (Bcl-2 activated X). Indépendamment d'E7, E6 a également un rôle d'hyperprolifération via son extrémité C-terminale portant un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ (PSD-95, Dlg, ZO1). La liaison d'E6 à ces dernières a pour effet de provoquer la prolifération des cellules supra-basales, perturbant l'adhésion cellulaire et pouvant mener au développement de tumeurs métastatiques **(Nguyen et al., 2003)**.

d. Amplification du génome

Les protéines virales sont exprimées à partir de deux promoteurs majeurs, le premier, p97 (HPV-16) ou p105 (HPV-18), indépendant de la différenciation cellulaire, permet l'expression des protéines précoces. Le second, p670 (HPV-16), n'est activé que lorsque les cellules se différencient, et permet l'expression des transcrits menant à la production des protéines L1 et L2. L'activation du promoteur tardif, non modulé par E2, permet d'augmenter la réplication et le nombre de copies d'ADN viral (10^4 par cellule) **(Ibeanu, 2011)**. Les mécanismes précis déclenchant le programme de différenciation des cellules hôtes, et menant à la phase productive dans le cycle des HPV restent incertains **(Conway and Meyers, 2009)**. Lors de la progression des cellules au sein de l'épithélium, l'activation des promoteurs permet l'augmentation de l'expression des protéines virales impliquées dans la réplication telles que E1, E2, E4 et E5. Cependant, E5 et E7 agissent en synergie pour induire la synthèse d'ADN viral dans les compartiments supra-basaux **(Maufort et al., 2010)**

E5 est une protéine transmembranaire localisée dans l'appareil de golgi, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire, et qui s'associe aux pompes à protons ATPases, protéines essentielles pour l'acidification des compartiments intracellulaires (lysosomes, endosomes, golgi) **(Hwang et al., 1995)**. Le recyclage des récepteurs aux facteurs de croissance est alors favorisé et permet l'activation de la voie de signalisation des récepteurs à

l'EGF (Epidermal Growth Factor). E5 a donc un rôle déterminant dans la reprogrammation des cellules en différenciation afin de permettre la synthèse et l'amplification de l'ADN **(Genther et al., 2003)**.

La protéine épissée E1^E4 est impliquée dans la réplication des génomes viraux en agissant sur la transition G2/M. La libération des virions matures est favorisée par la fragilisation des réseaux cellulaires de kératine. Le rôle d'E4 reste indéfini mais serait lié à son association avec les complexes cycline B/Cdk et cycline A/Cdk menant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M en séquestrant ceux-ci dans le cytoplasme **(Doorbar, 2007)**. Dans une cellule exprimant de forts niveaux d'E4 et un niveau continu d'E7, la maintenance de la phase S permet l'accumulation des génomes viraux.

e. Assemblage des particules virales et libération des virions

Cette étape finale permet l'assemblage des particules virales infectieuses. La synthèse des capsides est régulée par les niveaux d'expression et l'épissage des ARN messagers. Dans les cellules différenciées, les protéines majeures et mineures de capsides, L1 et L2, sont exprimées à partir du promoteur tardif. Celles-ci s'accumulent, puis s'assemblent en capsides icosaédriques, composées de 360 copies de L1 et 12 copies de L2, contenant le génome viral.

L'assemblage se fait dans les couches supérieures de l'épithélium et nécessite la présence d'E2, L1 et L2. Tandis que les copies de L1 s'associent en capsomères dans le cytoplasme, la liaison avec les PML (ProMyelocytic Leukaemia) ne se fait qu'après liaison à L2 dans sa région C-terminale **(Doorbar, 2007)**. Le recrutement des génomes viraux nécessite la présence d'E2 via ses sites spécifiques de reconnaissance **(Florin et al., 2002)**. La présence de celle-ci permet une encapsidation efficace et augmente l'infectivité des particules virales.

De par la nature non lytique des papillomavirus, les particules virales nouvellement formées ne sont libérées qu'après différenciation et desquamation des cellules des couches supérieures de l'épithélium, période qui peut prendre plusieurs semaines à plusieurs mois. Ce phénomène favorise l'échappement au système immunitaire, du fait de l'absence de mort cellulaire induite par le virus, de l'absence d'inflammation résultante, et de l'éloignement avec les cellules présentatrices d'antigènes **(Stanley, 2012a)**.

4. Carcinogenèse

La carcinogenèse cervicale se déroule en plusieurs étapes. Celle-ci débute par l'infection des cellules basales de l'épithélium squameux. Les HPV oncogènes sont responsables de cette infection, qui est généralement rapidement éliminée de l'organisme par le système immunitaire. Cependant, en cas d'échappement au système immunitaire et avec le concours d'autres cofacteurs, cités précédemment, l'infection persiste, provoquant une instabilité génétique, et la formation de transformations néoplasiques de l'épithélium (**Figure 13**).

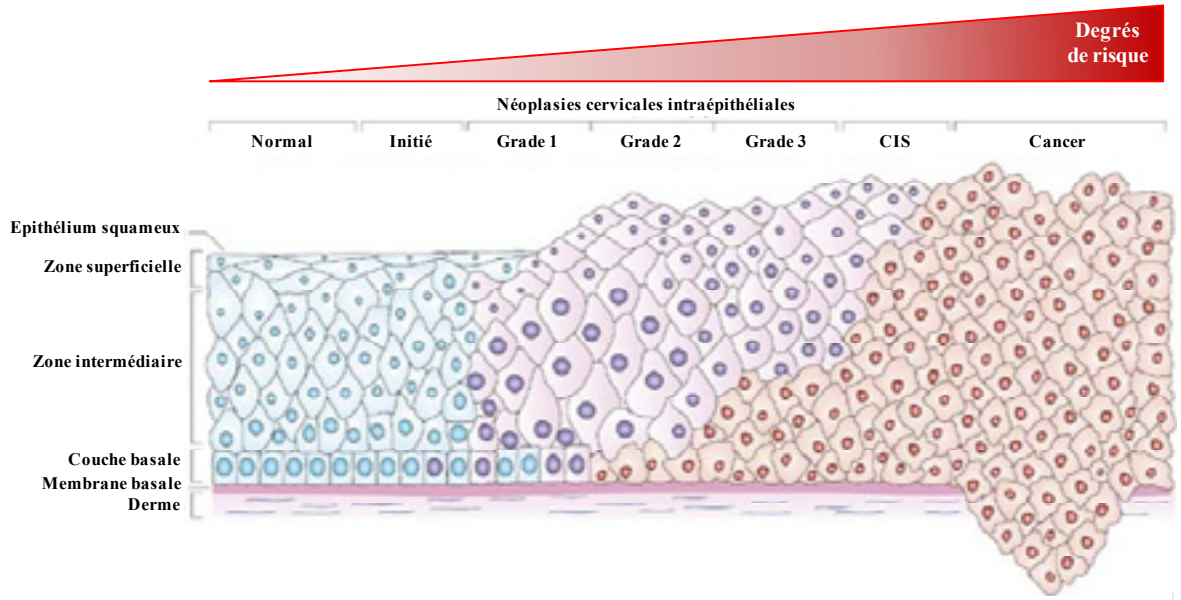


Figure 13 : Processus de développement des lésions précancéreuses de l'épithélium cervical.

L'infection débute au niveau des cellules basales et poursuit sa progression en envahissant progressivement toutes les zones de l'épithélium cervical. Modifié d'après **(Kelloff and Sigman, 2007)**.

Les six caractéristiques des cellules cancéreuses sont : leur capacité à produire leurs propres signaux de croissance, leur non-réponse aux signaux d'inhibition de croissance, l'absence de mort cellulaire, la maintenance de l'angiogénèse, l'invasion des tissus par les membranes basales et les capillaires. De plus, le septième cofacteur pourrait être les déficiences dans la réponse immunitaire **(Jayshree et al., 2009)**.

Le facteur principal dans l'induction de la carcinogenèse est l'intégration du génome viral dans le génome hôte. En effet, sous forme épisomale, l'expression des gènes viraux tels que E5, E6 et E7 est régulée par E2 **(Collins et al., 2009; Gammoh et al., 2009; Jayshree et al., 2009)**. Après intégration, qui se produit dans les sites fragiles, tels que les régions E1 et E2 (**Figure 14**), le rétrocontrôle négatif sur l'expression des oncogènes viraux est perdu. Par conséquent, les niveaux d'expression d'E6 et E7 augmentent, induisant la dérégulation du cycle cellulaire. Celui-ci est régulé et contrôlé par de nombreux facteurs, dont les

suppresseurs de tumeurs p53 et pRb, qui vont être dégradés via le système ubiquitine protéasome suite à l'action des oncoprotéines E6 et E7.

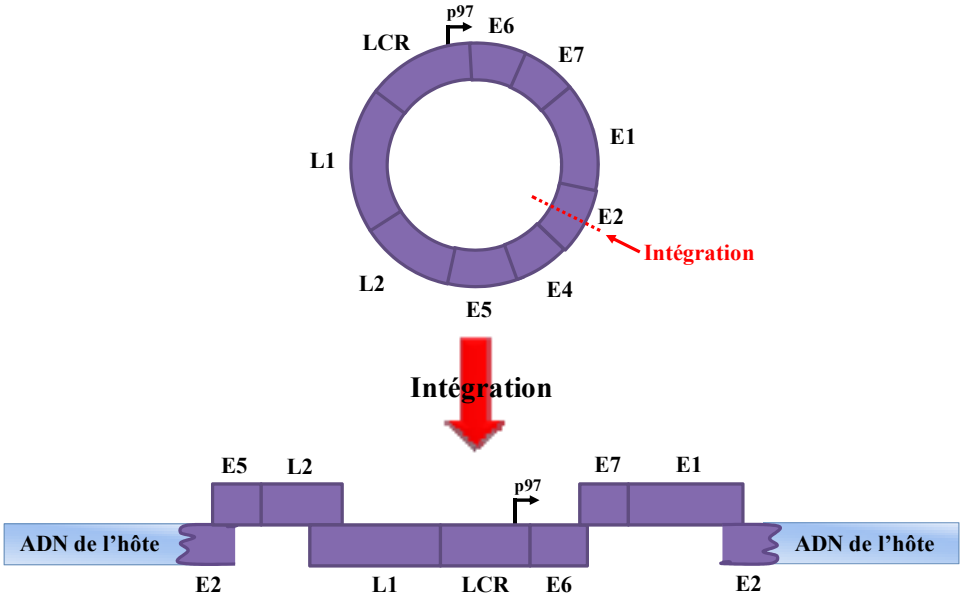


Figure 14 : Représentation schématique de l'intégration du génome viral HPV

Le processus de développement du cancer prend en moyenne plus de 10 ans après infection par le virus, fait suite à la surexpression des oncoprotéines E6 et E7, surexprimée après l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Cet événement d'intégration est non naturel pour le virus mais donne un avantage aux cellules infectées, qui deviennent immortelles. Elle se produit notamment au niveau de sites fragiles tels que le gène E2, provoquant ainsi sa disruption. Sa capacité de rétrocontrôle des oncoprotéine E6 et E7 se retrouve alors annulée, induisant ainsi leur surexpression via le promoteur p97.

III. Implication des oncoprotéines virales dans l'oncogenèse

L'expression des oncoprotéines E6 et E7 en présence de faibles niveaux d'E1, E2, E4 et E5 permet la maintenance du génome viral. Par la suite ces protéines ont un rôle crucial, l'augmentation de leurs niveaux d'expression facilite l'amplification du génome viral.

1. Rôle de l'oncoprotéine E7

a. Structure

Les protéines E7 sont de petites molécules composées d'environ 100 acides aminés, dont l'extrémité N-terminale contient des homologies de séquence avec la protéine E1A de l'adénovirus et l'antigène T du virus SV40 **(McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)**. Les régions conservées CR1, CR2 et CR3 contribuent fortement aux activités transformantes de la protéine E7 (**Figure 15**). Au sein de la région CR2, se trouve un motif conservé L-X-C-X-E qui est nécessaire à l'association d'E7 avec la protéine de susceptibilité au rétinoblastome

pRb **(Munger et al., 1989)**. D'après certaines études, le domaine C terminal d'E7 contiendrait un site de liaison indépendant de faible affinité à pRb **(Liu et al., 2006; Patrick et al., 1994)**. En effet, certains mutants dans lesquels le CR2 est absent sont incapables de lier les protéines de la famille de pRb **(McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)**. A proximité du motif L-X-C-X-E se trouve également un site de phosphorylation caséine kinase II (CK II). La partie C terminale contient également deux motifs Cys-X-X-Cys formant un domaine de liaison au zinc qui fait office de domaine de dimérisation in vitro. Cette propriété reste non démontrée *in vivo* et son implication dans les activités biologiques d'E7 reste à déterminer **(Barbosa et al., 1989; Liu et al., 2006)**.

Récemment, une étude a montré qu'un site secondaire de liaison à pRb est présent dans le domaine CR3, qui pourrait influencer la dérégulation de pRb **(Todorovic et al., 2012)**.

Actuellement, l'hypothèse du partage d'un ancêtre commun pour E6 et E7 est encouragée par la présence de quatre motifs Cys-X-X-Cys qui partage une similarité avec l'extrémité C terminale d'E7 **(G. Travé, communication personnelle)**.

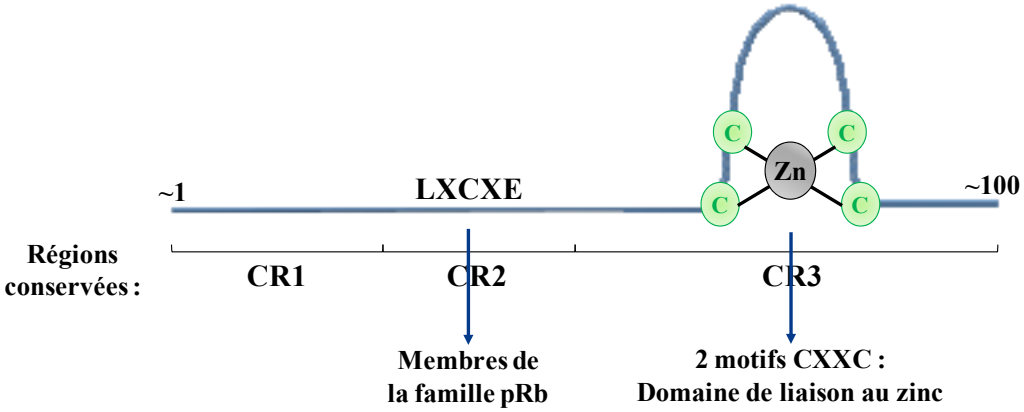


Figure 15 : Représentation schématique d'E7 HPV-16

Le schéma représente les régions conservées CR1, CR2, et CR3, le domaine de liaison au zinc, et le motif L-X-C-X-E. La région CR2 permet notamment l'interaction avec les membres de la famille pRb via leur fixation au motif conservé LXCXE. Le domaine de liaison au zinc, formé par deux motifs CXXC, est conservé entre différents types d'HPV. D'après **(Klingelhutz and Roman, 2012)**

La structure d'E7 a été résolue par RMN **(Liu et al., 2006)** et cristallographie aux rayons X **(Ohlenschlager et al., 2006)**. Les études ont montré que le domaine N terminal est non structuré alors que le domaine C terminal forme un domaine de liaison unique au zinc **(Figure 16)**. La taille théorique de HPV-16 E7 est de 11kDa, cependant, sa taille réelle est comprise entre 18 et 20kDa. Cette différence observée peut s'expliquer par la présence de nombreux résidus acides dans la région CR1, localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine.

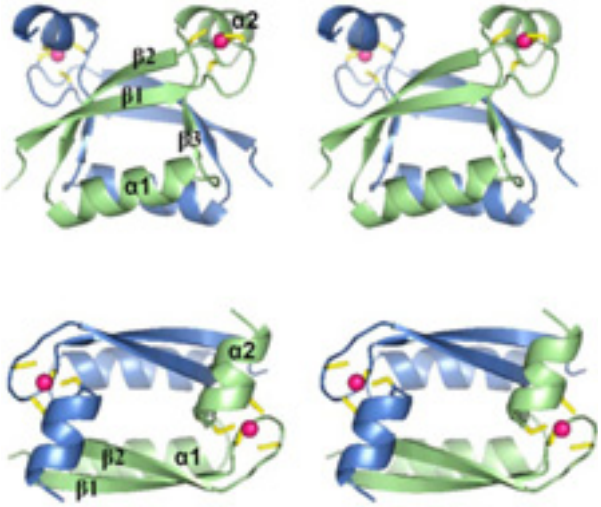


Figure 16 : Structure du dimère d'E7 du génotype 1A

Chaque dimère est représenté en deux vues orthogonales, avec les deux protomères colorés en bleu et vert, et l'atome de zinc lié et le ligand cystéine sont colorés en violet et jaune. D'après **(Liu et al., 2006)**

E7 est majoritairement localisée dans le cytoplasme **(Huh et al., 2005)**, mais est également retrouvée au sein des nucléoles. Elle est dégradée via le système ubiquitine protéasome et impliquant la conjugaison de l'ubiquitine à son l'extrémité N-terminale **(Reinstein et al., 2000)**. E7 ne présente pas d'activité enzymatique, ni de capacité de liaison à l'ADN. Cependant, ses activités biologiques sont liées à sa capacité à s'associer à des complexes régulateurs cellulaires **(Figure 17)**.

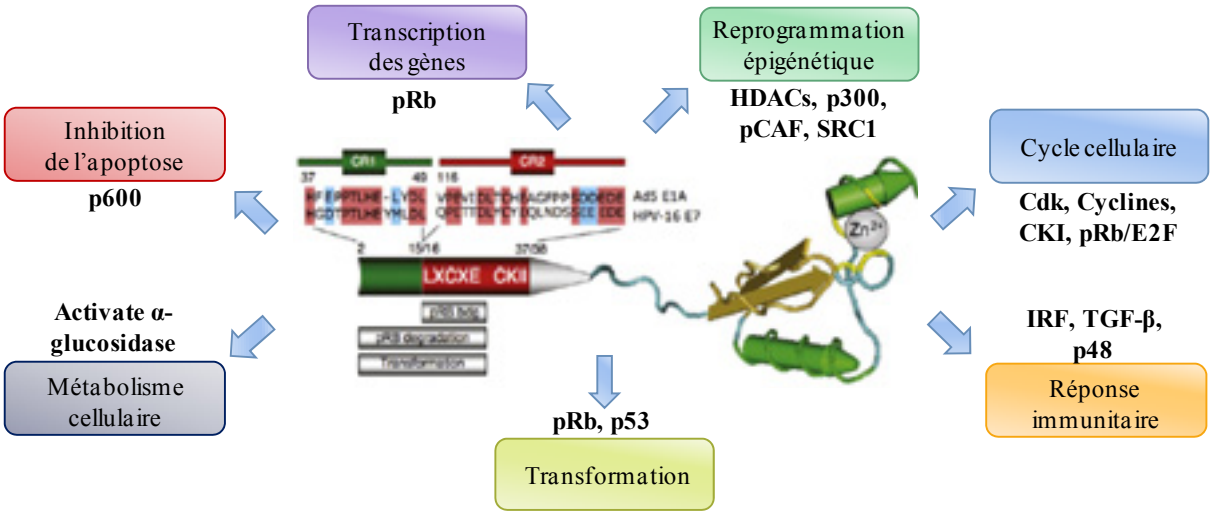


Figure 17 : Représentation schématique d'E7 HPV-16 et des principales activités biologiques

E7 a de nombreux partenaires cellulaires, impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, l'expression des gènes, la réplication de l'ADN et la signalisation cellulaire. Certaines interactions mènent à l'inactivation ou la dégradation de la cible, d'autres à l'activation. D'après **(McLaughlin-Drubin and Munger, 2009)**

b. Activités biologiques

i. Dégradation de pRb

Le motif LXCXE présent dans le domaine CR2 de la protéine E7 permet son interaction avec la protéine de susceptibilité au rétinoblastome, pRb et avec les autres membres de sa famille, p107 et p130 **(Dyson et al., 1992; Munger et al., 1989; Shin et al., 2012)**. Ces protéines sont capables de réguler l'entrée en phase S du cycle cellulaire et sa progression en agissant sur les activités transcriptionnelles du facteur de transcription E2F. Ce facteur de transcription est un régulateur central de la transition G1/S et de la progression en phase S, et est impliqué dans de nombreuses voies cellulaires, notamment la différenciation, l'apoptose, l'instabilité génomique. Lié à pRb en phase G1 il fait office de répresseur transcriptionnel **(Figure 18)**.

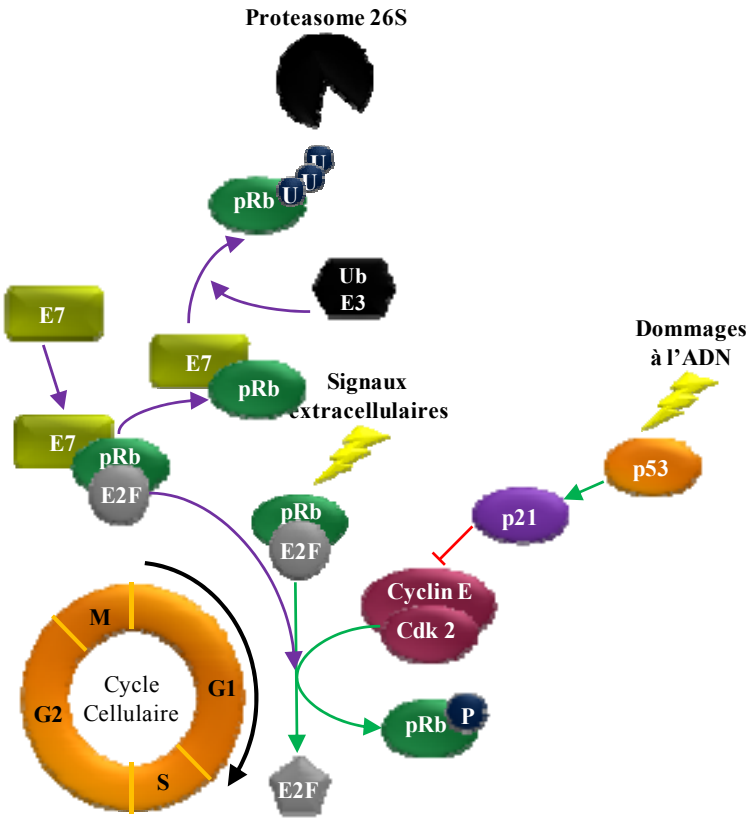


Figure 18 : Implication de l'oncoprotéine E7 dans la régulation du cycle cellulaire

L'expression de la protéine virale E2 permet la répression de l'expression d'E6 et E7. Cependant l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte s'accompagne la plupart du temps par la perturbation d'E2 qui annule son expression. La progression du cycle cellulaire est régulée par la protéine pRb interagissant avec E2F. Dans les cellules normales, durant la phase G1 pRb est phosphorylé par les kinases dépendantes des cyclines (CDK), menant à la libération d'E2F, qui activera la transcription des gènes nécessaires à l'entrée en phase S. Lors de l'infection par HPV, E7 se lie à pRb et empêche sa liaison avec E2F, qui actif constitutivement ne sera plus soumis au contrôle par le cycle cellulaire. De plus, l'inhibition des complexes cyclines/cdk est levée du fait de la diminution de l'expression de p21 et p27, renforçant encore la progression dans le cycle cellulaire. D'après **(Jayshree et al., 2009)**

Dans le cycle cellulaire normal, l'entrée en phase S est modulée par la phosphorylation de pRb par cdk4/6 et cdk2, entrainant la libération du facteur E2F, agissant cette fois comme activateur transcriptionnel des gènes nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire. La perte de contrôle du cycle cellulaire est induite comme dans le cas de l'infection par SV40 par l'association préférentielle d'E7 au complexe E2F/pRb **(Dyson et al., 1992)**.

Toutefois, à l'inverse de l'antigène T de SV40, E2F ne sera pas libérée suite à la phosphorylation de pRb mais après sa dégradation par le protéasome **(Jones et al., 1997)**. Cette dégradation nécessiterait pour HPV-16 l'intervention de l'ubiquitine ligase E3 culline-2 **(Huh et al., 2007)**. La maintenance de la phase S dans les cellules en différenciation est alors assurée par l'induction de la dégradation de pRb par les E7 d'HPV de haut risque et par conséquent par l'activation de la transcription dépendante de E2F. Des études montrent que la dégradation de pRb nécessite, en plus du site de liaison dans la région CR2, des séquences contenues dans la région CR1 et probablement dans CR3 **(Jones et al., 1997; Todorovic et al., 2012)**. Cependant, l'inactivation de pRb est nécessaire mais pas suffisante à l'induction de la transformation cellulaire **(Shin et al., 2012)**.

ii. E7 et p53

Dans les cellules exprimant E7, les niveaux et la demi-vie de p53 sont augmentés **(Demers et al., 1994)**. Ces mécanismes de stabilisation via E7 sont encore inconnus, mais semblent indépendants de p14-ARF (Alternative Reading Frame), qui est un inhibiteur de la dégradation de p53 Mdm2 dépendante **(Bates et al., 1998)**. Cependant, malgré les hauts niveaux d'expression de p53 dans les cellules exprimant E7, sa transcription n'est pas activée et est même inhibée par E7 **(Bodily et al., 2011; Eichten et al., 2002)**. HPV-16 E7 interfère également avec les signaux d'arrêt de croissance en G1 médiés par p53 en réponse aux dommages à l'ADN **(Demers et al., 1994; Shin et al., 2012)**.

iii. E7 et le cycle cellulaire

Les HPV ont développé des stratégies afin d'encourager les activités transformantes, en permettant aux cellules basales infectées de poursuivre la synthèse d'ADN grâce à l'expression de la protéine E7. Ces activités sont largement dues à la capacité d'E7 à se lier aux membres de la famille de pRb et à provoquer leur dégradation **(Collins et al., 2005)**.

Or, la dérégulation du cycle cellulaire par E7 n'est pas exclusivement induite par la dégradation de pRb. En effet, les cdk sont modulées par des activateurs ou inhibiteurs de cycline dépendante kinases (CKI). L'expression des cyclines E et A, sous-unités régulatrices de cdk2, et fortement produites dans les cellules exprimant E7, est sous le contrôle d'E2F. E7 interagit également avec les CKI, p21CIP1 et p27KIP1, qui sont exprimées suite à des signaux antiprolifératifs, l'activation de p53 ou encore la perte d'adhésion cellulaire. De plus, E7 d'HPV-16 peut également s'associer directement avec les complexes cdk2/cycline A et E **(Tommasino et al., 1993)**, permettant l'augmentation de l'activité cdk2.

iv. E7 et le système immunitaire

En s'associant avec IRF-1 (Interferon Regulatory Factor), E7 empêche son activité, telle que l'activation des promoteurs de l'IFN-α **(Park et al., 2000)**. E7 influence ainsi la réponse et la surveillance immunitaire. De par son interaction avec p48, E7 va également bloquer la transduction des signaux de la voie de signalisation des interférons **(Barnard and McMillan, 1999)**. Enfin, elle supprime la réponse immunitaire cytotoxique par la dérégulation du transporteur associé à TAP1 (Antigen Peptide Transporter 1), molécule clef de la voie de présentation des antigènes par le CMH-I.

v. E7 et la reprogrammation épigénétique

En plus de son action sur les protéines de la famille pRb, E7 agit également sur la transcription des gènes sous le contrôle du facteur E2F. E7 interagit avec les histones deacétylases de classe I (HDACs), qui sont des co-répresseurs transcriptionnels induisant le remodelage de la chromatine en modifiant les résidus lysine sur les histones. L'association d'E7 et des HDACs augmenterait la transcription dans les cellules en différenciation et favoriserait la progression dans la phase S. De plus, E7 peut également s'associer directement ou indirectement avec les histones acétyltransférases (HATs) comme p300, pCAF et SRC1 **(Avvakumov et al., 2003; Baldwin et al., 2006; Huang and McCance, 2002)**.

vi. E7 et le métabolisme cellulaire

Les cellules cancéreuses présentent un métabolisme énergétique basé sur les processus de glycolyse plutôt que la respiration mitochondriale. Ainsi, E7 interagit avec une enzyme, l'activate α-glucosidase, qui régule le catabolisme du glycogène en réduisant les stocks

cellulaires et les rendant disponibles pour le métabolisme **(Zwerschke et al., 2000)**. Dans les cellules transformées, l'expression de cette enzyme a pour conséquence l'augmentation du pH, due à une activité accrue des protéines échangeuses d'ions Na^+/H^+.

vii. E7 et l'instabilité génomique

Au cours de la transformation maligne les cellules cancéreuses accumulent des anomalies chromosomiques et structurales favorisant la progression cancéreuse. Les cellules exprimant E7 présentent un nombre anormal de centrosomes **(Duensing et al., 2000)**, ainsi que des anomalies mitotiques **(Duensing and Munger, 2002)** associées à l'instabilité génomique et au développement du cancer. La synthèse de centrioles aberrants est dépendante de l'activité cdk2, qui est activée de différentes manières suite à l'expression d'E7. De plus, cette instabilité semble être indépendante de l'inhibition de pRb **(Duensing and Munger, 2003)**. E7 et la mort cellulaire

2. Rôle de l'oncoprotéine E6

a. Structure

Les papillomavirus codent pour E6 dont l'open reading frame (ORF) est localisée directement en aval de la région non codante NCR. Ces protéines E6 présentent une longueur d'environ 150 acides animés, et contiennent deux domaines stables repliés E6N et E6C d'environ 75 résidus chacun **(Nomine et al., 2003)**. Elles comportent également quatre motifs C-X-X-C qui s'associent pour former deux domaines de liaison au zinc **(Barbosa et al., 1989; Grossman and Laimins, 1989; Nomine et al., 2006; Zanier et al., 2012)**. Ces sites de liaison au zinc sont essentiels pour de nombreuses fonctions connues d'E6, notamment pour la liaison avec des protéines cellulaires contenant un motif L-X-X-L-L comme l'ubiquitine ligase E6AP. D'autres régions permettent la liaison avec d'autres protéines cellulaires telles que p53, p300 et les protéines contenant des motifs de liaison aux domaines PDZ **(Figure 19)**.

De plus, grâce à l'analyse des régions repliées et non repliées des protéines, il a été montré que les E6 d'HPV de haut risque sont bien plus désordonnées que les E6 d'HPV de bas risques **(Uversky et al., 2006)**.

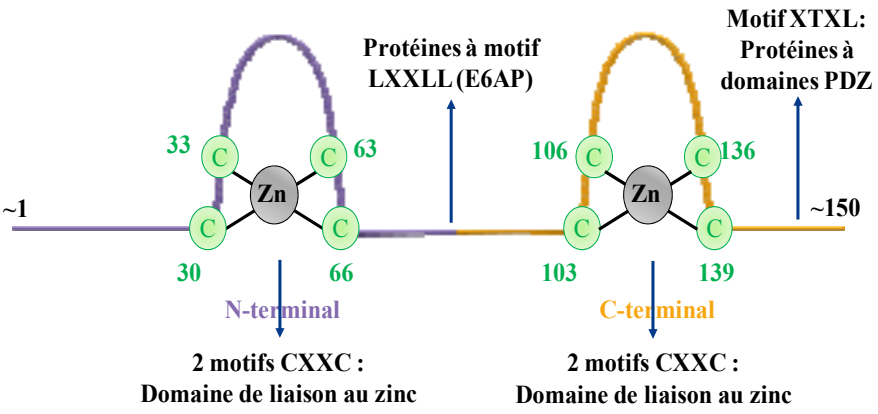


Figure 19 : Représentation schématique d'E6 HPV-16

Les deux motifs de liaison au zinc sont conservés parmi les différents HPV. Les zones d'interactions avec les principales cibles sont indiquées. La partie N terminale interagit avec p53, et la partie C terminale présente un motif de liaison aux protéines à domaines PDZ. D'après **(Klingelhutz and Roman, 2012)**

E6 peut être localisée à la fois dans le noyau, le cytoplasme et dans les fractions membranaires, et sa localisation est différente entre les HPV de bas risque et de haut risque **(Grossman and Laimins, 1989; Guccione et al., 2002; Masson et al., 2003)**. Les HPV de haut risque sont sujets aux mécanismes d'épissage alternatif générant différents messagers E6, permettant d'obtenir les deux oncoprotéines E6 et E7. En effet, en plus du site donneur d'épissage hautement conservé, est également présent un site conservé accepteur au sein de l'ORF d'E6 et situé proche du début de l'ORF d'E7, entrainant la perte d'un petit intron dans l'ORF d'E6, et générant ainsi une forme tronquée d'E6 appelée E6*. De plus, une théorie controversée suggère que l'ARN non épissé permet l'expression majoritaire de la protéine E6, alors que la forme épissée permet l'expression à la fois d'E6* et d'E7 **(Tang et al., 2006)**. Les protéines E6* sont des versions tronquées d'E6 dont peuvent exister jusqu'à quatre formes pour HPV-16, en fonction de la position acceptrice de l'épissage. Les protéines présentent leurs propres fonctions inhibitrices ou activatrices **(Filippova et al., 2007)**. E6* en se liant à E6 inhibe la dégradation de p53 médiée par E6 et affecte l'apoptose **(Filippova et al., 2009)**.

La protéine E6 d'HPV-16 (16E6) comportent quatorze cystéines, huit liant le zinc et six non conservées, exposées à la surface. Cette exposition provoque l'agrégation de la protéine via la formation de pont disulfures **(Ristriani et al., 2000)**. Au sein du laboratoire, ces six cystéines ont été mutées en sérine, permettant d'éviter l'agrégation et l'obtention d'un mutant 16E6 6C6S monomérique à faible concentration **(Nomine et al., 2003; Nomine et al., 2001)**.

Afin de déterminer la structure d'E6, les structures des deux domaines N et C terminal d'E6 ont été déterminées indépendamment, puis associées dans la prédiction de la structure

complète. Les domaines E6C et E6N sont capables de se replier, et la structure du domaine muté E6C 4C4S à pu être obtenue par RMN **(Nomine et al., 2006)**. La structure cristallographique d'E6 HPV-16 a été récemment résolue au sein de notre équipe, lui permettant notamment l'interaction avec l'ubiquitine ligase E6AP **(Figure 20) (Zanier et al., 2013)**.

b. E6 protéine multifonctionnelle

E6 est une protéine multifonctionnelle avec de nombreuses fonctions biologiques et partenaires cellulaires, impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, l'expression des gènes, la réplication de l'ADN, la signalisation cellulaire, l'instabilité génomique et l'apoptose **(Figure 21)**.

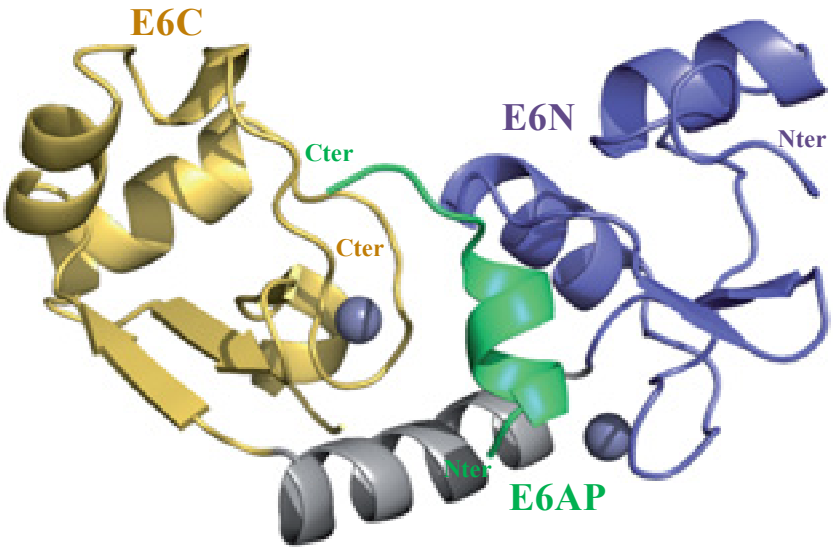


Figure 20 : Structure cristallographique d'E6 HPV-16 liée au peptide E6AP

E6 HPV-16 se lie aux résidus 403 à 414 d'E6AP (en vert). E6C est représenté en jaune, E6N en bleu et le linker en gris. Adapté d'après **(Zanier et al., 2013)**

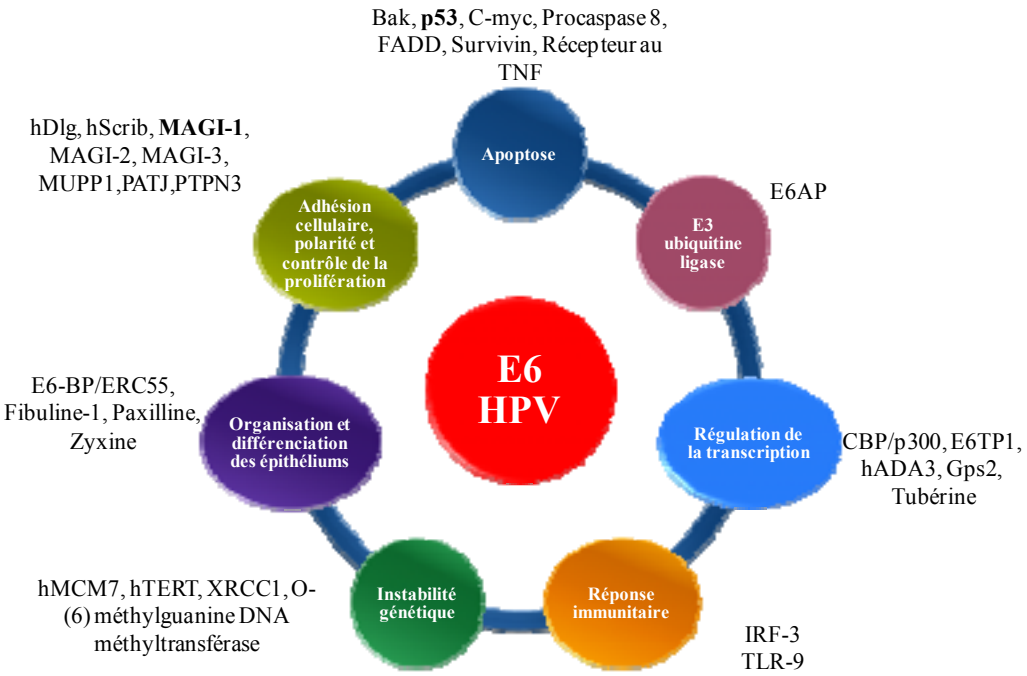


Figure 21 : Cibles et partenaires d'E6 des HPV de haut-risque

L'oncoprotéine E6 est une protéine multifonctionnelle. Ses interactions avec de nombreux partenaires cellulaires lui permettent différentes fonctions biologiques impliquées notamment dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose via p53, l'adhésion cellulaire via les protéines à domaine PDZ. Ses propriétés font d'elle l'un des éléments clefs du processus de carcinogenèse en induisant de nombreuses perturbations cellulaires

i. Inactivation de p53

L'une des activités les plus connues et étudiées d'E6 est sa capacité à induire la dégradation du suppresseur de tumeur p53 **(Figure 22)**. Celui-ci est muté dans environ 50% des cancers **(Martinez-Rivera and Siddik, 2012)**, mais cependant, à l'inverse des autres cancers, dans les cas de cancers du col de l'utérus, les mutations de p53 ne sont retrouvées qu'à hauteur de 5,8% **(Hainaut et al., 1998; Olivier et al., 2010)**. Celles empêchent la réparation ou la mort cellulaire induites par p53, et permettent la réplication des cellules endommagées qui seraient normalement éliminées.

Le niveau d'expression de p53 dans les cellules normales est faible avec une demi-vie courte de 8 à 20 min **(Levine, 2009)**. Les dommages à l'ADN entrainent une augmentation du niveau d'expression de p53 et l'activation de modifications post-traductionnelles. De plus, p53 est également activée suite à une stimulation anormale de la synthèse d'ADN, comme dans le cas d'une infection par HPV. Après activation, p53 initie la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, en fonction de l'étendue et du type de dommage **(Howie et al., 2009)**.

Le niveau d'expression de p53 est contrôlé par l'E3 ubiquitine ligase MDM-2 qui lie p53 **(Wang and Jiang, 2012)**. L'interaction p53/Mdm2 est inhibée durant l'infection virale et d'autres conditions de stress, permettant la stabilisation de p53 et son activation. P53 se lie alors à une autre ubiquitine ligase E3 cellulaire, E6AP, dont la liaison nécessite la présence d'E6. L'inactivation de p53 se fait via sa dégradation par le système ubiquitine protéasome, via la liaison avec E6-AP **(Scheffner and Whitaker, 2003)**. Le complexe trimérique E6/E6-AP se lie ensuite à p53, qui va être polyubiquitiné, puis dégradé par le protéasome 26S (**Figure 22**).

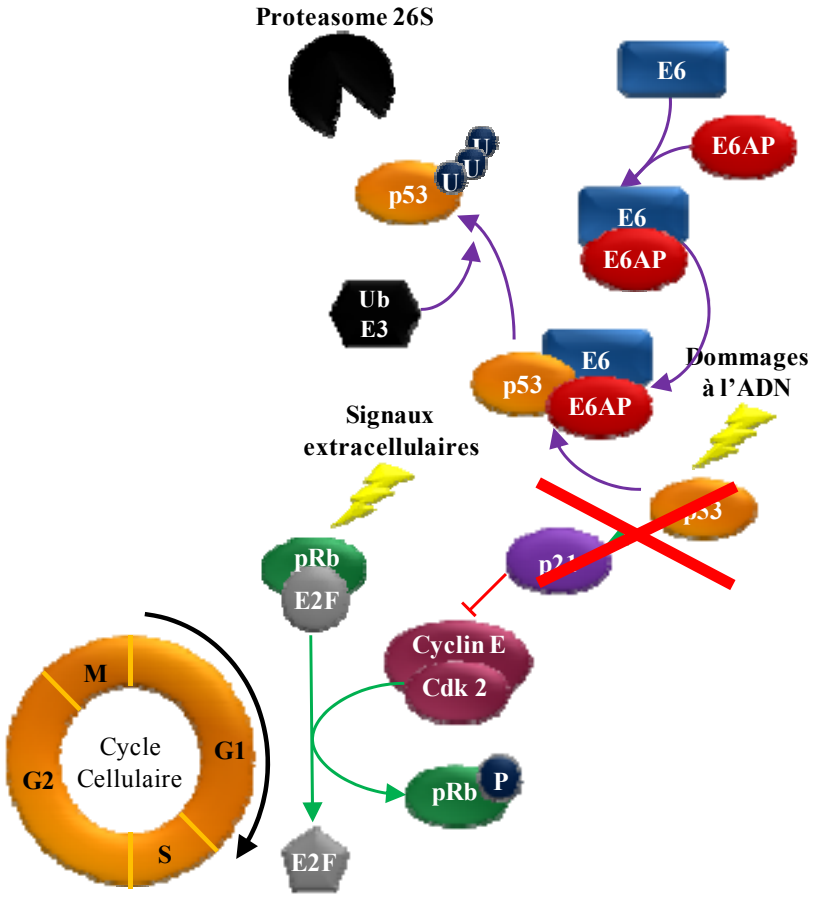


Figure 22 : Influence d'E6 sur le cycle cellulaire

E6 interfère avec le cycle cellulaire normal et induit la réplication et la synthèse d'ADN continue. Elle induit la dégradation de p53 par le protéasome 26S via l'interaction avec l'ubiquitine ligase E6AP, permettant ainsi la libération d'E2F et l'entrée en phase S.

Il est intéressant de noter que les E6 de haut et bas risque se lient à p53 par leurs extrémités C-terminale. Cependant, seuls les E6 de haut risque se lient à la région core de p53, interaction nécessaire à sa dégradation **(Crook et al., 1991)**. Les E6 de bas risque ne permettent pas la dégradation de p53 et ont donc recourt à d'autres mécanismes pour permettre son inhibition. Les E6 de bas risque sont entre autre capable de séquestrer p53 dans

le cytoplasme, ou encore d'inhiber son activation transcriptionnelle. De plus, tout comme les E6 de haut risque, les E6 de bas risque sont capables d'interagir avec le complexe p300/CBP, impliqué dans l'acétylation de p53 **(Klingelhutz and Roman, 2012)**. Celui-ci peut être acétylé ou phosphorylé, et affecter ainsi la capacité de p53 à moduler différents promoteurs.

En interagissant avec p53, E6 empêche sa liaison au niveau de séquences spécifiques de l'ADN. Et l'affinité de chaque E6 pour p53 peut être reliée à l'inhibition observée. Les E6 de bas risque ne dégradant pas p53 elles agissent sur la liaison de p53 avec ses effecteurs, sa localisation et ses modifications post-traductionnelles, notamment au niveau de séquences d'ADN site spécifique **(Lechner and Laimins, 1994)**. Il a également été montré que l'association d'E6 avec p53 induit un changement conformationnel de p53, menant à l'inhibition de sa liaison à l'ADN ou à la dissociation d'un complexe ADN-p53 déjà formé **(Thomas et al., 1995)**.

Le second mécanisme d'inhibition de la signalisation de p53 indépendant de la dégradation des protéines, est la séquestration de p53 dans le cytoplasme. Ce phénomène peut être expliqué par la liaison d'E6 à p53, masquant le signal de localisation nucléaire (NLS) à l'extrémité C terminale de p53, ou encore par l'augmentation de son export nucléaire **(Mantovani and Banks, 2001)**.

Le dernier mécanisme d'inhibition de p53 est la suppression de sa transactivation induite par l'interaction avec CBP/p300 **(Patel et al., 1999)** ou l'histone acétyltransférase hADA3 **(Kumar et al., 2002)**. p300 est capable d'acétyler p53 suite à un dommage de l'ADN et augmente sa capacité de liaison à l'ADN **(Barlev et al., 2001)**. A l'inverse, E6 se lie à p300, et inhibe l'acétylation de p53. Les E6 de haut et bas risque se lient à p300, cependant, les E6 de haut risque présentent une affinité plus forte. De plus, il a été montré que seules les E6 de haut risque et 11E6 sont capables d'empêcher la transactivation de p53 par p300, et peuvent bloquer l'activation de p53 en interagissant avec hADA3 **(Kumar et al., 2002)**.

E6 semblerait également inhiber l'activation de p53 en bloquant la voie p14/ARF, qui survient durant les stress oncogéniques impliquant l'inhibition directe de l'ubiquitine ligase E3 Mdm2 de par son association avec ARF. Ainsi, 16E6 inhibe l'activation de p53 p14/ARF dépendante, sans agir sur la réponse aux dommages à l'ADN et indépendamment de la dégradation de p53 médiée par E6, processus facilité par la dégradation de hADA3 **(Shamanin et al., 2008)**.

ii. Effet anti-apoptotique

L'une des plus grandes conséquences de la dégradation ou du blocage de p53 par E6 est l'inhibition de l'apoptose. La voie de signalisation de p53 peut également être utilisée pour éliminer les cellules anormales. E6 exerce son action en bloquant l'apoptose dans les cellules déficientes en p53 **(Pan and Griep, 1995)**. Deux voies d'activation majeures de l'apoptose existent, activées par différents stress : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque via la mitochondrie. L'oncoprotéine E6 agit sur les deux voies dans le but de créer un environnement cytoprotecteur empêchant la mort cellulaire, pointant ainsi les événements critiques que subit une cellule suite à ces différents stress **(Figure 23)**.

L'activation des récepteurs de mort cellulaire à la surface cellulaire, suite à des signaux apoptotiques, permet la mise en place de la première voie d'apoptose, extrinsèque, notamment en réponse à une infection virale et la réponse immunitaire de l'hôte. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) incluant TNFR-1, Fas/CD95 et les récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Après liaison du ligand, les récepteurs s'associent en trimère et recrutent des protéines adaptatrices au niveau de leur domaine cytoplasmique DD (death domain). Ces protéines comptent parmi elles FADD (Fas associated death domain), TADD (TNFR-associated death domain) et les caspases initiatrices 8 et 10, et forment ainsi le complexe DISC (death inducing signaling complex). DISC en retour active la caspase 8, qui clive les caspases effectrices 3 et 7, qui à leur tour ciblent et clivent des substrats en aval, tels que la PARP (polyADP-ribose polymerase). L'action d'E6 se situe à des stades précoces de la signalisation extrinsèque, en interagissant avec TNFR-1, FADD et la caspase 8. En effet, 16E6 bloque le signal apoptotique en se liant directement au récepteur TNFR-1, empêchant ainsi son interaction avec TRADD **(Filippova et al., 2004)**. En plus de la voie du TNF, 16E6 peut agir sur l'apoptose par le biais des voies Fas et TRAIL. Cette inhibition se fait par la liaison et la dégradation à la fois de FADD et de la caspase effectrice 8 **(Garnett et al., 2006)**. Ces effets cytoprotecteurs sont notamment observés pour les E6 d'HPV à haut risque. Les mécanismes des E6 d'HPV de bas risque étant encore méconnus, il est important de noter qu'E6 est capable agir sur de multiples voies de signalisation afin d'exercer ses effets. La liaison de FADD n'étant pas dépendante des motifs conservés des domaines PDZ des E6 d'HPV de haut risque, d'autres E6 pourraient également inhibent cette voie de signalisation extrinsèque **(Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008)**.

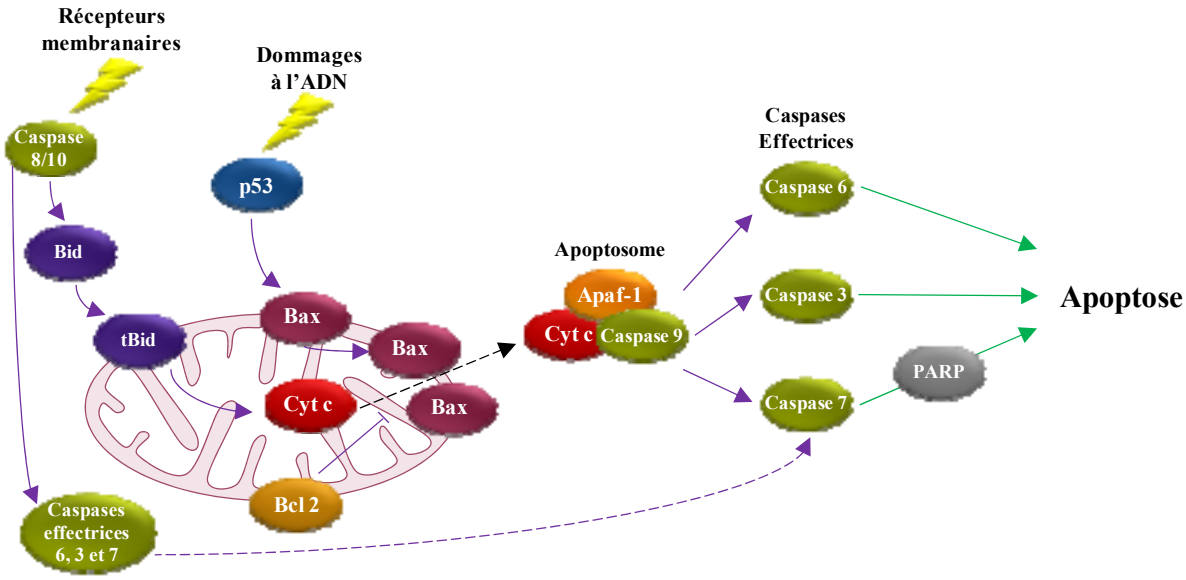


Figure 23 : Rôle de l'oncoprotéine E6 dans l'apoptose

L'apoptose peut être activée de deux manières différentes, par la voie extrinsèque, via les récepteurs de mort cellulaire, ou la voie intrinsèque suite à des stress cellulaires. La voie extrinsèque active la caspase 3 via l'activation de la caspase 8. E6 peut bloquer les récepteurs de mort cellulaire en agissant sur leur interaction avec des molécules adaptatrices ou en induisant leur dégradation. Les dommages à l'ADN activent la voie intrinsèque et induisent l'activation de p53, qui active Bax. De plus, ces stress mènent à la formation de pores dans la membrane mitochondriale et à la libération du cytochrome C et d'autres protéines dans le cytosol. Ces protéines en s'associant avec la pro-caspase 9 forment l'apoptosome, qui clive la caspase 9. Celle-ci active à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7, provoquant la mort cellulaire. De la même manière, E6 est responsable de la dégradation de Bak et bloque la libération des protéines dans le cytosol, mais également du blocage d'IAP et de l'apoptosome. D'après **(Howie et al., 2009)**

La voie intrinsèque dépend de signaux cellulaires, tels que les dommages à l'ADN, les stress oxydatifs, ou encore induits par les agents chimio-thérapeutiques. Ces stress activent des voies de signalisation se recoupant toutes au niveau de la mitochondrie, qui joue alors le rôle de balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques. Suite à cela, les protéines BH3 pro-apoptotiques sont activées et mènent à la formation de pores sur la membrane mitochondriale par le biais de Bax ou Bak. Ces pores ainsi formés permettent la libération des protéines mitochondriales, comme le cytochrome c, AIF (apoptosis inducing factor), l'endonucléase G, Smac/Diablo et Htr/omi. Ces protéines s'associent ensuite pour former l'apoptosome, complexe qui comme DISC pour la voie extrinsèque, permet le clivage des caspases 3 et 7, et l'induction de la mort cellulaire. Les E6 d'HPV de bas risque et de haut risque sont capables de bloquer la signalisation cellulaire intrinsèque en interagissant avec Bak et en permettant sa dégradation par le protéasome **(Jackson et al., 2000)**. De plus, E6AP serait également impliquée dans la dégradation de Bak **(Simmonds and Storey, 2008)**. Il a été montré que le knockdown d'E6 permet de rétablir l'apoptose en association avec la transactivaion des gènes p53 dépendants, Bax et PUMA **(Saha et al., 2012)**. Ainsi, la dégradation de Bak ne serait pas constitutive mais surviendrait après un signal apoptotique, en impliquant des changements

conformationnels permettant la dissociation de son partenaire anti-apoptotique MCL-1, et nécessaire à la liaison avec E6 **(Jackson et al., 2000)**. Le niveau de Bak semble toutefois être faible dans les cellules exprimant E6 **(Du et al., 2004)**. Les effets d'E6 au sein de la voie intrinsèque sont très controversés, notamment de par les profils d'expression des protéines Noxa, Puma, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 et Bax **(Underbrink et al., 2008)**.

Il faut noter que les voies intrinsèques et extrinsèques sont reliées entre elles, notamment par la caspase 8. Celle-ci peut en effet être activée de manière intrinsèque via les caspases 3 et 7, ou de manière extrinsèque par son clivage par la protéine Bid. Ces mécanismes visant à amplifier les signaux apoptotiques détectés. La protéine E6 est capable d'empêcher l'activation croisée des deux voies en agissant sur de multiples réponses aux signaux apoptotiques. Plus particulièrement, E6 interagit avec des protéines faisant la jonction entre ces deux voies d'activation. E6 exerce son action en agissant en aval des caspases effectrices, et augmentant l'expression de deux inhibiteurs de l'apoptose c-IAP2 et la survivine, capables d'inactiver les caspases effectrices **(Borbely et al., 2006)**.

Enfin, 16E6 se lie et dégrade c-Myc de manière dépendante à E6AP via le protéasome **(Gross-Mesilaty et al., 1998)**. Le rôle de c-myc dans la protection contre l'apoptose reste cependant incertain, étant donné que certaines études indiquent un niveau d'expression augmenté ou inchangé dans les cellules exprimant E6 **(McMurray and McCance, 2003)**.

iii. Activation de la télomérase

Dans les cellules somatiques normales suite aux divisions cellulaires successives, la sénescence survient lorsque les télomères se raccourcissent. En effet, à chaque division cellulaire, lorsque l'ADN est répliqué, environ 150 à 200 nucléotides à l'extrémité 3' des chromosomes sont perdus. Or, si les cellules ne répondent pas aux signaux apoptotiques ou de sénescence, les conséquences peuvent être catastrophiques pour l'ADN, qui peut être endommagé et accumuler des mutations. La sous-unité catalytique de la télomérase reverse transcriptase humaine (hTERT) n'est exprimée que dans certaines cellules, telles que les cellules souches. De plus, l'activation de celle-ci est observée dans 95% des cancers humains, suite à l'inactivation des voies de signalisation de p53 et pRb **(Van Doorslaer and Burk, 2012)**. L'inactivation de pRb et l'activation de la télomérase sont requis pour l'immortalisation des cellules épithéliales humaines en culture **(Kiyono et al., 1998)**. Plus précisément, dans le cas d'une infection par HPV et d'immortalisation cellulaire, E7 inactive pRb et E6 induit l'expression d'hTERT et l'activation de la télomérase **(Klingelhutz et al.,**

1996). E6 se lie à E6AP et l'utilise pour activer hTERT et la télomérase **(Gewin et al., 2004)**. L'oncogène c-Myc est connu pour activer la transcription de hTERT, et l'hétéodimère c-Myc/Max se lie au promoteur proximal de hTERT. A l'inverse, le facteur NFX1-91 a été identifié comme répresseur de l'activation d'hTERT, mais est dégradé par le complexe E6/ubiquitine ligase E3 E6AP **(Gewin et al., 2004)**. En dégradant NFX1-91, le complexe E6/E6AP induit un changement dans la structure du promoteur hTERT et augmente son expression. Cependant, d'autres études suggèrent que l'activité d'E6 seule est insuffisante pour l'augmentation de l'expression d'hTERT, et inclus des altérations des gènes des cellules hôtes **(de Wilde et al., 2010)**.

La transactivation du promoteur hTERT nécessite la formation d'un complexe entre E6, E6AP et c-myc, l'induction par E6 de l'expression de c-myc, et l'implication d'un variant de NFX1, NFX1-123 **(Yugawa and Kiyono, 2009)**.

iv. Action sur la signalisation des protéines G

En plus de moduler la transcription des gènes p53 dépendants, par dégradation ou via p300 (ou hADA3), E6 est également capable d'agir sur la transcription d'autres voies de signalisation cellulaires. E6 agit sur la signalisation des protéines G, en interagissant avec trois protéines différentes : E6TP1 (E6-targeted protein 1), la tubérine, et Gps2 (G protein pathway suppressor 2). E6TP1 est dégradée de manière E6AP dépendante, et cet événement permettrait d'agir sur RAP (receptor associated protein) membre de la famille des protéines liant le GTP, ayant potentiellement un rôle dans l'oncogenèse médiée par E6. Une autre protéine se liant à E6, la tubérine, présente tout comme E6TP1 une activité GAP (GTPase activating protein). Celle-ci est dégradée par E6 et est impliquée dans la régulation négative sur la voie de signalisation mTOR, voie majeure de la croissance cellulaire. La dernière protéine dégradée par E6 est Gps2, sa dégradation permet de supprimer la transactivation du promoteur HPV précoce.

v. Système immunitaire

La protéine E6 module également la transcription de gènes impliqués dans l'immunité innée et dans la reconnaissance des pathogènes. Les E6 d'HPV de haut risque interagissent notamment avec IRF-3 (interferon regulatory factor-3) **(Ronco et al., 1998)** et TLR9 (Toll-like receptor 9) **(Ghittoni et al., 2010)**.

IRF-3 est activé lors des infections virales ou par des ARN double brin, et active la transcription de l'interféron-β (IFN-β). De plus, son interaction avec 16E6 inhibe sa transactivation, empêchant la réaction antivirale par le biais d'IFN-β **(Ronco et al., 1998)**.

TLR9 est activé par les motifs CpG dérivés des ADN doubles brins viraux ou bactériens, et active les systèmes de défenses de la cellule contre l'organisme intrus via la production de cytokines **(Muller et al., 2008)**. En effet, l'expression du TNF-α (Tumor necrosis factor α) est diminuée et une atténuation de la réponse à cette cytokine proinflammatoire a été observée dans les lésions cervicales. A l'inverse la molécule anti-inflammatoire IL10 (interleukine 10) voit son expression augmenter, limitant la migration de cellules immunitaire sur le site de l'infection. De plus, il a été montré que l'expression de 16E6/E7 inhibe la transcription de TLR9, entrainant un arrêt fonctionnel de la voie de signalisation dans la cellule **(Hasan et al., 2007)**.

vi. Instabilité génomique

La protéine E6 parmi ses diverses interactions et modes d'actions, présente également une fonction de maintien de la stabilité des chromosomes dans les cellules infectées par HPV. Pour cela, les E6 d'HPV de haut risque et de bas risque interagissent avec la protéine hMCM7 (human mimichromosome maintenance 7) et médient sa dégradation de manière E6AP dépendante via le protéasome. MCM7 est impliquée dans la régulation de la réplication de l'ADN, permettant de s'assurer qu'un seul cycle de réplication à lieu par cellule. C'est pourquoi sa dégradation via l'interaction avec E6 peut entrainer l'apparition d'anomalies chromosomiques dans les cellules infectées par HPV.

E6 peut également interagir avec deux autres protéines impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN double brin, XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) et MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) **(Iftner et al., 2002)**. E6 se liant à XRCC1 réduit sa capacité à réparer les dommages de l'ADN. Et la liaison d'E6 avec MGMT induit également sa dégradation médiée par E6AP, sensibilisant les cellules infectées par HPV aux dommages à l'ADN par des agents alkylants **(Srivenugopal et al., 2002)**. L'ensemble de ces interactions entraine une instabilité génomique et accélère le processus de carcinogenèse.

vii. Différenciation et adhésion cellulaire

Les HPV ont développé un ensemble de mécanismes permettant d'instaurer une prolifération continue, d'éviter la différenciation finale et de contrôler l'adhésion cellulaire. Or, la prolifération nécessite l'adhésion à la matrice extracellulaire (ECM) empêchant la progression des dysplasies. Lors de la division cellulaire, la cellule répond à des signaux de prolifération, maintient une structure épithéliale correcte et stoppe le processus lorsque le signal n'est plus émis, la plupart du temps lorsque le tissu à atteint la taille requise.

Afin d'outrepasser les limitations dans la prolifération cellulaire, la protéine E6 inactive de nombreuses protéines impliquées dans l'organisation épithéliale. Parmi ces protéines, la paxilline, qui associée aux protéines d'adhésion focales, est impliquée dans l'organisation de l'actine et dans la maintenance du cytosquelette de la cellule **(Tong and Howley, 1997; Wade et al., 2008)**. La liaison d'E6 à la paxilline empêche la formation des fibres d'actine, et cette perte d'intégrité épithéliale favorise la transformation virale. L'autre protéine clef dans l'adhésion cellulaire à la matrice (ECM) est la zyxine, impliquée dans la connexion de la matrice extracellulaire au cytosquelette. Elle régule notamment la prolifération cellulaire et la différenciation, la transmission des signaux des sites de l'adhésion cellulaire au noyau, et favorise l'organisation de l'actine **(Degenhardt and Silverstein, 2001)**. La liaison d'E6 à la zyxine, tout comme à la paxilline, empêche la conservation de la structure cellulaire, aidant ainsi à la transformation cellulaire.

De plus, E6 et la fibulin-1 déstabilisent la matrice extracellulaire, favorisant l'invasion tumorale **(Du et al., 2002)**. E6 interagit également avec une protéine de liaison au calcium ERC-55/E6-BP empêchant la différenciation terminale des cellules épithéliales **(Chen et al., 1995; Das et al., 2000)**.

Toutes ces activités regroupées limitent la capacité des cellules infectées à adhérer à la matrice extracellulaire et à conserver une morphologie cellulaire normale, tout en augmentant le potentiel réplicatif des cellules, permettant ainsi la transformation cellulaire et le développement de l'oncogenèse.

viii. Relation avec les protéines à domaine PDZ

Une caractéristique unique des E6 d'HPV de haut risque est la présence d'un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ à l'extrémité C-terminale et qui est absent des HPV de bas risque **(Songyang et al., 1997)**. Ce motif est la signature moléculaire du potentiel

oncogénique de bon nombre d'HPV. En effet, il a été montré que la perte de ce motif par un virus, a pour conséquence une réplication réduite, et l'incapacité de celui-ci à maintenir son génome viral sous forme d'épisome.

Les protéines à domaine PDZ sont impliquées dans de nombreuses fonctions, notamment le contrôle de la polarité cellulaire, de l'attachement cellule/cellule et la régulation de différentes voies de signalisation **(Thomas et al., 2008)**. Cibles de l'oncoprotéine E6, ces protéines à domaine PDZ sont dégradées par le système ubiquitine protéasome **(Figure 24)**.

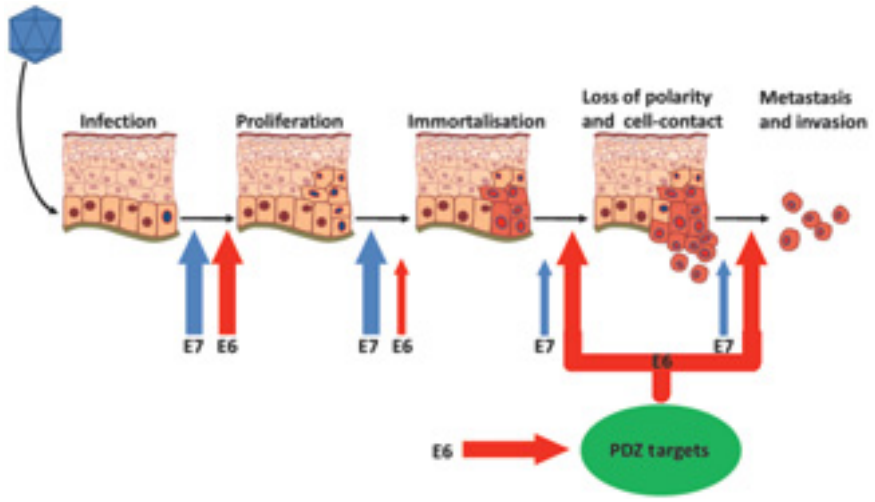


Figure 24 : Contributions des oncoprotéines E6 et E7 dans le développement du cancer

Les premiers stades de développement du cancer sont fortement encouragés par les interactions de diverses protéines avec E7. Les stades plus tardifs de la progression maligne sont plus fortement influencés par la protéine E6 et sa capacité de ciblage des protéines cellulaires à domaines PDZ. D'après **(Pim et al., 2012)**

La capacité des HPV de haut risque à transformer efficacement les cellules et à induire la prolifération cellulaire est fortement liée à la capacité d'E6 à se lier et inactiver ses nombreux partenaires cellulaires **(Figure 25)**.

Protéine	Fonction	Effet sur la protéine cible	Références
Dlg	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Gardiol et al., 1999; Pim et al., 2009)
MAGI-1 MAGI-2 MAGI-3	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur Localisation membranaire de PTEN	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Pim et al., 2009; Thomas et al., 2002)
hScrib	Polarité cellulaire	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Nakagawa and Huibregtse, 2000; Pim et al., 2009)
MUPP1	Signal de repliement	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Lee et al., 2000)
PATJ	Formation des jonctions serrées et intégrité cellulaire	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome. Dégradation directe par E6*	(Storrs and Silverstein, 2007)
PSD95	Signal de repliement	Ubiquitination et dégradation	(Handa et al., 2007)

		par le système protéasome	
PTPH1/ PTPN3	Tyrosine phosphatase	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Jing et al., 2007; Spanos et al., 2008)
PTPN13	Phosphatase	?	(Spanos et al., 2008)
TIP1	Régulateur des interactions PDZ	?	(Hampson et al., 2004)
TIP-2/ GIPC	Voie de signalisation du TGFβ	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Favre-Bonvin et al., 2005)
CAL	Traffic intracellulaire	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome	(Jeong et al., 2007)
PAR3	Polarité cellulaire Suppresseur de tumeur	Ubiquitination et dégradation par le système protéasome Relocalisation cellulaire	(Tomaic et al., 2009)

Figure 25 : Tableau récapitulatif des cibles à domaines PDZ de l'oncoprotéine E6
D'après **(Klingelhutz and Roman, 2012; Thomas et al., 2008)**

Parmi les protéines à domaine PDZ, E6 se lie à hScrib, qui est impliquée dans la polarité cellulaire, et intervient dans sa dégradation, éliminant ainsi le contrôle de la progression du cycle cellulaire en empêchant l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire **(Nakagawa and Huibregtse, 2000)**. Le suppresseur de tumeur hDlg (human Drosophila large homologue 1), est nécessaire à l'adhésion cellule/cellule, à la polarité basoapicale, et à la prolifération épithéliale. Sa liaison avec E6 empêche la formation des jonctions cellules/cellules, mais entraine également la perte de polarité cellulaire et l'absence de contrôle de prolifération **(Lee et al., 1997)**. La survie du virus est encore accrue de par la liaison d'E6 avec PATJ, et sa dégradation, qui présente les mêmes fonctions dans les jonctions serrées que hScrib et hDlg.

E6 intervient également dans la dégradation de PTPN3, tyrosine phosphatase associée à la membrane et impliquée dans la phosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance, permettant ainsi la survie des cellules infectées sans stimulation **(Jing et al., 2007)**.

Les E6 d'HPV de haut risque sont également impliquées dans la liaison avec des protéines localisées dans les jonctions épithéliales serrées, comme MAGI-1, MAGI-2 et MAGI-3. De plus, ces protéines contribuent à la régulation du suppresseur de tumeur PTEN, dont les mutations sont fréquemment associées avec les cancers rénaux, utérins ou de la prostate et qui sert potentiellement de marqueur tumoral.

MUPP1, tout comme hScrib et hDlg, joue un rôle dans la régulation négative de la prolifération cellulaire, dont la perte provoquée par E6 permet la progression et la croissance cellulaire.

L'interaction d'E6 avec ces différentes protéines permet une croissance invasive des kératinocytes et supporte la mise en place de la morphologie caractéristique des cellules cancéreuses.

3. La transformation cellulaire induite par E6 et E7

Durant l'infection productive, la transcription d'E6 et E7 est faible et régulée par l'expression d'E2. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, qui se produit au sein de sites fragiles et notamment dans l'ORF d'E2, entraine une perte d'E2 **(Thorland et al., 2000)**. Cette perte dérégule l'expression d'E6 et E7 et induit l'instabilité génomique en perturbant l'intégrité chromosomique à de nombreux niveaux. Les cellules acquièrent alors un avantage sélectif du point de vue de la croissance cellulaire et continuent leur progression maligne **(zur Hausen, 2002)**.

Dans la grande majorité des cellules de carcinomes cervicaux, la transformation requière une expression continuelle des protéines E6 et E7. Avant l'intégration virale, ces protéines coopèrent afin d'outrepasser les contrôles du cycle cellulaire. L'expression des protéines E6 et E7 des HPV de haut risque permet l'immortalisation des cellules **(Munger et al., 1989; Sedman et al., 1991)**. Cependant, E6 seule est incapable d'immortaliser les kératinocytes primaires **(Hawley-Nelson et al., 1989)**. Mais en coopérant, les protéines E6 et E7 des HPV de haut risque provoquent la présence d'un nombre anormal de centrosomes, la formation d'un fuseau mitotique aberrant et induisent l'instabilité génomique **(Song et al., 1999)**.

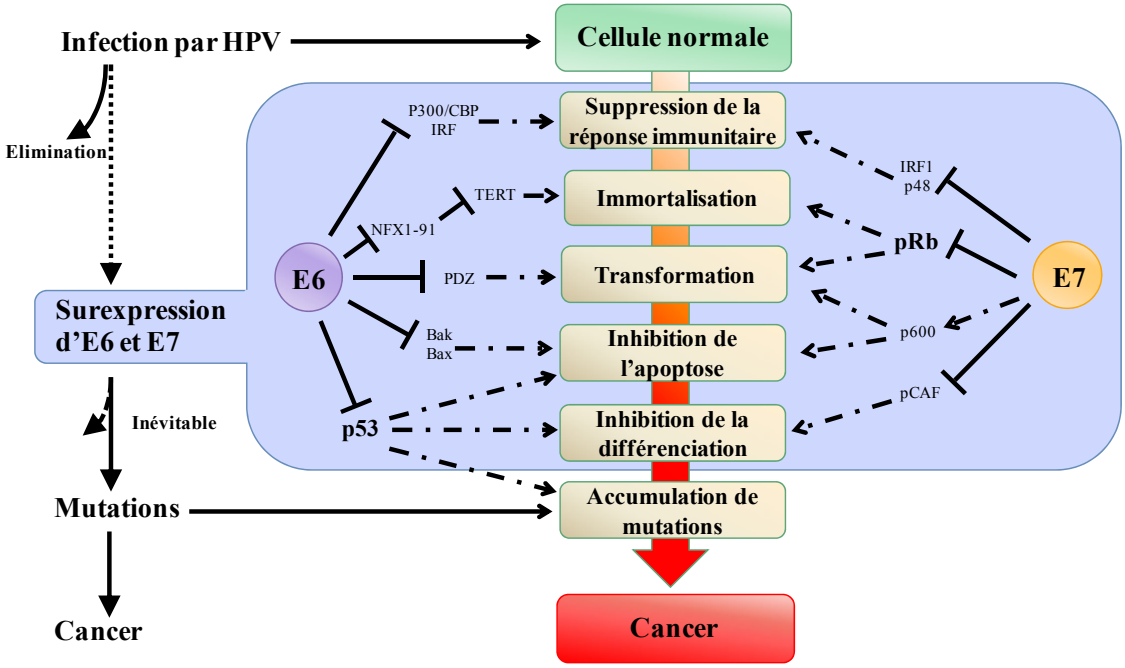


Figure 26 : Récapitulatif des mécanismes de carcinogenèse induite par les HPV

L'augmentation de l'expression des oncoprotéines E6 et E7 a de nombreuses conséquences biologiques et induit l'instabilité génomique, qui augmente le risque d'accumulation de changement cellulaire et épigénétique. Les altérations menant à l'activation des oncogènes ou à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, provoque un avantage sélectif pour les populations clonales et persistent dans leur progression maligne. D'après **(Yugawa and Kiyono, 2009)**

Cette coopération à de nombreux niveaux cellulaires a pour but de maintenir l'infection, afin de permettre l'amplification des génomes viraux ainsi que la production de nouvelles particules virales infectieuses **(Figure 30)**. E7 de son coté se lie aux membres de la famille des suppresseurs de tumeur pRb, comme p105 (pRb), p107 et p130, et dérégule le cycle cellulaire en permettant l'entrée en phase S **(Munger et al., 2001; Shin et al., 2012)**. Cette fonction est très importante pour la maintenance de la réplication pendant la différenciation. Cette maintenance de l'activité des cellules dans le cycle cellulaire facilite la réplication du virus pendant la différenciation. Une des conséquences de la perte de fonction de pRb, due à E7 des HPV de haut risque, est la stabilisation de p53 qui peut entrainer l'apoptose. C'est pourquoi les E6 d'HPV de haut risque ont évolué pour induire la dégradation de p53 via la liaison avec l'ubiquitine ligase E3 E6AP et bloquer ainsi l'apoptose **(Howie et al., 2009)**. De plus, p53 n'est pas un substrat naturel d'E6AP, et nécessite la présence d'E6 pour s'y lier. Cependant, les E6 d'HPV de bas risque se lient également à p53, mais ne le dégradent pas, et utilisent d'autres mécanismes pour l'inactiver. En effet, les mutants d'E6 incapables de dégrader p53 sont toujours capables d'immortaliser les cellules, indiquant que d'autres activités d'E6 sont également impliquées. L'activation de l'expression de hTERT par E6 en plus de l'inactivation de pRb par E7 est nécessaire pour l'immortalisation des kératinocytes. E6 en se liant également à des protéines contenant des domaines PDZ permet d'induire la prolifération cellulaire et la maintenance des génomes viraux à long terme. En agissant également sur le métabolisme cellulaire des cellules infectées, E6 et E7 permettent à celles-ci une croissance continue. De plus, en perturbant de nombreuses voies de signalisation ainsi que l'adhésion cellulaire, ces protéines vont favoriser le développement de métastases. Cette coopération dans la modulation de différents facteurs cellulaires contrôlant le cycle cellulaire, permet dans les infections persistantes de médier le développement de cancers.

4. Inhibition des oncoprotéines E6 et E7

Actuellement de nombreuses stratégies visent à cibler l'oncoprotéine E6 afin d'éteindre son expression, d'annuler ses effets et de permettre la restauration de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans les cellules transformées **(Saha et al., 2012)**. En effet, E6 et E7 sont des cibles de choix, leurs actions combinées étant essentielles pour la maintenance du phénotype cancéreux et l'échappement à l'apoptose **(Moody and Laimins, 2010)**. L'inhibition d'E6 ou E7, voire des deux, en ciblant l'expression des gènes ou encore les interactions protéine-protéine représente une stratégie efficace. De nombreuses approches peuvent être employées :

l'ARN interférence par de petits ARN interférents, les ribozymes ou les aptamères **(Govan, 2005)**.

Les études *in vitro* menées sur des cellules HPV positives suggèrent que le ciblage d'E6 et/ou d'E7 est possible de différentes manières. D'une part en agissant sur la dégradation de p53 et d'autres protéines, médiée par l'interaction d'E6 avec l'ubiquitine ligase E6AP, par de petits peptides empêchant la liaison d'E6 à E6AP **(Liu et al., 2004)**. Ces études sont encore très récentes et nécessitent un approfondissement clinique. La dégradation de p53 via la formation du complexe E6/E6AP peut également être inhibée par des anticorps anti-E6 **(Lagrange et al., 2005)**. Une autre alternative consiste à protéger p53 de la dégradation médiée par E6, en ciblant p53 par de petites molécules, plutôt qu'en inhibant directement E6. Par exemple, la petite molécule RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) supprime la croissance des cellules HPV positives *in vitro* et également dans les xénogreffes *in vivo*, en bloquant l'ubiquitiniation de p53 ainsi que sa dégradation, et en augmentant l'expression des facteurs proapoptotiques Puma et Bax **(Zhao et al., 2010)**. Une autre solution est l'inhibition sélective du protéasome, propriété des inhibiteurs de protéases du HIV. Il a été montré que l'antiprotéase anti-rétrovirale, Lopinavir, utilisée en combinaison avec l'antiprotéase Ritonavir (Kaletra), peuvent stabiliser p53 et induire l'apoptose dans les cellules HPV positives **(Hampson et al., 2006; Kim et al., 2010)**.

Le ciblage d'E6 par ARN interférence est une alternative thérapeutique en pleine expansion, notamment par l'utilisation de petits ARN interférents, siARN (small interfering RNA), shARN (short hairpin RNA) ou miARN (micro ARN) **(Gu et al., 2008)**. Cette méthode permet de cibler spécifiquement, avec une grande efficacité une protéine particulière et d'induire l'extinction de son expression. L'introduction de ces petits ARN interférents a permis une extinction sélective de l'expression d'E6 et E7 par siARN dans le cadre de cancers du col de l'utérus **(Jiang and Milner, 2002)**. Suite à cette extinction il a également été mis en évidence la survenue de la mort cellulaire par apoptose dans les cellules HPV positives **(Butz et al., 2003)**, ou encore la sénescence **(Hall and Alexander, 2003)** et d'induire un arrêt de croissance *in vitro* et/ou *in vivo* **(Chang et al., 2010; Yamato et al., 2008; Yoshinouchi et al., 2003)**.

Des stratégies visant à cibler à la fois les protéines E6 et E7 ont permis d'induire l'apoptose *in vitro* et *in vivo* **(Chen et al., 2011; Gu et al., 2011; Gu et al., 2008; Jonson et al., 2008; Zhou et al., 2012),** ou encore de sensibiliser les cellules au cisplatine et de mener à

la mort cellulaire **(Tan et al., 2012)**. Il est également possible d'agir sur l'expression des messagers E6/E7 grâce au traitement par les ions Fer et à leurs propriétés anti-prolifératives via la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) **(Poljak-Blazi et al., 2009)**.

D'autres alternatives d'action sur E6 ont été explorées en utilisant les propriétés inhibitrices des variants d'épissage d'E6 ou de ses mutants. Par exemple, en exprimant de manière ectoptique la forme E6*, qui permet l'augmentation de p53 et l'induction de l'apoptose en modulant les fonctions d'E6 full-length **(Pim and Banks, 1999; Wanichwatanadecha et al., 2012)**. De plus, E6* permettrait également de moduler la dégradation de protéines cellulaires, telles que les protéines à domaine PDZ **(Pim et al., 2009)**. De plus, des scFvs anti-16 E6 ont été mis au point et leur expression au sein des cellules transformées à permis de restaurer les niveaux de p53 et d'induire la mort des cellules par apoptose **(Lagrange et al., 2007)**.

Au sein de notre équipe un mutant de p53, F47R, a récemment montré son potentiel dominant négatif, en étant défectif pour l'ubiquitination et la dégradation de p53. Son expression prolongée permet également de supprimer la prolifération des cellules HeLa et d'induire la sénescence **(Ristriani et al., 2009)**.

D'autres approches potentielles régulant l'expression d'E6 et E7 peuvent être utilisées, telles que la surexpression de E2, pour rétablir les rétrocontrôles perdus lors de l'intégration du génome viral, et bloquer l'expression d'E6 et E7. E2 se lie aux sites régulateurs du génome viral pour encourager la réplication de l'ADN viral, réguler la transcription des gènes et permettre la ségrégation de l'épisome viral dans les cellules filles durant la mitose **(D'Abramo and Archambault, 2011; Ramirez-Salazar et al., 2011)**. L'expression d'E2 de manière continue permet la sénescence **(Goodwin and DiMaio, 2000),** ou l'apoptose **(Blachon and Demeret, 2003)**.

Enfin, il est également possible d'agir sur les cellules HPV positives en inhibant la croissance de celles-ci in vitro et in vivo en utilisant le dihydrotanshinone I (DI), qui permet en combinaison avec des irradiations de diminuer l'expression d'E6, d'augmenter l'expression de p21 et d'induire un arrêt de la croissance cellulaire en phase G2 **(Ye et al., 2012)**.

IV. Adénovirus

1. Généralités

a. Classification

Les adénovirus ont été identifiés et caractérisés en 1953, à partir de fragments d'amygdales, suite à la dégénérescence de cultures de cellules primaires de tissus adénoïdes **(Rowe et al., 1953)**. Ces virus contiennent un ADN linéaire double brin encapsidé dans une coque protéique de forme icosaédrique. Sa capacité à transformer les cellules en culture a fait de l'adénovirus un modèle biologique dans la recherche contre le cancer. Il sert également de modèle expérimental, de par ses nombreux avantages. Il est en effet aisé de le produire à haut titre, est capable d'infecter les cellules de manière synchrone, et possède un génome viral manipulable, dont certains gènes non essentiels peuvent être supprimés. Ce dernier à également permis la compréhension de l'expression et de la régulation des gènes viraux et cellulaires, de la réplication de l'ADN, du contrôle du cycle cellulaire et de la régulation de la croissance. De plus, l'épissage des ARN messagers (ARNm) à été mis en évidence, à partir de longs transcrits primaires, dont les introns sont ensuite éliminés **(Bachenheimer and Darnell, 1975)**.

La famille des *Adenoviridae* compte plus de 150 membres, infectant à la fois les mammifères et les oiseaux. Cette famille dont font partie des adénovirus, est composée de plusieurs genres : les Atadénovirus, les Mastadénovirus, les Siadénovirus, les Ichtadénovirus et les Aviadénovirus (**Figure 27**). Le genre Aviadénovirus est constitué des virus d'oiseaux, alors que le genre Mastadénovirus inclus un grand nombre de virus de mammifères. En dépit de la cross réactivité entre les membres de chaque genre, conservant des épitopes localisés sur la protéine d'hexon du virion, aucun antigène commun à tous les adénovirus n'a pu être identifié **(Norrby, 1969)**.

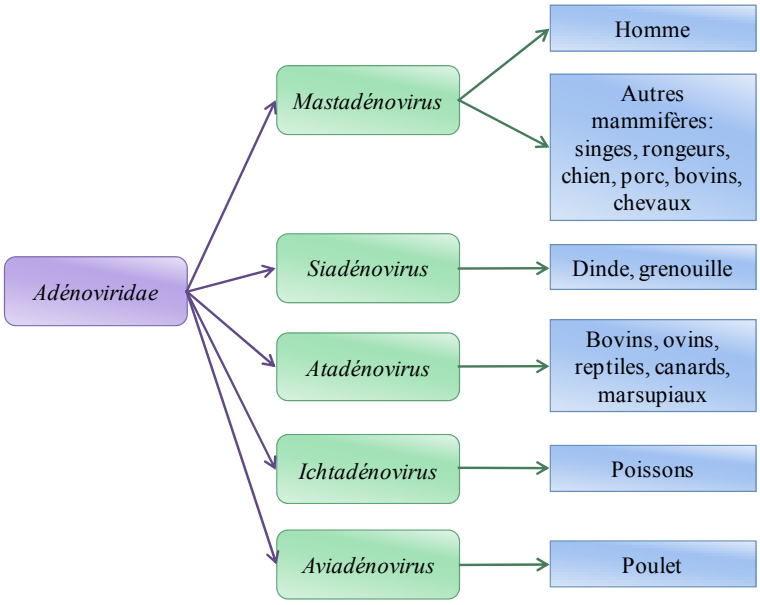


Figure 27 : Classification de la famille des *Adenoviridae*

Le genre Mastadénovirus est composé de plus de 54 types d'adénovirus, subdivisés en sept espèces de A à G (source : Virus Taxonomy 2012, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)). Les adénovirus sont classés en fonction des homologies de séquences d'ADN et de leur capacité à agglutiner les hématies **(Rosen, 1960)**.

Ils sont généralement associés aux maladies des voies respiratoires (espèces A, C et E), intestinales (espèces F, mais aussi A, C, D et G). De plus, l'espèce B présente un tropisme respiratoire (B1) mais peut également être impliquée dans les maladies des voies urinaires ou rénales (B2), et l'espèce C dans les affections du foie, des yeux, des amygdales, et des tissus adénoïdes.

Cependant, l'infection par les HAd peut également être asymptomatique, ou se manifester par des pharyngites, des otites, des gastroentérites ou des conjonctivites épidermiques. Et les manifestations plus graves sont généralement beaucoup plus rares, à part pour les sujets immunodéprimés. De plus, ces pathogènes sont couramment rencontrés dans la vie de tous les jours, en effet, leur séroprévalence est élevée pour la majorité des types d'adénovirus humain (**Figure 28**).

Espèce	Sérotypes Types	Récepteur(s)	Molécule adaptatrice	Répétitions de la tige de la fibre	Tropisme	Séroprévalence en %
A	12, 18, 31	CAR	FIX, FX	23	Intestinal, respiratoire	35 - 70
B1	3, 7, 16, 21, 50	CD46, Desmoglein2, CD80, CD86	FX	6	Respiratoire, oculaire	2-15 (HAd16, 21, 50) 1-3 (HAd34, 35)
B2	11, 14, 34, 35	CD46, Desmoglein2, CD80, CD86	FX	6	Rénal, respiratoire, oculaire	35-70 (HAd3,7) 18 (HAd18)
C	1, 2, 5, 6	CAR, VCAM-1, HSPG, CMH1-α2, SR	FIX, FX, Lf, DPPC	22/18	Respiratoire oculaire, lymphoïde, hépatique	40-80
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	SA, CD46, CAR	FX	8	Oculaire, cryptique	3-44
E	4	CAR		12	Respiratoire	45
F	40, 41	CAR		12 (fibres courtes) 21/22 (fibres longues)	Intestinal	41
G	52	ND		9 (fibres courtes) 17 (fibres longues)	Intestinal	ND

Figure 28 : Classification des *Mastadenovirus* humains

D'après **(Arnberg, 2012; Henaff et al., 2011)**

Les adénovirus de type 5 (Ad5) sont parmi les plus utilisés pour la thérapie génique, la vaccination et oncolyse, et il présente un meilleur profil de sécurité après administration systémique. En effet, il a été montré en comparant l'Ad5 avec d'autres sérotypes issus de l'espèce C, que celui-ci reste le plus sûr en comparaison des autres sérotypes. Etant donné ses mécanismes de séquestration différents dans les cellules et les tissus de foie, de poumons et de reins, ainsi que ses niveaux non corrélés à la toxicité, et son infection transitoire, le virus est rapidement éliminé par le système immunitaire **(Stone et al., 2007)**.

b. Structure du virion

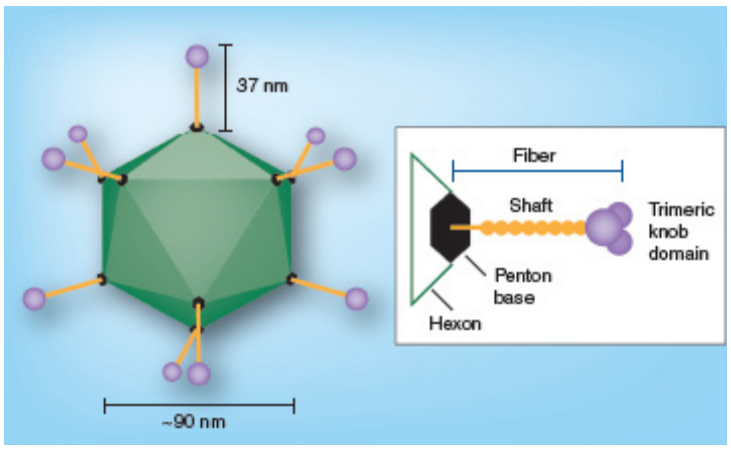


Figure 29 : Capside de l'adénovirus

La capside adénovirale est icosaédrique, avec un diamètre de core d'environ 90 nm. Elle est composée de trois protéines principales de capsides, l'hexon, le penton base et la fibre. Les protéines mineures de capsides stabilisent la particule virale. D'après **(Duffy et al., 2012)**

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN double brin de 36 kbp, dont la découverte en 1953 à mis en évidence leur complexité structurale **(Figure 29)**. Un grand travail expérimental à été nécessaire afin de comprendre et de détailler cette organisation, notamment par des études par microscopie électronique et par cristallographie aux rayons X. Elles ont permis la compréhension de la disposition et la composition des composants de l'adénovirus et l'obtention des premières images à une résolution de 6Å ($6*10^{10}$ m) **(Fabry et al., 2005; Saban et al., 2005; Stewart et al., 1993)**.

Les virions contiennent au moins neuf polypeptides, qui ont été nommés après électrophorèse sur gel SDS, en chiffres romains et en ordre décroissant de poids moléculaire **(Maizel et al., 1968) ; Figure 30)**. Le polypeptide I est absent, en effet, la molécule identifiée à l'époque s'est révélée agrégée. La particule virale est composée de différentes protéines, une structurale pII (Hexon), d'autres impliquées dans la pénétration dans la cellule hôte comme pIII (penton-base), pIIIa, la protéine associée au penton base, et pIV (fibre) responsable de l'hémagglutination. Le cœur du virion contient quatre protéines ainsi que le génome viral. Les polypeptides V, VII et mu sont des protéines basiques et riches en arginine contenant l'ADN viral. La fonction de mu est inconnue. pVII est la protéine majeure de capside, et sert comme les histones, de centre autour duquel l'ADN viral est entouré. pV quant à lui se lie au penton base, et fait le pont entre le core et la capside. Enfin la protéine terminale TP est attachée covalemment à l'extrémité 5' de l'ADN viral. Elle médie la

circularisation de l'ADN viral via une interaction non covalente protéase sensible, sert de primer à la réplication de l'ADN et facilite l'attachement du génome viral à la matrice nucléaire **(Rekosh and Russell, 1977; Robinson and Bellett, 1975; Schaack et al., 1990)s**.

L'organisation en 252 capsomeres, 240 hexons (II) et 12 pentons (III), permet la formation des vingt cotés triangulaires de la capside. Les autres protéines mineures, IIIa, VI, VII et IX, sont également associées à la face intérieure de la capside, et la stabilisent **(Vellinga et al., 2004)**. Six autres protéines structurales du core sont impliquées dans la stabilisation et l'assemblage de la particule virale. Cinq d'entre elles (V, VII, Mu, IVa2 et protéine terminale TP) sont associées au génome viral, tandis que le composant restant, la protéase virale de 23KDa, jouent un rôle vital dans l'assemblage du virion.

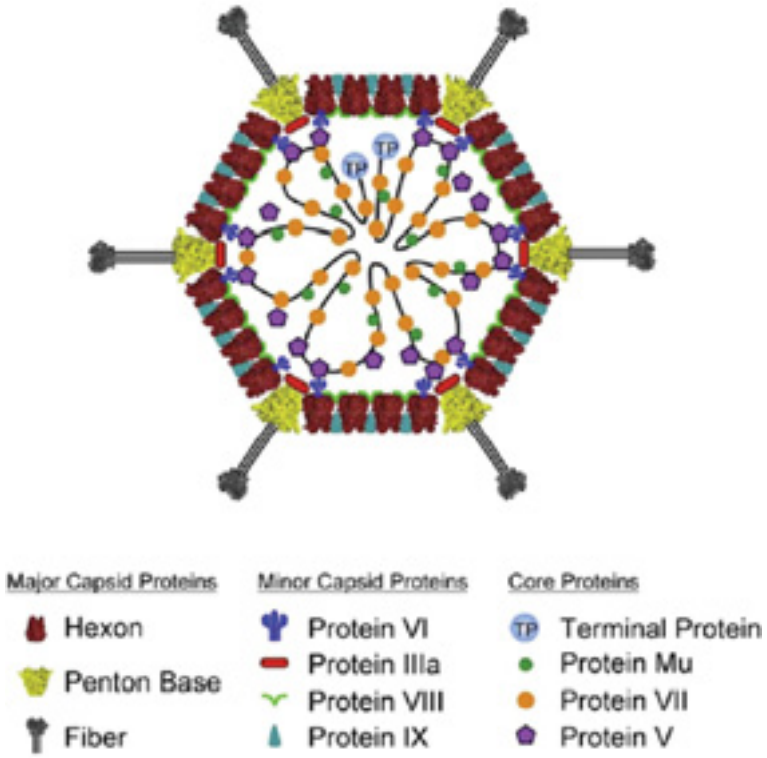


Figure 30 : Structure de l'adénovirus

Les protéines virales sont divisées en trois groupes. Le premier ensemble, les protéines majeures de capside, forme la base de la capside adénovirale et est responsable de l'attachement du virus à la membrane de la cellule hôte. Le second groupe est composé des protéines core, impliquées dans la compaction de l'ADN viral. Enfin le dernier groupe, composé des protéines mineures de capsides, localisées au niveau de la surface interne de la capside, permet de renforcer la structure de celle-ci. D'après **(Thaci et al., 2011)**

L'adénovirus de type 2 dont le génome à été le premier à être complètement séquencé, avec une taille d'environ 36 kpb **(Roberts et al., 1984)**. Par la suite, ont suivi les Ad5 **(Chroboczek et al., 1992)**, Ad12 **(Sprengel et al., 1995)**, ainsi que d'autres Ad. Les ADN des différents adénovirus présentent des séquences terminales inversées (ITR) dont les tailles

sont comprises entre 40 et 160 pb, et qui permettent aux simples brins d'ADN viral de se circulariser par appariement avec les séquences terminales.

c. Organisation génomique

Les génomes des différents sérotypes d'adénovirus présentent tous la même organisation, et les gènes codant sont localisés à la même position du chromosome viral. L'ADN linéaire contient deux origines de réplication identiques, une à chaque séquence terminale répétée (ITR). Il contient également une séquence d'encapsidation ψ, permettant l'interaction de l'ADN viral avec les protéines d'encapsidation **(Hearing et al., 1987)**.

L'ADN viral porte cinq unités de transcription précoces (E1A, E1B, E2, E3 et E4), deux unités précoces retardées (IX et Iva2) et une unité tardive qui est conçue pour générer cinq familles d'ARN messagers (de L1 à L5), toutes transcrites par l'ARN polymérase II. Il porte également un ou deux gènes VA (virus-associated) transcrits par l'ARN polymérase III. Par convention, la carte génomique débute avec le gène E1A sur le brin supérieur, contenant également les unités E1B, Major Late, VA RNA et E3. Tandis que le brin inférieur code les unités E4, E2 et Iva2 **(Figure 31)**.

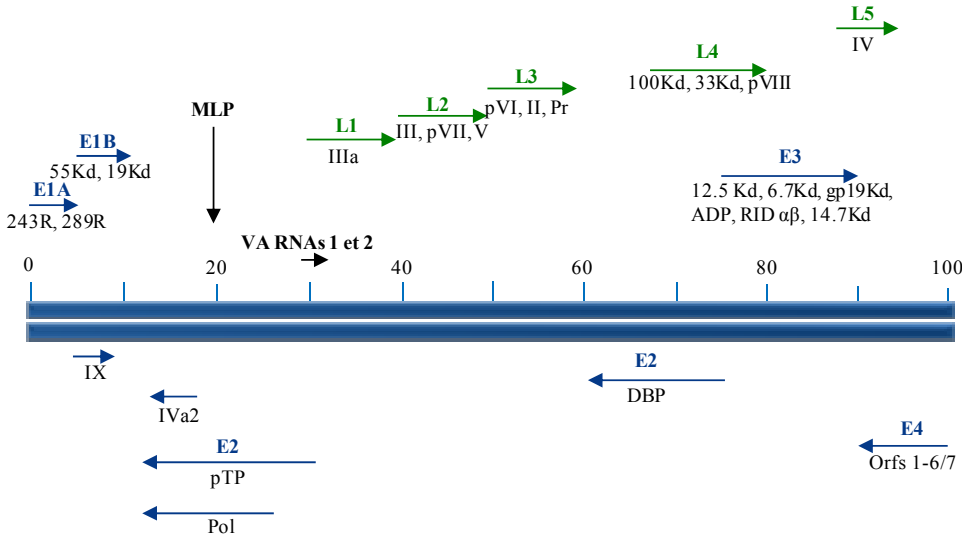


Figure 31 : Transcription du génome de l'adénovirus

Les transcrits précoces (E) sont indiqués en bleu, les tardifs (L) en vert, et représentés dans la direction de la transcription. MLP : Major Late Promoter. D'après **(Russell, 2000)**

Les unités de transcription des adénovirus codent pour une série de polypeptides avec une fonction bien définie. E1A par exemple, code pour deux protéines qui activent la transcription et permettent l'entrée de la cellule hôte en phase S, E1B code pour deux protéines bloquant l'apoptose, E2 code pour trois protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, et E3

permet la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte suite à l'infection. Enfin, les protéines tardives sont responsables de la production et de l'assemblage des composants de la capside. Seule E4 code pour différentes fonctions, en médiant la régulation transcriptionelle, le transport des ARNm et modulant la réplication de l'ADN, ainsi que l'apoptose.

d. Les récepteurs de l'adénovirus

Les adénovirus appartenant aux espèces A, C, D, E et F s'attachent aux cellules grâce à la fixation aux récepteurs CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) **(Arnberg, 2009; Bergelson et al., 1997)**. Alors que les virus du groupe B utilisent pour leur attachement, soit la protéine CD46 (membrane cofactor protein MCP) exprimée ubiquitairement **(Marttila et al., 2005; Seiradake et al., 2006)**, ou la glycoprotéine membranaire desmoglein-2 (DSG-2) **(Wang et al., 2011)**. Les adénovirus du groupe D associés avec la kératoconjonctivite épidermique (EKC), adhèrent aux cellules par le récepteur GD1a glycan qui est associé à une protéine inconnue **(Nilsson et al., 2011)**. Les récepteurs des espèces G n'ont pas encore été identifiés.

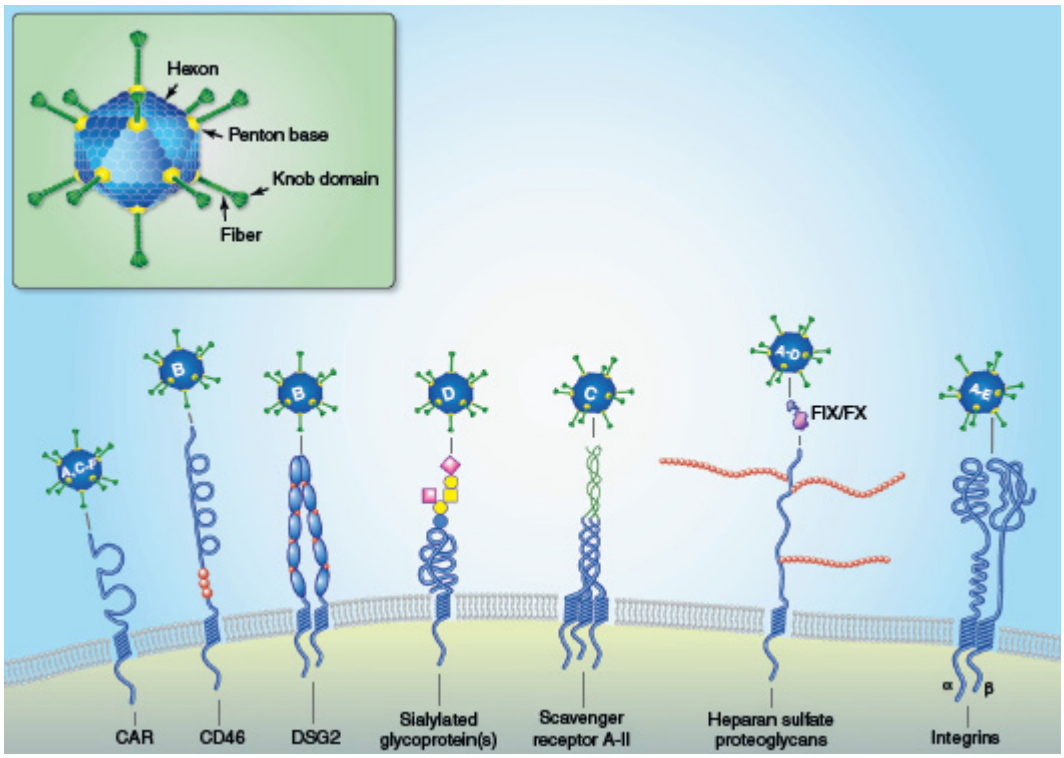


Figure 32 : Illustrations des récepteurs de l'adénovirus humain

Abréviations : CAR (Coxsackie and adenovirus receptor), CD46 (membrane cofactor protein), DSG2 (desmoglein-2), FIX/FX (coagulation factor IX et X). Les structures des récepteurs CAR, CD46, FIX/FX et intégrines ont été déterminées, mais celles des récepteurs restants ne sont encore qu'a l'état de modèles. L'adénovirus représenté dans l'encadré gauche met en évidence les protéines de capsides interagissant avec les récepteurs sur la cellule hôte. D'après **(Arnberg, 2012)**

D'autres récepteurs additionnels sont impliqués dans l'attachement des différents types d'adénovirus, mais les détails de ces interactions sont encore méconnus **(Arnberg, 2009)**. Le contact de la fibre avec le récepteur primaire est suivi de l'engagement des récepteurs de l'intégrine avec la protéine penton base de l'adénovirus, qui permet ensuite l'entrée dans la cellule **(Li et al., 2001)**.

i. CAR : Coxsackievirus and adenovirus receptor

CAR est constituée d'une protéine de 46 KDa, médiant l'infection des adénovirus du groupe B. Il est le récepteur adénoviral le plus étudié, fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Il forme des homodimères intercellulaires dans les jonctions serrées et est fortement exprimé dans de nombreux tissus, tels que le cœur, la prostate, le pancréas, le cerveau, mais faiblement dans les reins, le muscle squelettique, les poumons, les ovaires et les leucocytes. Cependant, son rôle de récepteur cellulaire *in vivo* au sein des organes intacts reste à définir. Les adénovirus de l'espèce C par exemple, induisent des infections latentes dans les lymphocytes T **(Garnett et al., 2009)**, et la majorité des cellules épithéliales polarisées. Ces cellules exprimant CAR à leur surface basale, sont d'importantes cellules cibles *in vivo* d'où débute l'infection **(Walters et al., 2002)**. Les fibres étant sécrétées, elles interagissent avec les homodimères de CAR, augmentent l'espace intercellulaire et facilitent la libération des virions à partir du site d'infection, qui semble être la principale fonction de l'interaction fibre-CAR **(Arnberg, 2012)**. Enfin, à part les récepteurs de l'espèce B, tous les adénovirus se lient au récepteur CAR **(Bergelson et al., 1997; Seiradake et al., 2006)**.

La structure obtenue par cristallographie de la fibre liée au domaine N terminal du récepteur CAR, montre que CAR interagit avec un site à l'extérieur de la fibre trimérique **(Roelvink et al., 1999)**. La nécessité du virus de mettre en place les interactions avec CAR et avec les intégrines en même temps, semble imposer des contraintes géométriques sur les interactions avec le récepteur, impliquant que les fibres soient à la fois longues **(Roelvink et al., 1998)** et flexibles **(Wu et al., 2003)**. Les fibres des différents sérotypes d'adénovirus ont des structures relativement similaires, sauf pour certaines boucles exposées à la surface, qui définissent la spécificité du récepteur **(Bewley et al., 1999)**.

ii. Intégrines

Les intégrines forment des hétérodimères à la surface cellulaire et contribuent, tout comme CAR, à l'adhérence cellulaire, à l'exception qu'elles interagissent avec des composés de la matrice extracellulaire (ECM). Elles sont composées de sous-unités α et β, et transfèrent le signal dans les cellules. Actuellement, 18 sous-unités α et 8 β ont été caractérisées chez les humains. Et leurs distributions dans les organes infectés par les adénovirus (voies respiratoires, yeux, intestin) sont bien connues **(Arnberg, 2009; Sheppard, 2003; Vigneault et al., 2007)**.

Tout comme CAR, la répartition des intégrines sur les cellules épithéliales polarisées est régulée, et elles facilitent l'entrée *in vitro* des adénovirus **(Arnberg, 2009)**. Beaucoup d'entres elles sont exprimées constitutivement de manière basolatérale, permettant l'ancrage des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire. Elles peuvent cependant être relocalisées de manière apicale en fonction des stimuli reçus **(Huang et al., 1995; Lutschg et al., 2011)**. L'interaction avec les intégrines cellulaires est régulée par le motif RGD (Arg-Gly-Asp) du penton base de tous les adénovirus, exceptés ceux de l'espèce F ayant un tropisme gastro-intestinal (Ad40 et 41).

Dans certains cas, l'attachement du virus dépend de l'interaction directe entre le penton base et l'intégrine exprimée à la surface cellulaire, sans toutefois nécessiter un récepteur de fibre primaire. Ainsi, un Ad2 déficient en fibre peut infecter une cellule déficiente en CAR en mettant en jeu l'attachement aux intégrines αMβ2 et αLβ2, suivi d'une interaction avec une intégrine α_v nécessaire pour l'internalisation **(Huang et al., 1996)**.

2. Le cycle viral

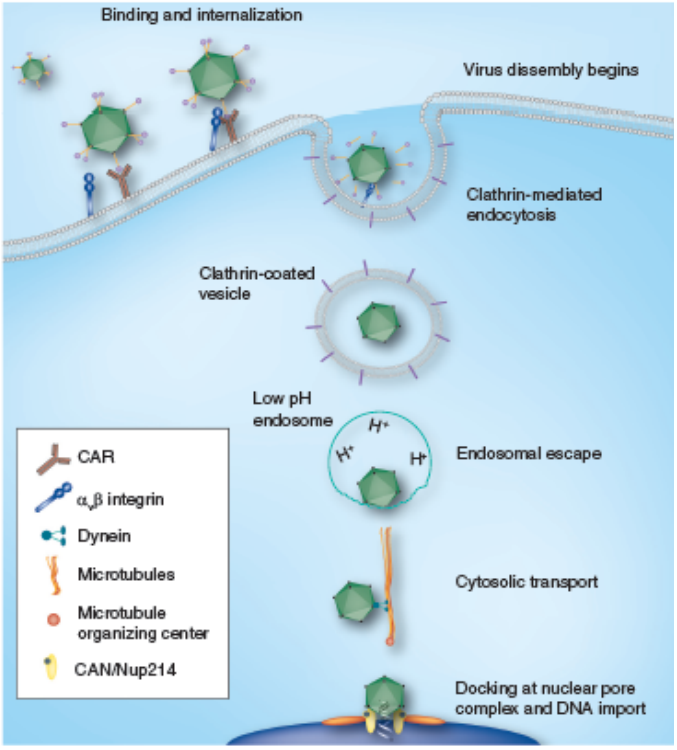


Figure 33 : Voie d'infection *in vitro* de l'adénovirus de type 5

In vitro, l'Ad5 débute son infection par sa liaison avec un récepteur d'attachement primaire, CAR, grâce à sa fibre. Puis il se lie via le penton base, avec un récepteur secondaire, les intégrines αvβ. Cette reconnaissance permet l'entrée du virus dans la cellule par endocytose médiée par les clathrines. Le virus se dissocie progressivement dans les endosomes précoces. Des protéines virales (pVI) sont ensuite libérées et l'endosome est lysé sous l'effet du pH. Les adénovirus se lient ensuite à la dynéine et sont transportés jusqu'au noyau le long des microtubules. Enfin, le virus se lie au noyau, par le récepteur CAN/Nup214 et l'ADN viral est importé. D'après **(Duffy et al., 2012)**

a. Liaison des adénovirus aux cellules

Le cycle viral de l'adénovirus débute par la liaison de celui-ci aux récepteurs situés à la surface des cellules hôtes, et cet attachement est médié par les protéines de fibre et le penton base du virus (**Figure 33**). Tous les adénovirus excepté ceux du groupe B se lient avec une forte affinité, tout d'abord à un récepteur primaire CAR, via l'interaction entre celui-ci et le bouton terminal de la fibre du virus. Puis, une seconde interaction est nécessaire à l'internalisation, entre le penton base et des membres de la famille des récepteurs hétérodimeriques de surface, les intégrines **(Bergelson et al., 1997)**. Le tropisme cellulaire des adénovirus est influencé par la disponibilité des récepteurs cellulaires, des fibres et du penton. La combinaison de ces deux interactions permet la mise en place d'une interaction irréversible entre la particule virale et la surface de la cellule.

b. Entrée

La liaison du virus aux récepteurs cellulaires, permet son entrée dans la cellule par endocytose **(Maxfield and McGraw, 2004)**. Les études menées au microscope électronique ont permis de mettre en évidence la formation de vésicules contenant les particules virales, et composées d'une enveloppe dense aux électrons ayant été plus tard identifiées comme vésicules à clathrine **(Dales, 1962)**.

L'identification de la voie d'entrée par apoptose a été mise en évidence par la colocalisation entre l'adénovirus et d'autres ligands connus pour leur mécanisme d'endocytose. De plus, la présence nécessaire de cholestérol libre renforce l'hypothèse de l'implication des vésicules à clathrine **(Worgall et al., 2000)**. De surcroit, la formation de vésicules libres de clathrine nécessite la présence de la dynamine **(Chen et al., 1991)**. En effet, le mutant thermosensible de la dynamine K44A agit comme inhibiteur dominant négatif de l'endocytose et bloque la formation des vésicules à clathrine à 37°C **(Damke et al., 1994)**.

c. Libération dans le cytosol

Les adénovirus du groupe C, après leur entrée dans les cellules, libèrent rapidement les capsides virales dans le cytosol. Ce phénomène se produit avec une demi vie entre 3 et 15 min **(Miyazawa et al., 1999)**. Cette rapidité suggère que le virus s'échappe de l'endosome précoce avant même la formation d'un lysosome **(Mellman, 1992)**.

Le processus de dissociation de la particule virale est progressif et débute à la surface de la cellule infectée par la perte de la protéine de fibre. Ce processus est facilité par les interactions avec les intégrines α_v **(Wickham et al., 1994)**. Le trafic en direction des endosomes se fait via les vésicules à clathrines, connus pour accumuler les complexes ligand-récepteur, et qui stockent momentanément les particules virales **(Maxfield and McGraw, 2004)**. En effet, il a été montré que des ligands marqués colocalisent rapidement avec ce compartiment **(Leopold et al., 1998)**.

Une fois la vésicule d'endocytose formée, la présence des particules virales induit une acidification de l'endosome, modifiant ainsi la capside elle-même, provoquant la lyse de la membrane de l'endosome et la libération de la capside dans le cytosol. L'importance de l'acidification des endosomes dans la libération des adénovirus du groupe C a été montrée par le blocage et la rétention de ceux-ci par des composés lysomotropiques **(Prchla et al., 1995)**.

La dissociation partielle du virion est donc due à l'acidification de l'endosome, provoquant la perte des fibres et des penton bases, et permettant l'exposition de la protéine VI à la surface du virion **(Wiethoff et al., 2005; Wodrich et al., 2010)**. La lyse des endosomes par les adénovirus des groupes A, B, C et E peut être empêchée par une protéine antimicrobienne de la réponse immunitaire innée, la α-defensine **(Smith et al., 2010)**. Cette protéine stabilise la capside et empêche la libération de la protéine pVI dans la lumière de l'endosome **(Smith and Nemerow, 2008)**. Le blocage de la protéine VI par un anticorps à permis de montrer que sa neutralisation dans les vésicules d'endocytose bloque la sortie des virions **(Maier et al., 2010)**. L'exposition de la protéine pVI suite à l'acidification de l'endosome permet l'activation de la cystéine protéase virale de 23K, qui induira le clivage de nombreuses protéines de capside, afin de permettre sa maturation **(Maier et al., 2010)**.

Les actions combinées telles que l'association entre le penton base et la membrane de l'endosome, l'action de la protéase virale L3/p23, de la protéine VI et la protéine de fibre, permettent la mise en place de l'activité lytique de la capside virale **(Shayakhmetov et al., 2005; Wickham et al., 1995; Wiethoff et al., 2005)**.

d. Translocation nucléaire

Une fois dans le cytoplasme, de nombreux virus utilisent les microtubules pour être transportés au noyau. Les particules adénovirales partiellement dissociées interagissent indirectement ou directement avec des moteurs moléculaires comme la dynéine, pour se déplacer le long des microtubules et s'accumuler au centre organisateur des microtubules (MTOC ; **(Leopold and Crystal, 2007)**. La dissociation du virus du MTOC pourrait impliquer un passage du transport par la dynéine, a celui par la kinésine, le système ubiquitine protéasome ou encore les récepteurs du transport nucléaire. L'hexon serait l'une des premières protéines impliquées dans la translocation **(Smith et al., 2008)**. Actuellement, le mécanisme de détachement de la particule virale du MTOC est inconnu, cependant, CMR1 (Chromosome Maintenance Region 1), une protéine d'export nucléaire joue un rôle clef dans le ciblage des adénovirus aux pores nucléaires **(Strunze et al., 2005)**. Les virus arrivés à la surface des pores nucléaires se lient à une protéine, CAN/Nup214, nécessaire à la poursuite de la dissociation des particules virales et à l'entrée de l'ADN viral **(Greber et al., 1997; Trotman et al., 2001)**. L'interaction entre la capside et le noyau est favorisée par une protéine chaperonne, Hsc70, qui favorise l'infection, et qui permet la dissociation de la capside et la libération du génome adénoviral **(Saphire et al., 2000)**. La seconde protéine,

l'histone H1, jouant un rôle dans les étapes finales de la translocation nucléaire, serait capable de lier la capside de l'Ad2.

Le déplacement et l'internalisation du virus sont favorisés par l'activation des cascades de signalisation de la PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase), ERK 1/2 et des p38/MAP, qui sont nécessaires à la polymérisation de l'actine et du cytosquelette **(Li et al., 1998a)**.

e. Réplication de l'ADN viral

i. Phase précoce

L'expression des gènes précoces de l'adénovirus à trois objectifs. Le premier est d'induire l'entrée en phase S de la cellule hôte, permettant de créer un environnement optimal pour la réplication virale. Les mécanismes d'entrée en phase S sont assurés par E1A, E1B et E4. Le second objectif est la mise en place de mécanismes viraux afin d'empêcher l'activation des systèmes de défense de la cellule hôte. Les gènes E3 et les VA RNA participent à ce processus. Enfin, le dernier objectif est de synthétiser les gènes viraux nécessaires à la réplication de l'ADN viral. Ces trois événements sont dépendants de l'activation transcriptionnelle du génome viral, et sont principalement sous l'influence des produits de E1A. La transcription est associée avec une série d'événements d'épissage concernant les quatre cassettes précoces, E1, E2, E3 et E4.

E1A est la première unité de transcription à être exprimée après l'arrivée de d'ADN viral au noyau. Sa transcription est contrôlée par un promoteur constitutivement actif, qui code pour deux ARNm durant la phase précoce. Le produit du gène E1 peut être subdivisé en deux, E1A et E1B. Il existe deux protéines E1A, nommées 289R (13S) et 243R (12S), contenant des extrémités 5' et 3' identiques, mais différentes par l'épissage et par un segment présent dans le polypeptide le plus long (46 aa). Ces produits sont phosphorylés en partie par les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et les MAP kinase (mitogen-activated protein). Ces protéines sont impliquées dans la modulation du métabolisme cellulaire afin de sensibiliser la cellule hôte à la réplication virale. La cellule hôte à développé des mécanismes de défense contre les interférences extérieures et l'élimination des cellules défectives. Ces mécanismes impliquent les réponses innées et adaptatives du système immunitaire, et notamment le facteur de transcription NFκB. E1A interfère avec la division cellulaire et module les profils d'expression en faveur de la transcription virale. Les protéines E1A sont des trans-

activateurs, capables d'activer et d'augmenter l'expression d'autres unités de transcription adénovirales **(Nevins, 1981)**. E1A active la transcription de nombreux gènes précoces viraux et cellulaires, de par la capacité de 13S E1A d'interagir directement avec la TBP (TATA-binding protein). E1A est capable d'interagir avec pRb, et permettant l'activation d'E2F, afin d'agir sur l'expression des gènes viraux mais également sur les facteurs cellulaires, en favorisant la progression dans le cycle cellulaire. Tous les promoteurs adénoviraux précoces, à l'exception d'E1B, contiennent des sites de liaisons pour la famille des facteurs de transcription ATF. De plus, E1A peut également interagir avec Jun/fos et ATF2.

Le gène E1B code pour deux protéines E1B-19K et E1B-55K. Et E1B-19K semble coopérer avec E1A et p53 pour empêcher l'apoptose. En effet, E1B-19K est un analogue de Bcl-2 qui est anti-apoptotique **(Cuconati et al., 2002)**. E1B-55K quant à lui interagit également avec p53 et est aussi impliqué dans la colocalisation avec le cytoplasme. E1A-55K a également un effet sur la transcription des ARNm viraux tardifs **(Harada and Berk, 1999)** et agit comme un effecteur de l'inflammation *in vivo* **(Ginsberg et al., 1999)**.

L'unité E2 code pour deux produits : la région E2A codant pour la DBP (single stranded DNA binding protein) et E2B codant pour la protéine terminale (TP) et l'ADN polymérase virale. Elles permettent la mise en place de la machinerie de réplication de l'ADN viral et l'amorçage de la transcription des gènes tardifs **(Hay et al., 1995)**.

Les gènes E3 ne sont pas essentiels à la réplication des virus *in vitro*, mais permettent l'échappement au système immunitaire de la cellule hôte. L'une de ces protéines E3, ADP (adenovirus death protein) facilite la lyse des cellules infectées et rend la libération des virus plus efficace **(Tollefson et al., 1998)**. La protéine gp19K, localisée à la membrane du réticulum endoplasmique, se lie à la chaine lourde du CMH-I et empêche son transport vers la membrane plasmique **(Burgert and Kvist, 1987)**. Grâce à cette protéine, les cellules infectées échappent à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques. De plus, les produits E3 RIDα, RIDβ et 14.7K inhibent les voies de signalisation pro-apoptotiques **(Chin and Horwitz, 2006; Klingseisen et al., 2012).**

Les produits de la cassette E4 (ORFs 1 à 7) facilitent le métabolisme des ARNm du virus, favorisent la réplication de l'ADN viral et l'extinction de la synthèse des protéines de la cellule hôte **(Halbert et al., 1985; Weigel and Dobbelstein, 2000)**. Ils sont également associés à la résistance à la lyse des lymphocytes T cytotoxiques **(Kaplan et al., 1999)**. De plus, récemment certains des produits d'E4 ont montré leur capacité à se lier aux protéines kinase activées par l'ADN, empêchant la concaténation de l'ADN viral. Ainsi, ces kinases

seraient nécessaires à l'activation de p53 suite aux dommages à l'ADN, représentant ainsi que autre manière de bloquer les voies d'apoptose **(Boyer et al., 1999)**.

Il est intéressant de noter que beaucoup de caractéristiques d'E1B et E4 servent à contrecarrer les activités d'E1A. En effet, l'ORF4 de E4 inhibe l'activation du promoteur E2F par E1A **(Mannervik et al., 1999)**. L'ORF6 quant à elle a un effet direct sur la transactivation de p53 **(Boivin et al., 1999)**, en interagissant avec E1B 55K lors de sa liaison avec p53 et le libérant afin qu'il soit dégradé **(Boyer and Ketner, 2000)**. L'ORF3 semblerait également agir en faveur de l'inactivation de l'interaction E1B-p53 **(Konig et al., 1999)** et jouerait un rôle dans la mise en place de la réplication et de la transcription au noyau **(Leppard and Everett, 1999)**.

La réplication de l'ADN débute aux deux extrémités de l'ADN, et requière la présence de séquences dans l'ITR utilisées comme origines de réplication **(Hay et al., 1995)**. Les gènes adénoviraux précoces restent actifs durant tout le cycle de réplication viral, même si leur niveau diminue progressivement. Puis, se met en place la phase de transcription tardive, avec cinq cassettes de transcrits (L1 à L5) produits suite à des événements d'épissage.

ii. Phase intermédiaire

Lors de cette phase, les gènes Iva2 et IX sont exprimés de manière croissante. La transition de la phase intermédiaire vers la phase tardive permet la production des composants structuraux du virus, l'encapsidation et la maturation des particules virales dans le noyau.

Durant la phase précoce, le taux d'expression des protéines tardives est très faible. Et après la réplication de l'ADN viral, les gènes IX et IVa2 activent la transcription tardive via le promoteur MLP (major late promoter) **(Backstrom et al., 2010; Christensen et al., 2012; Lutz and Kedinger, 1996; Lutz et al., 1997)**.

Les adénovirus expriment également à partir de l'ARN polymérase III des ARNs (VA RNA I et II) d'environ 160 nucléotides de long. Ceux-ci ne sont pas traduits, mais jouent un rôle dans la lutte contre les mécanismes de défense cellulaire via IPS-1 (IFN-beta promoter stimulator-1). Les VA-RNA jouent un rôle important dans la réplication de l'adénovirus, en bloquant l'action antivirale associée à l'activation de la protéine kinase cellulaire PKR (double-stranded RNA dependant protein kinase). Une fois PKR inactivée, la traduction des ARNm tardifs peut débuter **(Machitani et al., 2011)**.

iii. Phase tardive

Les régions tardives de l'adénovirus sont organisées en un long transcrit primaire de 29 Kb, codant pour cinq familles d'ARN (L1 à L5) et dont l'expression est contrôlée par le promoteur MLP **(Evans et al., 1977; Nevins and Darnell, 1978)**. Ce promoteur présente une faible activité dans la phase précoce de l'infection, mais qui augmente fortement au cours de la phase tardive. Le transcrit est sous contrôle de l'ARN polymerase II et du MLP, dont l'activation est dépendante des protéines IVa2 et pIX et de certains facteurs de transcription.

Les cinq familles d'ARNm codées par le promoteur MLP contiennent toutes la même région 5' non codante de 200 nucléotides, appelée TLS (tripartite leader sequence) **(Berget et al., 1977)**. Cette région non codante est essentielle pour la traduction des ARNm tardifs. De plus, une activation sélective de la synthèse protéique des transcrits contenant la TLS est réalisée par la L4 100-kd, une protéine de 100kd codée par la famille des ARNm tardifs L4, favorisant ainsi la traduction des ARNm viraux **(Hayes et al., 1990)**.

Au cours de la phase tardive, de nombreux régulateurs, comme la PKR, coopèrent pour faciliter la traduction sélective des ARNm viraux au détriment des ARNm cellulaires. Après activation la PKR phosphoryle eIF-2a (eukaryotic initiation factor-2a), l'inactivant et bloquant la traduction des ARNm de la cellule hôte. De plus, l'inactivation de eIF-AF contribue à la traduction sélective au sein des cellules infectées par les virus **(Huang and Schneider, 1991)**.

iv. Phase de production et de libération des particules virales

Après réplication de l'ADN viral, et la production en grande quantité de protéines structurales, les capsomères d'hexon trimériques s'assemblent à partir des monomères après leur synthèse dans le cytoplasme **(Horwitz et al., 1969)**. L'assemblage des hexons et des pentons requière la participation d'une seconde protéine virale tardive, L4 100-Kd, qui facilite l'assemblage des trimères en agissant comme un patron d'assemblage.

Cet assemblage débute par la formation d'une capside vide, suivi par l'entrée de l'ADN viral, dont la reconnaissance est assurée par la séquence d'encapsidation ψ centrée à 260 bp de l'extrémité gauche du génome viral. De nombreuses protéines se lient à la séquence d'encapsidation, mais leur rôle dans l'interaction entre l'ADN et la capside reste à déterminer **(Schmid and Hearing, 1998)**.

L'encapsidation du génome viral est un phénomène polarisé, débutant avec l'extrémité gauche de l'ADN viral, et est facilité par la protéine L1. La protéinase à cystéine codée par L3 clive ensuite quatre constituants et génère les protéines matures pVI, VII, VIII et μ. Ce clivage stabilise la particule et la rend infectieuse. La mort de la cellule infectée et la libération des particules virales infectieuses dans le cytoplasme complètent le cycle viral.

Il existerait deux mécanismes permettant la libération des particules virales. Le premier implique la disruption des filaments du cytosquelette, notamment de la vimentine en réponse à l'action de la protéine E1B-19kd. De plus, la protéinase L3, clive la cytokératine K18 et l'empêche de polymériser de former des filaments. Les filaments étant perturbés, la cellule est plus fragile et sensibilisée à la lyse. Le second mécanisme implique la protéine E3 11.6kd, aussi appelée ADP (adenovirus death protein) et induit la mort cellulaire par son accumulation durant les phases tardives de l'infection.

Le cycle viral dure entre 30 à 36 heures, et conduit à la libération d'environ 10 000 particules virales infectieuses par cellule suite à la lyse des cellules hôtes infectées par les adénovirus sauvages.

V. Thérapie génique et adénovirus

1. Introduction à la thérapie génique

En 1947, le Dr Clyde E. Keeler introduit pour la première fois la thérapie génique comme technique thérapeutique pouvant permettre la correction de maladies héréditaires **(Keeler, 1947)**. Plus tard en 1972, les Dr Friedmann et Roblin envisagent une amélioration future de certaines maladies génétiques via l'utilisation de la thérapie génique **(Friedmann and Roblin, 1972)**. La preuve de principe est devenue réalité en 1990, avec la première patiente âgée de 4 ans, Ashanti DeSilva, souffrant d'une immunodéficience à l'adénosine désaminase sévère (ADA SCID). Elle fut traitée à l'aide d'une thérapie *ex vivo*, après prélèvement et traitement de ses lymphocytes T par un gammaretrovirus réintroduisant le gène ADA, puis réinjection des lymphocytes traités.

Le principe de thérapie génique est simple : réparer une déficience des cellules somatiques d'un tissu ou d'un organe spécifique en y introduisant de l'ADN ou de l'ARN. Ceci afin de restaurer les fonctions normales de la cellule au sein d'un patient atteint d'une maladie présentant un phénotype particulier. Le transfert de gène peut se faire soit *ex vivo*, comme

expliqué précédemment, ou *in vivo* après injection du transgène de manière systémique ou localement au niveau d'un organe ou d'une tumeur. Dans les traitements contre le cancer plusieurs approches peuvent être utilisées, comme la correction des mutations induites, l'activation de la réponse immunitaire contre les celles tumorales, l'ARN interférence, la lyse ciblée, la destruction des cellules tumorales par des virus à réplication sélective, ou encore des thérapies suicides ou anti-angiogéniques **(Duarte et al., 2012; Limberis, 2012)**.

L'utilisation de la thérapie génique permet le développement de nouvelles thérapies pour de nombreuses maladies actuellement restées sans traitement efficace. La thérapie génique contre le cancer représente actuellement 64,4 % des essais cliniques réalisés à l'échelle mondiale. En outre, 8,7% des essais cliniques s'appliquent aux maladies monogéniques, 8,5% aux affections cardiovasculaires, 8% pour les maladies infectieuses, et dans des proportions plus faibles pour les maladies neurologiques, oculaires, inflammatoires **(Source : The journal of Gene Medicine,** www.wiley.co.uk/genmed/clinical; **Figure 34)**.

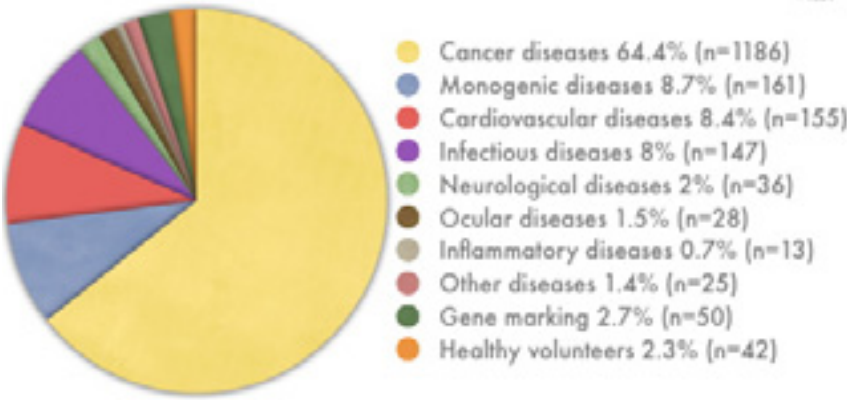


Figure 34: Répartition des essais cliniques en thérapie génique en fonction des pathologies ciblées

Données mondiales de 1989 à juin 2012. Source : The journal of Gene Medicine, www.wiley.co.uk/genmed/clinical

2. Méthodes et état des thérapies

Actuellement, le succès de la thérapie génique est dépendant du vecteur de transfert, de la voie d'administration, de l'accessibilité du tissu cible et de la stabilité de l'expression du transgène. L'attention a donc été portée sur la manipulation des virus pour les traitements médicaux. C'est pourquoi, de nombreux outils de transfert de gènes ont été développés, afin de permettre d'atteindre différentes cibles, soit par l'intermédiaire de méthodes virales, soit non virales. Les thérapies virales utilisent la capacité des virus à se transformer en cargo génétique, et à permettre le transfert à une cellule ciblée **(Figure 35)**.

Vecteur	Adénovirus	Adeno-associated virus	Lentivirus	Rétrovirus	Liposomes
Infection ou transduction	Cellules en division ou non	Cellules en division ou non	Cellules en division ou non	Cellules en division	Cellules en division ou non
Génome hôte	Pas d'intégration	Intégration ou non	Intégration	Intégration	Pas d'intégration
Expression du transgène	Transitoire	Stable	Stable	Stable	Transitoire
Capacité d'encapsidation	~ 8 kb	~ 5 kb	~ 8 kb	~ 8 kb	> 20 kb
Avantages	Grande capacité d'encapsidation, hauts rendements de production	Hauts rendements de production, expression a long terme, faible immunogénicité	Grande capacité d'encapsidation, hauts rendements de production	Grande capacité d'encapsidation, expression a long terme	Faible immunogénicité
Inconvénients	Haute immunogénicité, expression transitoire	Faible capacité d'encapsidation	Mutagénèse insertionnelle	Haut risque de mutagénèse insertionnelle	Expression transitoire

Figure 35 : Comparaison des vecteurs les plus utilisés en thérapie génique

D'après **(Limberis, 2012)**

Dans de nombreux protocoles de thérapie génique mis au point pour des maladies génétiques, une réadministration de la thérapie virale après le premier traitement est nécessaire. Cependant, la majorité des thérapies induit une réponse immunitaire humorale diminuant l'efficacité de la réadministration **(Rogers et al., 2011)**. De plus, l'immunité préexistante dirigée contre le cargo viral suite aux infections par des virus sauvages et précédents l'administration de la thérapie réduit potentiellement l'efficacité du transfert de gène **(High and Aubourg, 2011)**. D'où la nécessité de mettre au point des cargos viraux de plus en plus développés et efficaces afin d'échapper aux réponses immunitaires. Il existe également des vecteurs non viraux, composés de lipides, peptides, carbohydrates ou nanoparticules, capable de se lier à la membrane plasmique de la cellule et de libérer l'ADN thérapeutique dans le cytoplasme de la cellule, tout en induisant qu'une faible réponse immunitaire.

a. Les adéno-associated virus (AAV)

Les AAV sont membres du genre dependovirus de la famille des Parvoviridae (parvo = petit), incluant de nombreux petits virus non enveloppés, à symétrie icosaédrique. Ils infectent de nombreuses espèces de mammifères, incluant l'homme mais ne sont cependant pas pathogènes **(Berns and Linden, 1995)**. Plus de 80% des plus de 20 ans présentent une réponse immunitaire contre les AAV. Les virions AAV sont les plus petits cargos de thérapie génique, la capside ayant un diamètre de 18 à 25 mm, ne codant que 60 protéines, toutes codées par le même gène. Le génome viral est constitué d'un ADN linéaire simple brin,

polarisé de manière négative à hauteur de la moitié des virions produits ou positive pour l'autre moitié.

Tous les AAV présentent les mêmes structures, tailles et organisations génétiques, mais sont cependant différents de par la composition des protéines de capside et déterminant la spécificité de récepteur. Les récepteurs des AAV sont exprimés de manière ubiquitaire. Le sérotype le plus utilisé expérimentalement et en essais cliniques, est l'AAV2, qui se lie aux cellules hôtes par les HSPGs (heparan sulfate proteoglycans). Les intégrines αvβ5, ainsi que les récepteurs du FGF (FGFR-1) et du HGF (HGFR) font office de co-récepteurs **(Yang et al., 2011)**.

Les AAV pénètrent les cellules en culture par endocytose via la voie des clathrines et sont retrouvés dans les endosomes précoces après entrée **(Bantel-Schaal et al., 2002)**. Ces endosomes maturent ensuite en endosomes tardifs en se déplaçant vers le noyau. Une caractéristique intéressante des AAV, tels que l'AAV8 et l'AAV9, est leur capacité à traverser la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins. Une fois injectés de manière intraveineuse (IV) ou intrapéritonéale (IP), ces vecteurs sont capables de transduire très efficacement les myofibres, représentant une solution de thérapie contre les dystrophies musculaires **(Inagaki et al., 2006; Kornegay et al., 2010)**.

Le génome simple brin de l'AAV à une longueur de 4,7 kb et contient deux ORF, correspondant à deux gènes, rep et cap, codant pour les protéines nécessaires à la réplication virale et à la formation de la capside. Ces régions présentent chacune deux séquences ITR d'environ 145 nt, formant un palindrome et servant d'origine de réplication.

Les vecteurs AAV sont la plupart du temps obtenus à partir du génome de l'AAV2 et clonés dans un plasmide après élimination de toutes les séquences virales, à l'exception des deux ITR. Le transgène et ses éléments régulateurs sont alors clonés entre les ITR et l'encapsidation est réalisée par cotransfection dans des cellules HEK 293 avec un plasmide auxiliaire contenant les gènes AAV rep et cap. Le second plasmide peut également être remplacé par un adénovirus portant les gènes helper E2A, E4 et VA-RNA. L'utilisation de capsides de sérotypes différents de l'AAV2 permet d'une part d'augmenter l'efficacité de transduction dans les cellules déjà permissives, et d'autre part d'étendre le tropisme à d'autres organes. De plus, le second plasmide cotransfecté contient souvent, pour des raisons pratiques, à la fois les gènes rep et cap, et les gènes helper de l'adénovirus. Les déterminants

moléculaires du tropisme restent à identifier, mais cependant, la plupart des sérotypes transduisent les cellules après la mitose.

Etant dépendant de la présence d'un virus helper, l'AAV peut en son absence entrer en latence, en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte ou en persistant sous forme épisomale **(Schultz and Chamberlain, 2008)**.

b. Les rétrovirus

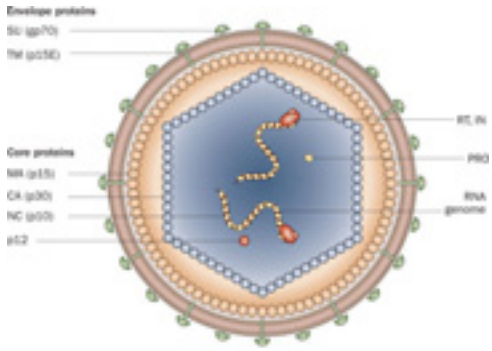


Figure 36 : Représentation de la particule rétrovirale

Gène *gag* : MA : protéine de matrice, CA : protéine de capside, NC : protéine de la nucléocapside, Gène *pol* : RT : réverse transcriptase, IN : intégrase, PRO : protéase, Gène *env* : SU : composant de surface, TM : composants transmembranaires. D'après **(Silverman et al., 2010)**

i. Les gammarétrovirus

Les gammarétrovirus sont des virus enveloppés de la famille des retroviridae, dont les virions portent deux copies du génome à ARN simple brin d'environ 10 kb. La plupart des vecteurs rétroviraux sont basés sur le virus de la leucémie murine (MoMLV), qui possède un génome simple codant pour gag, pol et env, et complété des régions LTR **(Pages and Bru, 2004)**.

Une fois entré dans la cellule, l'ARN est reverse transcrit par la reverse transcriptase, en ADN double brin, qui s'intègre de manière stable dans un des chromosomes de la cellule hôte. Cette intégration permet ainsi une expression à long terme du gène thérapeutique inséré. L'intégration du rétrovirus dans le génome de la cellule hôte se fait de manière aléatoire, c'est pourquoi, pour des raisons de sécurité des vecteurs s'autoinactivant sont développés **(Yu et al., 1986)**. Ils contiennent une délétion de la région 3' LTR, qui est copiée dans le promoteur 5' LTR durant la reverse transcription. Cette modification supprime les éléments enhancer et affecte l'expression des gènes cellulaires.

Les rétrovirus sont cependant incapables d'infecter les cellules quiescentes, en effet, l'ADN double brin est incapable de traverser la membrane nucléaire, désassemblée uniquement durant la mitose. Dans les versions de vecteurs les plus simples, la transcription du gène thérapeutique est contrôlé directement par le LTR viral en 5' et ces vecteurs sont ensuite produits dans des cellules mammifères.

ii. Les lentivirus

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est le lentivirus le plus étudié, et a été modifié pour être utilisé en thérapie génique. Les lentivirus présentent de nombreuses propriétés intéressantes en tant que vecteur de thérapie génique : (i) l'expression du transgène est stable suite à l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule hôte, (ii) ils sont capables d'infecter les cellules en division ou non, (iii) le tropisme est étendu aux tissus et permet le ciblage de gènes et de différents types cellulaires, (iv) aucunes protéines virales n'est exprimées après transduction du vecteur, (v) le vecteur est capable d'introduire des éléments génétiques complexes, tels que des séquences polycistroniques ou contenant des introns, (vi) le profil d'intégration est plus sûr, et (vii) le vecteur est facilement manipulable et productible.

Les vecteurs lentiviraux sont largement utilisés en biologie ou lors d'études de la surexpression de transgène stable, d'extinction persistante de gène, d'immunisation, d'imagerie *in vivo*, de génération d'animaux transgéniques, d'induction de cellules pluripotentes, de modification de cellules souches ou d'extinction spécifique. A l'inverse des autres rétrovirus, les lentivirus sont capables de se répliquer dans les cellules en division ou non **(Freed and Martin, 1994)**.

Tout comme les adénovirus les lentivirus présentent une grande capacité d'encapsidation. Ceux-ci s'intègrent stablement, mais cependant de manière aléatoire **(Ciuffi, 2008)**. Et une attention particulière est portée sur le développement de lentivirus présentant des caractéristiques de sécurité empêchant l'apparition de RCL (replication competent lentivirus). De manière pratique, les gènes accessoires (vif, vpr, vpu et nef) et les gènes régulateurs (tat et rev) sont séparés des gènes gag, pol et env **(Fuller and Anson, 2001)**. La sécurité peut encore être augmentée par la construction de vecteurs s'autoinactivant (SIN), dont l'efficacité à été montrée cliniquement dans l'arrêt de la progression dans le cas de leucodystrophie **(Cartier et al., 2009)** et de leucémie **(Porter et al., 2011)**.

c. Les poxvirus ou virus de la vaccine

Le virus de la vaccine fait partie de la famille des poxviridae, qui comprend des virus enveloppés ovoïdes à ADN double brin linéaire de 130 à 230 kbp, et contenant des séquences ITR. Le virus de la vaccine (VV) a montré une efficacité significative et reproductible dans le traitement de nombreux cancers humains, tel que le cancer de la vessie **(Gomella et al., 2001)**.

Afin d'augmenter la spécificité du virus pour les cellules cancéreuses, deux gènes viraux ont été délétés : la thymidine kinase virale (TK) et VGF (vaccinia growth factor) **(McCart et al., 2001)**. La TK est nécessaire pour la réplication du virus, indépendamment de l'état de prolifération cellulaire, et VGF imite EGF (epidermal growth factor) et sensibilise les cellules avoisinantes à l'infection par VV. Etant donné que la plupart des cellules cancéreuses présentent des activités TK et EGF élevées, la délétion des gènes viraux augmente la sélectivité virale pour les tumeurs **(Puhlmann et al., 2000)**. Il a été démontré que des xénogreffes de lignées cellulaires d'ovaires humains sur modèle murin sont efficacement infectées, et que le virus est capable de s'y répliquer, augmentant ainsi la survie des souris traitées **(Hung et al., 2007)**. De plus, un VV doublement muté pour TK et VGF, et codant pour le gène suicide de la cytosine désaminase de levure (CD), a permis le ciblage des cellules tumorales dans des carcinomes ovariens de souris **(Chalikonda et al., 2008)**.

Le VV grâce à ses propriétés oncolytiques, ses données de sécurité accrues, son large génome permettant l'insertion de large quantité d'ADNc, représente un excellent vecteur pour les cancers ovariens en stade avancé.

d. Virus de l'herpès simplex (HSV)

Trois différents types de vecteurs sont dérivés de l'herpès simplex 1 (HSV-1) : les vecteurs atténués, les vecteurs défectifs en réplication, et les vecteurs amplicon.

Les vecteurs atténués sont toujours capables de se répliquer, mais présentent une virulence réduite. En effet, les gènes non essentiels sont éliminés, comme la thymidine kinase (ICP36/UL23), la sous-unité majeure de la ribonucléotide reductase (ICP6/UL39), ou le facteur de neurovirulence (ICP 34.5) **(Argnani et al., 2005)**.

La première génération de vecteurs défectifs a été obtenue avec des mutations d'un seul gène essentiel IE (immediate-early) codant pour ICP4 **(Glorioso and Fink, 2004)**. La pathogénicité de ces vecteurs au sein du cerveau est réduite mais tout en conservant un potentiel toxique dans les cultures cellulaires. L'amélioration de ces virus par délétion de gènes additionnels à montré une persistance prolongée *in vivo* et permettent également le clonage de plusieurs cassettes thérapeutiques dans différentes régions du génome **(Burton et al., 2005; Epstein et al., 2005)**.

Les virus amplicon présentent des particules virales identiques aux virions sauvages du HSV-1. Ceux-ci sont composés, en plus de la cassette thérapeutique, d'un plasmide contenant l'origine ori-S et le signal d'encapsidation (pac) du génome HSV-1 **(Epstein, 2009)**. Ces vecteurs offrent la capacité de clonage la plus large et la plus étendue, pouvant permettre l'encapsidation de molécules d'ADN de plus de 150 kb. Ils sont produits par cotransfection de l'amplicon avec 5 cosmides se chevauchant partiellement, ou encore via un seul chromosome bactérien artificiel (BAC) exprimant les protéines virales nécessaires à la production des particules virales.

Le HSV a un grand champ d'action, il est capable d'infecter à la fois les cellules en division ou non, et d'établir une infection latente dans les neurones. Ces propriétés favorisent l'utilisation de ces virus en thérapie génique. L'application majeure de ces virus est la thérapie oncolytique contre le cancer, seule ou en combinaison avec la chimiothérapie **(Kanai et al., 2010; Liu and Kirn, 2008)**. Dans le but d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs, une nouvelle génération de vecteurs à été mise au point, qui en plus des gènes délétés mentionnés précédemment, contiennent des gènes codants pour différents cytokines à la fois dans le système nerveux et dans d'autres tissus comme les muscles, le cœur et le foie (IL-4, 12, 10, GM-CSF) ou la molécule de co-stimulation B7.1 **(Ferrera et al., 2005; Geevarghese et al., 2010; Harrington et al., 2010; Kaufman and Bines, 2010)**.

3. Méthodes non virales

Actuellement 70% des essais cliniques sont réalisés avec des vecteurs viraux, de par leur haute efficacité de transduction/infection et d'expression du transgène. Cependant, il existe différentes approches non virales divisées en trois groupes : l'ADN nu, les approches physiques (transfection hydrodynamique, gene gun, et électroporation) ou les méthodes

chimiques, faisant appel à des composants cationiques comme les liposomes ou les polymères **(Al-Dosari and Gao, 2009; Kawakami et al., 2008)**.

Etant donné la faible capacité d'entrée et l'élimination rapide de l'ADN nu ou plasmidique dans le contexte cellulaire, l'injection directe d'ADN nu n'est réalisée que si celle-ci peut induire une activation du système immunitaire ou des effets locaux. L'ADN nu est actuellement aussi utilisé (345 essais) que les adénovirus (438 essais) ou les rétrovirus (370 essais) (**Figure 37**). Une optimisation des protocoles d'injection est cependant nécessaire pour augmenter leur efficacité sans pour autant induire de forte toxicité.

Les liposomes et les polymères cationiques sont les vecteurs non viraux plus étudiés et utilisés. En effet, grâce à leur charge positive, ils peuvent interagir directement avec l'ADN (chargé négativement) par des interactions électrostatiques et permettant la formation de lipoplexes ou polyplexes (polymères). Les lipoplexes sont capables de transporter de grandes quantités de matériel génétique, souples physiquement et chimiquement, modifiables, facilement produits en grande quantité et à faible coût, et n'induisant qu'une faible réponse immunogénique **(Simoes et al., 2005)**. Depuis leur première utilisation pour le transport de transgène, un nombre croissant de nouveaux lipides cationiques a été produit et utilisé dans des protocoles de transfection de différents types cellulaires, modèles animaux et patients **(Al-Dosari and Gao, 2009)**.

Actuellement, les lipoplexes représentent 5,9% des essais cliniques réalisés (n = 111) et pour la plupart dans des traitements de cancers et de mucoviscidose. Toutefois, en dépit des progrès réalisés l'efficacité *in vivo* de ces vecteurs reste faible, ceci étant dû aux faibles niveaux de transfection en comparaison avec les vecteurs viraux, et à la réduction considérable de leur activité biologique par les composants du sérum. De plus, l'administration systémique de lipoplexes peut induire une forte toxicité de par leur charge positive et leur tendance à l'agrégation, limitant ainsi leurs applications cliniques **(Morille et al., 2008)**.

Des efforts du point de vue de la performance et de la formulation sont réalisés afin de synthétiser de nouveaux lipides et polymères, pouvant augmenter la stabilité et l'efficacité de ces complexes avec les acides nucléiques. L'incorporation de composants hydrophiles, comme le polyéthylène glycol (PEG), permettrait notamment de masquer la charge positive des complexes, et d'augmenter le temps de circulation dans le sang et tout en réduisant la toxicité **(Neves et al., 2009)**.

4. Adénovirus et thérapie génique

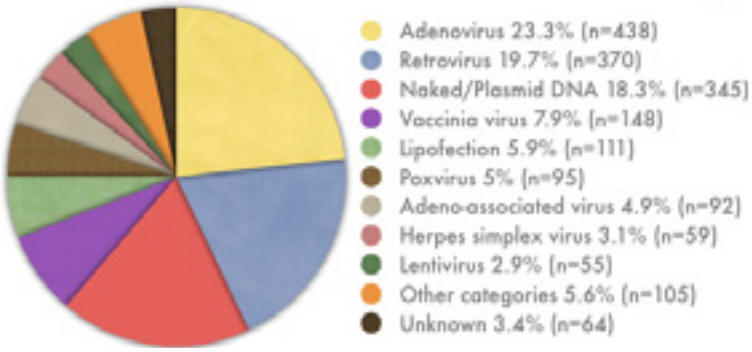


Figure 37 : Utilisation des vecteurs lors des essais cliniques de thérapie génique

Données mondiales de 1989 à juin 2012. Source : The journal of Gene Medicine, www.wiley.co.uk/genmed/clinical

De nombreuses caractéristiques des adénovirus font d'eux des vecteurs de thérapie génique intéressants. Ils sont capables d'infecter les cellules quiescentes et les cellules en division et permettent d'y exprimer de hauts niveaux de transgène de manière transitoire. Leur capacité à conserver leur ADN sous forme épisomale minimise les risques de mutations insertionnelles. Les adénovirus déficients, non réplicatifs sont classés en trois catégories : de première génération (région E1 et/ou E3 délétées), de seconde génération (délétions additionnelles dans les régions E2 et E4), et de troisième génération ou vecteurs helper-dépendant (délétions de la totalité des gènes viraux, excepté les ITR et les séquences d'encapsidation). Ces derniers n'exprimant plus de gènes viraux pouvant induire une réponse immunitaire, permettent l'expression de transgènes à long terme.

A l'inverse, les adénovirus réplicatifs conditionnels (CrAd) ou les adénovirus oncolytiques sont capables de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses et d'induire la lyse et la mort de celles-ci. Ces cellules permettent de complémenter les gènes viraux délétés, notamment E1A et E1B, et responsables de la réplication dans les cellules tumorales **(Heise et al., 2000)**. Ces dernières présentent en effet des anomalies dans les contrôles du cycle cellulaire et permettent la réplication sélective des virus.

De plus, les adénovirus peuvent être produits à haut titres infectieux (10^{13} particules/mL), permettant leur développement dans les industries de nanobiotechnologie. Grâce à leur grand potentiel, ils sont les vecteurs les plus utilisés en essais cliniques (23,3%). Ils ont également des capacités d'encapsidations élevées, de 7,5 kb pour les vecteurs de premières générations à 36 kb pour les vecteurs helper-dépendant **(Hillgenberg et al., 2001)**. Ces vecteurs pouvant

cependant être contaminés par les virus helper, l'encapsidation de celui-ci peut être empêché par l'utilisation d'un système *Cre-lox* **(Gonzalez-Aparicio et al., 2011)**.

a. Avantages et inconvénients des vecteurs adénoviraux

Au sein des adénovirus utilisés en thérapie génique, l'Ad5 est le plus étudié. En dépit de sa large utilisation, de nombreuses difficultés doivent être surmontées pour augmenter la viabilité de l'Ad5 en tant que vecteur de transfert de gène thérapeutique. En effet, pour de nombreuses cibles thérapeutiques, comme les tumeurs métastatiques disséminées, et afin de cibler le maximum d'entre elles, le mode d'administration optimale est la voie systémique. Mais, l'efficacité et la sécurité de l'Ad5 en administration intravasculaire est entravée par son tropisme hépatique, lieu d'élimination du corps humain **(Huard et al., 1995)**. En effet, les macrophages résidents du foie, les cellules de kupffer (KC) séquestrent l'Ad5 et contribuent à la réponse inflammatoire de l'hôte **(Lieber et al., 1997)**. Et une fois le système endothélial saturé, le virus est majoritairement pris en charge par les hépatocytes, réduisant ainsi la disponibilité et la capacité du virus à cibler des sites spécifiques. Néanmoins, le scepticisme prévaut dans la communauté médical, suite au décès de Jesse Gelsinger (phase I de déficience à l'ornithine transcarbamylase), suite à un syndrome de réponse inflammatoire systémique après administration intravasculaire de 3.8×10^{13} particules virales **(Raper et al., 2003)**. Cet incident à mis en évidence le manque de connaissance des interactions Ad-hôte et la nécessité de leur compréhension pour l'utilisation sûre de ce vecteur.

b. Les thérapies adénovirales

Des progrès remarquables dans la compréhension de la biologie des adénovirus ont été faits ces dernières années. Ils ont également pu être transposés du laboratoire directement en essai clinique et ont permis d'observer des succès en phase III. Dans le traitement du cancer, l'utilisation des Ad5 pour introduire le gène suppresseur de tumeur p53 est un point central des études actuelles. Par exemple, aux Etats-Unis, deux études cliniques en phase III se concentrent sur l'administration intratumorale d'Adp53 (INFN201) seul ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle pour le traitement des carcinomes squameux de la tête et du cou **(Gabrilovich, 2006; Invitrogen, 2007)**.

En plus du remplacement de gène et de la combinaison de la thérapie avec des agents chimiothérapeutiques, des thérapies suicides sont également en développement **(Barton et al.,**

2011). Ce concept permet le transfert viral d'enzyme métabolisant des pro-drogues non toxiques administrées, en agents anticancéreux actifs localement. Un essai clinique en phase III est actuellement en cours testant l'efficacité de la thérapie suicide en utilisant la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSVtk), ou la cytosine désaminase (CD), en combinaison avec la radiothérapie pour le cancer de la prostate.

Bien qu'ayant démontré une bonne capacité de transfert local, la mise au point d'un vecteur adénoviral pouvant être injecté de manière intraveineuse et spécifiquement au niveau des tissus cibles, sans pour autant induire une réponse immunitaire, reste un challenge pour de nombreuses applications. Les prochains succès seront déterminés par la compréhension des interactions du virus avec les protéines hôtes, permettant de mieux comprendre et prédire l'efficacité *in vivo*. De plus, l'accès à la pharmacocinétique et la toxicité, rendront ainsi les vecteurs ciblés plus sûrs et individualisés en fonction des applications sélectionnées.

i. Vecteurs de première génération

Les vecteurs de première génération sont obtenus par substitution de la région E1 et/ou E3 par une cassette d'expression composée d'un gène thérapeutique, d'un promoteur et d'un site de polyadénylation. Etant donné le rôle de la protéine E1 dans la réplication et dans la production de particules virales, elle est apportée en trans grâce à la production des virus dans des lignées cellulaires spécifiques, comme les HEK 293, 911, N52.E6 ou PER.C6 **(Danthinne and Imperiale, 2000)**. La région E3 code pour des protéines permettant l'échappement au système immunitaire de la cellule hôte, mais n'est cependant pas essentielle pour la réplication *in vitro* de l'adénovirus et ne nécessite donc pas de complémentation pour la production du vecteur. Les vecteurs délétés uniquement de la région E1 permettent le clonage d'ADN ayant une taille jusqu'à 5,1 kb, alors que les vecteurs délétés à la fois de E1 et E3, peuvent transporter des fragments d'ADN jusqu'à 8,3 kb **(Russell, 2009)**. Les vecteurs délétés pour E1 sont incapables de se répliquer *in vivo*. Cependant, plusieurs gènes adénoviraux sont toujours exprimés et stimulent une forte réponse inflammatoire de l'hôte, réduisant ainsi la durée de l'expression du gène thérapeutique. En effet, les cellules transduites sont éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques **(Bessis et al., 2004; Chirmule et al., 1999; Liu and Muruve, 2003; Nayak and Herzog, 2010)**.

L'ADN étranger est sous contrôle d'un promoteur hétérologue. De plus, dans le cas des délétions d'E1, une attention particulière est portée sur la conservation des séquences ITR et d'encapsidation. L'élimination d'E1 à pour effet de diminuer la transcription des gènes E2,

dépendant d'E1, et donc d'affaiblir la réplication des ADN viraux et la production des capsides virales. Ainsi la suppression des produits du gène E1B empêche également la mise en place des mécanismes de défenses contre l'apoptose. L'expression du transgène n'est cependant que transitoire suite à l'action du système immunitaire dirigé contre les antigènes de la capside virale et contre le transgène lui-même. L'une des raisons expliquant cela est que bien que réduite, l'expression du gène E2 est toujours possible dans les types cellulaires exprimant des protéines ayant des fonctions comparables à E1. De plus, ceci favorise la réplication et la synthèse d'antigènes structuraux et la production d'adénovirus compétents pour la réplication.

ii. Les vecteurs de seconde génération

Pour passer outre certains inconvénients des vecteurs de première génération, une seconde génération de vecteurs à été développée, portant des délétions supplémentaires ou des inactivations dans les régions E1 ou E3, et E4 **(Rasmussen et al., 1999)**. Ces vecteurs sont capables de transférer jusqu'à 14 kb de transgène **(Wang and Finer, 1996)**. En dépit de l'élimination de ces régions, ces vecteurs n'éliminent pas complètement le potentiel immunogène et inflammatoire des gènes résiduels. Cependant, l'expression du gène thérapeutique est réduite en comparaison avec les vecteurs de première génération, due a l'absence des gènes E2 et E4 ayant indirectement ou directement des effets sur les niveaux d'expression des gènes codés par les virus. Or, une plus faible expression de protéines virales permet également des réponses immunes et inflammatoires plus faibles, tout en ayant la même efficacité de transduction que les vecteurs de première génération.

Cette approche éliminant certains ou la totalité des gènes E2, permet la réplication de l'ADN viral, tout en éliminant la possibilité de formation de RCA. La formation de RCA peut aussi être empêchée en construisant des lignées cellulaires de production ne contenant pas de fragments de séquences adénovirales excepté E1 **(Fallaux et al., 1998; Fallaux et al., 1999)**. La réponse du système immunitaire reste cependant un obstacle majeur pour une expression persistante du transgène *in vivo* et nécessite donc des infections répétées. La production des vecteurs de première et seconde génération est essentiellement basée sur la construction de vecteurs viraux par recombinaison, qui peut être faite dans les cellules helper, bactériennes ou *in vitro*.

iii. Vecteurs de troisième génération ou « gutted »

Les vecteurs de troisième génération sont caractérisés par une délétion quasi complète du génome adénoviral et sa substitution par un ADN exogène, seules les régions requises en cis pour la réplication de l'ADN viral et l'encapsidation (ITRs et ψ) sont conservées. Ces vecteurs sont appelés « gutless » ou « gutted » ou plus précisément dépendant des helper. Ces vecteurs sont également capables de transférer jusqu'à 37 kb d'ADN exogène, et permettent le transfert de larges séquences d'ADN ou de gènes multiples **(Alba et al., 2005; Brunetti-Pierri and Ng, 2008)**.

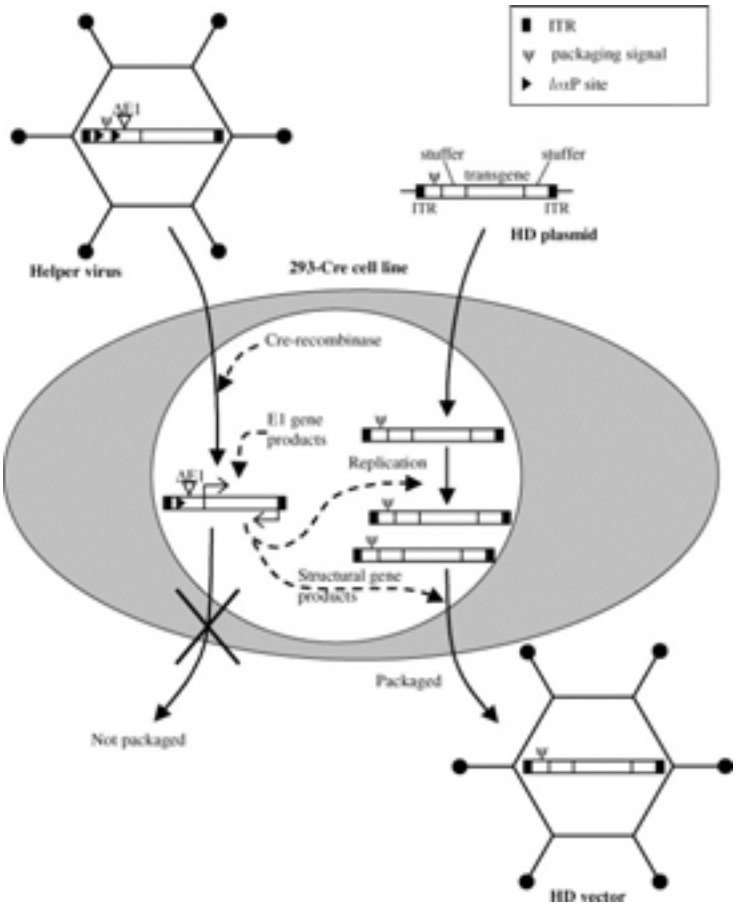


Figure 38 : Construction et production d'un vecteur adénoviral helper dépendant

Les gènes adénoviraux qui sont délétés du vecteurs helper-dépendant sont apportés en *trans* par un virus helper délété pour E1 et par une lignée cellulaire helper complémentant E1 (HEK-293). Pour limiter la propagation du virus helper, la séquence d'encapsidation de se virus est entourée de sites loxP. L'expression de la Cre-recombinase dans les cellules helper permet l'élimination de la séquence d'encapsidation et empêche la propagation du virus helper. Le vecteur helper-dépendant comporte cependant les ITR et la séquence d'encapsidation (ψ). Pour favoriser la propagation et l'encapsidation, la proportion de génome d'adénovirus sauvage éliminée est remplacée par un fragment d'ADN « stuffer » non viral. Les 293-Cre expriment stablement la Cre-recombinase.

La production des vecteurs adénoviraux requière une procédure en deux étapes, en premier la construction d'un vecteur d'ADN génomique contenant la séquence d'intérêt, puis

sa réplication et son encapsidation à l'aide de vecteur helper afin de produire des préparations virales infectieuses **(Figure 38)**. Ces vecteurs, composés uniquement des ITR viraux et de la région ψ d'encapsidation, sont construits en apportant tous les gènes nécessaires à la réplication de d'ADN viral en trans par des virus helper **(Parks et al., 1996)**.

Les vecteurs gutted peuvent être utilisés pour une expression des gènes *in vivo* à long terme **(Vetrini and Ng, 2010)**. Cependant, l'utilisation de ces virus pose également des problèmes, notamment du à des vecteurs helper contaminant ou une instabilité du vecteur. La mise au point d'un système helper Cre-lox à permis d'empêcher l'encapsidation du virus helper **(Umana et al., 2001)**.

iv. Les adénovirus oncolytiques

Les adénovirus oncolytiques, manipulables et pouvant cibler différents mécanismes anticancéreux, ont pris une importance grandissante dans les thérapies contre le cancer. En plus d'induire la mort des cellules tumorales à la fin de leur cycle lytique, ces virus sont également capables de répandre de nouveaux virions au sein même de la tumeur et d'infecter les autres cellules cancéreuses. Ils sont donc très efficaces pour le traitement de grosses tumeurs et de métastases. Après tests cliniques de ces Ad oncolytiques de « première génération », de nouvelles approches ont permis le développement de seconde et troisième génération d'Ad oncolytiques augmentant encore l'efficacité thérapeutique dans les tissus néoplasiques **(Liu et al., 2007)**. Ceux-ci permettent le transfert du gène thérapeutique tout en potentialisant les mécanismes antitumoraux d'un seul vecteur.

Par exemple, les Ad oncolytiques associés à des nanocomplexes sont capables d'augmenter la spécificité des virus contre les cellules cancéreuses avec des effets secondaires limités. Plusieurs stratégies de développement d'Ad oncolytiques plus puissants sont en développement et focalisent sur la maximisation de l'effet lytique des Ad. Ces stratégies incluent la coexpression de transgènes thérapeutiques, l'augmentation du rayon d'action viral dans les tissus tumoraux, ou d'administration systémique d'Ad couplés à des nanocomplexes, permettant de les protéger du système immunitaire et de prolonger leur durée de vie.

Parmi ces adénovirus oncolytiques, les CRADs (conditionally replicating adenoviruses) permettent une sélectivité pour des cellules tumorales. Plusieurs études cliniques ont permis de mettre en évidence un profil de sécurité favorable. Notamment l'Onyx-015, hybride entre les Ad2 et 5 et contenant des délétions dans la région E1B-55K, une protéine bloquant p53 et

permettant la synthèse de l'ADN et la réplication virale. Il fut le premier virus oncolytique utilisé en thérapie humaine contre le cancer, et développé pour détruire sélectivement les cellules présentant un p53 inactif **(Bischoff et al., 1996)**.

L'Ad5-delta24-RGD possède une séquence RGD incorporée dans le bouton de la fibre, modification qui a permis une augmentation de l'efficacité du transfert de gène dans les cellules de cancers ovariens via l'interaction avec les intégrines. Les virus oncolytiques sont capables de perturber de nombreux effecteurs et points de contrôle de la cellule, en agissant sur p53, mdm2 ou Rb, et de les influencer de manière à permettre au virus de compléter son cycle viral.

VI. L'ARN interférence

1. Généralités

L'ARN interférence (ARNi) à été découvert en 1998 et a révolutionné la régulation des gènes. Premièrement, l'ARN double brin a été identifié comme effecteur de l'ARN interférence **(Fire et al., 1998)**. Peu de temps après, les siARN (small interfering RNAs) ont été mis en évidence dans les plantes et dont la capacité à réguler les cellules mammifères est médiée par un clivage endonucléolytique séquence dépendant de l'ARNm **(Hamilton and Baulcombe, 1999; Zamore et al., 2000)**.

En 2001, des siARN synthétiques ont été utilisés pour la première fois, afin d'éteindre l'expression d'un gène, permettant de mettre en évidence les mécanismes d'ARNi, introduisant ainsi de potentielles applications au développement de cette technique **(Elbashir et al., 2001)**. Depuis cette période, l'extinction sélective de gènes par détournement des voies d'ARNi endogènes par l'intermédiaire de structures synthétiques a pris une forte ampleur, que ce soit pour l'étude de la fonction d'un gène, ou pour le développement de stratégies thérapeutiques.

L'ARN interférence est un mécanisme endogène de dégradation spécifique de l'ARN messager cible à l'aide de petits ARN double brin (dsARN), qui empêche ainsi la traduction de la protéine codée par celui-ci. Les petits ARNs incluent les miARN endogènes, les siARN et shARN exogènes. En tant qu'initiateurs de l'ARN interférence (ARNi), ils sont de surcroit conçus de manière à contenir un de leurs deux brins complémentaire avec l'ARNm ciblé (appelé brin guide, ou antisense), et un autre brin lui étant complémentaire (appelé brin

passager, ou sense). En fonction de l'espèce, il existe différentes formes d'ARNi, incluant la voie des microARN (miARN), le silencing transcriptionnel de gènes, et le silencing post transcriptionnel de gènes. Ce processus est fortement conservé durant l'évolution et hautement dépendant de la séquence des gènes ciblés. De nombreuses protéines clefs facilitent l'ARNi, incluant Dicer et les protéines Argonaute (Ago).

L'ARNi de par sa spécificité, son adaptabilité, et sa capacité de ciblage, présente un fort potentiel pour la thérapie génique, notamment contre le cancer. Etant donné la difficulté à inhiber certaines cibles avec des petites molécules thérapeutiques, des protéines recombinantes, et des anticorps monoclonaux, l'ARNi est une approche alternative révolutionnaire.

2. Mécanisme

Le mécanisme d'ARN interférence peut être activé suite à la prise en charge de petits fragments d'ARN double brin (d'environ 22nt), appelé siARN (small interfering RNAs), par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Celui-ci sépare les deux brins, et le brin guide coordonne le clivage de l'ARNm cible par Argonaute **(Zamore et al., 2000)**.

Dans les cellules mammifères, les siARN sont produits par la ribonucléase Dicer suite à une transformation endonucléolytique des longs ARN double brins exogènes introduits **(Jinek and Doudna, 2009)**. Dicer est une endonucléase de la famille des RNase III, permettant la production de duplex d'ARN d'environ 21 à 25 nt de long, portant des extrémités sortantes caractéristiques. La longueur du duplex du siARN et ses extrémités sortantes sont des attributs nécessaires pour une reconnaissance correcte par le complexe RISC et son intégration à ce même complexe. De plus, des études récentes montrent que la prise en charge du duplex de siARN par Dicer est elle-même reliée à la formation du complexe RISC. En effet, Dicer s'associe en premier lieu avec TRBP (human immunodeficiency trans activating response RNA-binding protein) lors de la formation du complexe RISC **(Gregory et al., 2005; MacRae et al., 2008)**.

Le composant principal et l'acteur majeur du complexe RISC est la protéine Argonaute (Ago). Ces protéines Ago humaines sont au nombre de quatre (AGO 1 à 4), et l'extinction par les siARN est notamment médiée par AGO2 **(Hutvagner and Simard, 2008)**. Afin d'exercer son action via les siARN, AGO2 doit se lier au brin guide, tout en éliminant le brin passager.

Plusieurs études structurales ont permis d'identifier les mécanismes d'action d'AGO2, qui porte trois domaines fonctionnels, PAZ, MID et PIWI. Ce dernier domaine PIWI, présente une activité RNase H et donne à AGO2 sa fonction de clivage **(Song et al., 2004)**. Les extrémités terminales du siARN font office d'ancre et permettent le chargement de celui-ci sur le complexe RISC **(Figure 39)**. De plus, l'extrémité 3' est reconnue spécifiquement par le domaine PAZ d'AGO2. De surcroit, AGO sélectionne le brin ayant l'extrémité 5' la moins stable thermodynamiquement, c'est-à-dire le brin guide, et découpe le brin passager pour permettre son élimination du complexe **(Schwarz et al., 2003)**.

Au sein du complexe RISC, les bases 2 à 8 du brin guide incorporé, sont accessibles à l'appariement watson-crick avec l'ARNm cible. Cette région appelée « seed » est essentielle pour la reconnaissance spécifique de la cible et permet l'alignement des groupes phosphates cibles avec le site actif de clivage d'AGO **(Parker et al., 2005)**. Cependant, l'appariement de la cible avec les nucléotides 10 et 11 du brin guide est également crucial pour l'orientation et le clivage des groupes phosphates **(Chiu and Rana, 2002)**.

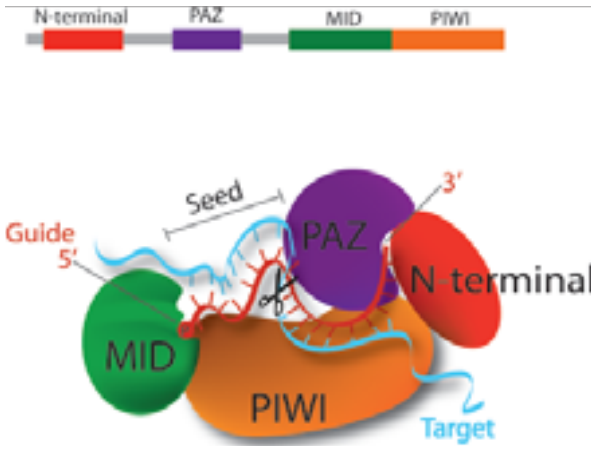


Figure 39 : Modèle de reconnaissance et dégradation de l'ARNm cible via AGO2

Le groupe monophosphate 5' du brin guide s'ancre entre les domaines MID et PIWI d'AGO2, alors que le domaine PAZ permet la reconnaissance de l'extrémité dinucléotide en 3'. Ce positionnement permet l'accessibilité de la séquence seed (nt 2 à 8 du brin guide) à l'appariement avec l'ARNm ciblé avec les nucléotides 10 et 11. Ainsi l'orientation correcte des groupes phosphates entre ces deux appariements permet leur clivage par le domaine PIWI d'AGO2. D'après **(Gavrilov and Saltzman, 2012)**.

Au sein du complexe RISC, les bases 2 à 8 du brin guide incorporé, sont accessibles à l'appariement watson-crick avec l'ARNm cible. Cette région appelée « seed » est essentielle pour la reconnaissance spécifique de la cible et permet l'alignement des groupes phosphates cibles avec le site actif de clivage d'AGO **(Parker et al., 2005)**. Cependant, l'appariement de la cible avec les nucléotides 10 et 11 du brin guide est également crucial pour l'orientation et le clivage des groupes phosphates **(Chiu and Rana, 2002)**.

La machinerie d'ARNi peut également être mise en route par des petites molécules d'ARN codées de manière endogène, les microARN (miARN) **(Carthew and Sontheimer, 2009)**. Les précurseurs des miARN, les ARN primaires (pri-miARN) sont produits dans le noyau, et sont transformés par l'enzyme de la famille des RNase III, Drosha, en miARN précurseurs (pre-miARN) ayant une forme en épingle à cheveux. Sous cette forme, ils présentent deux bras appariés liés par une boucle, un groupement phosphate en 5' et une extrémité 3' composée de deux nucléotides. Ces pré-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5, où ils sont raccourcis par Dicer, afin d'éliminer la boucle et d'élaborer un duplex ayant les mêmes caractéristiques que les siARN, lors de leur chargement au sein du complexe RISC **(Krol et al., 2010)**.

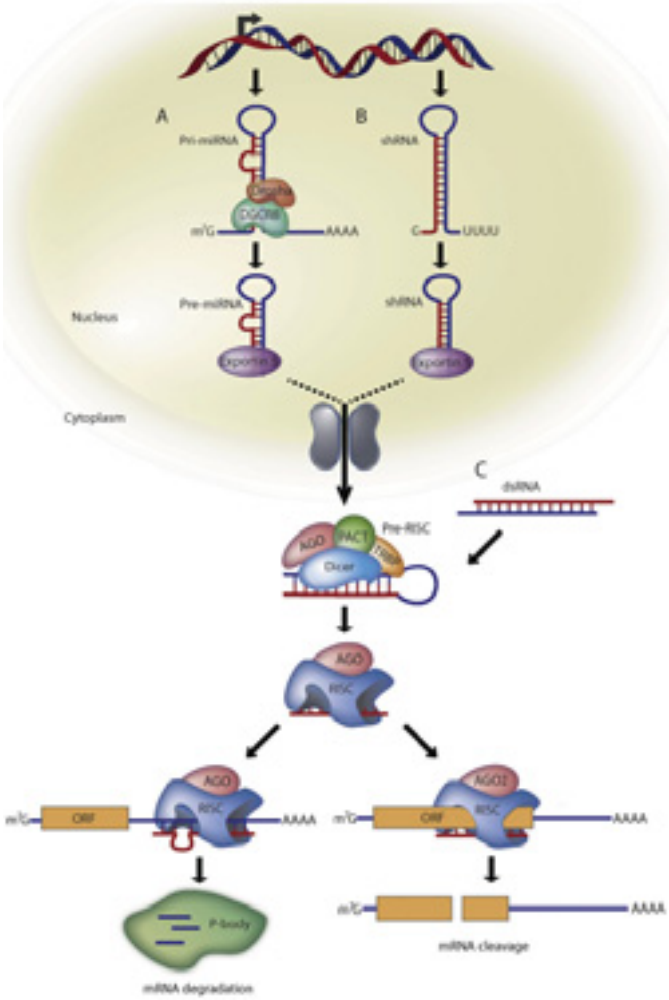


Figure 40 : Schéma de l'extinction des gènes post-transcriptionnelle

(A) Les miARN sont introduits, soit sous forme plasmidique, soit apporté par un vecteur viral en tant que pri-miARN (miARN primaire) puis sont transformés par Drosha et DGCR8 en un précurseur de 70 nt, le pre-miARN. Il est ensuite transporté au cytoplasme par l'exportine 5 (dsRNA-binding protein), où il est prit en charge par le complexe Dicer/TRBP et coupé en miARN duplex de 22 nt. Celui-ci s'associe avec une protéine AGO et est prit en charge par le complexe RISC, où le brin passager est éliminé et le brin guide est conservé pour cibler l'ARNm. Le complexe RISC va alors éteindre l'expression du gène cible soit par inhibition de la traduction, soit par transport vers les processing bodies (p-bodies) où l'ARNm est déadénylé et dégradé. **(B)**

Comme les miARN, les shARN sont transcrits à partir d'ADN exogène et passent par la même voie de prise en charge. Cependant, la complémentarité parfaite entre le brin guide et l'ARNm ciblé permet le clivage médié par AGO2 et la destruction de l'ARNm cible. **(C)** A l'inverse, les siARN sont introduits artificiellement dans le cytoplasme, puis suivent les mêmes étapes que les siARN et les shARN. D'après **(Burnett and Rossi, 2012)**

A l'inverse des siARN, les miARN peuvent être partiellement ou totalement complémentaires à la région 3' UTR de l'ARNm cible. Les miARN sont également capables d'induire le clivage des ARNm et leur dégradation comme les siARN, mais peuvent également permettre une extinction de l'expression d'un gène via répression de la traduction et la détérioration de l'ARNm par déadénylation **(Bagga et al., 2005)**.

3. Les petits ARN interférents

a. Les miARNs

Les microARN (miARN) sont une classe de petites molécules d'ARN non codantes hautement conservées, jouant un rôle indispensable dans la régulation des fonctions cellulaires de manière à la fois physiologique et pathologique. Les miARN sont transcrits initialement à partir de l'ADN génomique comme transcrit primaire (pri-miARN) à partir de précurseurs généralement localisés soit dans les régions intergéniques, soit dans les introns des gènes codant des protéines. De plus, chaque transcrit pri-miARN peut contenir plusieurs boucles de pre-miARN **(Bartel, 2004)**. Après transformation par l'endonucléase RNase III, Drosha, le pre-miARN est exporté au cytoplasme et subit un second clivage par une autre RNase III, Dicer. Ce second clivage permet de produire un long miARN mature composé d'un brin guide et d'un brin passager, contenant des mésappariements au site de clivage du brin passager par AGO2.

Le miARN mature est incorporé au complexe RISC afin d'induire une répression de la traduction avec dégradation du miARN cible et séquestration dans les P-bodies cytoplasmiques **(Liu et al., 2005)**. A l'inverse des siARN et des shARN, qui requièrent une complémentarité parfaite avec l'ARNm cible, les miARN induisent typiquement des inhibitions de la traduction ou des dégradations en se liant au 3' UTR de l'ARNm. En conséquence, le changement dans l'expression d'un simple miARN est capable d'agir sur une centaine de gènes différents étant donné le panel de ciblage offert par celui-ci **(Chang et al., 2008)**. Récemment, il a été montré que les miARN peuvent également lier des régions codantes **(Tay et al., 2008)** ou la région 5' UTR **(Lytle et al., 2007)**. De plus, ils peuvent

également se fixer sur une combinaison de sites pouvant inhiber l'expression des gènes, mais cependant dans une moindre mesure par rapport au 3' UTR.

En complément de l'extinction de l'expression de gènes cibles, les miARN peuvent aussi encourager la traduction des protéines en se liant au 5' UTR de l'ARNm **(Lytle et al., 2007)**. Ils ont aussi la capacité de se lier à l'ADN et de réguler l'expression de gènes. Par exemple, miR-373 est capable d'activer l'expression de gène en se liant au promoteur des séquences de l'E-cadhérine et CSDC2 (cold-shock domain-containing protein) **(Place et al., 2008)**. Ces observations ont permis d'étendre la région d'action des miARN et de diversifier leur rôle régulateur.

b. Les miARNs artificiels

Figure 41 : Représentation schématique d'un miARN artificiel

Les miARN artificiels ressemblent aux miARN naturels par leurs caractéristiques, incluant les boucles, les mismatchs internes, les séquences flanquantes, mais sont généralement exprimés sous le contrôle d'un promoteur ARN polymérase II. D'après (**Liu and Berkhout, 2011)**

De structure comparable aux shARNs, les miARNs artificiels sont conçus pour présenter un brin guide totalement complémentaire à l'ARNm ciblé, induisant ainsi son clivage **(Figure 41)**. Ils sont exprimés à partir de promoteurs ARN polymérase II **(Lee et al., 2004)**. Ces derniers permettent un contrôle spatial et temporel de l'expression des ARN interférents et sont utilisés pour la construction de système d'expression pour les applications *in vitro* et *in vivo* **(Rao et al., 2010)**. Ce contrôle permet d'éviter les effets secondaires constatés avec les siARN et les shARN, tels que les réponses immunitaires et la toxicité **(Kleinman et al., 2008; Sledz et al., 2003)**.

En effet, l'apparition d'effets secondaires est dose dépendant, se manifestant au-delà d'un certain seuil, et suggèrant une dose maximale de petits ARN interférents au sein des cellules. Les facteurs impliqués sont notamment l'exportin-5 et AGO2, qui peuvent être saturés par l'afflux massif des miARN artificiel après expression via un plasmide, et provoquer une perturbation globale des mécanismes d'ARN interférence endogène **(Grimm et al., 2010)**.

c. Les siARN

Les siARN synthétiques sont les premiers outils d'ARNi à avoir été introduits dans les cellules mammifères **(Elbashir et al., 2001)**. Ces petits ARN sont incorporés directement dans le complexe RISC, où ils guident et clivent l'ARNm complémentaire. Après dégradation et libération de l'ARNm ciblé, le brin guide lié au complexe RISC se lie à un autre ARNm et débute un nouveau cycle de clivage.

Les siARN sont capables de cliver l'ARN cible à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau **(Robb et al., 2005)**. Cette machinerie de suppression permet à un siARN bien conçu d'exercer son action à des concentrations *in vitro* picomolaires. Cependant, des limitations existent pour leurs utilisations *in vivo*. Tout d'abord, les siARN sont sensibles aux nucléases présentes dans le plasma, et doivent être protégés avant injection dans les tissus cibles. De plus, de par leur sensibilité et la dégradation qui en résulte, ainsi que leur production non endogène, les injections de siARN doivent être répétées. Or, leur pharmacocinétique est caractérisée par une demi-vie courte et une élimination rapide. C'est pourquoi des modifications chimiques des siARN sont requises pour augmenter la stabilité et le temps de circulation. Ces dernières engendrent cependant des couts élevés et représentent donc un facteur limitant à l'application clinique des siARN.

d. Les shARN

Les short-hairpin ARN (shARN) sont une alternative aux siARN et ont été développés pour permettre un silencing à long terme **(Miyagishi and Taira, 2002; Yu et al., 2002)**. Ces shARN sont transcrits dans le noyau à partir d'un vecteur d'expression portant une séquence courte d'ADN double brin et contenant une boucle. Le shARN est ensuite transformé et pris en charge par RISC dans le cytoplasme, suivant le même schéma que les siARN. De la même manière, l'homologie entre le brin guide et l'ARNm cible, détermine la régulation de l'expression post transcriptionnelle par le shARN. Plus précisément, le clivage de l'ARNm, la dégradation de l'ARNm ou l'inhibition de la traduction. Les propriétés du promoteur sont cruciales pour obtenir un système d'expression du shARN efficace. Les promoteurs polymérase III, incluant U6 **(Miyagishi and Taira, 2002; Yu et al., 2002)** et H1 **(Brummelkamp et al., 2002)**, sont notamment utilisés pour permettre l'expression des shARN. Etant donné l'absence de contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes par les promoteurs polymérase III, et leur impossibilité à entrer en compétition pour les

mécanismes d'export nucléaire endogène, ils sont utilisés pour la construction de système d'expression pour les applications *in vitro* et *in vivo* **(Rao et al., 2010)**.

4. Applications et challenges

L'intérêt principal de l'ARNi est sa capacité à détourner la machinerie endogène afin d'éteindre l'expression d'un gène cible de manière artificielle. Le complexe RISC est activé et recruté suite à l'introduction d'un effecteur actif de l'ARNi, et permet l'extinction spécifique de la cible choisie. Les siARN sont conçus en se basant sur la séquence de l'ARNm du gène d'intérêt, et sont actuellement la stratégie privilégiée de ciblage dans les cellules mammifères.

Le potentiel d'extinction peut être appliqué à la conception d'agents thérapeutiques pour de nombreuses maladies causées par un ou différents gènes, notamment les anomalies génétiques, les maladies induites par les virus, les maladies auto-immunes et les cancers **(Aagaard and Rossi, 2007)**. Cependant, alors que les miARN ne sont pas aussi malléables que les siARN, beaucoup de miARN endogènes peuvent être des oncogènes et servir eux même de cibles thérapeutiques **(Hammond, 2006)**. Cette hypothèse est ainsi intégrée dans la conception de thérapies **(Bertrand et al., 2002)**. Le brin guide des siARN peut être recyclé pour différents cycles de clivages d'ARNm.

L'efficacité de l'extinction de gènes par ARNi peut varier fortement via l'intervention de nombreux facteurs. En effet, de nombreuses interactions spécifiques sont impliquées, en faisant notamment appel à des procédés biologiques endogènes complexes, entre des molécules effectrices et la machinerie naturelle endogène. La compréhension claire de ces interactions est indispensable à la conception de siARN, en prenant en compte la stabilité thermodynamique finale **(Song et al., 2005)**, l'accessibilité de la cible **(Heale et al., 2005)**, les caractéristiques dues à la position de la cible et les attributs structuraux **(Kim et al., 2005)**.

L'utilisation thérapeutique des siARN est extrêmement prometteuse de par l'efficacité et la spécificité de l'extinction des gènes, démontrées à la fois dans des études *in vivo* et *in vitro*. Néanmoins, leur application plus large nécessite de surmonter différentes barrières intracellulaires et extracellulaires. En effet, les siARN sont très sensibles à la dégradation par les enzymes circulantes dans le sérum et les tissus, et la demi-vie des siARN nus dans le sérum oscille entre quelques minutes à une heure **(Behlke, 2006)**. C'est pourquoi, le grand challenge est l'accumulation de niveaux thérapeutiques suffisants de siARN au site cible **(Guo et al., 2010)**. Pour être efficace, les siARN ne doivent pas être dégradés dans le sérum

mais également être capables de rejoindre les cellules cibles au sein de tissus spécifiques. D'autres obstacles doivent également être surmontés, tels que la taille et la charge négative des siARN, afin de permettre leur diffusion à travers la membrane plasmiques et d'empêcher l'accumulation intracellulaire. Enfin, une fois entrés dans le cytoplasme, les siARN sont sensibles à la dégradation par les RNAses intracellulaires, et doivent également être reconnus et incorporés au complexe RISC.

Le plus grand obstacle à l'utilisation *in vivo* des siARN est son introduction dans différents types cellulaires, tissus ou organes **(Aagaard and Rossi, 2007; Behlke, 2006)**. Des progrès ont donc été réalisés dans les stratégies d'introduction des siARN, tels que les modifications chimiques, les formulations par liposomes, et les nanoparticules. Actuellement 22 thérapies siARN/shARN sont en phase clinique, ciblant 16 maladies **(Burnett and Rossi, 2012)**. Et les méthodes d'injection peuvent notamment être classées en différentes catégories : *ex vivo*, locale, et systémiques (actives - ciblées ou passives).

5. Utilisation des l'ARN interférence pour les thérapies anticancéreuses

Le cancer est une maladie caractérisée par une résistance à la mort, une prolifération anormale, une réparation cellulaire aberrante, et la différenciation des cellules. Il est le résultat d'une accumulation à long terme d'altérations génétiques et épigénétiques.

Grâce à leur solidité et leur stabilité, les siARN et les shARN sont largement utilisés pour l'extinction de gènes dérégulés et associés au développement des cancers. En effet, de nombreuses études cliniques présentent un retour positif suite à l'extinction de gènes critiques pour la croissance de tumeurs, de métastases, l'angiogénèse et la résistance aux chimiothérapies. Par exemple, dans les cancers métastatiques du pancréas, qui sont parmi les cancers les plus meurtriers, le gène PDX-1 (pancreatic duodenal homebox-1) est surexprimé **(Liu et al., 2011)**. Dans le pancréas, PDX-1 assure le fonctionnement des cellules beta en régulant l'insuline et le transport de glucose. Son extinction par un shARN exprimé à partir d'un vecteur plasmidique injecté de manière intrapéritonéale permet d'inhiber la croissance tumorale.

Dans les stades avancés de cancer de la prostate, les cellules tumorales provoquent fréquemment des métastases osseuses ou lymphatiques. Une injection systémique de siARN ciblant EZH2 ou p110-alpha et formulés avec de l'atelocollagène, à été développée pour les métastases osseuses dans des modèles de souris xénogreffées. Après 28 jours de traitement, la

croissance tumorale à été stoppée dans les souris tr aitées, en comparaison avec les souris contrôles, sans toutefois provoquer d'augmentation de la réponse immunitaire **(Minakuchi et al., 2004)**.

De plus, d'autres études ont montrées l'efficacité des shARN et des siARN pour les cancers de la prostate et du sein **(Ryo et al., 2005)**, dans des tumeurs métastatiques en agissant sur l'VEGF (vascular endothelial growth factor) **(Takei et al., 2004)**, ou encore des cancers du poumon **(Singh et al., 2008)**.

VII. Introduction au projet de thèse

La thématique centrale de notre équipe est la compréhension des mécanismes d'induction du cancer du col de l'utérus, par des approches structurales et fonctionnelles. Comme souligné dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit de thèse et en dépit des progrès réalisés en matière de prévention et de dépistage du cancer du col de l'utérus, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques reste cependant nécessaire. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse.

Les papillomavirus humains sont les agents étiologiques majeurs dans la progression vers le cancer du col de l'utérus. Les protéines E6 et E7 sont les clefs de voute de l'induction du processus de carcinogénèse. Notre équipe a pu mettre au point et optimiser les méthodes de production de la protéine E6, et ainsi obtenir les structures RMN des domaines C-terminal et N-terminal de la protéine E6 **(Nomine et al., 2006; Zanier et al., 2012)**. De plus, un mutant dominant négatif de 16E6, F47R, a été identifié. Il est capable d'induire la sénescence des cellules HPV positives et de rehausser le haut niveau de la protéine suppresseur de tumeur, p53 **(Ristriani et al., 2009)**. L'inhibition de la protéine E6 et/ou E7 afin de restaurer les points de contrôle du cycle cellulaire via l'augmentation de l'expression de la protéine p53 fait partie des stratégies thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus. Il est également possible d'agir sur la dégradation de p53 en empêchant son interaction avec E6AP via l'utilisation d'anticorps, ou encore de le protéger de l'ubiquitination et donc de la dégradation.

Les petits ARN interférents sont cependant les petites molécules les plus utilisées dans le ciblage d'E6. L'ARN interférence (ARNi), à l'origine utilisé par les plantes comme moyen de défense contre les infections virales, peut être initié dans les cellules mammifères grâce à l'introduction de petits ARN interférents. Ce mécanisme est basé sur l'extinction de gènes post-transcriptionnelle et séquence spécifique, induite par la reconnaissance d'ARN double

brin (dsARN). Etant donné sa forte conservation dans de nombreuses espèces, il permet à la fois des applications thérapeutiques et des analyses fonctionnelles d'un gène au sein d'une cellule ou d'une voie de signalisation.

De nombreuses maladies sont dues à une dérégulation de l'expression des gènes, de ce fait, l'utilisation de l'ARNi est devenue une puissante méthode thérapeutique contre des maladies telles que le cancer, les infections et les affections respiratoires. L'introduction de petits ARN interférents dirigés contre les protéines E6 et/ou E7 permet la dégradation de l'ARN messager cible et l'inhibition de sa traduction, annulant ainsi les effets de ces deux protéines virales. Ces stratégies de ciblage présentent néanmoins des limitations quant à leur introduction et à leurs actions dans les cellules et tissus cibles. En effet, un petit ARN interférant introduit dans une cellule est soumis à la dégradation par des enzymes circulantes dans le sérum et les tissus, et présente par conséquent une demi-vie relativement réduite. Cette dégradation empêche l'accès de la thérapie au site cible. La taille et la charge des ces petits ARN interférents sont également des facteurs pouvant devenir des obstacles aux effets thérapeutiques. Pour outrepasser les difficultés rencontrées par les petits ARN interférents dans une démarche d'inhibition, ceux-ci peuvent être introduits dans les cellules mammifères par le biais de vecteurs viraux. Ils deviennent ainsi à la fois cargos cellulaires et systèmes d'expression de ces petits ARN interférents. Les vecteurs viraux présentent de nombreux avantages, notamment la capacité à transduire les cellules mammifères quiescentes ou en division, et permettant ainsi une entrée efficace des petits ARN interférents et l'extinction du gène ciblé dans différents types cellulaires.

Mon projet de thèse s'est donc focalisé sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques visant au ciblage des oncoprotéines E6 et E7, par le biais de la combinaison de deux approches, qui sont l'ARN interférence et les vecteurs adénoviraux. Les vecteurs adénoviraux sont les plus utilisés actuellement dans les essais cliniques de thérapie génique, notamment grâce à leur stabilité, l'absence d'intégration génomique et leur production aisée à hauts titres. De nombreuses vecteurs adénoviraux sont disponibles, notamment des versions défectives non réplicatives, dont les régions non essentielles à la réplication du génome viral sont délétées et remplacées par une cassette d'expression d'un transgène.

Mon sujet de thèse s'est donc porté sur l'élaboration d'une stratégie adénovirale d'expression de petits ARN interférents, notamment des miARN artificiels dirigés contre E6 et/ou E7. Cette combinaison de deux approches complémentaires avait pour but le ciblage

efficace des oncoprotéines impliquées dans la carcinogénèse. Cette restauration des contrôles du cycle cellulaire, à pour but l'induction la mort des cellules tumorales *in vitro* et l'application *in vivo* des thérapies développées dans des modèles de souris nude xénogreffées. Enfin, dans un dernier volet, nous avons abordé l'extension de la stratégie thérapeutique sur d'autres types cellulaires issus de cancers HPV positifs, mais également via l'expression de nouveaux miARN artificiels ciblant d'autres oncoprotéines virales.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. Lignées cellulaires

Nom	Description	Caractéristiques
293 A	Cellules primaires embryonnaires humaines de rein	Transformées par l'ADN de l'Ad5 (segment allant du nucléotide 1 au 4344), expression des protéines E1A et E1B d'une partie de l'a protéine pIX de l'Ad5
C33A	Cellules dérivées de carcinomes du col utérin	HPV négatives, expression d'une protéine de pRB de taille anormale et d'une protéine p53 mutée (R273C)
CaSki	Cellules métastatiques dérivées de carcinomes du col utérin	HPV 16 positives (environ 600 copies par cellules)
HaCaT	Kératinocytes humains immortalisés	HPV négatives
HeLa	Cellules dérivées d'adénocarcinomes du col utérin	HPV 18 positives, expression faible de p53, mais normale de pRB
MCF7	Cellules dérivées d'adénocarcinomes humains de sein	
SCC90	Cellules d'origine orolaryngée	HPV 16 positives, p53 sauvage
SiHa	Cellules dérivées de carcinomes du col utérin	HPV 16 positives (1 à 2 copies par cellules) p53 et pRB positive
SQ20B	Cellules d'origine laryngée	HPV négatives, p53 mutée

2. Plasmides

Nom	Gene de résistance	Promoteurs	Description
pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR	Spectinomycine	CMV et EM7	Vecteur d'expression de la technique de clonage Gateway, permet la ligation des séquences codantes des miARN et contenant les sites *att*B1 et B2
pcDNA-BsaI	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression avec la séquence : TGCTGGAGACCTGCAGGGTCTCG, fermant le plasmide et permettant son amplification
pcDNA 16_1	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression avec la séquence codante du miARN dirigé contre 16E6 : GAGCTGCAAACAACTATACAT
pcDNA 16_2	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression avec la séquence codante du miARN dirigé contre 16E6 : AATCCATATGCTGTATGTGAT

pcDNA 18_1	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression avec la séquence codante du miARN dirigé contre 18E6 : ACCCTACAAGCTACCTGATCT
pcDNA 18_2	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression, exprimant le miARN dirigé contre 18E6 : TGTATGGAGACACATTGGAAA
pcDNA LacZ	Spectinomycine	CMV et EM7	Produit de la ligation du vecteur d'expression avec la séquence codante du miARN dirigé contre LacZ : GACTACACAAATCAGCGATTT
pDONR^{TM} 221	Kanamycine	EM7 et T7	Vecteur donneur de la technique de clonage Gateway et contenant les sites *att*P1 et P2
pEXP-BP-BsaI	Kanamycine	EM7 et T7	Produit de la recombinaison entre pDONR^{TM} 221 et pcDNA-BsaI, qui une fois digéré par BsaI, permet une ligation directe des séquences codantes pour mes miARN.
pAd/CMV/V5 Dest	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur de destination de la technique de clonage Gateway, exprimant le génome wild-type de l'Ad5 délété des régions E1 et E3 et contenant les sites *att*R1 et R2
pAd 16_1	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur adénoviral, produit de la recombinaison LR, exprimant le miARN 16_1 dirigé contre 16E6
pAd 16_2	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur adénoviral, produit de la recombinaison LR exprimant le miARN 16_2 dirigé contre 16E6
pAd 18_1	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur adénoviral, produit de la recombinaison LR exprimant le miARN 18_1 dirigé contre 18E6
pAd 18_2	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur adénoviral, produit de la recombinaison LR exprimant le miARN 18_2 dirigé contre 18E6
pAd LacZ	Ampiciline	CMV et T7	Vecteur adénoviral, produit de la recombinaison LR exprimant le miARN LacZ dirigé contre la beta-galactosidase.

3. Anticorps

Anticorps	Clone	Origine	Dilution Western Blot	Dilution Immunofluorescence	Fournisseur
16 E6	6F4	Monoclonal de souris	1/500		IREBS
18 E6	395	Monoclonal de souris	1/1 000		
Actine		Polyclonal de lapin	1/1 000		
Anti-IgG lapin HRP-Linked		Mouton	1/10 000		GE Healthcare
Anti-IgG souris HRP-Linked		Mouton	1/10 000		GE Healthcare
Caspase-3	#9662	Polyclonal de lapin	1/1 000	1/200	Cell Signaling
Caspase-3 clivée	#9664	Monoclonal de lapin	1/1 000	1/400	Cell Signaling
Caspase-7	#9242	Polyclonal de lapin	1/1 000	1/200	Cell Signaling
Caspase-7 clivée	#9491	Polyclonal de lapin	1/1 000		Cell Signaling
Caspase-9	#9502	Polyclonal de lapin	1/1 000		Cell Signaling
Caspase-9 clivée	#9501	Polyclonal de lapin	1/1 000		Cell Signaling
p21	C-19	Polyclonal de lapin	1/1 000		Santa Cruz
p53	DO-1	Monoclonal de souris	1/1 000		Santa Cruz
PARP	#9542	Polyclonal de lapin	1/1 000		Cell Signaling
PARP clivée	#5625	Polyclonal de lapin	1/1 000	1/200	Cell Signaling

II. Méthodes

1. Introduction au clonage par la méthode gateway

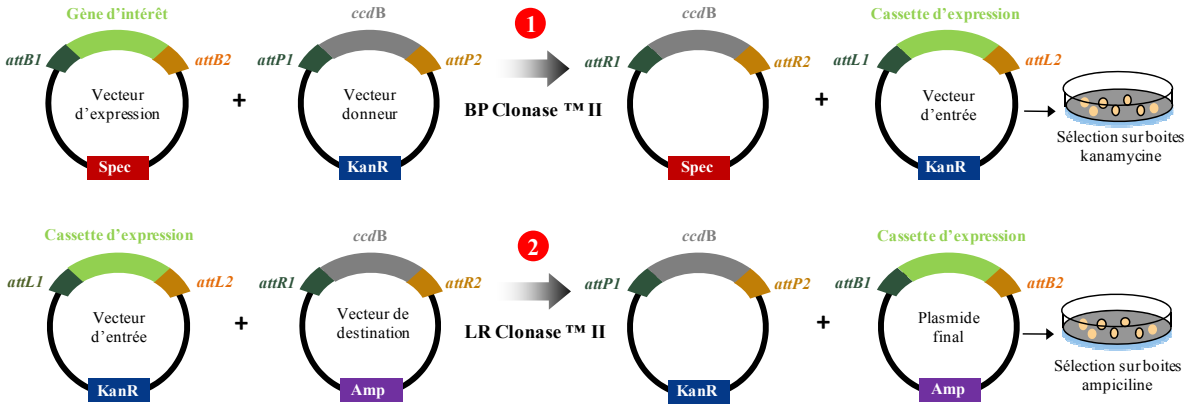


Figure 42 : Schéma récapitulatif du clonage gateway

Cette technique de clonage par gateway, mis au point par Invitrogen, a prit de l'ampleur et permet le transfert d'un miARN ou d'un transgène au sein de cellules mammifères à l'aide de vecteurs viraux. Elle permet entre autre de faciliter et de minimiser le nombre d'étapes nécessaires pour obtenir des vecteurs viraux comme les adénovirus ou les lentivirus. Cette technique est basée sur le système de recombinaison site spécifique du phage lambda et permet la conservation de l'ensemble de la séquence du transgène.

Les propriétés de recombinaison site spécifique du bactériophage lambda permettent le transfert d'un transgène d'un vecteur à un autre par deux étapes. Les sites de recombinaison du phage sont nommés *attP1* et *attP2*, tandis que les sites flanquant le transgène à transférer sont nommés *attB1* et *attB2*, différents l'un de l'autre. La site spécificité permet également une directionnalité et fait en sorte qu'un *attB1* ne puisse recombiner qu'avec un *attP1*. Cette recombinaison à lieu grâce une enzyme d'intégration particulière nommée Clonase.

La première étape du clonage consiste en l'ajout des séquences de recombinaison *attB1* et *attB2* de part de d'autre du transgène. Cet ajout peut se faire de deux manières, par PCR ou par clonage du transgène au sein d'une cassette d'expression contenant déjà les sites de recombinaison. La première étape de recombinaison se fait grâce à l'enzyme BP clonase II permettant le transfert du transgène à partir du vecteur d'expression, ou de l'ADN de départ, vers un vecteur donneur.

Au cours de la seconde étape, le vecteur d'entrée résultant recombine grâce à ses sites de recombinaison *attL1* et *attL2* avec un vecteur de destination adénoviral via l'action de l'enzyme d'intégration LR clonase. Le plasmide adénoviral résultant intègre donc le transgène d'intérêt. Lors de toutes ces étapes une sélection positive via le gène ccdB (control cell death B) permet d'éliminer les plasmides n'ayant pas recombiné correctement et donc pas intégré la cassette contenant le transgène d'intérêt.

Les applications au gateway sont multiples, et permettent notamment le clonage et l'expression sous le contrôle d'un promoteur CMV fort de petites molécules thérapeutiques comme des miARNs ou des protéines. De plus, la présence du gène rapporteur EmGFP permet un suivi du transgène d'intérêt dans les phases de tests *in vitro* et *in vivo*, et dans le cas des vecteurs viraux également un suivi dans les phases de production du vecteur.

2. Techniques de biologie moléculaire appliquées à la construction des plasmides recombinants

a. Modifications du plasmide pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR

Afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention du plasmide adénoviral final contenant les miARN artificiels d'intérêts, le plasmide d'expression pcDNA^{TM} 6.2-GW/EmGFP-miR a été modifié et fermé grâce à l'insertion d'un oligo double brin éliminable par la digestion avec l'enzyme de restriction BsaI.

i. Design des séquences codantes des miARN artificiels simples brins

Les oligos simples brins ont été conçus grâce à l'outil de conception d'Invitrogen (Carlsbad, US), disponible à l'adresse : https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/. Deux oligonucléotides d'ADN simple brin sont nécessaires à la formation d'un miARN artificiel, le premier codant le pré-miARN cible, aussi appelé « top strand oligo » et le second, partiellement complémentaire au premier, appelé « bottom strand oligo ». Les deux oligos simple brin sont ensuite appariés pour générer le miARN double brin final **(Figure 43)**.

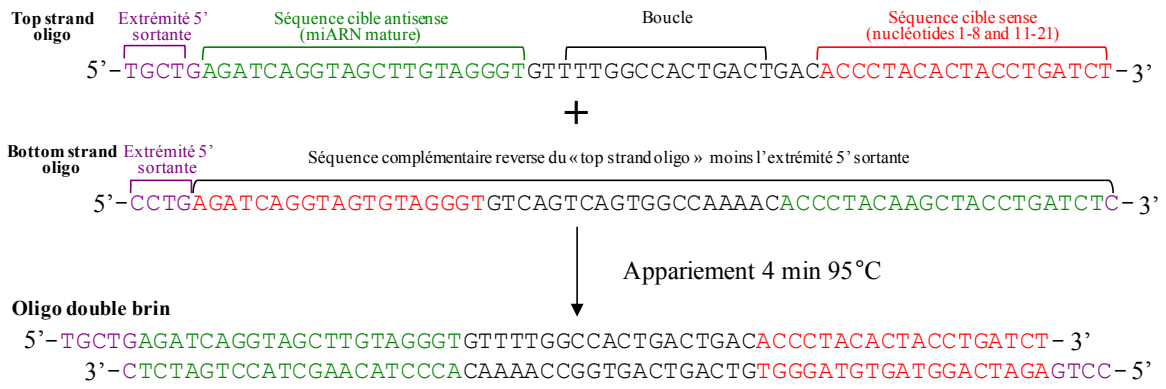


Figure 43 : Représentation schématique de la réaction d'appariement du miARN 18_1.

La séquence complète d'HPV16 E6 (numéro d'accession : NC_001526, nucléotides 83-559) et HPV18 E6 (numéro d'accession : NC_001357, nucléotides 105-581) ont été utilisées comme cibles et collées dans l'outil de conception en ligne. Les options de l'outil furent choisies pour garantir la correspondance du miARN artificiel avec les caractéristiques désirées, comme le ciblage de l'ORF (open reading frame) et un pourcentage GC compris entre 30 et 50. L'outil de conception en lui-même s'assure que la séquence cible ne contient pas plus de 3 répétition du même nucléotide, et que celle-ci ne soit pas identifiée comme site d'interaction ARN-protéine. Après conception, les oligos sont synthétisés par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, US) avec un haut degré de pureté (purification PAGE).

ii. Caractéristiques requises du pré-miARN

Le silencing et la transcription ont été optimisés par la présence des attributs présents dans le pré-miARN, de 5' en 3' et pris en considération par l'outil de conception **(Figure 44)** :

- Une extrémité 5' sortante TGCTG (pour le top strand) dérivée du miR-155 murin endogène, qui sera compatible avec les 4 nucléotides de l'extrémité sortante du vecteur d'expression pcDNA^{TM} 6.2-GW/EmGFP-miR, et permettant donc le clonage de l'oligo double-brin.
- Une extrémité 5' sortante de 4 nucléotides CCTG (pour le bottom strand) compatible avec l'extrémité sortante de 4 nucléotides dans le plasmide pcDNA^{TM} 6.2-GW/EmGFP-miR linéarisé, et un nucléotide C en 3' pour compléter la compatibilité.
- Une séquence complémentaire inversée, de la séquence mature du miARN (séquence cible de 21 nucléotides) en antisense de la séquence de l'ARN messager ciblé.
- Une boucle terminale GTTTTGGCCACTGACTGAC de 19 nucléotides, dérivée du miR-155, contenant un site MscI permettant l'analyse de séquence.

- Une séquence sense formée par les nucléotides 1 à 8 et 11 à 21. Les nucléotides 9 et 10 ont été retirés pour former une boucle interne dans le miARN mature, permettant un knockdown efficace.

Après transcription, les deux « top » et « botton strand » forment une tige-boucle, contenant une boucle interne courte et une boucle terminale plus large.

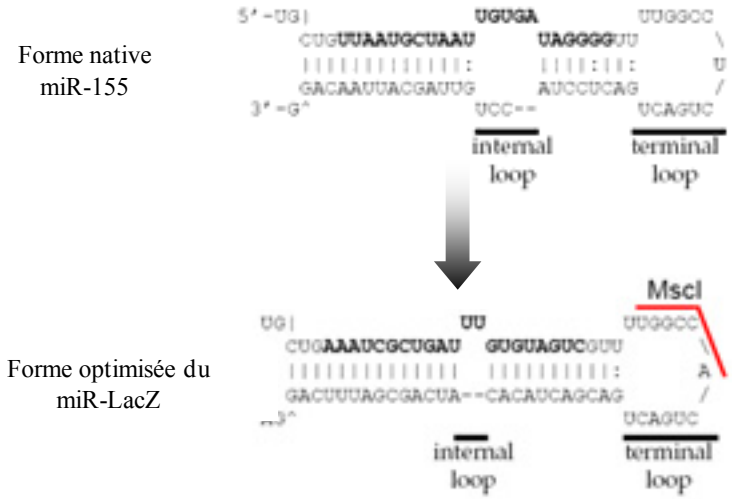


Figure 44 : Représentation du miARN LacZ optimisé.

Le remplacement de la boucle interne de 3 à 5 nucléotides du miARN 155 natif, par une boucle interne de 2 nucléotides permet un meilleur knockdown. La boucle terminale à été conservée, et un site MscI a été introduit pour l'analyse de séquence. La séquence du miARN mature est représentée en gras.

iii. Réaction d'appariement des deux brins

Chaque oligo étant livré sous forme simple brin, il est donc nécessaire de générer la forme active double brin. Les oligos sont dilués dans l'eau à concentration finale de 200 µM. Un couple d'ADN double brin est composé d'un « top strand » et d'un « bottom strand » **(Figure 43)**. Tous les réactifs nécessaires sont contenus dans le kit BLOCK-iT™ Inductible Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP. La réaction de ligation se fait, pour chaque couple dans un volume total de 20 µl, avec 5 µl d'ADN « top strand », 5 µl d'ADN « bottom strand » (tous deux à 200 µM), 2 µl de d'oligo annealing buffer 10X et 8 µl d'eau DNAse/RNAse free. Les tubes sont ensuite incubés à 95°C pendant 4 min au bain-marie. Après le temps d'incubation, les tubes sont laissés à température ambiante pendant 5 à 10 min, permettant l'appariement des deux brins simple brin. Les oligos sont alors à une concentration de 50 µM et seront dilués 5000 fois avant d'être stockés à -20°C.

Dans la procédure de clonage gateway classique, ces oligos peuvent directement être clonés dans le plasmide d'expression pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR, cependant, nous avons

modifié le protocole afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention du vecteur viral final.

iv. Construction du vecteur pcDNA-BsaI

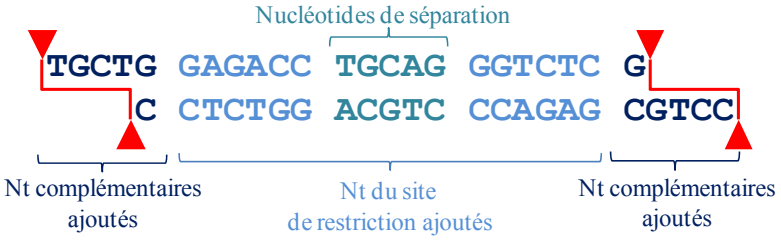


Figure 45 : Séquence de l'oligo BsaI ajouté.

Le fragment inséré contient deux sites BsaI reclivables, permettant la libération du plasmide original après digestion par BsaI. Les nucléotides (nt) en bleu foncé sont complémentaires aux extrémités du plasmide pcDNA original, ceux en bleu clair génèrent 2 sites BsaI et ceux au centre de la figure séparent les 2 sites BsaI.

Un oligonucléotide double brin, appelé BsaI **(Figure 45)** a été utilisé pour faire une première ligation et permettre la construction du plasmide pcDNA-BsaI.

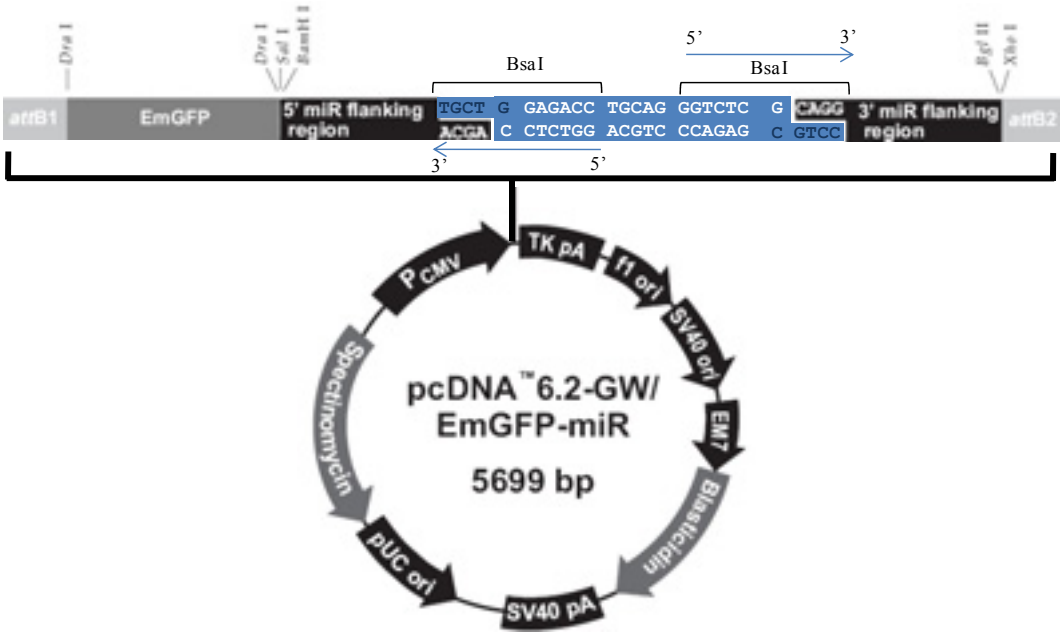


Figure 46 : Carte du plasmide pcDNA-BsaI modifié.

Un nouveau fragment est inséré contenant deux sites de restriction BsaI, qui peuvent être éliminés après digestion par l'enzyme correspondante. La modification permet la fermeture du plasmide, son amplification et son utilisation lors de la réaction de recombinaison BP.

Comme représenté sur le schéma **(Figure 46)**, le premier site BsaI est clivable dans le sens reverse et le second dans le sens forward, en accord avec la séquence de restriction BsaI, qui coupe 5 nucléotides en aval du site de reconnaissance et libère une extrémité 5' sortante de 4 nucléotides. La ligation de cet oligo ferme le plasmide pcDNA^{TM} 6.2-GW/EmGFP-miR

et permet son amplification **(Figure 46)**. Les tubes de ligation sont préparés dans un volume final de 20 µl, avec 4 µl de tampon de ligation 5X, 2 µl de plasmide pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR, 4 µl d'oligo BsaI (10 mM), 9 µl d'eau RNAse free et 1 µl (1 U) de T4 DNA ligase. La ligation est réalisée à température ambiante durant 2 heures.

Pour vérifier la bonne intégration de l'oligo BsaI dans le plasmide recombinant, 2 µl de ligation sont transformés par choc thermique dans les bactéries compétentes *E. coli* One Shot TOP 10 (Invitrogen, US). Puis, 20 µl et 150 µl de bactéries transformées sont étalées sur boites LB agar contenant 50 µg/ml de spectinomycine, et incubées en chambre chaude à 37°C sur la nuit. Les colonies résultantes sont ensuite cultivées en milieu LB liquide contenant 50 µg/ml de spectinomycine, puis l'ADN plasmidique est isolé par minipréparation NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren). L'intégration de l'oligo BsaI est vérifiée par digestion enzymatique par BsaI, puis le produit de la digestion est vérifiée sur gel d'agarose 1 %, contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Les clones positifs sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

b. Génération d'un plasmide d'entrée par recombinaison BP :

Dans une réaction BP, le plasmide d'expression pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR, contenant les sites *att*B recombine avec un substrat *att*P, par exemple le plasmide pDONR™ 221, pour créer un plasmide d'entrée. L'orientation correcte de la séquence d'ADN d'intérêt est assurée par la compatibilité unique des sites *att*, composés d'une séquence de 7 bp. Concrètement, un site *att*B1 ne recombinera qu'avec un site *att*P1, mais ne pourra pas recombiner avec un site *att*P2, permettant ainsi un clonage directionnel.

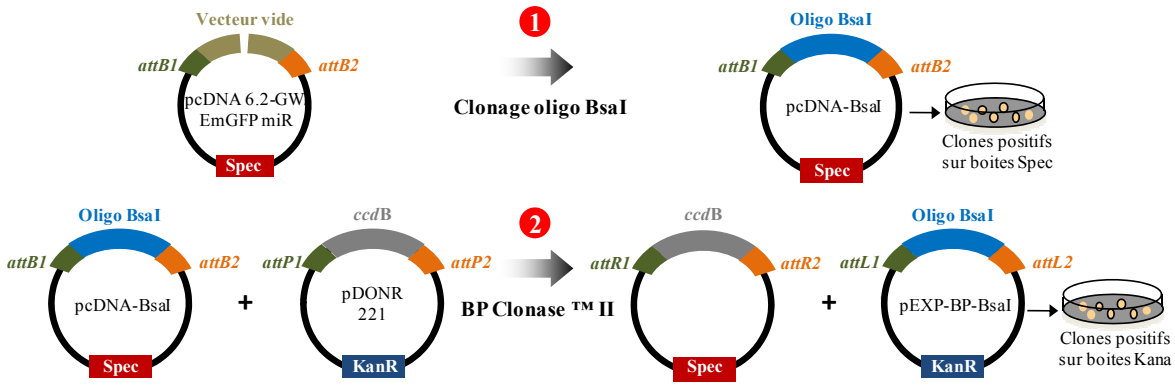


Figure 47 : Schéma des premières étapes du protocole Gateway modifié.

(1) Introduction de l'oligo BsaI dans le vecteur d'expression, permettant sa fermeture et son amplification. Les clones résultants sont sélectionnés sur boites LB spectinomycine et appelés pcDNA-BsaI
(2) Les clones positifs pcDNA-BsaI sont utilisés lors de l'étape de recombinaison BP, transférant la cassette d'expression BsaI au sein du vecteur donneur, pDONR™ 221, grâce à la BP Clonase II. Les clones positifs résultants sont sélectionnés sur boites LB kanamycine et appelés pEXP-BP-BsaI.

L'ADN d'intérêt (plasmide ou fragment PCR), contenant *att*B1 et *att*B2, est combiné avec un vecteur donneur, contenant *att*P1, *att*P2 et un marqueur de sélection négative, *ccd*B. L'addition de la BP Clonase™ **(Figure 47)** induit la recombinaison entre le plasmide d'expression et le vecteur donneur, produisant un plasmide d'entrée contenant l'ADN d'intérêt, et un sous produit contenant *ccd*B.

i. Protocole de la recombinaison BP

Le clone d'expression, pcDNA-BsaI doit tout d'abord être linéarisé avant la réaction de recombinaison BP, favorisant le processus de recombinaison et augmentant la quantité de colonies transformées après sélection. Pour cela, 1 µg du clone d'expression est digéré par une enzyme de restriction à site unique, SpeI, localisé à l'extérieur de la région *att*B et ne coupant pas au sein de l'ADN d'intérêt. Après digestion, l'ADN plasmidique est précipité à l'éthanol et resuspendu à concentration finale de 55 ng/µl.

Pour minimiser les risques d'inhibition de la réaction, le contenu total d'ADN au sein de chaque tube doit rester inférieur à 500 ng dans un volume final de 10 µl. 110 ng du clone linéarisé pcDNA-BsaI est mélangé à 150 ng de pDONR™ 221, 5 µl de tampon TE et 2 µl de mix BP Clonase II. Les tubes sont brièvement vortexés et incubés sur la nuit à 25°C dans un bain-marie. La réaction est arrêtée le lendemain par addition de 1 µl de Protéinase K (2 µg/ml).

ii. Sélection et amplification du vecteur d'entrée pEXP-BP-BsaI

Afin de vérifier le bon transfert de la cassette d'expression BsaI au sein du plasmide d'entrée pEXP-BP-BsaI **(Figure 52)**, 2 µl de produit de réaction sont transformés par choc thermique dans les bactéries compétentes *E. coli* One Shot TOP 10 (Invitrogen, US). Puis, 20 µl et 150 µl de bactéries transformées sont étalées sur boites LB agar contenant 25 µg/ml de kanamycine, et incubées en chambre chaude à 37°C sur la nuit. Les colonies résultantes sont ensuite cultivées en milieu LB liquide contenant 25 µg/ml de kanamycine, puis l'ADN plasmidique est isolé comme précédemment par minipréparation NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren). L'intégration de la cassette BsaI est à nouveau vérifiée par digestion enzymatique par BsaI, et sur gel d'agarose 1 %, contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BET).

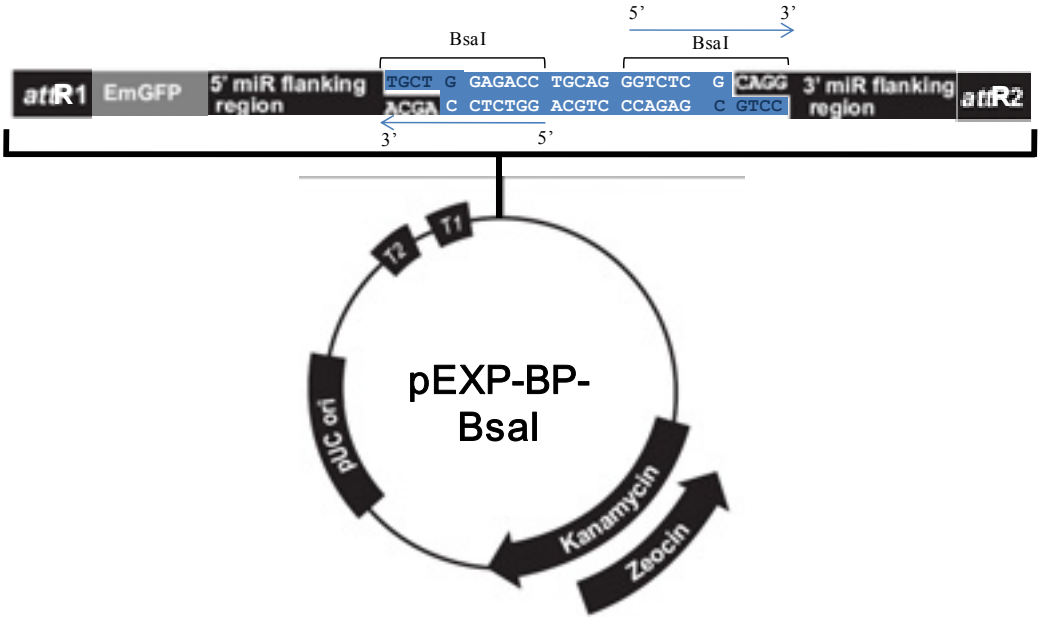


Figure 48 : Carte du produit de la recombinaison BP : pEXP-BP-BsaI.

La cassette d'expression contenant l'oligo BsaI est transférée dans le vecteur donneur, induisant un changement du gène de résistance et de spécificité de séquence *att*.

iii. Préparation du plasmide pEXP-BP pour les clonages suivants

Les clones positifs pEXP-BP-BsaI sont ensuite dirigés par BsaI afin de libérer les extrémités complémentaires qui permettront les clones suivants. Les produits de digestion sont extraits sur gel 1 % et purifiés par NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, DE). Le plasmide résultant est appelé pEXP-BP et dilué à une concentration de 16 ng/µl.

c. Clonages des séquences codantes des miARN double brin

Le plasmide d'entrée pEXP-BP peut être utilisé comme matériel de départ pour le clonage des séquences codantes double brin des miARN artificiels, permettant d'éviter le passage systématique par l'étape de recombinaison BP pour nouvelle séquence codante de miARN **(Figure 49)**.

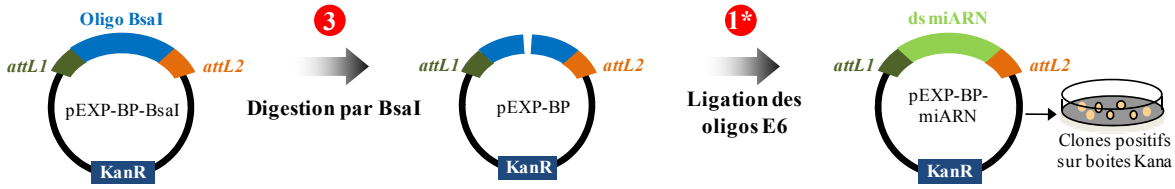


Figure 49 : Schéma de la simplification du protocole gateway.

i. Ligation des séquences codantes des miARN double brin

Les séquences codantes des miARN précédemment conçues présentent différentes localisations **(Figure 50)**. Etant donné la transcription d'E6 et E7 à partir d'un pré-ARN messager bi-cistronique, deux formes de messagers coexistent après épissage : la première contenant l'intron 1 permet l'obtention d'E6 full-length et la seconde sans l'intron 1, E6*I, qui permettra la production majoritaire d'E7 **(Tang et al., 2006)**. Les deux miARN E6 HPV 16 ciblent donc spécifiquement E6, alors qu'un miARN 18 cible à la fois E6 et E7 et le second uniquement E6.

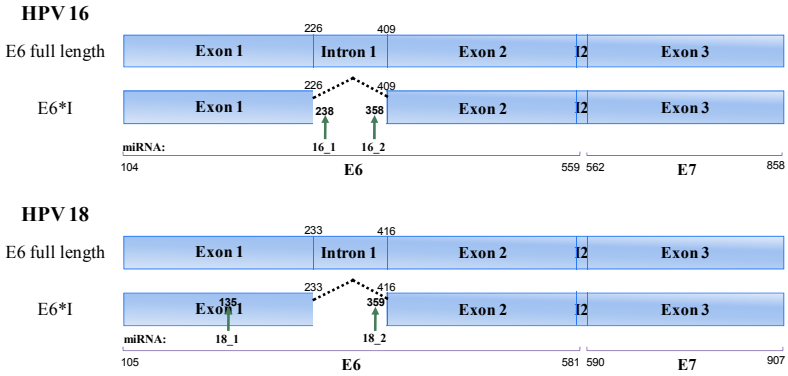


Figure 50 : Représentation des ORF des gènes cibles et de sites de ciblage des miARN.

Deux miARN ciblant E6 ont été conçus pour chaque type d'HPV 16 et 18. Ceux-ci ont été sélectionnés en fonction de leurs localisations et du score obtenu à la suite de l'utilisation de l'outil de conception BLOCK-iT. Le ciblage de l'intron par un miARN induit la dégradation d'E6 uniquement, alors que le ciblage de l'exon 1 induit la dégradation d'E6 et E7.

Les réactions de ligation de chaque séquence codante des miARN sont réalisées comme la précédente ligation de l'oligo BsaI. Et les plasmides résultants sont appelés : pEXP-BP-18_1, pEXP-BP-18_2, pEXP-BP-16_1, pEXP-BP-16_2 et pEXP-BP-LacZ en fonction de leurs localisations. La bonne insertion des miARN artificiels est ensuite vérifiée après transformation par choc thermique, amplification des plasmides en milieu LB contenant 25 µg/ml de kanamycine **(Figure 49)** et digestion de 16h à 37°C par l'enzyme BanII. Le plasmide pEXP-BP-BsaI qui ne contient pas de séquence de miARN est utilisé comme témoin négatif vis-à-vis des autres plasmides. La digestion BanII génère deux fragments pour chaque plasmide, un fragment identique pour les clones positifs et négatifs, et un autre différent en taille. Chaque clone est ensuite vérifié sur gel d'agarose 1% et les clones ayant correctement intégré les séquences de miARN artificiels sont conservées à -20°C.

d. Génération du plasmide adénoviral final par recombinaison LR

La dernière étape de clonage consiste à transférer la cassette d'expression du miARN dans le vecteur adénoviral final, par la réaction de recombinaison LR. Dans cette réaction, les pEXP-BP, contenant les sites *att*L recombinent avec un substrat *att*R, le vecteur de destination adénoviral pAd/CMV/V5 Dest, pour créer le clone d'expression final **(Figure 51)**.

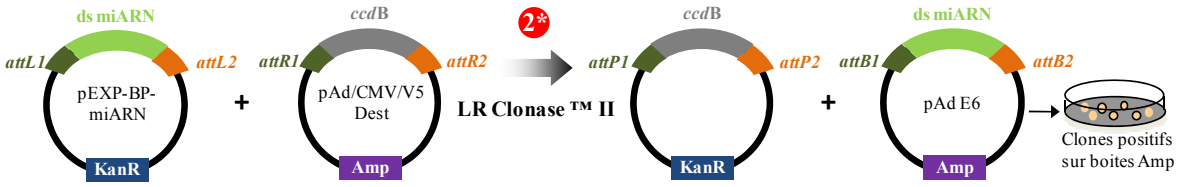


Figure 51 : Construction des plasmides adénoviraux par recombinaison LR.

i. Protocole de recombinaison LR

Pour réaliser la recombinaison LP dans un volume total de 10 µl, 200 ng de chaque clone d'entrée est mélangé à 300 ng de vecteur de destination pAd/CMV/V5 Dest, 1 µl de tampon TE et 2 µl de mix d'enzyme LR Clonase II. Les tubes sont brièvement vortexés et incubés sur la nuit dans un bain-marie à 25°C, étape suivie et stoppée par l'addition de 1 µl de Protéinase K (2 µg/µl) et incubé à 37°C durant 10 min.

Les clones positifs, c'est-à-dire ayant intégré la cassette d'expression du miARN artificiel et ayant une taille correspondante au vecteur de destination (environ 36 kbp) **(Figure 52)**, sont ensuite sélectionnés sur boites LB agar contenant 50 µg/ml d'ampicilline, puis les ADN plasmidiques isolés par minipréparation NucleoSpin Plasmid. Puis, enfin la taille des plasmides est analysée sur gel d'agarose 1%, BET (1 µg/ml) et visualisée sous lumière UV en comparaison avec le marqueur de taille SmartLadder (Eurogentec). Les plasmides ayant une taille d'environ 36 kbp sont alors sélectionnés.

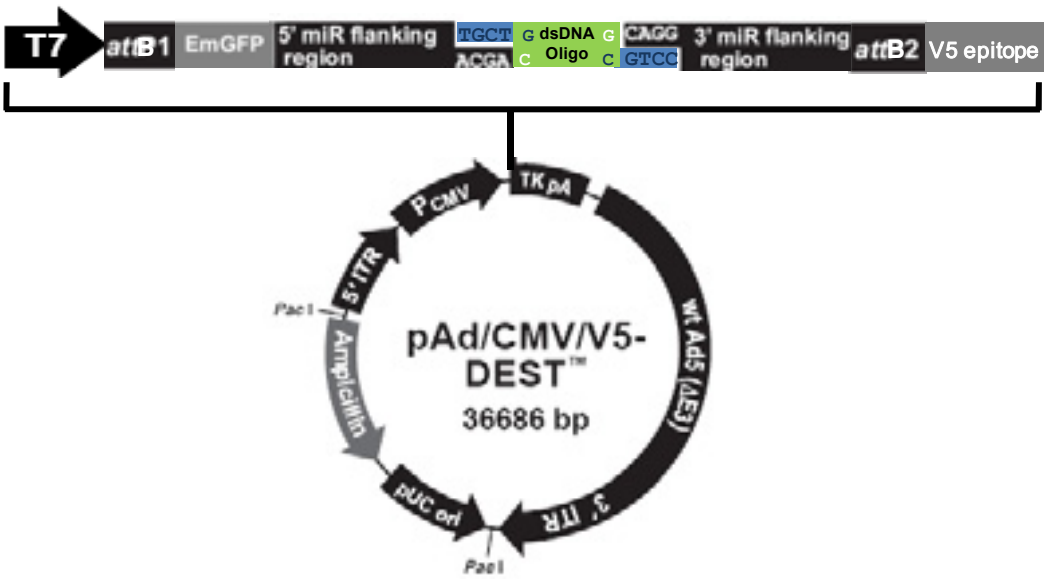


Figure 52 : Carte du produit de la recombinaison LR : pAd E6.

Les pAd E6 contiennent la cassette d'expression du miARN correspondant, le génome de l'Ad5 délété des régions E1 et E3, le promoteur CMV permettant un haut niveau d'expression constitutif, et 2 sites de restriction *Pac*I, qui sont nécessaires à la libération du génome adénoviral avant transfection pour la phase d'amplification.

3. Production et amplification des particules virales recombinantes

a. Amplification

La production des adénovirus recombinants délétés pour la région E1 nécessite l'utilisation de cellules pouvant compenser cette absence, comme les 293 (Graham 1977). Celles-ci ont intégré dans leur chromosome 19, l'extrémité 5' du génome adénoviral de l'Ad5les rendant permissives pour les virus délétés de la région E1, et permettant ainsi leur amplification. Les vecteurs adénoviraux pAd E6 sont tout d'abord digérés par l'enzyme de restriction *Pac*I, étape permettant la libération du génome viral. La digestion en elle-même est réalisée à 37°C dans un bain-marie pendant 30 min et avec 3 µg d'ADN plasmidique. Le produit de la digestion est alors transfecté dans un puits de plaque 6 puits, grâce à l'utilisation du Jet-PEI (Polyplus Transfection) dans des cellules 293A compétentes pour E1 et la réplication virale. Afin de réaliser la transfection, les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 5% de sérum fœtal de veau (FCS) jusqu'à environ 60% de confluence, dans un puits de plaque 6 puits, et incubé à 37°C, 5% CO_2 pendant 48 h. La réplication et l'amplification virale peuvent être facilement suivies grâce à l'émission de fluorescence par l'EmGFP.

Après la période de réplication initiale de 48 h, les cellules 293A fluorescentes et le surnageant de 2 ml sont récoltés et centrifugés dans un falcon de 14 ml, a 1500 rpm pendant 8

min. Le surnageant est conservé à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure et les cellules contenues dans le culot sont lysées par quatre cycles de congélation (azote liquide à -196°C) – décongélation (bain marie à 37°C). Cette opération est nécessaire pour récupérer les particules virales nouvellement formées contenues dans les cellules, et doit être répétée pour chaque étape d'amplification **(Figure 53)**.

Cette première étape est réalisée dans une boite de culture de diamètre 10 cm, l'extrait cellulaire et le surnageant sont mélangés et déposés sur la boite après élimination du milieu de culture, celle-ci est ensuite incubée à 37°C par 5% de CO_2 durant 1 h et remuée délicatement toutes les 15 min. Après la période d'incubation le volume est complété à 10 ml avec du DMEM 5% FCS et replacé dans l'incubateur pour 48 h. La seconde amplification est réalisée de la même manière, mais dans une boite de culture de 14 cm. La troisième amplification est réalisée dans deux boites 14 cm, et finalement la dernière dans 15 boites de 14 cm.

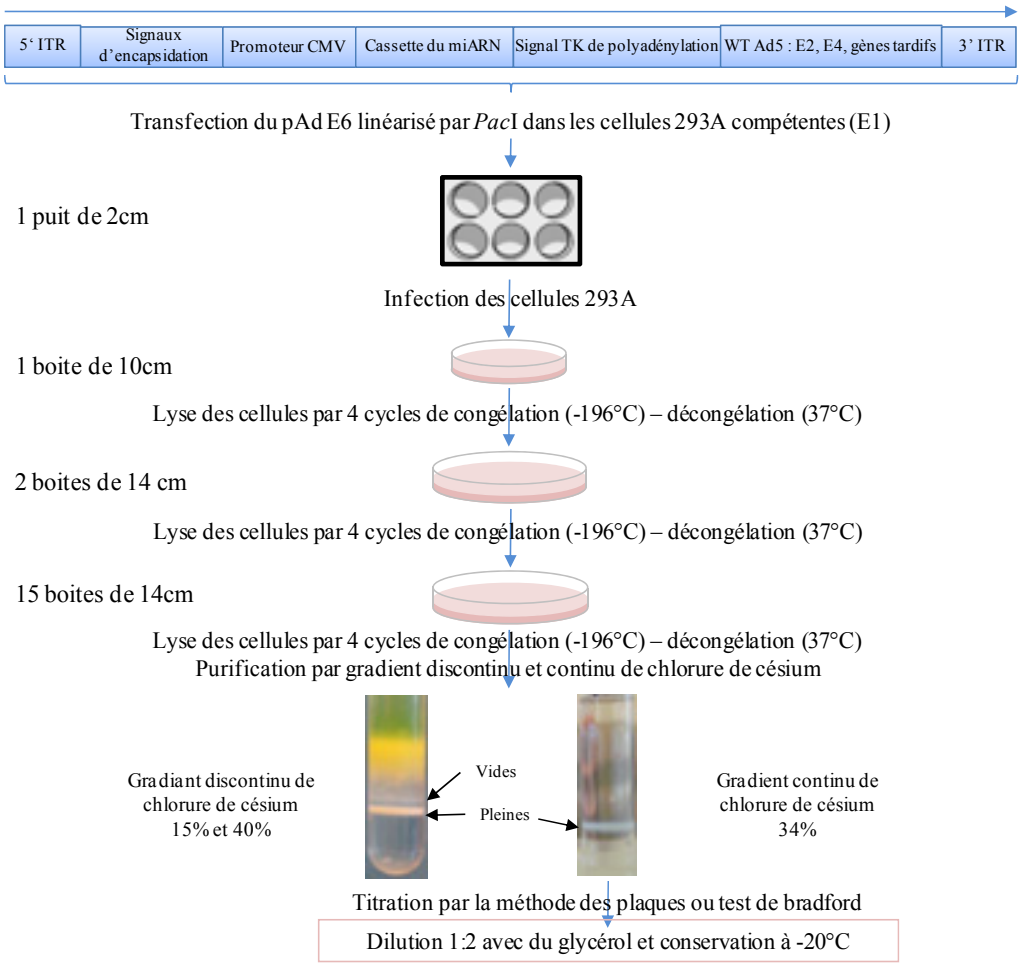


Figure 53 : Schéma de production des adénovirus recombinants

Six étapes sont nécessaires pour obtenir des virus en grande quantité et qualité. Le génome de l'adénovirus recombinant transfecté est composé de E2, E4 et des gènes tardifs. Mais également les extrémités nécessaires ITR, les signaux d'encapsidation, le promoteur CMV, la cassette du miARN et le signal TK de polyadénylation.

Toutes les étapes d'amplification ont été réalisées dans les cellules 293A compétentes pour le gène délété E1 essentiel pour la réplication et l'amplification virale.

b. Purification des particules virales

Après l'infection des 293A, un effet cytopathogène (ECP) peut être observé après 2 à 3 jours, et des changements dégénératifs sont associés à la multiplication des particules virales, notamment le détachement et l'arrondissement des cellules au sein de la boite de culture. Le contenu des boites est récolté, centrifugé et lysé par le même protocole congélation-décongélation cité précédemment. Le volume de l'extrait résultant est ajusté à 3 ml avec du PBS, et les particules virales sont purifiées par gradient discontinu de chlorure de césium (ClCs, 15% et 40%) après ultracentrifugation (28 000 rpm, 1h30, 16°C) dans un rotor SW41 Beckman. Afin d'éliminer les particules virales vides (bande du haut après le gradient ClCs (**Figure 53**) un second gradient continu de ClCs est réalisé (34%) à 32 000 rpm dans un rotor Beckman SW60, à 16°C durant 16h. Les particules adénovirales infectieuses sont concentrées en une seule bande, récoltées avec une seringue et diluées au 1:1 avec du glycérol avant conservation à -20°C.

Les solutions virales ainsi diluées peuvent être conservées dans le glycérol ou encore être dialysées afin d'éliminer le chlorure de césium pour être directement utilisées sur modèle animal souris Nude. Ce tampon de dialyse est composé de 10 mM de Tris pH 8, 2 mM de $MgCl_2$, 5% de sucrose et 75 mM de NaCl, et la dialyse est réalisée à température ambiante en changeant régulièrement la solution de tampon afin d'éliminer totalement le chlorure de césium.

c. Vérification de l'ADN viral

La production simultanée de plusieurs adénovirus différents du point de vue du miARN artificiel d'intérêt à exprimer peut souvent favoriser les contaminations croisées. C'est pourquoi une PCR de vérification est réalisée après production de chaque adénovirus pour identifier précisément la cassette d'expression du miARN artificiel contenue dans l'ADN viral. Les primers sont conçus pour amplifier un fragment de 360 bp. Le primer forward, appelé forEmGFP 1880, est le même pour tous les virus, ciblant 24 bp dans le gène de l'EmGFP en position 1880 de l'ADN viral. A l'inverse, les primers reverse ciblent le « bottom strand » au sein de la cassette du miARN qui sont différents pour chaque virus **(Figure 54)**.

Nom du primer	Séquence (sens 5' - 3')
forEmGFP_1880	ACAGCCACAAGGTCTATATCACCG
revLacZ	GACTACACAAATCAGCGATTT
rev18_1	ACCCTACAAGCTACCTGATCT
rev18_2	TGTATGGAGACACATTGGAAA
rev16_1	GAGCTGCAAACAACTATACAT
rev16_2	AATCCATATGCTGTATGTGAT

Figure 54 : Liste des primers de vérification de l'ADN viral

Les primers reverse sont différents pour chaque adénovirus produit, alors que le primer forward est unique, ciblant au sein du gène du rapporteur fluorescent de l'EmGFP.

Pour chaque virus, 1 µl de solution virale purifiée est mélangé à 19 µl de NaOH 1 mM, et chauffé à 100°C pendant 15 min, ceci permettant la rupture de la capside virale et la libération de l'ADN viral. Puis, 0.5 µl de lysat viral est utilisé pour la réaction de PCR, mélangé avec 5 µl de tampon RedTaq 10x (Sigma), 1.2 µl de primer forEmGFP_1880 (20 µM) 0.4 µl dNTP 25 mM, 1 µl d'ADN polymérase RedTaq (1U/µl), 41.2 µl d'eau miliQ et enfin 1.2 µl de primer reverse (20 µM) spécifique pour chaque virus. Concernant les contrôles, à la place de l'ADN viral sont ajoutés 0.3 µl de plasmide pcDNA (300 ng), contenant le miARN correspondant au virus testé, et 0.3 µl de pcDNA LacZ (300 ng) pour le contrôle négatif. Les amplifications sont faites grâce au kit RedTaq (Sigma) dans un ThermoCycler (Eppendorf) comme suit : étape d'initialisation (95°C, 30 sec), puis 30 cycles composés d'une étape dénaturation (95°C, 30 sec), d'une étape d'hybridation (55°C, 1 min) et d'une étape d'élongation (74°C, 1 min). La réaction est complétée par une étape d'élongation finale (74°C, 10 min). Les résultats des amplifications sont visualisés sur gel d'agarose 1.2% sous lumière UV en comparaison avec les contrôles. Dans un souci de précision et de contrôle complet, chaque virus est testé pour l'ensemble des couples de primers.

d. Titration

i. Par la méthode des plaques

Cette méthode est utilisée afin de déterminer le nombre de particules virales infectieuses de chaque solution virale, grâce à la formation de plaques de lyse. Les plaques sont des zones de destruction cellulaire, générées par les particules virales infectieuses après un cycle d'infection complet et une propagation des particules nouvellement formées vers les cellules avoisinantes. 24h avant infection, 100 000 cellules par puits sont inoculées dans une plaque 12 puits, cultivées 24h avec du milieu DMEM 10% FCS jusqu'à confluence. Avant infection,

le milieu est éliminé et les cellules recouvertes de 250 µl des différents virus dilués en cascade de 10^{-8} à 10^{-11} **(Figure 55)**.

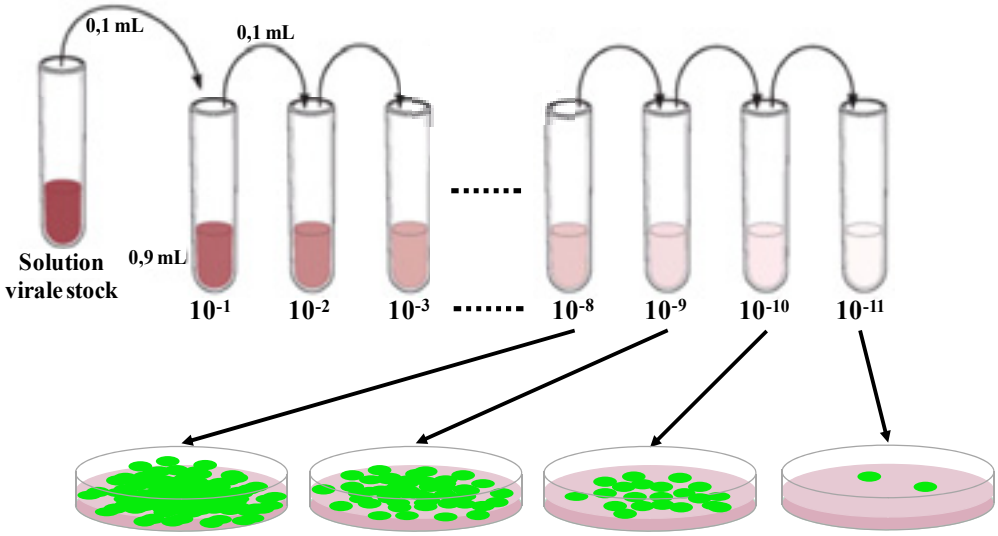


Figure 55 : Représentation schématique de la titration par la méthode des plaques

La solution virale récupérée après gradiant de chlorure de césium doit être titrée, c'est-à-dire déterminer la concentration en particules virales infectieuses par mL de solution stock. Pour cela la solution virale stock est diluée en cascade jusqu'à atteindre des dilutions de 10^{-8} à 10^{-11}, qui seront ensuite étalées sur un tapis cellulaire de 293A confluentes, puis recouvertes par une solution de milieu de culture additionné de 3% d'agarose. Après 5 jours d'incubation, le nombre de plage de lyse peut être visualisé aisément grâce à la présence de l'EmGFP. Les plaques sont comptées sur chaque dilution afin d'obtenir le titre viral final.

Après une heure d'incubation dans l'incubateur, la solution virale est retirée et remplacée par 2 ml de Sea Plaque 1.25% (10 ml 5% Sea Plaque, 30 ml DMEM 5% FCS) chauffé à 42°C. La plaque 12 puits est ensuite incubée à 37°C, 5% CO_2 jusqu'à formation des plaques virales, qui sont ensuite comptées pour déterminer la concentration de particules virales en PFU/ml (plaques forming units).

ii. Détermination de la concentration en protéines

Un test de bradford peut être réalisé dans une plaque 96 puits, pour déterminer la concentration protéique des virus purifiés. 250 µl de réactif de bradford dilués 5 fois sont ajoutés dans chaque puits, et complétés avec 5 µl de chaque échantillon de solution virale. Une gamme standard à la BSA est utilisée comme référence avec des dilutions en cascade de 10 µg/µl à 0 µg/µl, et les densités optiques sont mesurées à 595 nm. Chaque densité optique mesurée peut être comparée avec la gamme standard et transformée en PFU/ml, grâce à la conversion suivante : 1 µg de protéines virales correspond à 4 x 10^9 particules physiques.

e. Détermination de la multiplicité d'infection (MOI) optimale

Pour chaque type cellulaire, il a été nécessaire de déterminer la multiplicité d'infection (MOI) optimal, c'est-à-dire le nombre de particules virales par cellule) et le temps d'action optimal pour les miARN artificiels. 3 différentes MOIs (10, 80 et 100 particules virales par cellules) ont été examinées et les résultats ont été analysés après 2, 3 ou 5 jours d'action. Trois types cellulaires ont été testés, HeLa (HPV 18), SiHa et CaSki (HPV 16). Les critères de sélection de la MOI optimale sont les suivants : le niveau de fluorescence des cellules transduites, ainsi que la conservation de leur intégrité cellulaire (bonne adhésion et forme conservée). La MOI optimale à été déterminée en testant différentes conditions de transduction avec le virus témoin Ad LacZ, et arrêtée à 10 pour SiHa, 80 pour CaSki et 100 pour HeLa.

4. Utilisation des adénovirus *in vitro* sur cellules cancéreuses

a. Conditions de culture, de transduction et de récolte des cellules

Pour chaque expérience réalisée, les cellules sont inoculées en plaque 6 puits, à la concentration adaptée et incubées dans du milieu DMEM 10% FCS dans un incubateur à 37°C. La quantité de virus transduite pour chaque type cellulaire et calculée en fonction de la MOI et du nombre de cellules inoculées dans chaque puits. Les solutions virales sont diluées à la MOI adaptée dans un volume final de 1 ml de DMEM 5% FCS et ajoutées aux puits après élimination du milieu de culture. Pour optimiser et permettre aux virus de transduire les cellules, celles-ci sont incubées 1h à 37°C, 5% CO_2 dans un incubateur. Après la période d'incubation d'une heure, la suspension virale est retirée et remplacée par 2 ml de milieu DMEM 5% FCS frais.

La récolte des cellules traitées intervient entre 2 à 5 jours post-transduction en fonction du temps nécessaire à l'expression du messager co-cistronique miARN-EmGFP, qui peut être visuellement suivie par l'expression de la protéine rapportrice EmGFP. Les cellules sont raclées ou trypsinées, le surnageant de culture et les lavages au PBS sont également récupérés et regroupés dans un falcon de 14 ml sur glace, selon le type d'expérimentation réalisé. Le tout est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min, lavé avec 1 ml de PBS, recentrifugé à 2000 rpm pendant 20 min à 4°C et les culots conservés à -20°C.

b. Protocole de transfection des cellules au jetPEI

Les transfections sont réalisées avec 3 µg d'ADN plasmidique, 6 µl jetPEI (PolyPlus transfection) en présence de NaCl 150 mM selon les recommandations du fournisseur.

c. Quantification des mARNs par PCR quantitative en temps réel

Les primers de qRT-PCR ont été conçus grâce à l'outil Primer Express Software (Applied Biosystem) et les séquences codantes des mARN ciblés ont permis la recherche des couples primers/sondes. Comme paramètre général, les couples primers/sondes **(Figure 56)** qui ont été choisi ont un score de pénalité faible et la taille de l'amplicon est d'environ 100 nt.

Primer	Séquence (sens 5' - 3')
16E6 forward	CACAGGAGCGACCCAGAAA
16E6 reverse	CACGTCGCAGTAACTGTTGCTT
18E6 forward	GAGGCCAGTGCCATTCGT
18E6 reverse	ATACTTGTGTTTCTCTGCGTCGTT
HPRT forward	GACTAATTATGGACAGGACTGAACG
HPRT reverse	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT

Figure 56 : Liste des primers de PCR quantitative en temps réel

Les expériences ont été préparées et réalisées sur le système StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystem) et avant utilisation de chaque couple de primers, les efficacités de réaction ont été déterminées, ainsi que les températures optimales. Les efficacités ont été testées à deux concentrations de primer différentes, 50 nM et 300 mM finales. Un pourcentage d'efficacité compris dans la zone théorique (entre 90% et 105%) a été obtenu avec une concentration en primers de 50 mM pour HPRT et 16E6 et avec 300 mM pour 18E6.

Le programme a été définit comme suit : holding step (95°C, 10 min) cycling step 40x (95°C, 15 sec, puis 55°C, 1 min), melting curve step (début à 55°C et augmentation de 0.3°C à chaque cycle jusqu'à 95°C).

Les culots cellulaires sont ensuite traités avec le kit RNeasy Plus (Qiagen) afin d'en extraire les molécules d'ARN d'une longueur supérieure à 200 nt. Ce kit permet un enrichissement en ARN messagers, étant donné que la plupart des ARNs (tels que 5.8S ARNr, 5S ARNr et les ARNt, qui représentent 15 à 20% des ARN totaux) ont une longueur inférieure à 200 nt. Le contenu total d'ARN est ensuite élué dans de l'eau RNAse free et 200 ng sont reverse transcrits en ADNc grâce au kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). Pour les étapes de quantification en système StepOnePlus™ Real-Time PCR, 20 ng d'ADNc, 25 µl de Power Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems), et

en fonction de chaque type de primer, 50 mM ou 300 mM, sont mélangés pour chaque échantillon. Les contrôles négatifs sont définis sans Sybr Green ou de l'eau en remplacement de l'ADNc. Chaque quantification est lancée pour 40 cycles à 55°C comme température d'amplification et les courbes de fusion sont également collectées pour être analysées.

d. Analyse des niveaux d'expression des protéines par western blot

Après récolte des cellules, le culot cellulaire est lysé sur glace dans un tampon (25 mM Tris pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% NP40) supplémenté extemporanément par 1/50 de cocktail d'inhibiteurs de protéase et 2 mM DTT. Le culot est régulièrement resuspendu pour favoriser la lyse. Cette période d'incubation est suivie par un test de bradford afin de déterminer la concentration de protéines totales au sein de l'échantillon lysé.

Chaque échantillon de protéine est préparé avec un tampon dénaturant de laemmli 4X (Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, Glycérol 40%, bleu de bromophénol, beta-mercaptoéthanol 10%) et chauffé à 100°C pendant 5 min. Ils sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide 12% et séparés par électrophorèse d'une heure et demie à 20 mA. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose avec un appareil de transfert liquide dans un tampon de transfert (Tris-HCl 50 mM pH 9.5 et glycine 14%) durant 1h30 à 200mA. Pour vérifier le transfert correct des protéines sur la membrane, celle-ci est marquée au rouge ponceau pendant 2 min. Elle est ensuite saturée avec une solution de TBS (Tris Buffer Saline, Tris HCl 100mM pH 7.5, NaCl 150 mM) contenant 7% de lait écrémé, et les protéines révélées par une incubation d'une heure à température ambiante ou une nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire préparé dans une solution de TBS 0.2% Tween 20, 5% de lait, puis une incubation identique avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradish peroxidase) (GE Healthcare). La visualisation du signal émis se fait grâce à l'ajout du substrat ECL Plus (Chemiluminescence detection kit, Amersham Biotech) qui est ensuite capturé sur film radiographique ou par caméra CCD ImageQuant LAS 4010 (GE Healthcare).

e. Analyse indirecte des niveaux d'expression par immunofluorescence

Quarante huit heures après transduction les cellules fixées sur lamelle sont lavées au PBS, puis fixées 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 3%, puis à nouveau lavées 4 fois au PBS.

En cas de marquage préliminaire au MitoTracker Red CMXRos (MT) (Molecular Probes), réalisé avant l'étape de fixation, celui-ci est dilué au 1/40 000 dans le milieu de culture DMEM des cellules, qui sont incubées 15 min à 37°C. Elles sont ensuite lavées avec du milieu de culture et à nouveau incubées 15 min à 37°C avec du DMEM 10% FCS frais. Après 4 lavages au PBS, elles sont fixées selon le protocole cité précédemment. Le MT est un fluorochrome capable de former des ponts disulfures avec les groupements –SH présents dans la matrice mitochondriale lorsque celle-ci est dépolarisée, où il est oxydé puis séquestré. Il donne donc une bonne indication de l'état de dépolarisation de la membrane mitochondriale.

Les cellules sont ensuite perméabilisées par une solution de PBS-Triton 0.1% durant 10 min, à nouveau lavées au PBS puis saturées avec du milieu de culture DMEM 10% FCS durant 15 min. Cette étape est suivie par la mise en présence des anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêts, dilués dans du milieu de culture DMEM 10% FCS pendant une heure. Après 6 lavages avec une solution de PBS 0.05% Tween 20, l'anticorps secondaire couplé a un fluorochrome est ajouté pendant 1 heure à température ambiante dans du milieu DMEM 10% FCS dans l'obscurité. Après une dernière étape de lavage au PBS, un marquage au DAPI (4', 6' Di Amidino-2-Phényl Indole) à 0.1 µg/ml est réalisé durant 5 min avant montage sur lame à l'aide de Fluoromount G (Southern Biotech). Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un objectif à immersion en microscopie à fluorescence.

f. Test de survie cellulaire ou test MTT

Ce test de cytotoxicité est basé sur l'activité de l'enzyme mitochondriale, succinate déshydrogénase, qui permet une quantification rapide de la prolifération et de la viabilité cellulaires.

Une solution de MTT à 0.5 mg/ml (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) est ajoutée aux cellules en culture. Après 2 heures d'incubation, les sels de tétrazolium du substrat se sont transformés en cristaux de formazan, grâce à l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase. Ces cristaux de formazan sont ensuite solubilisés par l'addition d'une solution Stop (40 mM HCl, 64% isopropanol, 32% butan-2-ol). Puis la densité optique est mesurée à 595 nm.

g. Induction de l'apoptose

Pour chaque protocole de test d'induction de la mort cellulaire par apoptose, le témoin positif est réalisé en traitant les cellules avec d'une solution de staurosporine (STS) dissoute dans du diméthylsulfoxide (DMSO) à 1 mg/ml (Bernard et al., 2001).

h. Cytométrie en flux et quantification des cellules en Sub-G_1

Après la période d'incubation de 48h, les culots cellulaires sont lavés avec une solution de PGE (PBS 1x, EDTA 1 mM, Glucose 1g/l), puis resuspendus dans 1 ml de PGE. 8 ml d'une solution 30% PGE – 70% éthanol sont ensuite ajouté à la suspension cellulaire, afin de fixer et perméabiliser les cellules.

Le marquage à l'iodure de propidium (IP) (Sigma-Aldrich), agent fluorescent intercalant de l'ADN, permet une analyse des différentes phases du cycle cellulaire, G_1 (contenu en ADN : N), G_2M (contenu en ADN : 2N) et Sub-G_1 (cellules en apoptose, contenu en ADN inférieur à N).

Après une nuit de fixation à 4°C, les cellules sont centrifugées puis resuspendues dans 100 µl de PGE, additionné d'1 µl RNAse A et de 5 µl d'iodure de propidium (1 mg/ml). Les cellules sont alors incubées dans l'obscurité pendant 30 min avant analyse sur le cytomètre en flux FACSCalibur (BD Biosciences).

i. Blocage de la voie de signalisation des caspases et de leurs activités

Cette expérience est réalisée dans des Lab-Tek chamber slide (Nunc), où 15 000 cellules sont inoculées par puits et cultivées dans du milieu DMEM 10% FCS à 37°C, 5% CO_2. Cinque heures plus tard le milieu est remplacé par du DMEM 5% FCS supplémenté avec 100 µM d'inhibiteur irréversible général de l'activité protéasique des caspases (Z-VAD-FMK, R&D Systems) ou d'inhibiteur irréversible spécifique d'activité protéasique de la caspase-9 (Z-LEHD-FMK, R&D Systems) **(Figure 14)**, issus du kit Caspase inhibitor Sampler Pack. Les cellules sont transduites 24 heures après inoculation, et laissées en présence de la suspension virale durant 1h. La solution virale est ensuite remplacée par du milieu frais DMEM 5% FCS, et le contrôle positif staurosporine ajouté 24h avant l'arrêt du temps d'incubation.

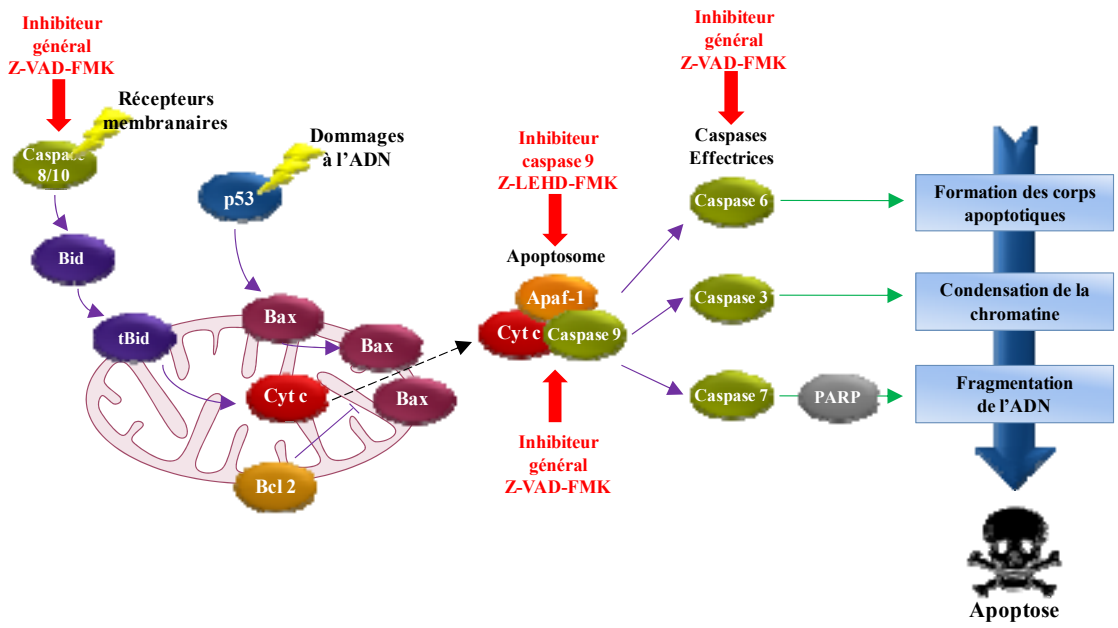


Figure 57 : Représentation de la voie de signalisation des caspases et des blocages réalisés.

Deux blocages successifs ont été réalisés, de manière générale sur toutes les caspases et spécifiquement sur la caspase-9, partie intégrante de l'apoptosome. Puis, les effets indirects sur l'activation de la PARP ont été visualisés.

A l'issue du temps d'incubation, les cellules sont traitées pour être analysées au microscope à fluorescence selon le protocole d'immunofluorescence cité plus haut et mises en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la PARP clivée (D64E10) (Cell Signaling).

5. Utilisation des adénovirus *in vivo* sur modèle murin

Afin d'évaluer l'efficacité antitumorale, 10^7 cellules HeLa sont injectées sur le flanc droit de souris nude. Lorsque les tumeurs atteignent la taille de 50 mm^3 les souris sont injectées avec des doses quotidiennes de tampon de dialyse ou de $5x10^9$ PFU de vecteur (Ad 18_2 ou AdLacZ) ou durant 5 jours et des groupes de cinq souris sont composés. Ces injections répétées permettent de maximiser le nombre de cellules transduites au sein de la tumeur formée, en effet, les adénovirus sont non réplicatifs et ne se propagent donc pas aux cellules avoisinantes. Puis la taille des tumeurs et le poids des souris sont mesurés deux fois par semaine selon la formule $V\ (mm^3) = (L \times W^2)/2$, où L et W sont respectivement la longueur et la largeur de la tumeur.

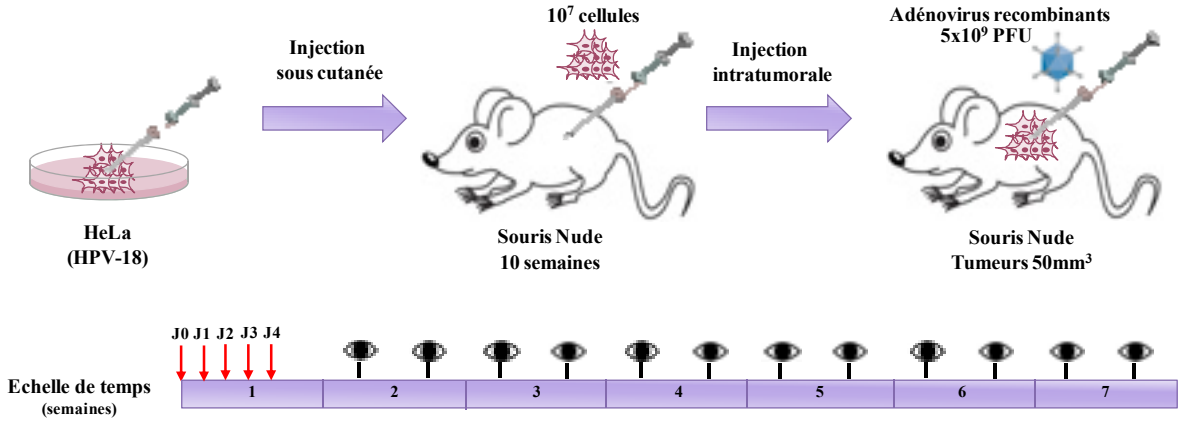


Figure 58 : Protocole d'expérimentation *in vivo*

Des souris nude de 10 semaines ont été greffées par 10^7 cellules HeLa, afin de permettre la formation de tumeurs sous-cutanées. Les adénovirus recombinants ont ensuite été injectés de manière intratumorale, lorsque les tumeurs atteignent la taille de $50mm^3$. 5 injections de $5x10^9$ PFU (particules virales infectieuses) ont été réalisées à raison d'une par jour. Puis des mesures de taille des tumeurs et de poids des souris sont réalisées deux fois par semaine.

Les souris sont sacrifiées soit lorsque la taille de la tumeur dépasse 2000 mm^3 soit à l'apparition de nécrose cutanée. Enfin un test de Student est utilisé pour évaluer la significativité des différents de volume de tumeur et de croissance tumorale relative au sein des différents groupes de souris.

Résultats

I. Publication n°1

1. Introduction au manuscrit

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus fréquent chez la femme, représentant 9% (529 800) des nouveaux cas de cancers et 8% des décès (275 100) **(Jemal et al., 2011)**. L'agent étiologique majeur est l'infection par les virus du papillome humain (HPV), qui sont de petits virus infectant les épithéliums muqueux et cutanés, et pouvant induire la formation de tumeurs **(zur Hausen, 2002)**. Les HPV sont subdivisés en deux catégories, les bas risques, responsables de verrues ou condylomes, et les hauts risques, notamment HPV 16 et 18 retrouvés dans plus de 99% des biopsies de tumeurs **(Walboomers et al., 1999)**. Les hauts risques sont impliqués dans la transformation maligne, après intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Après infection, dans la majorité des cas, HPV est éliminé naturellement par la cellule hôte, mais l'infection peut également être persistante et générer des lésions **(Frazer, 2009)** pouvant évoluer en cancer. L'infection est nécessaire mais non suffisante au développement du cancer, d'importants facteurs de risques contribuent à la cancérisation, tels que l'utilisation de contraceptifs oraux **(Munoz et al., 2006)**. De nos jours, plus de 200 types de HPV ont été identifiés **(Bernard, 2005; de Villiers et al., 2004)**.

En 2007, deux vaccins prophylactiques ont été mis sur le marché, Gardasil **(Shi et al., 2007)** et Cervarix **(Monie et al., 2008)** permettant la vaccination des jeunes femmes contre de futures infections génitales par les HPV de type 6, 11, 16 et 18. Cependant, la vaccination n'étant efficace uniquement si elle a lieu avant toute activité sexuelle, ainsi que son caractère non obligatoire, impliquent la nécessité de développement de nouvelles thérapies.

Le processus de cancérogenèse est principalement dû à l'expression de deux protéines virales, E6 et E7. Elles interfèrent avec le cycle cellulaire en interagissant avec de nombreux partenaires cellulaires, induisant notamment l'immortalisation des cellules. Au sein du laboratoire, nous nous intéressons entre autres à la relation structure-fonction de la protéine E6, dont la structure à été récemment résolue **(Nomine et al., 2006)**. L'oncoprotéine E6 agit notamment sur la dégradation de p53, gardien du génome, maintenu à un niveau d'expression faible dans les cellules normales **(Efeyan and Serrano, 2007)**. Cependant, suite aux stress,

tels que des dommages à l'ADN, le niveau de p53 augmente, permettant ainsi l'activation d'autres partenaires cellulaires, puis la mise en place de l'apoptose **(Sullivan et al., 2012)**. E6 forme un complexe trimérique E6/E6AP/p53, induisant ainsi la polyubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome 26S **(Scheffner and Whitaker, 2003)**. La diminution de p53 provoque alors une prolifération continue des cellules transformées, accumulant des mutations menant au développement de cancers.

Ce travail vise à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, en ciblant les oncoprotéines E6 et E7, impliqués dans la carcinogenèse. Pour cela, nous avons combiné 2 approches, l'ARN interférence et les vecteurs adénoviraux, pour générer des vecteurs capables d'entrer dans les cellules sans aide extérieure et d'éteindre l'expression des gènes ciblés.

L'ARN interférence (ARNi) est basée sur l'extinction de gènes post-transcriptionelle et séquence spécifique, induite par la reconnaissance d'ARN double brin (dsARN). Ce processus est largement conservé dans différents organismes, et peut être largement utilisé dans de nombreux domaines de recherche et pour des applications dans les thérapies comme le cancer. Il permet également l'analyse fonctionnelle d'un gène exprimé dans une cellule ou dans une voie de signalisation **(Wall and Shi, 2003)**. A l'origine, ce système est utilisé par les plantes comme moyen de défense contre les infections virales et les transposons, mais peut être initié dans les cellules mammifères en introduisant des séquences imitant les produits de Dicer, comme les microARN **(Takeshita and Ochiya, 2006)**. Les principaux avantages de l'ARNi sont sa grande spécificité ainsi que sa haute activité inhibitrice. De plus, de nombreuses maladies sont dues à une dérégulation de l'expression des gènes, c'est pourquoi, l'utilisation de l'ARNi est devenue une puissante méthode thérapeutique contre les cancers, les infections et les maladies respiratoires **(Bonetta, 2009; Soifer et al., 2007)**.

L'introduction des miARNs dans les cellules mammifères peut être faite par des vecteurs viraux exprimant des shorts hairpins ARNs (shARN), et qui seront transformés en siARN par la machinerie cellulaire. Les vecteurs viraux ont le principal avantage d'infecter à la fois les cellules mammifères en division ou non, permettant une entrée efficace de l'ARNi, et une extinction spécifique de l'expression du gène ciblé dans de nombreux types cellulaires. Les vecteurs adénoviraux sont connus pour être de bons vecteurs de transfert dans les cellules mammifères, grâce à leur stabilité, l'absence d'intégration génomique, ainsi que la production aisée à hauts titres (10^{12} PFU/mL) **(Graham, 2000)**. De nombreux vecteurs adénoviraux sont

disponibles et notamment des versions défectives non réplicatives, qui sont délétés des régions non essentielles (région précoce E1 et E3) du génome viral et qui permettent donc l'insertion d'ADN étranger.

Nous avons dans notre cas choisi d'utiliser l'adénovirus de type 5 (Ad 5), délété des régions précoces E1 et E3, résultant en un virus défectif, qui ne peut s'amplifier que dans des cellules exprimant E1, telles que les 293A. Celui-ci peut être facilement purifié, permet un transfert de gènes efficace et un haut niveau d'expression du transgène.

En alliant ces deux approches il est possible de cibler efficacement les oncoprotéines E6 et E7, impliquées dans la carcinogenèse, et permet ainsi une restauration du contrôle du cycle cellulaire, l'induction de la mort des cellules tumorales *in vitro* et l'utilisation des thérapies développées *in vivo*.

Artificial miRNA against the viral E6 protein provoke apoptosis in HPV positive cancer cells

Anaëlle Charlotte Bonetta[1], Laurent Mailly[2], Eric Robinet[2], Murielle Masson[1] and François Deryckere[1*]

[1]: Unité Mixte de Recherche 7242, Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, France

[2]: INSERM U748, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

Running title: **Artificial miRNA against papillomavirus E6**

Keywords: cancer therapy, gene therapy, adenovirus, cervical cancer, RNA interference

[*]: corresponding author

François Deryckere

IREBS - UMR 7242 – Equipe Oncoprotéines

Boulevard Sebastien Brant – BP 10413

67412 ILLKIRCH

FRANCE

Phone: +33 3.68.85.47.63

Fax: +33 3.68.85.47.70

E-mail: francois.deryckere@unistra.fr

Abstract

High-risk human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 are associated with more than 70 % of cervical cancer. The oncoprotein E6 is multifunctional and has numerous cellular partners. The best-known activity of E6 is polyubiquination of the tumor suppressor p53, targeting it for degradation by the proteasome 26S. Loss of p53 triggers genomic instability and favors cancer development. The aim of this study was to knockdown E6 of either HPV16 or HPV18 to restore p53 and provoke apoptosis in related cancer cells. To do so, we generated recombinant adenovirus (Ad) vectors expressing artificial miRNAs directed against HPV16 E6 (Ad16_1) or HPV18 E6 (Ad18_2). E6-knockdown was observed in HeLa and SiHa after treatment with Ad18_2 and Ad16_1 (respectively). Western-blot and immunofluorescence experiments revealed an increase in p53 levels after treatment of HeLa and SiHa cells. Sub-G1 DNA content, cleavage of caspases (3, 7 and 9) as well as of PARP1 indicated that treated HeLa and SiHa cells underwent apoptosis. The growth of HeLa tumors developed into Nude mice was clearly reduced after intra-tumoral injection of Ad18_2. These data demonstrated that recombinant adenoviruses expressing anti-E6 artificial miRNAs have interesting therapeutic potential for therapy of HPV-positive cancers.

Introduction

Cervical cancer is the third most common female cancer worldwide representing 9% (529 800) of the total new cancer cases and 8% (275 100) of total cancer deaths in 2008 (Jemal et al., 2011). Developing countries are the most affected, notably due to the lack of screening tests, allowing detection of early stage cervical cancer lesions (Jemal et al., 2011). That is why, in low resource countries 453 300 (85,5%) new cases and 242 000 (88%) deaths were reported in 2008. Major etiological agent in cervical cancer is infection by high-risk human papillomavirus, mainly HPV16 and 18 (de Villiers et al., 2004). In order to replicate, HPV needs to interfere with the normal cell cycle to inactivate the natural cell-cycle checkpoints. Viral oncoproteins E6 and E7 are essential for malignant transformation, maintenance of malignant phenotype in cervical cancer cells (zur Hausen, 2009), and their expression raises after viral integration into the host-cell genome. This event occurs downstream of the early genes E6 and E7, often in E1 and E2, provoking disruption of the E2 ORF and loss of E2-negative regulation on E6 and E7 (Hamid et al., 2009). The most documented function of E6 is its ability to induce polyubiquitination of p53, via formation of a complex E6-E6AP-p53, leading to the degradation of p53 by the proteasome 26S (Scheffner and Whitaker, 2003). E7 is responsible for pRb degradation, a negative regulator of the cell cycle, leading to S-phase entry, viral replication and maintenance (Yugawa and Kiyono, 2009). E6 and E7 inhibition or knockdown is a promising therapeutical way to act on cancer cells life cycle to potentially induce cell death or growth arrest (Zhou et al., 2012) (Tan et al., 2012) (Hong et al., 2009) (Yamato et al., 2008) (Chen et al., 2011).

RNA interference (RNAi) was primary identified in plants as a cellular defense system against viral infection or destabilizing transposons, and was primary identified in petunia flowers (Bartel, 2004). Mechanism widely conserved in higher organisms, it can be induced in mammalian cells by introducing sequences mimicking Dicer products, such as microRNAs (miRNA) (Takeshita and Ochiya, 2006). miRNAs, composed of 21-23 nucleotides, are part of the endogenous small regulatory RNAs family, having important cell regulation roles, such as differentiation, proliferation or apoptosis. After introducing in cells, miRNA coding sequences are transcribed by polymerase II or III (Lee et al., 2004), as part of long primary transcripts, and are processed through the RNA interference cellular pathway, via Drosha (Zeng et al., 2005), Dicer and RISC complex, into a mature single stranded miRNA guiding RISC complex to the complementary mRNA to mediate post-transcriptional silencing (PTS). The main advantages of RNAi against other methods are its specific inhibitory activity, and

that its introduction into cells can be done by viral vectors expressing shRNA or micro RNA (miRNA), thus bypassing transfection difficulties.

In this study, we explored the potential of RNA interference against E6 to restore p53 level to provoke growth arrest and/or apoptosis of HPV-positive cancer cells. To achieve this goal, we designed different artificial miRNA and inserted them into a non-replicative adenovirus. We showed in vitro silencing of E6 in HPV-positive cancer cells, subsequent p53 reestablishment and cell death by apoptosis. Therapeutical potential of the recombinant adenoviruses was also tested *in vivo* by intratumoral injections into HeLa xenografts and showed growth arrest in treated tumors. Our data demonstrate proof-of-principle for E6 silencing by artificial miRNA as a promising therapeutic approach for HPV-positive cancers.

Results

Knockdown of E6

By using the BLOCK it designer system (Invitrogen), we designed artificial miRNA directed against E6 from either HPV16 (16E6) or HPV18 (18E6), the selected sequences were inserted into a bicistronic CMV-driven-expression cassette allowing expression of both the EmGFP (Emerald GFP) and the miRNA of interest (see material and methods). These expression cassettes were then transferred to an adenovirus vector. In total 5 different non-replicative adenovirus were produced, two designed to knockdown 16E6 (Ad16_1 and Ad16_2) another two against 18E6 (Ad18_1 and Ad18_2), the fifth targeting LacZ (AdLacZ) as a negative control. Determination of the optimal multiplicity of infection (MOI) for each cell type was setup with the negative control AdLacZ (data not shown) with the following criteria: highest number of EmGFP fluorescent cells (close to 100%) without affecting cellular viability. After screening, the appropriate MOI (pfu/cell) chosen were: 10 for SiHa cells (HPV16-positive) and 100 for HeLa cells (HPV18-positive). We then analyzed the 16E6 and 18E6 mRNA expression levels using quantitative real time RT-PCR after transduction of either SiHa or HeLa cells. Negative controls used were AdLacZ (set as 100%) and mock (non transduced). In HeLa cells (**Figure 1a**), after 3 days of transduction at MOI 100, no difference in 18E6 mRNA levels could be detected between AdLacZ treated samples and mock indicating no effect of the adenovirus vector or unrelated miRNA on E6 mRNA level. On the opposite Ad18_1 and Ad18_2 had significant effects on 18E6 mRNA expression (respectively 62% and 34%). In SiHa cells (**Figure 1b**) after 3 days of transduction at MOI 10, AdLacZ (set as 100%) and Ad16_2 (96%) had very little effect on 16E6 mRNA level, when compared to that observed in mock treated samples (111%). On the contrary, treatment with Ad16_1 clearly affected expression of 16E6 mRNA, (47% residual expression).

18E6 knockdown was also confirmed by Western blotting on HeLa treated cells after 3 days of treatment with recombinant adenoviruses (**Figure 1c**). Negative controls Ad LacZ and mock (non treated cells) confirmed the absence of 18E6 knockdown. Ad18_1 had no effect on E6 expression level. On the contrary, transduction with Ad18_2 reduced 18E6 expression to undetectable level.

Effects of the E6 knockdown on p53 levels

Downstream effect of E6 silencing on p53 levels was studied by Western blot after 2 days of transduction. Transduction of HeLa cells (**Figure 2a**) with recombinant adenovirus 18_2 provoked an increase of p53 protein level of 6.1 fold in comparison to mock, taken as

reference in this experiment. The increase of p53 protein level after Ad 18_2 transduction was comparable and higher than after treatment with the proteasome inhibitor MG132 (5.6 fold higher than mock). On the contrary, AdLacZ and Ad18_1 had no significant effect on p53 elevation, which was concomitant with the previous observations (**figure 1a**). In SiHa cells (**figure 2b**), after 2 days of transduction of Ad16_1, relative p53 protein level was increased 3.3 fold compared to mock sample. This elevation was akin to treatment with MG132 (3.9 fold higher than mock). As observed in HeLa cells, treatment with AdLacZ and Ad18_1 had no effect on p53 level.

Cell death analysis

Having observed the knockdown effect on E6 and the increase of p53 levels after transduction with recombinant adenoviruses, we examined effects on apoptosis. Staining cells with propidium iodide allowed the analysis the cell cycle by flow cytometry and monitored cells with fragmented DNA (subG1 population) corresponding to apoptotic cells. In Hela cells (Figure 3a) 24 hours of treatment with positive control staurosporine resulted in 53.6% of the cells in apoptosis, in comparison to Ad16_2, taken as negative control (18.2%). On the other hand, treatment with Ad18_2 resulted in 78% of apoptotic cells, whereas Ad18_1 did not provoke apoptosis. In SiHa cells (Figure 3b), Ad16_1 provoked also a greater effect on apoptosis (68.5%) than the staurosporine positive control (47%).

Caspases 9, 3 and 7 are involved and necessary in apoptosis induced by knocking down E6 in HPV-positive cells

We investigated the signaling pathways involved in cell death. In a general manner, apoptosis can be triggered by two major cellular pathways, one of them is the intrinsic pathway induced by stresses such as DNA damages, and regulation of the Bcl-2 proteins. These proteins impact on mitochondrial outer-membrane permeabilization (MOMP) through the action of pro-apoptotic multi-domain members such as Bax and Bak, favoring cytochrome C release and apoptosome complex formation. After formation of the complex, procaspase-9 is recruited and activated, enabling activation of the executioner caspases -3, -6 and -7, and apoptotic downstream effectors, which are responsible for chromatin condensation, DNA fragmentation, plasma membrane asymmetry and formation of cellular apoptotic bodies (Kruidering and Evan, 2000) (Chipuk and Green, 2006). In SiHa and HeLa cells after treatment with Ad16_1 and Ad18_2 respectively, we analyzed the cleavage of caspase 3 and 7 as well as that of PARP1. To do so, we used antibodies specific for cleaved caspase 3,

cleaved caspase-7 and cleaved PARP1 in immunofluorescence analysis. In those cases (**figure 4**), we did not transduce recombinant adenoviruses in cells, but transfected plasmids expressing the artificial miRNAs biscistronicaly with reporter EmGFP, allowing presence of non transfected cells, serving as internal negative control in each single experiment (see material and methods). After 2 days of treatment in HeLa cells, we could observe cleavage of the executioner caspases 3 and 7 (**figure 4a and b**) in cells transfected with plasmid expressing mi 18_2 likewise in the positive staurosporine control. Whereas transfection with plasmid expressing mi LacZ and mi 16_1 had no effect on cleavage of caspases 3 and 7. We also examined PARP1 cleavage thanks to a specific antibody. The results were concomitant to the ones obtained before (**figure 4a and b**), we could observe PARP1 cleavage after expression of mi 18_2 and treatment with STS as positive control (**figure 4f**). Expression of mi LacZ and mi 16_1 had no effect on PARP1 cleavage. In SiHa cells, transfection with plasmid expressing mi 16_1 also resulted, as in positive control STS, in cleavage of caspase -3, -7 and PARP1, whereas mi LacZ and mi 18_2 had no effects (**figures 5a, b and c**). In addition DNA staining clearly highlighted the apoptotic phenotype (nucleus condensation and fragmentation) of HeLa treated with mi18_2 and SiHa treated with mi16_1. Theses results were confirmed with the use of caspase inhibitors showing that either a general caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) or a caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK) clearly blocked the apoptosis induced by the E6 knockdown in both HeLa and SiHa cells as monitored by PARP1 cleavage (**figure 5**). These inhibitors bind to the active site of the cysteine protease and inhibit induction of apoptosis. The use of caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK) confirmed induction of apoptose by intrinsic pathway.

Evalutation of antitumor efficacy in vivo: inhibition of Tumor Growth in Nude Mice

After these promising *in vitro* results we decided to perform *in vivo* tests on nude mice, and investigated potential anti-tumoral effects of the recombinant adenoviruses (**figure 6**). To do so we injected 10^7 HeLa cells in mice right flank, and waited an approximate tumor size of $50mm^3$ before injecting adenoviruses. The daily intra-tumoral injection of 5.10^9 pfu of vector was performed during 5 days, and sizes of tumors and mice survival were monitored during 8 weeks post-injection. Tumors non treated with recombinant adenoviruses (mock) were injected with dialysis buffer. Treatment of the tumors with AdLacZ (control vector) or negative control mock had no significant effects on mice survival. In fact mice die two and a half weeks after the beginning of AdLacZ treatment and 3 weeks after the first dialysis buffer injection. After 5 weeks all “mock” mice were dead and only 20% of AdLacZ treated mice

were still alive. On the contrary, treatment of the tumors with Ad 18E6 resulted in tumor growth arrest and 100% mice survival 7 weeks post injection. The experiment was ended when tumor volume reached 1000mm^3 and at that time 80% of mice treated with Ad 18E6 were still alive and bearing growth arrested tumors.

Discussion

In this study, we developed recombinant non replicative type 5 adenoviruses, deleted from E1 and E3, encoding biscistronic RNA allowing expression of EmGFP and artificial miRNA against E6 in HPV positive cancer cells. The bicistronic constructs revealed to be convenient: (i) this allowed to monitor very easily virus productions; (ii) but also more importantly to follow the efficiency of cellular transduction in the two cell lines HeLa and SiHa. Combining these two approaches allowed us to bypass transfection difficulties usually encountered in siRNA delivery and transfections, and to test these vectors *in vivo*.

The knockdown effect of the artificial miRNA on E6 mRNA E6 was monitored by real time quantitative RT-PCR. It reached almost 70% in HeLa cells after Ad18_2 transduction and 50% in SiHa cells after Ad16_1 transduction. Neither adenovirus entry nor the expression of LacZ miRNA had effects on E6 mRNA level as attested by the use of the control construct AdLacZ, demonstrating that the reduced levels of E6mRNA were indeed due to the expression of the E6 miRNA. Ad16_2 and Ad18_1 had a lesser E6 knockdown and were either not included in the following tests or used as controls. The sequences of miRNA 16_1 and 18_2 are located within the first intron present in the E6 mRNA, therefore we are pretty confident that E7 expression stays unaffected by these miRNA. At the protein level, a stronger knockdown was observed indicating that the miRNA exert their effects probably not only on mRNA degradation but also on E6 translation.

Decreased E6 mRNA and protein levels were correlated with the increase of p53 level as was reported before in other studies using siRNA or shRNAs (Butz et al., 2003) (Chen et al., 2011). In SiHa cells treated with Ad16_1 as well as in HeLa cells transduced with Ad18_2 we observed phenotypic alterations of cells, such as loss of adherence and global rounding, concomitant to EmGFP expression in vitro. Further analyses, revealed that E6-knockdown induced apoptosis of HPV tumor cells, ant that this was dependent on cleavage of caspase-9 inducing cleavage of caspase-3 and -7 and also caspase substrate, PARP1, consistent with the p53 intrinsic apoptosis signaling pathway.

Finally, to further explore therapeutic potential of the recombinant adenoviruses produced we tested them in vivo in nude mice. We demonstrated that Ad18_2 could be used *in vivo* conditions comparable with *in vitro* ones, where the experiment was first set up. Unlike the *in vitro* results, cells did not seem to undergo apoptosis, but cell growth arrest, phenomenon also observed in other studies (Fujii et al., 2006). Injections were deliberately multiplied (5 in total) in order to maximize number of positively transduced cells. However, as the virus is non replicative, it does not affect the neighboring cells, reducing virus accessibility to the entire tumor. Differences between *in vitro* (apoptosis) and *in vivo* results (growth arrest) can be explained by (i) specific tumoral biology, which was different than in vitro cell culture (vacularization, cell behaviour), (ii) apoptosis of the transduced cells but continuous growth of non-transduced cells. The overall survival was thus greatly increased with 80% of Ad 18_2 treated mice still alive after 7 weeks post-treatment and all control mice dead.

Recombinant adenoviruses obtained showed interesting effects on HPV positive cancer cells, in fact our results were concomitant with other studies suggesting that up regulation of wild-type p53 by RNA interference strategies can induce apoptosis (Jiang and Milner, 2002) (Chen et al., 2011) (DeFilippis et al., 2003) (Gu et al., 2006) (Sima et al., 2008), senescence (Hall and Alexander, 2003) (Butz et al., 2003) or growth arrest (Fujii et al., 2006). But therapeutical potential and safety can still be improved (i) by replacing CMV strong promoter by cancer specific promoters such as hTERT (ii) by combining expression of different microRNAs thank to the same adenovirus and (iii) finally by association of adenovirus injections and complementary treatment like localized radiotherapy.

Material and methods

Recombinant adenoviruses production:

The miRNA were designed using the Block-iT miRNA designer tool from Invitrogen (https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/).

The

Name	Target	Position	miRNA séquence
mi LacZ	Beta-galactosidase		GACTACACAAATCAGCGATTT
mi 16_1	E6 HPV 16	Intron 1 - 238	GAGCTGCAAACAACTATACAT
mi 16_2	E6 HPV 16	Intron 1 - 358	AATCCATATGCTGTATGTGAT
mi 18_1	E6 HPV 18	Exon 1 - 135	ACCCTACAAGCTACCTGATCT
mi 18_2	E6 HPV 18	Intron 1 - 359	TGTATGGAGACACATTGGAAA

selected miRNA encoding sequences were inserted into pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen). Using the Gateway cloning system (Invitrogen), the obtained clones were sequentially LR- and BP- recombined with pDONR221 and with pAd/CMV/V5Dest, respectively, to produce the different pAd-EmGFP-miR. Production of recombinant adenoviruses were performed as described before (Lagrange et al., 2007). Infectious particles were harvested, diluted with one volume of glycerol before storing at -20°C. All produced viruses were verified by PCR and sequencing. Plaque assays were performed to titer the virus preparations in plaque forming units (pfu)/ml. To determine the appropriate multiplicity of infection (MOI) and the optimal time of action of the miRNAs, we screened different MOIs and analyzed the results after 2, 3, or 5 days of action. Two different cell lines were used: HeLa (HPV18 positive) and SiHa (HPV16 positive). For each experiment, cells were seeded in a 6 well plate, at appropriate concentrations and incubated in DMEM 10% FCS in a 37°C incubator. At 70% of confluence cells were transduced at optimal MOI. Viruses were diluted at optimal MOI in 1 mL DMEM 5% FCS and added to the wells after medium removal. After 1 hour at 37°C, virus suspension was removed and fresh DMEM 5% FCS added. For in vivo experiments, adenoviruses were first dialysed against dialysis buffer (Tris 10mM pH 8,0, sucrose 5% (w/v), MgCl2 1mM, NaCl 75mM).

mRNA quantitation by real-time PCR:

The primers were designed with the help of Primer Express® Software (Applied Biosystem). As general guideline, we selected the primers/probes sets with a low penalty score and a low amplicon length (around 100 nt). Primers were designed for 16E6 (forward: CACAGGAGCGACCCAGAAA reverse: CACGTCGCAGTAACTGTTGCTT) 18E6

(forward: GAGGCCAGTGCCATTCGT reverse: ATACTTGTGTTTCTCTGCGTCGTT) and HPRT (forward: GACTAATTATGGACAGGACTGAACG reverse: CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT).

Experiments were prepared and performed on StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Before using the primer couples, efficiencies of reactions were calculated and optimal temperatures were experimentally determined for each couple. Efficiencies were tested at 2 different primer concentrations, 50nM and 300nM. HPRT and 16E6 efficiencies fitted the optimal range (between 90% and 105%) at 50nM and 18 E6 at 300nM. The program was as follows: holding step: 10 min at 95°C; cycling step (repeated 40 times): 15s at 95°C and 1 min at 55°C; and melt curve step: start at 55°C and adds 0.3°C at each cycle until 95°C.

Cells were seeded and transduced as described above. Forty-eight hours after transduction, cells were harvested and total RNA content was extracted using the RNeasy Plus kit (Qiagen) according to the instructions. The resulting total RNAs were eluted in RNAse free water and concentrations were determined by optical density at 260nm. 200ng of total mRNA were reverse transcribed in cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the protocol. For quantification steps in StepOnePlus^{TM} Real-Time PCR System, 20 ng of cDNA, Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 50nM or 300nM of each primer were used for each sample. Negative controls were set as no Sybr Green and water instead of cDNA. Each quantification was run for 40 cycles at 55°C amplification temperature and the melting curves were collected.

Western blot analysis :

One day before transduction, 200 000 cells were seeded in a well of a 6-well plate, incubated in DMEM 10% FCS in a 37°C incubator and transduced as detailed in a previous part. After the 48h incubation period, supernatants were harvested and kept on ice. Cells were washed with 1 mL of PBS, and trypsinized with 0,5 mL of 0,05% Trypsine EDTA. The whole volume was centrifuged 10 minutes at 1000xg and cell pellet washed by 1 mL of PBS.

A 30-minute cell lysis was performed in 40 µl of low stringency buffer (50 mM Tris pH 6, 250 mM NaCl, 1% NP40, 2 mM DTT, 1/50 protease inhibitor) on ice and cells were resuspended each 5 minutes. Protein concentrations of the obtained extracts were measured by Bradford assays. **Eighty** µg of total protein were mixed with Laemmli loading buffer and boiled for 10 minutes and run on SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose filters and then analyzed by Western blotting using either the mouse

monoclonal antibody against p53 (DO-1 sc-126, Santa Cruz), or rabbit polyclonal anti-actin antibody (A2066, Sigma-Aldrich). Bands were quantified by Image Lab (BioRad).

Immunofluorescence:

Cells were seeded and transduced as described above after having placed glass coverslips in the wells. After incubation period, cells were treated for immunofluorescence as described before (Lagrange et al., 2007). Primary antibodies used were specific for p53 (DO-1 sc-126, Santa Cruz), cleaved Caspase-9 (Asp330), cleaved caspase 3 (ab13847, Abcam), cleaved Caspase-7 (Asp198), cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb (1/200) and PARP Cleaved (Asp214) (D64E10) XP® Rabbit mAb (1/400) (Cell signaling) were diluted in DMEM 10% FCS and incubated for 1 hour. For cleaved caspases and cleaved PARP1 analyses, cells were transfected 48h before using jetPEI (Polyplus Transfection). Positive control staurosporine (1µg/ml) were added 24h before the end of the incubation time. After incubation the slides were washed 6 times with PBS 0,05% Tween 20. Alexa Fluor 568 Goat (1/1000) Anti-Rabbit IgG and Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (1/1000) were used as secondary fluorescent antibodies.

Cell cycle analysis by FACS :

Cells were seeded and transduced as described above. After the 48h, cells were scraped and centrifuged. Cell pellets were washed with PGE (1x PBS, 1mM EDTA, 1g/L Glucose), and resuspended in 1 ml PGE, 8 mL PGE-70% EtOH were then added to the cell suspension, the resulting suspension was kept at -20°C overnight before staining. The following day cell suspension was centrifuged and cell pellet resuspended in 100 µL PGE, 1 µL RNAse A and 5 µL propidium iodide (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL. Cells were then incubated 30 minutes in the dark before analysis by FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Inhibition of caspases :

One day before transduction 15 000 HeLa or SiHa cells were inoculated in a wells of a 8-well Lab-Tek chamber slide (Nunc) and incubated in DMEM 10% FCS in a 37°C incubator. After 5 hours the original medium were replaced by fresh medium (DMEM, 5% FCS) supplemented in 100 µM of general caspase inhibitor (Z-VAD-FMK, R&D Systems) or 100 µM caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK, R&D Systems) from caspase inhibitor sample pack. 24h after inoculation the appropriate viral dilution (MOI 100) were added on cells. The viral suspension were replaced after 1h of transduction by fresh medium (DMEM, 5% FCS).

Positive control staurosporine (1µg/ml) were added 24h before the end of the incubation time. Thereafter immunofluorescence for PARP1 cleavage was performed as described above.

Animals : Nude mice (NMRI-nu, Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed at the animal facility of Inserm U748, Institute of virology, Strasbourg. Experiments were performed after approval by the local regulatory authority (Departmental Direction of Veterinary Services) including the authorization for the Inserm U748 animal facility (C-67-482-7) and an authorization for performing experimentation on living animals (67-350).

Evaluation of antitumor efficacy *in vivo*: To assess the antitumoral activity *in vivo*, 7 weeks old female Nude mice were subcutaneously injected with 10^7 HeLa cells in the right flank. When tumors reach a size of approximately 50 mm^3, mice were randomized and received a daily intratumoral injection of vehicle (dialysis buffer) or 5.10^9 pfu of vector (AdLacZ or Ad18_2), for 5 days. Tumor size and mice body weight were measured twice a week. Tumor volume was determined according to the formula $V\ (mm^3) = (L \times W^2)/2$, where L and W are the length and the width of the tumor, respectively. Mice were sacrificed when tumor size was ≥ 2000 mm^3 or after appearance of skin necrosis, wathever came first. The two-tailed Student's *t*-test was used to study the statistical significance of the differences in the tumor volume and the relative tumor growth of the different treatment groups. For Kaplan–Meier survival curves, end-point was established at a tumor volume ≥ 1000 mm^3.

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses.* Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.* Virology, 2009. **384**(2): p. 260-5.
4. Hamid, N.A., C. Brown, and K. Gaston, *The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins.* Cell Mol Life Sci, 2009.
5. Scheffner, M. and N.J. Whitaker, *Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system.* Semin Cancer Biol, 2003. **13**(1): p. 59-67.
6. Yugawa, T. and T. Kiyono, *Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins.* Rev Med Virol, 2009. **19**(2): p. 97-113.
7. Zhou, J., et al., *Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis in vitro and in vivo.* Gynecol Oncol, 2012. **124**(2): p. 296-302.
8. Tan, S., et al., *HPV16 E6 RNA Interference Enhances Cisplatin and Death Receptor-mediated Apoptosis in Human Cervical Carcinoma cells.* Mol Pharmacol, 2012. **2012**: p. 10.
9. Hong, D., et al., *Gene silencing of HPV16 E6/E7 induced by promoter-targeting siRNA in SiHa cells.* Br J Cancer, 2009. **101**(10): p. 1798-804.
10. Yamato, K., et al., *New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer.* Cancer Gene Ther, 2008. **15**(3): p. 140-53.
11. Chen, L., et al., *Down-regulation of HPV18 E6, E7, or VEGF expression attenuates malignant biological behavior of human cervical cancer cells.* Med Oncol, 2011. **28 Suppl 1**(28): p. S528-39.
12. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
13. Takeshita, F. and T. Ochiya, *Therapeutic potential of RNA interference against cancer.* Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 689-96.
14. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.* Embo J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
15. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha.* Embo J, 2005. **24**(1): p. 138-48.
16. Kruidering, M. and G.I. Evan, *Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?* IUBMB Life, 2000. **50**(2): p. 85-90.
17. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *Dissecting p53-dependent apoptosis.* Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 994-1002.
18. Butz, K., et al., *siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells.* Oncogene, 2003. **22**(38): p. 5938-45.
19. Fujii, T., et al., *Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer.* Int J Oncol, 2006. **29**(3): p. 541-8.
20. Jiang, M. and J. Milner, *Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference.* Oncogene, 2002. **21**(39): p. 6041-8.
21. DeFilippis, R.A., et al., *Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells.* J Virol, 2003. **77**(2): p. 1551-63.
22. Gu, W., et al., *Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes.* Cancer Gene Ther, 2006. **13**(11): p. 1023-32.

23. Sima, N., et al., *RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53.* Apoptosis, 2008. **13**(2): p. 273-81.
24. Hall, A.H. and K.A. Alexander, *RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells.* J Virol, 2003. **77**(10): p. 6066-9.
25. Lagrange, M., et al., *Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(2): p. 487-92.

2. Figures

Figure 1

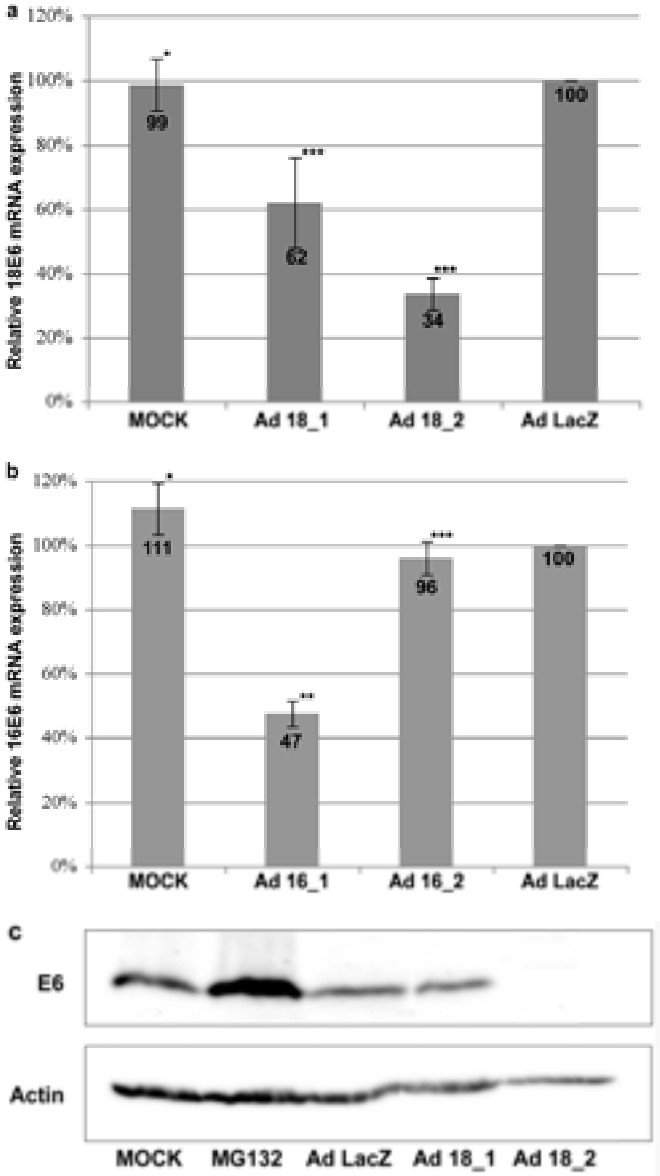
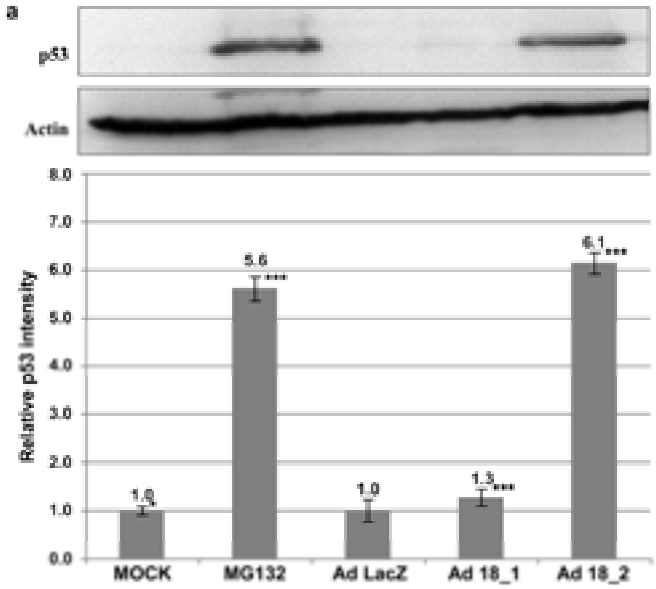


Figure 2


a
p53
Actin
Relative p53 intensity
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
1.0
5.6
1.0
1.3
6.1
MOCK
MG132
Ad LacZ
Ad 18_1
Ad 18_2

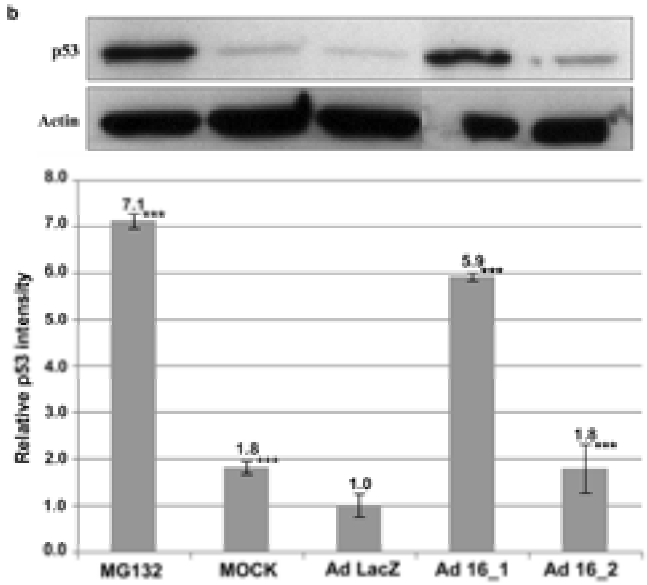

b
p53
Actin
Relative p53 intensity
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
7.1
1.8
1.0
5.9
1.8
MG132
MOCK
Ad LacZ
Ad 16_1
Ad 16_2

Figure 3

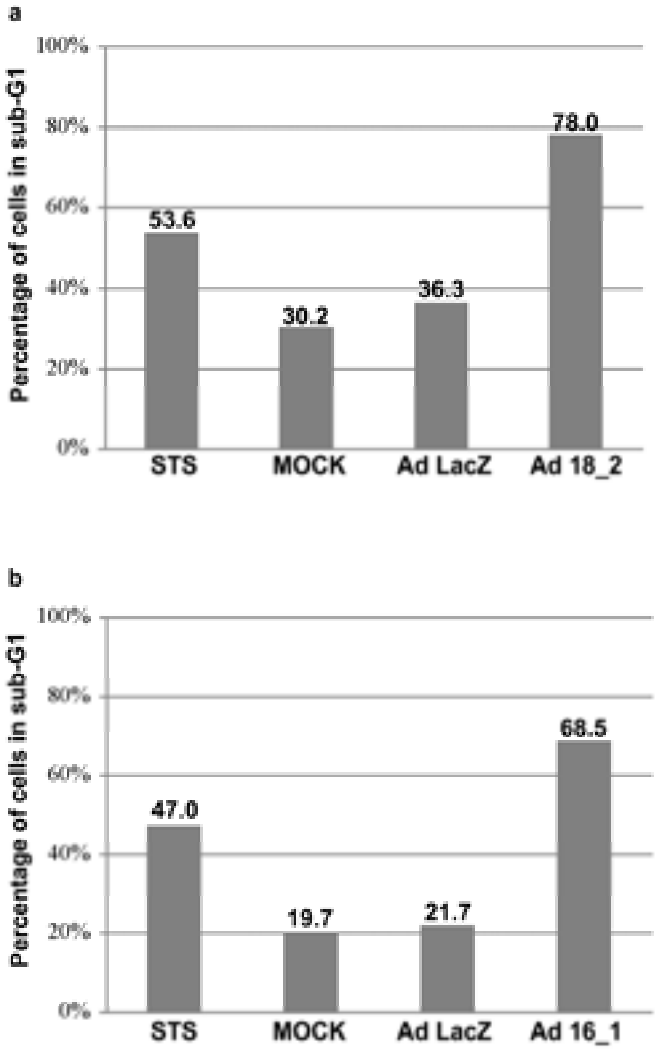

a
Percentage of cells in sub-G1
100%
80%
60%
40%
20%
0%
53.6
30.2
36.3
78.0
STS
MOCK
Ad LacZ
Ad 18_2
b
Percentage of cells in sub-G1
100%
80%
60%
40%
20%
0%
47.0
19.7
21.7
68.5
STS
MOCK
Ad LacZ
Ad 16_1

Figure 4

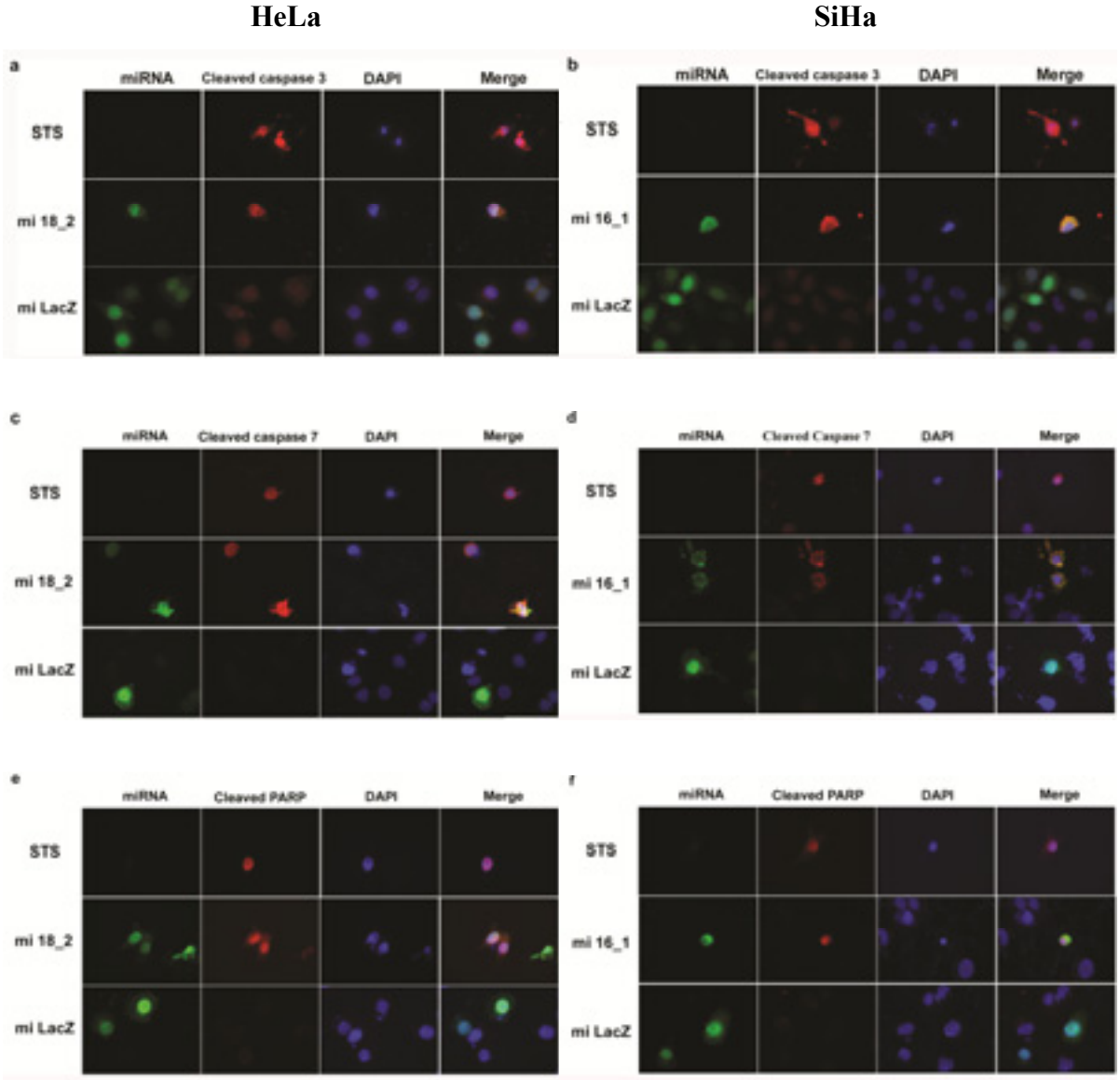

HeLa
SiHa
a
miRNA
Cleaved caspase 3
DAPI
Merge
STS
mi 18_2
mi LacZ
b
miRNA
Cleaved caspase 3
DAPI
Merge
STS
mi 16_1
mi LacZ
c
miRNA
Cleaved caspase 7
DAPI
Merge
STS
mi 18_2
mi LacZ
d
miRNA
Cleaved Caspase 7
DAPI
Merge
STS
mi 16_1
mi LacZ
e
miRNA
Cleaved PARP
DAPI
Merge
STS
mi 18_2
mi LacZ
f
miRNA
Cleaved PARP
DAPI
Merge
STS
mi 16_1
mi LacZ

Figure 5

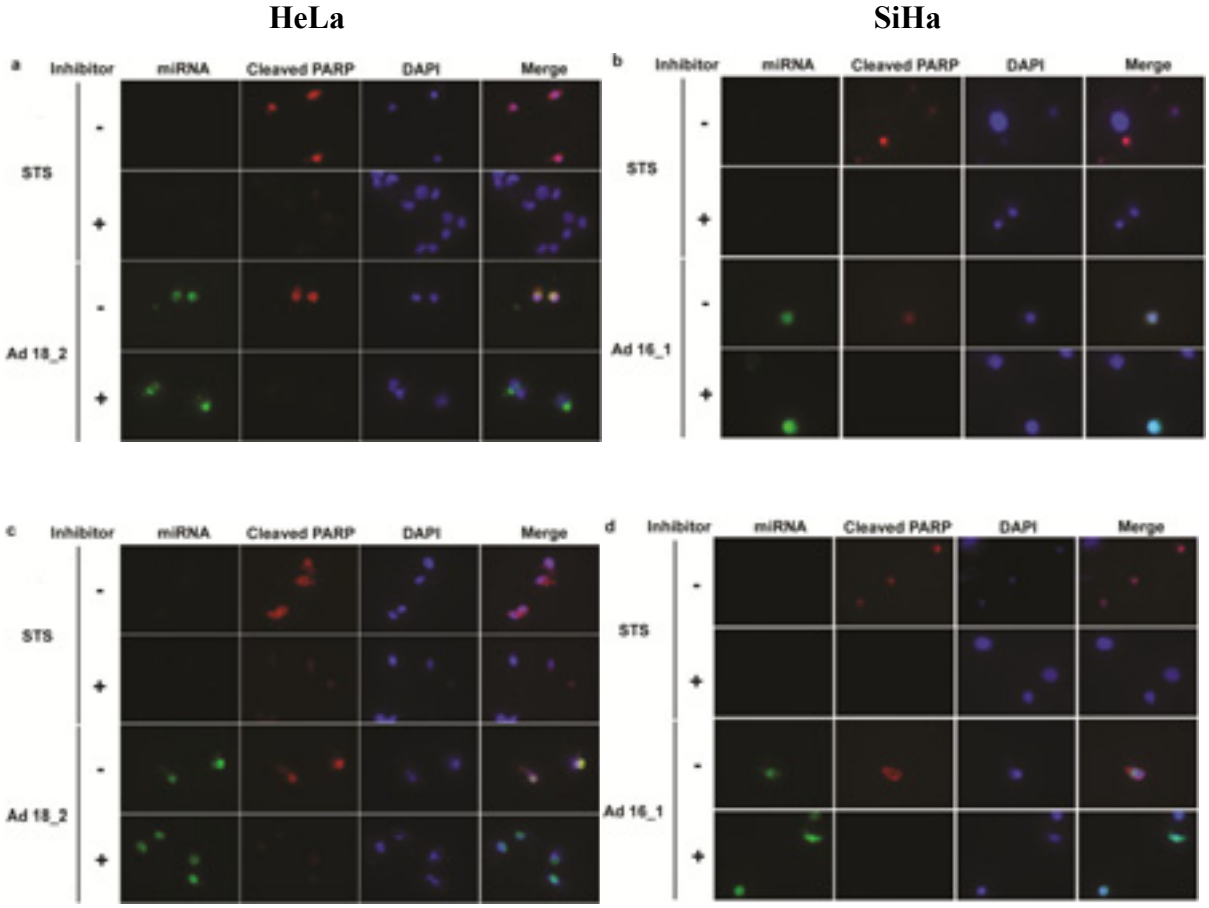

HeLa
SiHa
a
b
c
d
Inhibitor
miRNA
Cleaved PARP
DAPI
Merge
STS
Ad 18_2
Ad 16_1
-
+

Figure 6

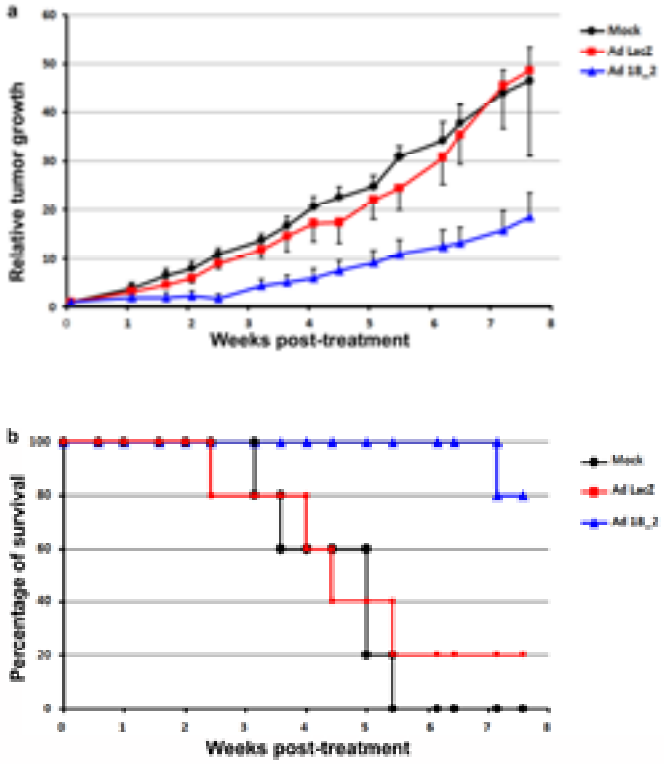

a
Relative tumor growth
Weeks post-treatment
Mock
Ad LacZ
Ad 18_2
b
Percentage of survival
Weeks post-treatment
Mock
Ad LacZ
Ad 18_2

Figure Legends

Figure 1: Analysis of E6 knockdown efficiency. After 3 days of transduction, total mRNAs were extracted and reverse-transcribed into cDNA. The relative quantification of 18E6 and 16E6 was determined by real-time PCR using HPRT as an internal control. Graphic representation of the relative mRNA quantification, set to 1 for mock treated controls. (**a**) Relative 18E6 mRNA levels in HeLa cells. (**b**) Relative 16E6 mRNA levels in SiHa cells. (**c**) 18E6 protein detection by Western blotting after recombinant adenoviruses transduction.

Figure 2: p53 protein levels. Western blotting using anti-p53 (DO1) was performed 2 days after transduction. Relative p53 intensity is analyzed by Image Lab software and normalized by the relative actin intensity of each sample. Mock-treated sample was set as 1. Treatments with the proteasome inhibitor MG132 treated-sample were used as positive controls. (**a**) Relative p53 intensity in HeLa cells. (**b**) Relative p53 intensity in SiHa cells.

Figure 3: Analysis of cell death. Cells were labeled with propidium iodide 2 days after transduction as described in material and methods and analyzed with a FACSalibur flow cytometer. Staurosporine (STS) was used as a positive control for apoptosis, and mock-treated cells (MOCK) as negative control. (a) Percentage of apoptotic HeLa cells after indicated treatments. (b) Percentage of apoptotic SiHa cells after indicated treatments.

Figure 4: Cleavage of caspase 3, caspase 7 and PARP1. Immunofluorescence was performed 2 days after transfection with antibodies specific for the cleaved forms of either caspase 3, caspase 7 and PARP1 on HeLa cells (a, c and e) and on SiHa cells (b, d and f). The expression of the artificial miRNA from the bi-cistronic "EmGFP-miRNA" expression cassette was followed by EmGFP fluorescence. Plasmid expressing miRNA directed against LacZ was used as negative control. (a, b) Caspase 3 cleavage. (c, d) Caspase 7 cleavage. (e, f) PARP1 cleavage.

Figure 5: Caspase inhibitors either general or specific for caspase 9 block apoptosis of HPV-transformed cells induced by knockdown of E6. Apoptosis after E6-knockdown was monitored by detection of PARP1 cleavage in presence or absence of caspase inhibitor (1mM) either general (a, b) or specific for caspase 9 (c, d) in HeLa (a, c) and SiHa (b, d) cells. As in figure 4, the expression of the artificial miRNA from the bi-cistronic "EmGFP-miRNA" expression cassette was followed by EmGFP fluorescence.

Figure 6: Evaluation of antitumor efficacy *in vivo*: Eight to 10 weeks old NMRI-Nude mice (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) were subcutaneously injected with 10^7 HeLa cells in the right flank. When tumors reached a size of approximatly 50 mm^3, mice were randomized and received a daily intratumoral injection of vehicle (dialysis buffer) or 5.10^9 PFU of vector (AdLacZ or Ad18E6), for 5 days. Tumor size and mice body weight were measured twice a week. Tumor volume was determined according to the formula $V\ (mm3) = (L \times W^2)/2$, where L and W are the length and the width of the tumor, respectively. The two-tailed Student's *t*-test was used to study the statistical significance of the differences in the tumor volume and the relative tumor growth of the different treatment groups. (a) Relative tumor growth. (b) Kaplan–Meier survival curves, end-point was established at a tumor volume $\geq 1000\ mm^3$.

3. Conclusion

Dans ce travail, nous avons mis au point de nouvelles alternatives thérapeutiques au traitement du cancer du col de l'utérus, par le biais de la construction de vecteurs adénoviraux recombinants non réplicatifs de type 5, exprimant des messagers bi-cistroniques EmGFP/ miARN (dirigés contre E6 HPV 16 ou E6 HPV 18). Le but était d'éteindre l'expression de la protéine E6 dans les cellules HPV positives via l'introduction de miARN artificiels. En combinant l'approche adénovirale et l'ARN interférence, nous avons pu outrepasser les difficultés de transfection pour certains types cellulaires, notamment SiHa, et atteindre une efficacité de transduction proche de 100%.

Ces mêmes vecteurs ont prouvé leurs efficacités *in vitro* dans les cellules HeLa et SiHa, en permettant la diminution du niveau d'expression des messagers E6 (70% d'extinction dans les cellules HeLa et 50% dans les SiHa). Cependant, les primers de RT-PCR quantitative en temps réel ont été choisis pour amplifier les fragments localisés dans l'exon 2 de la région codante d'E6, et quantifiant à la fois la forme full-length d'E6 et sa forme E6*I (Tang et al., 2006). Nous n'avons donc pas pu déterminer laquelle des formes est majoritairement ciblée par les miARN artificiels, c'est pourquoi, il serait intéressant de concevoir un nouveau couple de primers dans l'intron 1 et permettant d'identifier la forme majoritairement dégradée.

L'action d'Ad 18_1 sur HeLa, dont le miARN a été conçu pour cibler l'exon 1 de la région E6, n'a pas été suffisante pour induire une augmentation de l'expression de la protéine p53, mais est cependant responsable de la réduction de l'expression résultante d'E6 à 40%. Ceci peut être expliqué par la diminution de la proportion de messagers E6*I dans les cellules, et impactant le niveau d'expression d'E7. Cette hypothèse devra être développée et étudiée par l'amplification, d'un fragment dans la région intron 1, suggérée précédemment.

Nous avons ensuite étudié les effets de l'augmentation de l'expression de la protéine p53, et *in fine* la survenue de la mort cellulaire par apoptose en réponse à la transduction des vecteurs adénoviraux. Après observation, il est apparu que 2 jours de traitement étaient suffisants pour permettre l'entrée des adénovirus recombinants dans les cellules, l'expression des miARN artificiels et la survenue de la mort cellulaire par apoptose. En effet, nous avons également observé des modifications dans la morphologie cellulaire, comme la condensation et la fragmentation du noyau, et la perte d'adhérence sur les lamelles en verre.

Nous avons également établi que la mort cellulaire par apoptose faisait suite à l'activation de la voie des caspases, et qu'en cas de blocage de celles-ci, aucun processus de mort ne peut être induit suite à la transduction par les adénovirus recombinants ou par le contrôle positif staurosporine.

Enfin, les résultats obtenus nous ont encouragés à tester le potentiel thérapeutique des vecteurs adénoviraux mis au point, lors d'expérimentations *in vivo* dans des souris nude xenogreffées par des cellules HeLa. Nous avons donc pu montrer que les adénovirus recombinants peuvent être utilisés *in vivo* dans des conditions comparables à celles définies *in vitro*, en qu'en procédant à de multiples injections, il est possible d'augmenter la dose virale mais aussi de permettre d'atteindre un maximum de cellules. Suite au traitement par nos adénovirus recombinants, les tumeurs montrent un arrêt de croissance en comparaison avec les tumeurs non traitées, phénomène également observé dans d'autres études **(Fujii et al., 2006)**. Ceci peut être expliqué (i) par la nature non réplicative de la thérapie développée, en effet, la biologie tumorale est différente des conditions *in vitro* (vascularisation, comportement des cellules), et donc (ii) par un phénomène d'apoptose des cellules transduites, mais de croissance continue des cellules non transduites avoisinantes.

Nous avons pu démonter le potentiel thérapeutique des adénovirus recombinants sur des cellules cancéreuses HPV positives, notamment HeLa (HPV 18) et SiHa (HPV 16), tout en étant concomitant avec d'autres études suggérant que l'ARN interférence peut être utilisé comme outil thérapeutique. Cette approche permet l'augmentation du niveau d'expression de la protéine p53 wild-type, puis l'induction du processus de mort cellulaire par apoptose **(Chen et al., 2011; DeFilippis et al., 2003; Sima et al., 2008)**.

II. Résultats non publiés

1. Mise au point préalable des expérimentations

Cette partie des résultats correspond à la mise au point des conditions de transduction et de mesures, réalisée en amont des différents tests *in vivo* sur les différents types cellulaires HPV-positifs ou négatifs. Puis, sont listés les résultats préliminaires et/ou non publiés obtenus durant les derniers mois précédents la rédaction du manuscrit de thèse.

a. Détermination de la multiplicité d'infection (MOI) optimale

Type cellulaire	Observation après transduction	MOI	40 000 cellules/puits	200 000 cellules/puits
SiHa	3 jours	SG 10, 40, 80	Beaucoup de cellules flottantes Peu de cellules restantes à 80	Mort progressive avec toutes les conditions
SiHa	3 jours	SE 10, 40, 80	10 : Différence nette de survie, cellules conservent forme. 40 et 80 : fort taux de mort	10 : fluorescence uniforme, forme conservée et survie globale. 40 et 80 : trop de mort, forme altérée
SiHa	6 jours	SG 10, 40, 80	10 : perte de cellules 40 et 80 : cellules mortes	10 : trop de cellules mortes 40 et 80 : plus du tout de cellules
SiHa	6 jours	SE 10, 40, 80	10 : aucunes cellules mortes 40 : 50% de perte, morphologie changée. 80 : mort totale	10 : survie totale, bonne fluorescence 40 : 50 % de survie 80 : totalité des cellules mortes
CaSki	3 jours	SG 80, 100, 400	Fort taux de croissante en fonction de la MOI. Plus de cellules à 100 et 400	Mort globale quelque soit la MOI
CaSki	3 jours	SE 80, 100, 400	80 : Bonne fluorescence 100 et 400 : mort massive	80 : fluorescence uniforme. 100 et 400 : plus de cellules
CaSki	6 jours	SG 80, 100, 400	Mort croissante en fonction de la MOI.	Mort croissante, totalité des cellules au-delà de 100
CaSki	6 jours	SE 80, 100, 400	80 : fluorescence bonne, survie 100 : 30% de perte 400 : 100 % de perte	80 : fluorescence bonne, survie globale. 100 et 400 : trop de mort
HeLa	3 jours	SG 100, 400, 800	100 : quelques morts, survie bonne 400 et 800 : mort massive, peu de survie	100 : fluorescence bonne, survie 50% 400 et 800 : bonne fluorescence mais mort massive
HeLa	3 jours	SE 100, 400, 800	100 : peu de mort, fluorescence OK 400 : 50 % survie 800 : mort massive	100 : fluorescence bonne et taux de survie élevé. 400 et 800 : trop peu de survie
HeLa	6 jours	SG 100, 400, 800	Mort forte même à 100	Mort forte même à 100
HeLa	6 jours	SE 100, 400, 800	100 : bonne survie, morphologie conservée. 400 : 60 % de perte, au delà mort totale	100 : bonne fluorescence, morphologie conservée et survie globale

Figure 59 : Tableau des conditions testées pour la détermination de la MOI optimale à 3 et 6 jours.

SG : Surnageant viral conservé après les 1h de transduction, et ajout d'1 ml de DMEM 5% FCS.
SE : Surnageant viral éliminé après les 1h de transduction et remplacé par 2 ml de DMEM 5% FCS.

Après production des différents adénovirus recombinants, il a été nécessaire de déterminer la multiplicité d'infection optimale, afin de pouvoir visualiser les effets des miARN exprimés par les adénovirus recombinants, sans toutefois observer d'effets indésirables sur les cellules transduites. En effet, un trop grand nombre de particules virales par cellules peut être responsable de l'induction de la mort cellulaire, dans notre cas aspécifique.

Pour la mise au point des conditions, trois types cellulaires ont été testés, SiHa et CaSki (HPV 16), et HeLa (HPV 18), avec pour chaque type 3 MOI différentes (SiHa : 10,40 et 80 ; CaSki : 80, 100 et 400 ; CaSki et HeLa : 100, 400 et 800) (Figure 59). L'adénovirus LacZ, contrôle négatif exprimant un miARN témoin, a été choisi comme référence pour ces tests. Une première transduction est réalisée avec deux quantités différentes de cellules dans chaque puits (40 000 et 200 000 cellules), en effet, l'Ad LacZ étant un témoin négatif, il est supposé ne pas affecter la croissance cellulaire. De plus, nous souhaitions pouvoir observer le comportement des cellules transduites sur plusieurs jours sans pour autant atteindre une confluence de 100%. La première observation des cellules au microscope, 3 jours après transduction, nous a permis de d'identifier dans chaque type cellulaire les MOI les moins adaptées à la transduction. Puis la seconde observation, 6 jours après transduction, a permi de confirmer les premières observations.

Les MOI optimales déterminées sont :

- SiHa : 10 particules virales par cellules
- CaSki : 80 particules virales par cellules
- HeLa : 100 particules virales par cellules

Le MOI choisies permettent donc de visualiser une fluorescence uniforme, et un grand nombre de cellules fluorescentes, corrélé à l'expression du messager bis-cistronique (protéine rapportrice EmGFP et microARN interférent) et une absence d'effets secondaires. En effet, les MOI supérieures à celles définies plus haut, causaient beaucoup d'effets indésirables sur les cellules, notamment des altérations de forme et le décollement des cellules, indicateurs d'un début de mort cellulaire. On observe dans la totalité des puits testés avec une MOI supérieure, la mort massive des cellules transduites.

Nous avons également testés deux autres conditions de transduction, qui sont après une heure d'incubation à 37°C, l'ajout de 1 ml de DMEM 5% FCS au surnageant viral déjà en présence des cellules (condition SG), ou bien l'élimination du surnageant viral et son remplacement par du milieu DMEM 5% FCS frais (condition SE). Nous avons pu constater

que la condition SE permettait une meilleure survie globale des cellules transduites, potentiellement dû à la présence de chlorure de césium résiduel, ayant permis la purification des adénovirus recombinants utilisés.

b. Calcul de l'efficacité des couples de primers de qRT-PCR

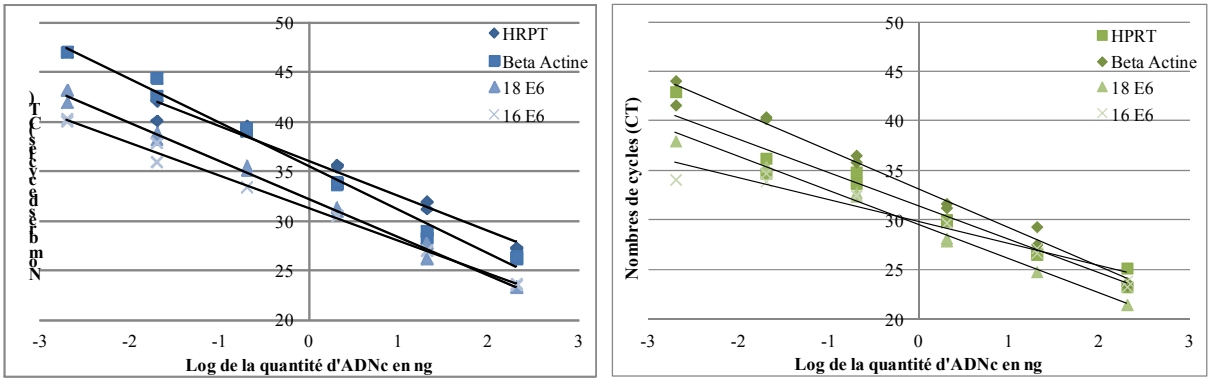


Figure 60 : Courbes d'étalonnage des différents couples de primers.

A gauche, courbes de chaque couple de primers à concentration 50 nM.
A droite, courbes de chaque primers à concentration 300 nM

Primers	Quantité	Equation de la courbe de tendance	Pente calculée	Efficacité : E	Pourcentage d'efficacité : %E
HRPT	**50/50 nM**	y = -3,5411x + 36,043	- 3,5411	1,916012	**92 %**
HPRT	**300/300 nM**	y = -3,3896x + 31,424	- 3,3896	2,141782	114 %
Beta Actine	**50/50 nM**	y = -4,4262x + 35,577	- 4,4262	1,682393	68 %
Beta Actine	**300/300 nM**	y = -3,91x + 33,079	- 3,91	1,801999	80 %
18 E6	**50/50 nM**	y = -3,8624x + 32,22	- 3,8624	1,815124	82 %
18 E6	**300/300 nM**	y = -3,4489x + 29,485	- 3,4489	1,949609	**95 %**
16 E6	**50/50 nM**	y = -3,2993x + 31,289	- 3,2993	2,00953	**101 %**
16 E6	**300/300 nM**	y = -2,2167x + 29,81	- 2,2167	2,825667	183 %

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{pente}\right)} \text{ et } \%E = ((E-1) * 100)$$

Afin de déterminer l'efficacité de chaque couple de primers que nous avons sélectionné, des courbes d'étalonnage ont été réalisées avec deux concentrations de primers différentes, 4 couples de primers et des dilutions en cascade d'un échantillon de d'ADNc non traité **(Figure 60)**.

Les conditions optimales, c'est-à-dire une efficacité comprise entre 90 et 105% ont été réunies pour les couples HPRT et 16 E6, à une concentration de 50 mM, et pour 18 E6 à une concentration de 300 mM.

2. Action des adénovirus recombinants sur différents types cellulaires

a. Effets des miARN sur les niveaux d'expression protéiques

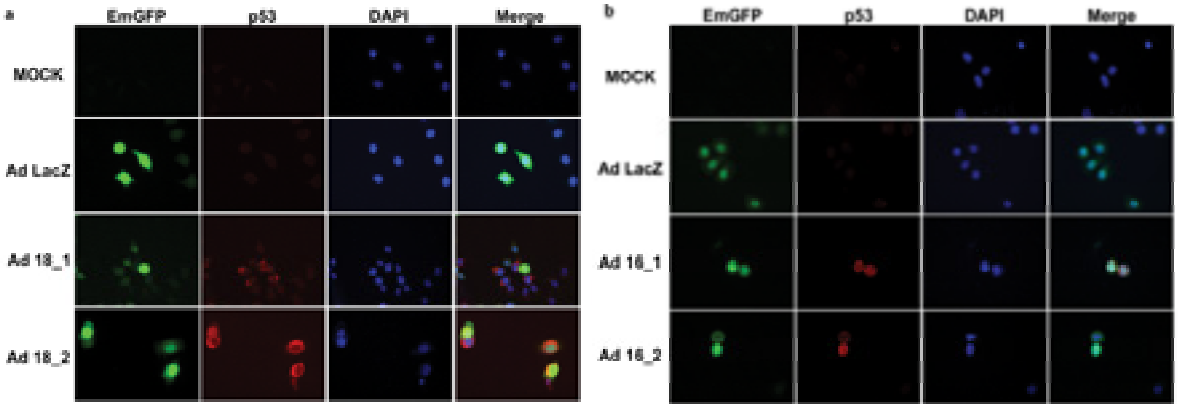


Figure 61 : Marquage de la protéine p53 en immunofluorescence

Marquage réalisé dans les cellules HeLa (**a**) et dans les cellules SiHa (**b**), après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Après traitement les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage des protéines est effectué par des anticorps spécifiques p53 (DO-1, SantaCruz Biotech).

Dans cette expérience, nous nous sommes intéressés aux niveaux d'expression de la protéine p53, dont l'interaction avec E6 induit sa dégradation. Nous observons au sein des cellules HeLa (**Figure 61a**), que suite à la transduction par l'Ad 18_2, le niveau d'expression de la protéine p53 augmente, en comparaison avec le témoin négatif Ad LacZ, et le témoin non traité MOCK. De plus, ces résultats sont en accord avec les résultats de western blot (voir publication).

L'augmentation de l'expression de la protéine p53 au sein des cellules SiHa (**Figure 61b**), à également été visualisée en immunofluorescence après 2 jours de transduction. En accord avec les résultats obtenus en western blot (voir publication), nous observons une augmentation du niveau d'expression de la protéine p53 suite à la transduction par les adénovirus recombinants Ad 16_1 et Ad 16_2.

Dans les cellules CaSki, après 2 jours de traitement, on constate une augmentation du niveau d'expression de la protéine p53 suite au traitement par l'Ad 16_1, en comparaison avec le traitement au MG132 (inhibiteur du protéasome), contrôle positif de l'augmentation de p53 **(Figure 62 gauche)**. Cette augmentation est la représentation indirecte de la diminution de l'expression des messagers 16 E6, se manifestant par l'augmentation du niveau d'expression de p53, qui n'est donc plus dégradé. Par immunofluorescence, nous pouvons

également observer, que seul le traitement avec l'Ad 16_1 induit une augmentation du niveau d'expression de p53 **(Figure 62 droite)**.

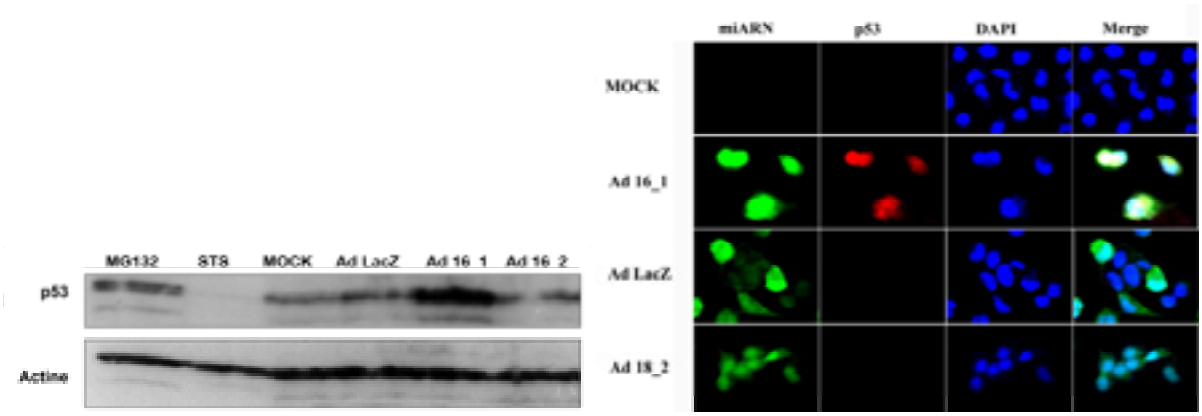


Figure 62 : Marquage de la protéine p53 par western blot et immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules CasKi, après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour le western blot, les cellules sont récoltées, puis lysées et les surnageants sont déposés sur gel SDS dénaturant à 12% de polyacrylamide. Après migration, un protocole de transfert liquide permet de transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose avant blocage et marquage par des anticorps spécifiques. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage des protéines est effectué par des anticorps spécifiques (DO-1 pour p53).

En conclusion, les deux miARN 16_1 et 18_2 sont donc capables d'induire l'augmentation du niveau d'expression de p53 respectivement dans les cellules SiHa et CasKi, et dans les cellules HeLa.

b. Contenu en ADN et quantification des cellules en sub-G1

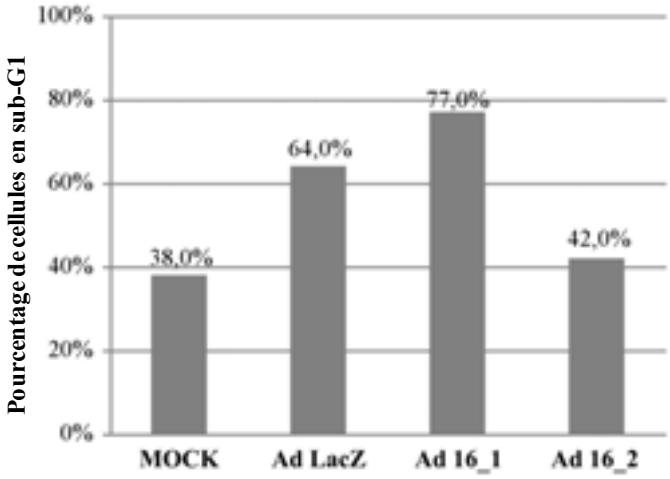


Figure 63 : Analyse du cycle cellulaire et pourcentage de cellules en sub-G1

Le marquage à l'iodure de propidium est réalisé dans les cellules CasKi, après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Les cellules sont récoltées, lavées puis fixées sur la nuit dans une solution de PGE 30% - Ethanol 70%. Après centrifugation les cellules sont resuspendues dans 100 µl de PGE et 5 µl d'iodure de propidium sont ensuite ajoutés. Les cellules sont ensuite analysées au FACscalibur.

Afin de corréler la diminution d'expression d'E6, l'augmentation du niveau de p53 à la mort cellulaire, nous nous sommes intéressés au contenu en ADN des cellules transduites. L'étude du cycle cellulaire des cellules CasKi **(Figure 63)** après marquage à l'iodure de propidium (1 mg/ml) et l'analyse du contenu en ADN par FACScalibur, révèle une augmentation de la proportion de cellules déplacées dans la fraction sub-G1. En effet, 77% des cellules traitées par l'Ad 16_1 sont déplacés dans la fraction sub-G1 du cycle cellulaire, en comparaison avec les cellules non traitées où 38% d'entres elles sont déplacées dans la fraction sub-G1. Cette augmentation du pourcentage de cellules déplacées dans cette fraction indiquerait un processus de mort cellulaire par apoptose après traitement par l'adénovirus recombinant Ad 16_1. Le déplacement de 64% des cellules traitées par Ad LacZ peut être expliqué par le comportement et la fragilité inhérents aux cellules CaSki.

Les résultats de ces tests *in vitro* préliminaires réalisés sur les cellules CaSki renforcent ceux obtenus sur les cellules SiHa (voir publication). En effet, l'Ad 16_1 a également montré ses effets sur un autre type cellulaire HPV-16 positif, SiHa, et renforce l'hypothèse de l'induction de la mort cellulaire par apoptose des cellules traitées.

c. Induction de la mort cellulaire: clivage des caspases et de la PARP

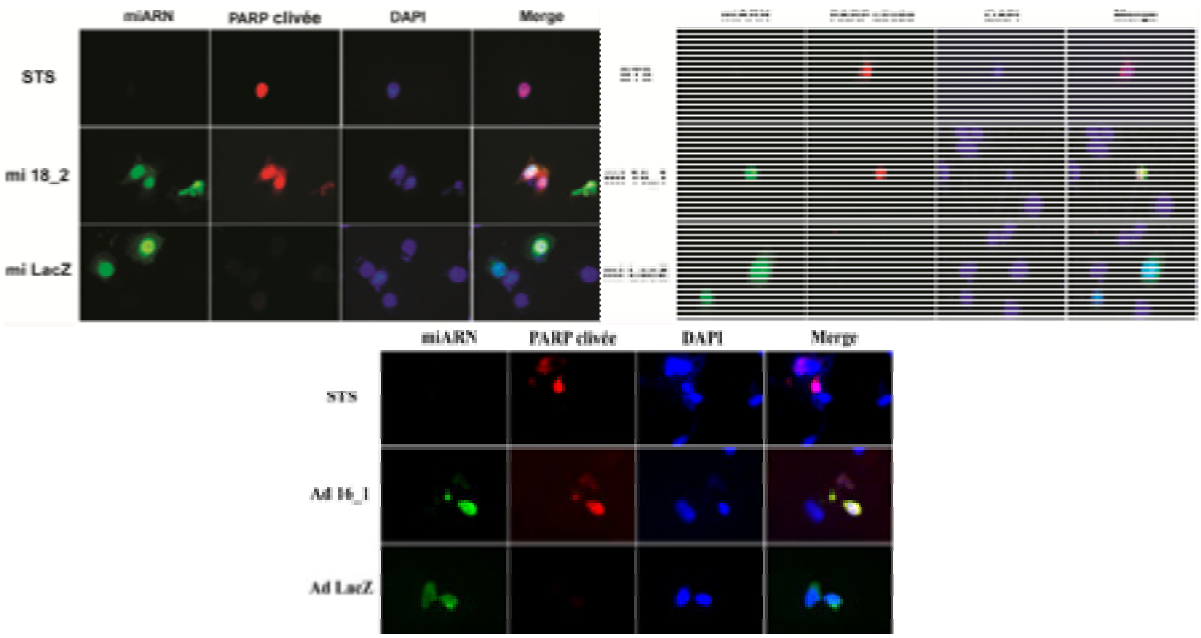


Figure 64 : Marquage de la PARP clivée par immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules HeLa (gauche), SiHa (droite) et CasKi (centre) après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage est effectué par anticorps spécifique PARP clivée (Asp214) (D64E10) (Cell signaling).

Afin de mettre en évidence les mécanismes d'induction de l'apoptose nous avons vérifié les profils de clivage de la PARP, marqueur de l'apoptose, par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques PARP clivée **(Figure 64)**. Les résultats obtenus sur les cellules HeLa, SiHa et CasKi montrent un clivage de la PARP après action soit du mi 18_2, soit du mi 16_1.

Des altérations de la morphologie cellulaire, visibles sur les clichés ci-dessus, comme la condensation du noyau et sa fragmentation, mais aussi la perte d'adhérence des cellules transduites, nous ont conduit à l'hypothèse de l'induction de la mort cellulaire au sein des cellules traitées. La différence entre cellules transduites par l'Ad 16_1 ou Ad 18_2 et les autres Ad est clairement visible, et de plus, il est plus difficile de trouver des cellules traitées toujours adhérentes et celles-ci sont bien plus petites et condensées.

En comparaison, le mi LacZ n'a d'effet ni sur le clivage de la PARP ni sur la condensation des noyaux. Le témoin positif inducteur de la mort cellulaire par apoptose, la staurosporine (STS) nous permet à la fois visualiser le clivage de la PARP et la condensation des noyaux.

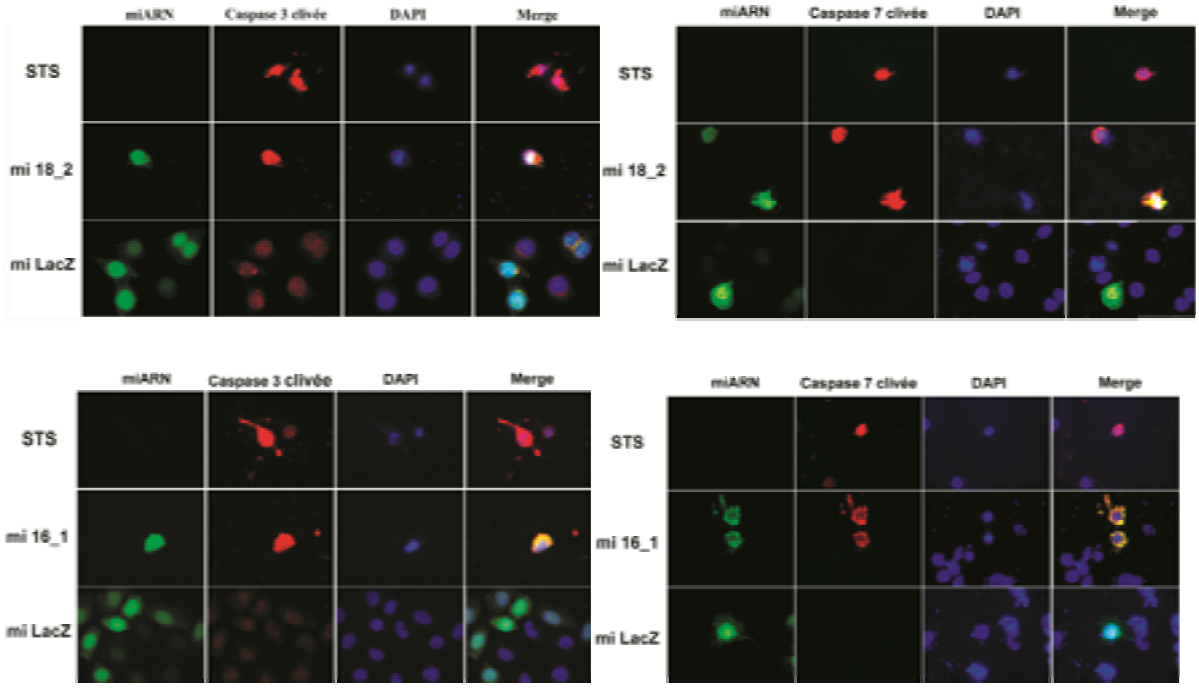


Figure 65 : Marquage des caspase 3 et 7 clivées par immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules HeLa (en haut), SiHa (en bas) après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage est effectué par anticorps spécifiques caspase 3 clivée (ab13847, Abcam) et caspase 7 clivée (Asp198, Cell signaling).

Parallèlement au clivage de la PARP, nous avons également vérifié le clivage et l'activation des caspases effectrices de la réponse apoptotique. Les résultats obtenus sur les cellules HeLa **(Figure 65 haut)** nous montrent que l'action du mi 18_2 induit le clivage de la caspase 3 et de la caspase 7. Au sein des cellules SiHa **(Figure 65 bas)**, les résultats obtenus suite à l'utilisation du mi 16_1 sont comparables. Le mi 16_1 induit également le clivage des caspases 3 et 7. En comparaison, le mi LacZ n'a pas d'effets sur le clivage des caspases 3 et 7. De plus, le témoin positif STS induit également le clivage des caspases 3 et 7, doublé d'une condensation des noyaux.

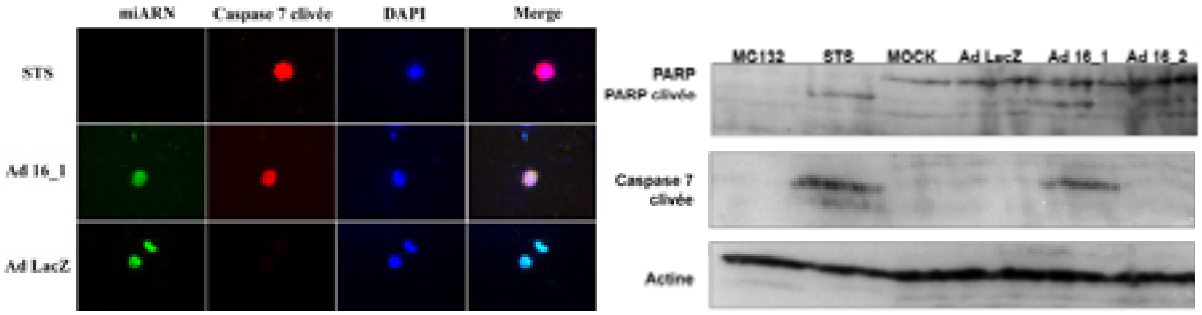


Figure 66 : Marquage de la caspase 7 et de la PARP clivées par western blot et immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules CasKi, après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour le western blot, les cellules sont récoltées, puis lysées et les surnageants sont déposés sur gel SDS dénaturant à 12% de polyacrylamide. Après migration, un protocole de transfert liquide permet de transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose avant blocage et marquage par des anticorps spécifiques. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage est effectué par anticorps spécifiques caspase 7 clivée (Asp198) et PARP clivée (Asp214) (D64E10, Cell signaling).

Dans les cellules CasKi **(Figure 66)** qui sont tout comme les SiHa HPV-16 positives, l'utilisation de l'Ad 16_1 montre les mêmes résultats que précédemment. Les clivages de la caspase 7, ainsi que de la PARP, ont également été observés par immunofluorescence après 2 jours de transduction, après traitement par la STS et l'Ad 16_1, en comparaison avec les traitements par l'Ad témoin LacZ.

Ces résultats sont concomitants avec l'augmentation de l'expression de la protéine p53, suite à l'action du miARN dirigé contre 16 E6. Ils viennent appuyer l'observation du clivage de la caspase 3 par immunofluorescence après 2 jours de traitement. De plus, ils confirment les hypothèses listées dans la publication n°1, c'est-à-dire l'induction de l'apoptose suite au traitement par l'Ad 16_1, via l'activation de la voie des caspases et de leurs effecteurs.

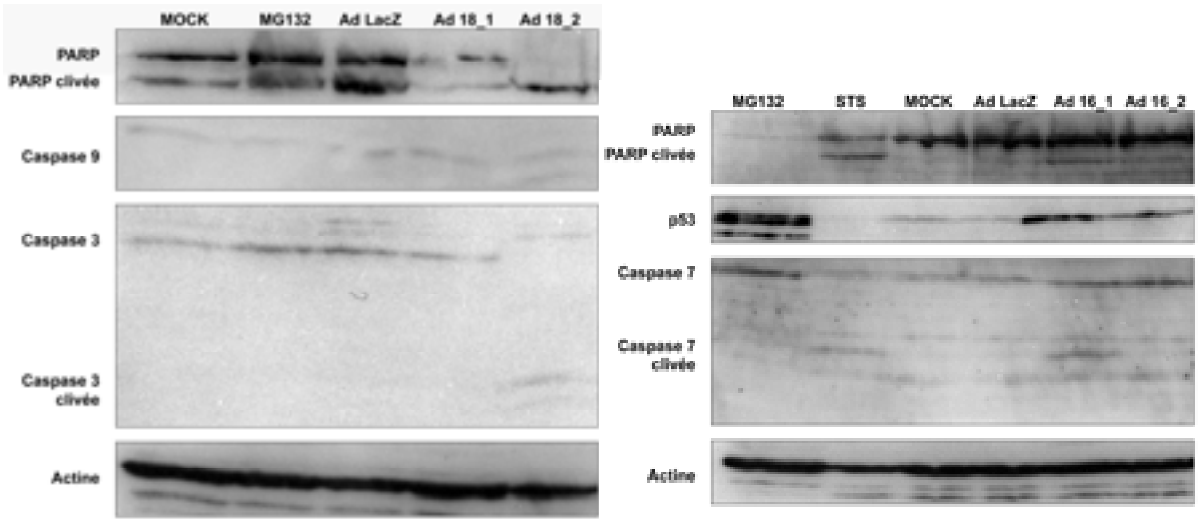


Figure 67 : Expression et clivage des caspases 3, 7, 9 et de la PARP

Le marquage est réalisé dans les cellules HeLa (gauche) et SiHa (droite), après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour le western blot, les cellules sont récoltées, puis lysées et les surnageants sont déposés sur gel SDS dénaturant à 12% de polyacrylamide. Après migration, un protocole de transfert liquide permet de transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose avant blocage et marquage par des anticorps spécifiques

Après 2 jours de traitement dans les cellules HeLa **(Figure 67 gauche)**, nous avons pu observer le clivage de la caspase 3 dans les cellules traitées par l'Ad 18_2, et qui semble également se vérifier pour la caspase 9, par l'apparition d'une seconde bande (caspase 9 clivée) sous la forme pro-caspase 9. Le traitement par les autres adénovirus recombinants, n'a pas d'effet sur le clivage des caspases, et les cellules présentent le même profil que celles non traitées. Le clivage de la PARP est cependant moins clair, en effet, nous observons l'absence de la bande pro-PARP, mais une expression du grand fragment de PARP clivée (bande inférieure) suite au traitement par l'Ad 18_2. Les échantillons non traités et traités présentent quant à eux les deux formes de la PARP, clivée et non clivée. Cette observation du clivage de la caspase 3 par western blot, vient conforter les précédentes observations faites en immunofluorescence, par marquage de la caspase 3 clivée.

Une analyse du profil de clivage des caspases et de la PARP à été réalisée au sein des cellules SiHa **(Figure 67 droite)** après 2 jours de transduction par les adénovirus recombinants. Celle-ci a révélé un clivage de la caspase 7, ainsi que de son effecteur PARP après traitement par l'Ad 16_1, tout comme pour le contrôle positif staurosporine. A l'inverse, les traitements par le MG132 (inhibiteur du protéasome), par l'Ad LacZ (adénovirus témoin) ou par l'Ad 16_2, n'ont pas d'effet sur le clivage et l'activation de la voie des caspases, et les cellules traitées présentent le même profil que les cellules non traitées de l'échantillon MOCK. Ces résultats sont concomitants avec l'augmentation de l'expression de la protéine

p53, suite à l'action du miARN dirigé contre 16 E6. Ils viennent appuyer l'observation du clivage de la caspase 3 par immunofluorescence après 2 jours de traitement. De plus, ils confirment les hypothèses listées dans la publication n°1, c'est-à-dire l'induction de l'apoptose suite au traitement par l'Ad 16_1, via l'activation de la voie des caspases et de leurs effecteurs.

En conclusion de cette première partie, nous avons pu observer sur les différents types cellulaires traités, la capacité des différents miARN à induire l'augmentation des niveaux d'expression de la protéine p53, en réponse à l'inhibition de l'oncoprotéine E6 d'HPV. Cette augmentation des niveaux de p53 permet en retour l'activation de la voie d'apoptose intrinsèque via la mitochondrie et le clivage des caspases effectrices ainsi que de la PARP, marqueur cellulaire de l'apoptose.

3. Potentiel thérapeutique des adénovirus sur d'autres types de cancers

a. Effets des adénovirus recombinants sur les cellules SQ20B

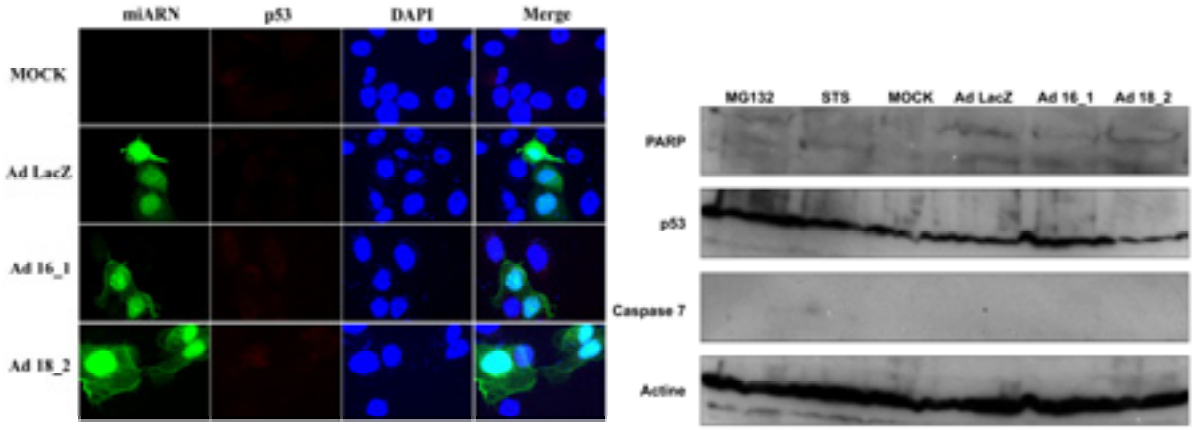


Figure 68 : Marquage de la protéine p53 en immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules SQ20B, après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour le western blot, les cellules sont récoltées, puis lysées et les surnageants sont déposés sur gel SDS dénaturant à 12% de polyacrylamide. Après migration, un protocole de transfert liquide permet de transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose avant blocage et marquage par des anticorps spécifiques. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage est effectué par anticorps spécifiques p53 (DO-1, SantaCruz Biotech), caspase 7 clivée (Asp198), PARP clivée (Asp214) (D64E10, Cell signaling).

Dans un nouveau volet de la thèse, nous nous sommes ensuite interrogés sur l'utilisation de nos adénovirus recombinants sur des types cellulaires issus de cancers différents, tel que les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS), notamment oropharyngée. Les deux

lignées cellulaires utilisées, SQ20B HPV négatives et SCC90 HPV-16 positives proviennent de notre collaboration avec Alain Jung et Elodie Hanns du Centre Paul Strauss de Strasbourg.

Les résultats obtenus par WB et par IF sur les SQ20B **(Figure 68)** montrent après 2 jours de traitement qu'aucuns des Ad recombinants n'induits d'augmentation du niveau d'expression de p53, suite à l'expression des mi 16_1 ou 18_2. Les cellules ne présentent pas non plus de condensation de leurs noyaux, ni de changement de forme. Ces observations nous montrent que les miARN agissent bien spécifiquement sur les cellules HPV positives et que les adénovirus en eux-mêmes n'ont aucun effet sur les cellules traitées. L'effet de knockdown d'E6 et d'augmentation de p53 des miARN exprimés par les adénovirus recombinants, ainsi que l'activation de la voie des caspases sont donc bien spécifiques aux cellules HPV-positives, et ne sont pas observés dans les cellules HPV-négatives.

b. Etude des effets des adénovirus recombinants sur les cellules SCC90

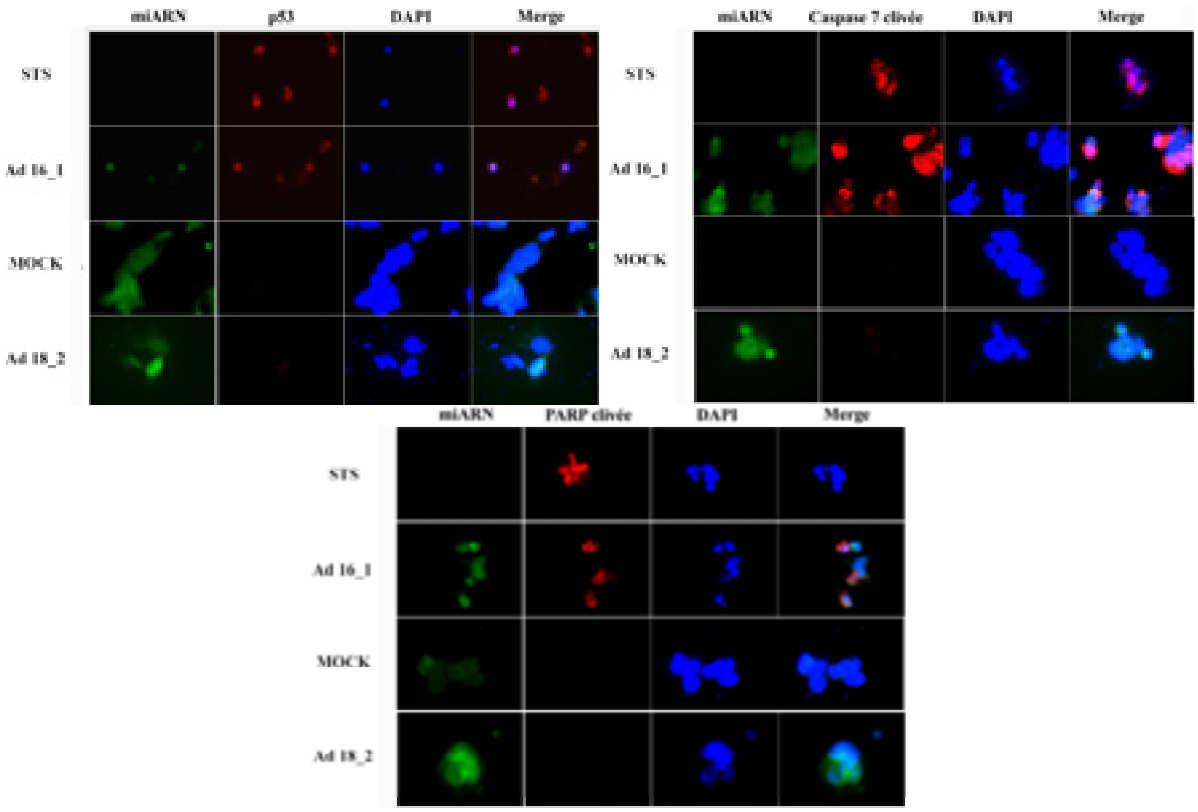


Figure 69 : Marquage de p53, de la caspase 7 et de la PARP clivées en immunofluorescence

Le marquage est réalisé dans les cellules SCC90 après 48h de transduction par les adénovirus recombinants. Pour l'immunofluorescence, après traitement, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de 3% paraformaldéhyde et perméabilisées par une solution de PBS – 0,1% Triton. Le marquage est effectué par anticorps spécifiques p53 (DO-1, SantaCruz Biotech), caspase 7 clivée (Asp198), PARP clivée (Asp214) (D64E10, Cell signaling).

Dans un second temps nous avons transduit les cellules SCC90 HPV-16 positives. Nous avons également procédé aux tests sur cellules SCC90, HPV-16 positives, issues de cancer VADS. Dans ce cas, comme dans le précédent, nous avons utilisé une MOI intermédiaire de 50 particules virales par cellules, et étudié les cellules après 2 jours de traitement avec les adénovirus recombinants (Figure 69).

Les résultats obtenus suite à la transduction par l'Ad 16_1 mettent en évidence l'augmentation du niveau d'expression de p53, le clivage de la caspase 7 et de la PARP, en comparaison aux témoins négatifs MOCK et Ad 18_2. En parallèle, le traitement à la STS, contrôle positif de l'apoptose, provoque le clivage de la caspase 7, ainsi que de la PARP, tout comme le traitement avec Ad 16_1. Ces résultats préliminaires nous indiquent qu'après traitement par Ad 16_1, les cellules présentent également un phénotype altéré, avec noyaux condensés, perte d'adhérence et formes arrondies, indiquant la mort cellulaire par apoptose.

Ces adénovirus sont donc utilisables dans d'autres types de cancers, et les résultats obtenus devront être confirmés par d'autres études. Cette hypothèse devra être vérifiée à l'aide d'autres expériences, comme celles faites pour les autres types cellulaires. Et il serait notamment envisageable d'effectuer des tests sur modèle murin assez rapidement, en effet, les SCC90 sont des cellules qui forment facilement et naturellement des agrégats lors de la culture en boite, conditions idéales pour l'injection sous cutanée et la formation de tumeurs.

4. Nouvelles stratégies de ciblage par vecteur adénoviral

a. Knockdown des kinases impliquées dans la voie de signalisation de p53

Au sein du laboratoire à été initié un projet de criblage du kinôme humain afin d'identifier les kinases intervenant dans la voie de signalisation de p53 et permettant sa restauration à haut niveau d'expression dans les cellules HPV positives.

Kinase ciblées	Séquence du miARN
PANK3 Panthotenate kinase 3	GACAAGCCGTGCTATTATT
NRBP1 Nuclear receptor Binding Protein 1	ATCTGGGACTGAAGCAATT
NTRK1 Neutrophic Tyrosine Kinase Receptor type 1	GAACCTGAGAGCTCTACAT

Figure 70 : Tableau récapitulatif des séquences des différents miARN dirigés contre les kinases

Suite à ce criblage, un pool de plusieurs kinases, dont le knockdown permet l'augmentation du niveau d'expression de p53, a été identifié, parmi lesquelles les kinases NRBP1, PANK3 et NTRK1. En se basant sur ces données nous avons conçus 3 miARNs ciblant ces dernières kinases **(Figure 70)**.

Nous avons ensuite construit et produit les adénovirus recombinants exprimant les miARN listés ci-dessus grâce au clonage Gateway.

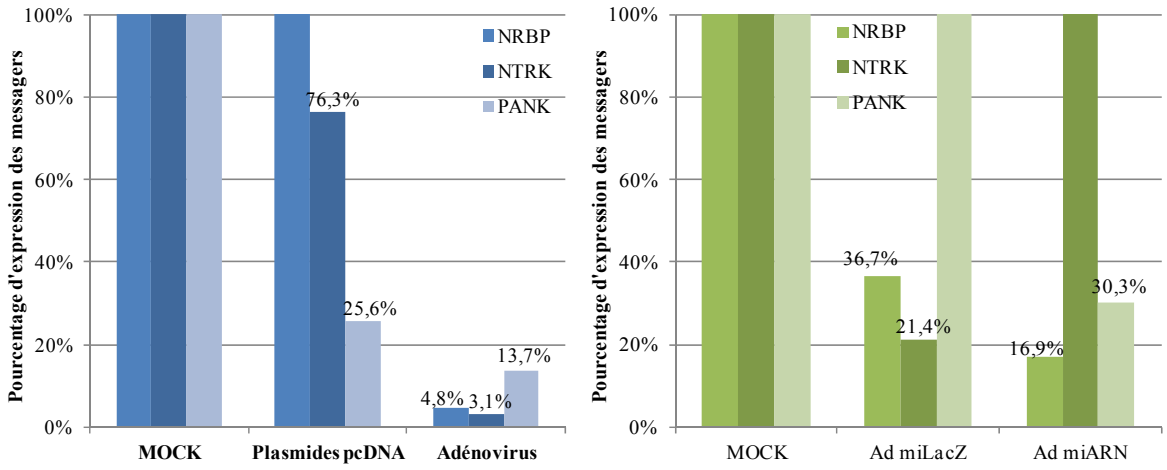


Figure 71 : Graphiques des expressions résultantes des messagers NRBP, NTRK et PANK

Après traitement, les cellules HeLa (gauche) et SiHa (droite) sont récoltées, et les culots cellulaires sont ensuite traités avec le kit RNeasy Plus (Qiagen) afin d'en extraite l'ARN. Le contenu total d'ARN est ensuite reverse transcrits en ADNc grâce au kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). Pour les cADN résultants sont quantifiés en système StepOnePlus™ Real-Time PCR.

Afin de vérifier les effets des miARN ciblant les différentes kinases nous avons procédé à des analyses par PCR quantitative en temps réel l'aide de primers spécifiques à ces dernières kinases. Nous avons à la fois testé les plasmides d'expression pcDNA créées durant le clonage ainsi que les adénovirus recombinants.

Les résultats obtenus nous indiquent que les expressions résultantes dans les cellules HeLa suite à la transfection des pcDNA sont de 100% pour NRBP1, 76,3% pour NTRK1 et 25,6% pour PANK3 **(Figure 71)**. Alors qu'elles sont de 4,8% pour NRBP1, 3,1% pour NTRK1 et 13,7% pour PANK3, après transduction par les adénovirus recombinants. Ces données nous indiquent que les miARN éteignent bien l'expression des différentes kinases avec une haute efficacité.

Concernant les expressions résultantes dans les cellules SiHa, elles ont été comparées pour chaque kinase après traitement avec les deux adénovirus, Ad LacZ (témoin) et l'adénovirus exprimant le miARN **(Figure 71)**. Après 2 jours de traitement avec les différents

adénovirus, nous pouvons voir que les expressions résultantes sont de 16,9% pour NRBP1 et 30,3% pour PANK3, alors que pour NTRK1, elle reste inchangée (100%) par rapport à la référence non traitée MOCK.

L'adénovirus témoin, Ad LacZ, induit cependant une extinction des expressions des kinases NRBP1 (36,7%) et NTRK1 (21,4%) par rapport aux échantillons non traités MOCK.

Nous avons ensuite vérifié si les diminutions des niveaux des messagers permettaient une augmentation des niveaux de p53. Cependant, aucun effet n'a été observé sur p53 suite à la transduction des adénovirus recombinant ou la transfection des plasmides d'expression.

Dans le cas de la kinase NRBP, deux siARN utilisés au laboratoire ont cependant permis d'induire une dégradation du messager NRBP cible et en réponse d'augmenter les niveaux d'expression de p53. Or, ces résultats se sont avérés impossible à reproduire avec d'autres siARN dirigés contre NRBP, provenant d'un autre fournisseur. Dans ce cas, l'effet sur la protéine p53 est donc séquence spécifique. Au vu des résultats peu encourageants des miARN sur le niveau de p53, cette partie du projet a été abandonnée.

b. Construction des adénovirus recombinants pAd 18 E7 et pAd 16 E7

Nom	Cible	Localisation	Position	Séquence du miARN
16 E7_1	E7 HPV 16	Intron 1	384	AACCGTTGTGTGATTTCTTAA
16 E7_2	E7 HPV 16	Exon E7	701	CGGACAGAGCCCATTACAATA
18 E7_1	E7 HPV 18	Intron 1	358	TGTATGGAGACACATTGGAAA
18 E7_2	E7 HPV 18	Exon E7	765	ACACAATGTTGTGTATGTGTT

Figure 72 : Tableau récapitulatif des séquences des miARNs ciblant la protéine E7

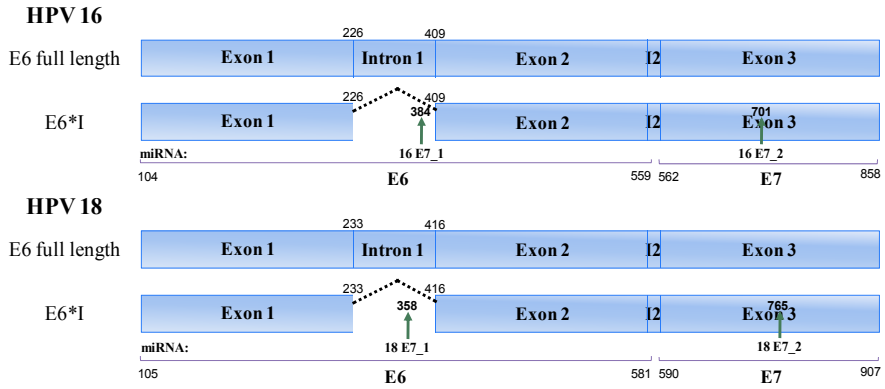


Figure 73 : Schéma récapitulatif de localisation des miARNs au sein des ORF E7

Après conception des différents miARN ciblants E7 HPV-18 et E7 HPV-16 **(Figure 72 et 73)**, selon le même schéma que les miARN ciblant E6, les oligos ont été commandés, puis clonés dans les plasmides d'expression pcDNA et dans les vecteurs adénoviraux finaux pAd. L'étape suivante a été la production, dans les cellules 293A, des quatre adénovirus recombinants Ad 16 E7_1, Ad 16 E7_2, Ad 18 E7_1 et Ad 18 E7_2.

Cette étape de construction devra être suivie par les tests in vitro des différents adénovirus sur les cellules SiHa et HeLa, afin de déterminer l'efficacité d'extinction de la cible de chaque adénovirus, puis le potentiel thérapeutique qu'ils pourraient représenter.

Conclusion générale

Actuellement, le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer féminin le plus fréquent. Il constitue notamment un problème majeur dans les pays en voie de développement. En effet, l'infection par les papillomavirus humains (HPV) est nécessaire mais pas suffisante à l'apparition de cancers, et de nombreux facteurs étiologiques interviennent, tels que la multiparité, ou le statut social. L'incidence de ce cancer est également fortement corrélée à l'accès aux méthodes de dépistage et aux soins des populations à risques.

Les mécanismes de carcinogénèse sont principalement mis en place suite à l'expression de deux protéines virales, E6 et E7, capables de déréguler le cycle cellulaire. Les traitements conventionnels actuels du cancer du col de l'utérus sont principalement basés sur des traitements locaux, comme la radiothérapie, dans les stades précoces, mais deviennent rapidement plus globaux, traumatisants et lourds, comme l'hystérectomie, dans les stades les plus avancés. Récemment, deux vaccins prophylactiques ont été mis au point, Gardasil et Cervarix. Toutefois, ils se révèlent inefficaces pour les femmes déjà infectées par HPV ou présentant des lésions cancéreuses. D'autres vaccins thérapeutiques, pouvant être également utilisés de manière prophylactique, et visant à induire une réponse immunitaire contre les antigènes HPV sont actuellement en études cliniques.

Cependant, le développement de thérapies innovantes et plus efficaces reste un challenge majeur dans la lutte contre le cancer du col de l'utérus. En effet, la vaccination est non obligatoire et ne protège que contre 4 types d'HPV, 2 de « bas-risques » types 6 et 11, responsables de condylomes, et 2 « haut-risque », types 16 et 18, responsables de 70% des cancers du col de l'utérus. De nouvelles études approfondissant les connaissances sur les interactions des vecteurs viraux de transfert de gènes et leurs hôtes permettront le développement de nouvelles approches thérapeutiques efficaces, sélectives et avec une forte réduction des effets secondaires.

Lors de mon doctorat nous nous sommes concentrés sur le ciblage des deux oncoprotéines virales E6 et E7, impliquées dans le développement du cancer du col de l'utérus. Nous avons axés nos travaux plus particulièrement sur l'extinction de celles-ci, afin de permettre de rétablissement des contrôles cellulaires et l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

Mon projet de thèse a consisté en la mise au point de vecteurs adénoviraux recombinants, ainsi qu'à leurs tests *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles cellulaires. Le projet s'est

découpé en quatre étapes, (i) la construction des plasmides adénoviraux en utilisant la technologie de clonage par Gateway, (ii) la production de ces vecteurs adénoviraux en système cellulaire adapté, (iii) les tests *in vitro* sur cellules HPV-positives HeLa (HPV18), SiHa (HPV16) et Caski (HPV16), (iv) et les tests *in vivo* sur modèle murin.

Concernant E6, nous avons tout d'abord sélectionné les miARNs, 2 miARNs ciblant 16E6 et 2 miARNs ciblant 18E6 à l'aide d'un outil de design en ligne. Nous avons choisi des séquences au sein du premier intron de l'ARN pré-messager E6 E7. Suite à l'épissage de l'intron 1 de la région codante E6, le messager E6*I généré permet une production majoritaire d'E7, alors que le messager full-length E6E7 (contenant l'intron E6) produit majoritairement E6 **(Tang et al., 2006).** De cette manière, les miARN générés devraient affecter principalement E6. Nous avons également utilisé un miARN dirigé contre LacZ, servant de témoin négatif. Le clonage par Gateway a ensuite permis de construire et de produire les vecteurs adénoviraux. Afin de vérifier les effets cellulaires des miARNs, nous avons transduit les différents Ad-miARN dans 3 types cellulaires, SiHa et CasKi (HPV16) et HeLa (HPV18). Puis, nous avons analysé l'effet direct des miARNs sur la diminution de l'expression des messagers E6 par qRT-PCR et l'effet indirect sur la remontée de p53.

En conclusion des différentes expériences réalisées sur les trois types cellulaires nous pouvons dire que le knockdown d'E6 est observé pour les cellules HeLa et SiHa, respectivement par Ad 18_2 et Ad 16_1. De plus, l'expression de p53 est augmentée dans les cellules HeLa, SiHa et CasKi, en réponse au knockdown effectué.

Afin de corréler ces différents paramètres à la mort cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'effet sur le cycle cellulaire, analysé en cytométrie de flux après marquage de l'ADN. Les résultats obtenus nous ont permis tout d'abord d'observer une augmentation du nombre de cellules HeLa, SiHa et CasKi déplacées dans la fraction sub-G1 du cycle cellulaire. Puis, nous avons pour observer l'activation des caspases 9, 3 et 7 et de la PARP et l'induction de la mort cellulaire des cellules tumorales via la voie intrinsèque d'apoptose pour les cellules HeLa, SiHa et CasKi.

Les résultats obtenus étant très encourageants, nous avons également entrepris la mise au point d'un protocole *in vivo* sur modèle de tumeurs HeLa dans des souris nude. La mort des groupes de souris témoins débute 2 semaines après le dernier traitement et se solde par la mort de la quasi totalité des souris non traitées après 5 semaines. En comparaison, 5 semaines après la dernière injection d'adénovirus recombinant, Ad 18_2, 100% des souris traitées survivent.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'augmentation considérable de la survie des souris traités par adénovirus recombinant. Ces derniers sont donc transposables à l'utilisation in vivo pré-clinique dans des modèles murins.

Parallèlement au ciblage de E6, nous avons également abordé un nouveau volet de développement de troise nouvelles approches thérapeutiques de ciblages via les adénovirus recombinants. La première focalisant sur 3 kinases : NRBP1, NTRK1 et PANK3. Ces kinases ont été sélectionnées lors d'un criblage par siARN du kinôme humain (communication personnelle de Xavier Bernard, Murielle Masson, Georges Orfanoudakis et Laurent Brino). Le critère de sélection était la restauration du niveau de p53 dans les cellules HeLa. Les siARN sélectionnés ont été vérifiés après criblage pour à la fois l'extinction de la cible et la remontée de p53. Les miARN ont été sélectionnés *in silico*, leurs séquences codantes clonées dans le plasmide d'expression bi-cistronique des miARN et les vecteurs adénoviraux ont été construits et produits. Les tests ont montré une bonne extinction des cibles par les miARN, par contre aucune remontée de p53 n'a été observée dans les cellules HeLa ou SiHa. Suite à ces résultats peu encourageants, cette partie de mon projet a été interrompue.

La seconde approche de ciblage a porté sur l'utilisation des adénovirus recombinants comme nouvelles stratégies thérapeutiques contre d'autres types de cancers HPV positifs, tels que les cancers VADS (Voies AéroDigestives Supérieures). En effet certaines de ces tumeurs VADS sont associées à des infections HPV (majoritairement HPV16). Très récemment nous avons utilisé l'Ad16_1 sur des cellules de cancers VADS **(Guihard et al., 2012; Jung et al., 2010)**, les cellules SCC90 (HPV16) et les cellules SQ20B (HPV négatives). Les résultats *in vitro* obtenus au sein des cellules SCC90 (HPV-16) nous ont permis d'observer l'augmentation du niveau d'expression de la protéine p53, le clivage des caspases 3, 7 et 9 et de la PARP, et l'induction de l'apoptose. De plus, les adénovirus n'ont pas d'effets sur les cellules HPV négatives SQ20B. Ces résultats étendent donc le potentiel thérapeutique des adénovirus recombinants mis au point et augmenteraient le champ d'application de l'utilisation de l'ARN-interférence anti-E6 comme thérapie anticancéreuse.

Mon travail de thèse a permis le développement d'un protocole de clonage dans l'adénovirus de type 5 permettant l'expression de miARN dirigés contre différentes protéines incluant 3 kinases (NRBP, PANK3, NTRK1), 16E6 et 18E6. Les vecteurs obtenus ont prouvé leurs efficacités *in vitro* dans les cellules HeLa et SiHa, en permettant la diminution du niveau des messagers ciblés. La diminution du niveau de E6 dans les cellules SiHa et HeLa a

provoqué l'augmentation de l'expression de la protéine p53, et *in fine* la survenue de la mort cellulaire par apoptose en réponse à la transduction des vecteurs adénoviraux. Les résultats obtenus nous ont encouragés à tester le potentiel thérapeutique des vecteurs adénoviraux mis au point, lors d'expérimentations *in vivo* dans des souris nude xénogreffées par des cellules HeLa. Suite au traitement par nos adénovirus recombinants, les tumeurs montrent un arrêt de croissance en comparaison avec les tumeurs non traitées. Cet arrêt de croissance est un phénomène couramment observé lors de la transposition d'un protocole de test *in vitro* vers l'*in vivo*. En effet, la vascularisation des tumeurs et leur densité cellulaire font qu'en dépit des injections répétées toutes les cellules ne sont pas transduites. C'est pourquoi les cellules transduites peuvent entrer en mort cellulaire, alors que les cellules non transduites poursuivent leur croissance, contrebalançant ainsi les effets de mort cellulaire et la masse cellulaire disparaissant.

Cependant, le potentiel thérapeutique des adénovirus recombinants pourrait encore être augmenté en apportant plusieurs améliorations. Tout d'abord, en mettant en place au sein d'un même adénovirus une stratégie combinatoire par l'introduction de multiples miARNs au sein du même adénovirus, afin d'en augmenter l'efficacité. Par exemple en introduisant des miARN ciblant E6 et E7, ou bien les E6 et E7 de multiples types d'HPV différents. En effet, lors des premières étapes de clonages des miARNs il est possible de chainer ceux-ci en un long transcrit primaire, permettant une expression co-cistronique par l'ARN polymérase II.

Ainsi, en ciblant à la fois les protéines E6 et E7 des HPV16 et HPV18 par plusieurs miARNs ayant précédemment montré leurs efficacités d'inhibition. Il serait possible d'agir sur le cycle tumoral par le biais de différentes voies de signalisation, menant ainsi à leur mort cellulaire programmée. De plus, il est envisageable de combiner la thérapie adénovirale *in vivo* avec des micro-irradiations localisées sur souris nude, afin de potentialiser ces deux approches.

La stratégie thérapeutique adénovirale peut elle aussi être étendue, sur d'autres types de cancers, par différentes molécules thérapeutiques, notamment par introduction ou le ciblage de molécules comme ceux déjà réalisés. Mais aussi dans d'autres stratégies thérapeutiques visant à empêcher l'interaction des oncoprotéines telles qu'E6 avec leurs partenaires cellulaires et ainsi les empêcher d'exercer les activités biologiques impliquées dans le développement de cancers. Pour finir, les adénovirus peuvent également être vu comme des outils d'extinction fonctionnels d'E6 et permettant d'étudier les répercutions sur d'autres processus cellulaires.

Références Bibliographiques

A

Aagaard, L. and Rossi, J.J. (2007) RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*, **59**, 75-86.

Adegoke, O., Kulasingam, S. and Virnig, B. (2012) Cervical Cancer Trends in the United States: A 35-Year Population-Based Analysis. *J Womens Health (Larchmt)*.

Al-Dosari, M.S. and Gao, X. (2009) Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *Aaps J*, **11**, 671-681.

Alba, R., Bosch, A. and Chillon, M. (2005) Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*, **12 Suppl 1**, S18-27.

Argnani, R., Lufino, M., Manservigi, M. and Manservigi, R. (2005) Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther*, **12 Suppl 1**, S170-177.

Arnberg, N. (2009) Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol*, **19**, 165-178.

Arnberg, N. (2012) Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 442-448.

Avvakumov, N., Torchia, J. and Mymryk, J.S. (2003) Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene*, **22**, 3833-3841.

B

Bachenheimer, S. and Darnell, J.E. (1975) Adenovirus-2 mRNA is transcribed as part of a high-molecular-weight precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 4445-4449.

Backstrom, E., Kaufmann, K.B., Lan, X. and Akusjarvi, G. (2010) Adenovirus L4-22K stimulates major late transcription by a mechanism requiring the intragenic late-specific transcription factor-binding site. *Virus Res*, **151**, 220-228.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. and Pasquinelli, A.E. (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, **122**, 553-563.

Baldwin, A., Huh, K.W. and Munger, K. (2006) Human papillomavirus E7 oncoprotein dysregulates steroid receptor coactivator 1 localization and function. *J Virol*, **80**, 6669-6677.

Bantel-Schaal, U., Hub, B. and Kartenbeck, J. (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol*, **76**, 2340-2349.

Barbosa, M.S., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1989) Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol*, **63**, 1404-1407.

Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, **8**, 1243-1254.

Barnard, P. and McMillan, N.A. (1999) The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, **259**, 305-313.

Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.

Barton, K.N., Stricker, H., Elshaikh, M.A., Pegg, J., Cheng, J., Zhang, Y., Karvelis, K.C., Lu, M., Movsas, B. and Freytag, S.O. (2011) Feasibility of adenovirus-mediated hNIS gene transfer and 131I radioiodine therapy as a definitive treatment for localized prostate cancer. *Mol Ther*, **19**, 1353-1359.

Baseman, J.G. and Koutsky, L.A. (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, **32 Suppl 1**, S16-24.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, **395**, 124-125.

Behlke, M.A. (2006) Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther*, **13**, 644-670.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. and Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, 1320-1323.

Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 3171-3175.

Bernard, B., Fest, T., Pretet, J.L. and Mougin, C. (2001) Staurosporine-induced apoptosis of hpv positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ*, **8**, 234-244.

Bernard, H.U. (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*, **32 Suppl 1**, S1-6.

Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. and de Villiers, E.M. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, **401**, 70-79.

Berns, K.I. and Linden, R.M. (1995) The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays*, **17**, 237-245.

Bertrand, J.R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A. and Malvy, C. (2002) Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 1000-1004.

Bessis, N., GarciaCozar, F.J. and Boissier, M.C. (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther*, **11 Suppl 1**, S10-17.

Bewley, M.C., Springer, K., Zhang, Y.B., Freimuth, P. and Flanagan, J.M. (1999) Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*, **286**, 1579-1583.

Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.

Blachon, S. and Demeret, C. (2003) The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, **85**, 813-819.

Bodily, J. and Laimins, L.A. (2011) Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*, **19**, 33-39.

Bodily, J.M., Mehta, K.P., Cruz, L., Meyers, C. and Laimins, L.A. (2011) The E7 open reading frame acts in cis and in trans to mediate differentiation-dependent activities in the human papillomavirus type 16 life cycle. *J Virol*, **85**, 8852-8862.

Boivin, D., Morrison, M.R., Marcellus, R.C., Querido, E. and Branton, P.E. (1999) Analysis of synthesis, stability, phosphorylation, and interacting polypeptides of the 34-kilodalton product of open reading frame 6 of the early region 4 protein of human adenovirus type 5. *J Virol*, **73**, 1245-1253.

Bonetta, L. (2009) RNA-based therapeutics: ready for delivery? *Cell*, **136**, 581-584.

Borbely, A.A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F. and Veress, G. (2006) Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol*, **87**, 287-294.

Bosch, F., Qiao, Y. and Castellsague, X. (2006) The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, S8-S21.

Bosch, F.X. and de Sanjose, S. (2007) The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*, **23**, 213-227.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J*, **3**, 1151-1157.

Boyer, J., Rohleder, K. and Ketner, G. (1999) Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology*, **263**, 307-312.

Boyer, J.L. and Ketner, G. (2000) Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J Biol Chem*, **275**, 14969-14978.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.

Brunetti-Pierri, N. and Ng, P. (2008) Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther*, **15**, 553-560.

Burgert, H.G. and Kvist, S. (1987) The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *Embo J*, **6**, 2019-2026.

Burnett, J.C. and Rossi, J.J. (2012) RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol*, **19**, 60-71.

Burton, E.A., Fink, D.J. and Glorioso, J.C. (2005) Replication-defective genomic HSV gene therapy vectors: design, production and CNS applications. *Curr Opin Mol Ther*, **7**, 326-336.

Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M. and Hoppe-Seyler, F. (2003) siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, **22**, 5938-5945.

C

Carcopino, X., Henry, M., Olive, D., Boubli, L. and Tamalet, C. (2011) [Detection and quantification of human papillomavirus genital infections: virological, epidemiological, and clinical applications]. *Med Mal Infect*, **41**, 68-79.

Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **136**, 642-655.

Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrere, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougneres, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. and Aubourg, P. (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, **326**, 818-823.

Castellsague, X. and Munoz, N. (2003) Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 20-28.

Chalikonda, S., Kivlen, M.H., O'Malley, M.E., Eric Dong, X.D., McCart, J.A., Gorry, M.C., Yin, X.Y., Brown, C.K., Zeh, H.J., 3rd, Guo, Z.S. and Bartlett, D.L. (2008) Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene. *Cancer Gene Ther*, **15**, 115-125.

Chang, J.T., Kuo, T.F., Chen, Y.J., Chiu, C.C., Lu, Y.C., Li, H.F., Shen, C.R. and Cheng, A.J. (2010) Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers. *Cancer Gene Ther*, **17**, 827-836.

Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A. and Mendell, J.T. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, **40**, 43-50.

Chen, J.J., Reid, C.E., Band, V. and Androphy, E.J. (1995) Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*, **269**, 529-531.

Chen, L., Wu, Y.Y., Liu, P., Wang, J., Wang, G., Qin, J., Zhou, J. and Zhu, J. (2011) Down-regulation of HPV18 E6, E7, or VEGF expression attenuates malignant biological behavior of human cervical cancer cells. *Med Oncol*, **28 Suppl 1**, S528-539.

Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. and Vallee, R.B. (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*, **351**, 583-586.

Chin, Y.R. and Horwitz, M.S. (2006) Adenovirus RID complex enhances degradation of internalized tumour necrosis factor receptor 1 without affecting its rate of endocytosis. *J Gen Virol*, **87**, 3161-3167.

Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2006) Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, **13**, 994-1002.

Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R. and Wilson, J. (1999) Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*, **6**, 1574-1583.

Chiu, Y.L. and Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, **10**, 549-561.

Christensen, J.B., Ewing, S.G. and Imperiale, M.J. (2012) Identification and characterization of a DNA binding domain on the adenovirus IVa2 protein. *Virology*, **433**, 124-130.

Chroboczek, J., Bieber, F. and Jacrot, B. (1992) The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology*, **186**, 280-285.

Ciuffi, A. (2008) Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther*, **8**, 419-429.

Collins, A.S., Nakahara, T., Do, A. and Lambert, P.F. (2005) Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. *J Virol*, **79**, 14769-14780.

Collins, S.I., Constandinou-Williams, C., Wen, K., Young, L.S., Roberts, S., Murray, P.G. and Woodman, C.B. (2009) Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res*, **69**, 3828-3832.

Conway, M.J. and Meyers, C. (2009) Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*, **88**, 307-317.

Crook, T., Tidy, J.A. and Vousden, K.H. (1991) Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, **67**, 547-556.

Cuconati, A., Degenhardt, K., Sundararajan, R., Anschel, A. and White, E. (2002) Bak and Bax function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J Virol*, **76**, 4547-4558.

Culp, T.D., Spatz, C.M., Reed, C.A. and Christensen, N.D. (2007) Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology*, **361**, 435-446.

D

D'Abramo, C.M. and Archambault, J. (2011) Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J*, **5**, 80-95.

Dales, S. (1962) An electron microscope study of the early association between two mammalian viruses and their hosts. *J Cell Biol*, **13**, 303-322.

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

Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. and Schmid, S.L. (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol*, **127**, 915-934.

Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther*, **7**, 1707-1714.

Das, K., Bohl, J. and Vande Pol, S.B. (2000) Identification of a second transforming function in bovine papillomavirus type 1 E6 and the role of E6 interactions with paxillin, E6BP, and E6AP. *J Virol*, **74**, 812-816.

de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. and zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*, **324**, 17-27.

de Wilde, J., Kooter, J.M., Overmeer, R.M., Claassen-Kramer, D., Meijer, C.J., Snijders, P.J. and Steenbergen, R.D. (2010) hTERT promoter activity and CpG methylation in HPV-induced carcinogenesis. *BMC Cancer*, **10**, 271.

DeFilippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L. and DiMaio, D. (2003) Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*, **77**, 1551-1563.

Degenhardt, Y.Y. and Silverstein, S. (2001) Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol*, **75**, 11791-11802.

Demers, G.W., Foster, S.A., Halbert, C.L. and Galloway, D.A. (1994) Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4382-4386.

Denny, L. (2012) Cervical cancer prevention: New opportunities for primary and secondary prevention in the 21st century. *Int J Gynaecol Obstet*.

Doorbar, J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, **32 Suppl 1**, S7-15.

Doorbar, J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, **110**, 525-541.

Doorbar, J. (2007) Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers*, **23**, 297-313.

Du, J., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Chan, P.K., Tsang, R.K. and van Hasselt, C.A. (2004) Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett*, **205**, 81-88.

Du, M., Fan, X., Hong, E. and Chen, J.J. (2002) Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 962-969.

Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., de Lima, M.C. and Pierrefite-Carle, V. (2012) Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett*, **324**, 160-170.

Duensing, S., Lee, L.Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C.P. and Munger, K. (2000) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10002-10007.

Duensing, S. and Munger, K. (2002) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*, **62**, 7075-7082.

Duensing, S. and Munger, K. (2003) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication

through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol*, **77**, 12331-12335.

Duffy, M.R., Parker, A.L., Bradshaw, A.C. and Baker, A.H. (2012) Manipulation of adenovirus interactions with host factors for gene therapy applications. *Nanomedicine (Lond)*, **7**, 271-288.

Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. and zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3812-3815.

Dyson, N., Guida, P., Munger, K. and Harlow, E. (1992) Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol*, **66**, 6893-6902.

E

Efeyan, A. and Serrano, M. (2007) p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*, **6**, 1006-1010.

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

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.

Epstein, A.L. (2009) Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Gene Ther*, **16**, 709-715.

Epstein, A.L., Marconi, P., Argnani, R. and Manservigi, R. (2005) HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther*, **5**, 445-458.

Evans, R.M., Fraser, N., Ziff, E., Weber, J., Wilson, M. and Darnell, J.E. (1977) The initiation sites for RNA transcription in Ad2 DNA. *Cell*, **12**, 733-739.

F

Fabry, C.M., Rosa-Calatrava, M., Conway, J.F., Zubieta, C., Cusack, S., Ruigrok, R.W. and Schoehn, G. (2005) A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *Embo J*, **24**, 1645-1654.

Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. and Hoeben, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, **9**, 1909-1917.

Fallaux, F.J., van der Eb, A.J. and Hoeben, R.C. (1999) Who's afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Ther*, **6**, 709-712.

Favre-Bonvin, A., Reynaud, C., Kretz-Remy, C. and Jalinot, P. (2005) Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol*, **79**, 4229-4237.

Ferrera, R., Cuchet, D., Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Ovize, M. and Epstein, A.L. (2005) Efficient and non-toxic gene transfer to cardiomyocytes using novel generation amplicon vectors derived from HSV-1. *J Mol Cell Cardiol*, **38**, 219-223.

Filippova, M., Filippov, V.A., Kagoda, M., Garnett, T., Fodor, N. and Duerksen-Hughes, P.J. (2009) Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J Virol*, **83**, 210-227.

Filippova, M., Johnson, M.M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S.S., Williams, K. and Duerksen-Hughes, P.J. (2007) The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol*, **81**, 4116-4129.

Filippova, M., Parkhurst, L. and Duerksen-Hughes, P.J. (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 25729-25744.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by

double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, **391**, 806-811.

Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002) Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*, **76**, 10009-10014.

Franco, E.L. and Harper, D.M. (2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*, **23**, 2388-2394.

Franco, E.L., Villa, L.L., Sobrinho, J.P., Prado, J.M., Rousseau, M.C., Desy, M. and Rohan, T.E. (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*, **180**, 1415-1423.

Frazer, I.H. (2006) HPV vaccines. *Int J Gynaecol Obstet*, S81-S88.

Frazer, I.H. (2009) Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*, **384**, 410-414.

Freed, E.O. and Martin, M.A. (1994) HIV-1 infection of non-dividing cells. *Nature*, **369**, 107-108.

Friedmann, T. and Roblin, R. (1972) Gene therapy for human genetic disease? *Science*, **175**, 949-955.

Fujii, T., Saito, M., Iwasaki, E., Ochiya, T., Takei, Y., Hayashi, S., Ono, A., Hirao, N., Nakamura, M., Kubushiro, K., Tsukazaki, K. and Aoki, D. (2006) Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*, **29**, 541-548.

Fuller, M. and Anson, D.S. (2001) Helper plasmids for production of HIV-1-derived vectors. *Hum Gene Ther*, **12**, 2081-2093.

Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B. and Galloway, D.A. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, **11**, 2090-2100.

G

Gabrilovich, D.I. (2006) INGN 201 (Advexin): adenoviral p53 gene therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther*, **6**, 823-832.

Gammoh, N., Isaacson, E., Tomaic, V., Jackson, D.J., Doorbar, J. and Banks, L. (2009) Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene*, **28**, 2299-2304.

Gardiol, D., Kuhne, C., Glaunsinger, B., Lee, S.S., Javier, R. and Banks, L. (1999) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, **18**, 5487-5496.

Garnett, C.T., Talekar, G., Mahr, J.A., Huang, W., Zhang, Y., Ornelles, D.A. and Gooding, L.R. (2009) Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol*, **83**, 2417-2428.

Garnett, T.O., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P.J. (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*, **13**, 1915-1926.

Gavrilov, K. and Saltzman, W.M. (2012) Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*, **85**, 187-200.

Geevarghese, S.K., Geller, D.A., de Haan, H.A., Horer, M., Knoll, A.E., Mescheder, A., Nemunaitis, J., Reid, T.R., Sze, D.Y., Tanabe, K.K. and Tawfik, H. (2010) Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum Gene Ther*, **21**, 1119-1128.

Genther, S.M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C. and Lambert, P.F. (2003) Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol*, **77**, 2832-2842.

Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T. and Galloway, D.A. (2004) Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*, **18**, 2269-2282.

Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B. and Tommasino, M. (2010) The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*, **40**, 1-13.

Ginsberg, H.S., Moldawer, L.L. and Prince, G.A. (1999) Role of the type 5 adenovirus gene encoding the early region 1B 55-kDa protein in pulmonary pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10409-10411.

Glorioso, J.C. and Fink, D.J. (2004) Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu Rev Microbiol*, **58**, 253-271.

Gomella, L.G., Mastrangelo, M.J., McCue, P.A., Maguire, H.J., Mulholland, S.G. and Lattime, E.C. (2001) Phase i study of intravesical vaccinia virus as a vector for

gene therapy of bladder cancer. *J Urol*, **166**, 1291-1295.

Gonzalez-Aparicio, M., Mauleon, I., Alzuguren, P., Bunuales, M., Gonzalez-Aseguinolaza, G., San Martin, C., Prieto, J. and Hernandez-Alcoceba, R. (2011) Self-inactivating helper virus for the production of high-capacity adenoviral vectors. *Gene Ther*, **18**, 1025-1033.

Goodwin, E.C. and DiMaio, D. (2000) Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12513-12518.

Govan, V.A. (2005) Strategies for human papillomavirus therapeutic vaccines and other therapies based on the E6 and E7 oncogenes. *Ann N Y Acad Sci*, **1056**, 328-343.

Graham, F.L. (2000) Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today*, **21**, 426-428.

Gravitt, P.E. (2011) The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest*, **121**, 4593-4599.

Greber, U.F., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Boucke, K., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997) The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *Embo J*, **16**, 5998-6007.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **123**, 631-640.

Grimm, D., Wang, L., Lee, J.S., Schurmann, N., Gu, S., Borner, K., Storm, T.A. and Kay, M.A. (2010) Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J Clin Invest*, **120**, 3106-3119.

Gross-Mesilaty, S., Reinstein, E., Bercovich, B., Tobias, K.E., Schwartz, A.L., Kahana, C. and Ciechanover, A. (1998) Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8058-8063.

Grossman, S.R. and Laimins, L.A. (1989) E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene*, **4**, 1089-1093.

Gu, W., Payne, E., Sun, S., Burgess, M. and McMillan, N.A. (2011) Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo with dual shRNAs. *Cancer Gene Ther*, **18**, 219-227.

Gu, W., Putral, L., Hengst, K., Minto, K., Saunders, N.A., Leggatt, G. and McMillan, N.A. (2006) Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Cancer Gene Ther*, **13**, 1023-1032.

Gu, W., Putral, L. and McMillan, N. (2008) siRNA and shRNA as anticancer agents in a cervical cancer model. *Methods Mol Biol*, **442**, 159-172.

Guccione, E., Massimi, P., Bernat, A. and Banks, L. (2002) Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology*, **293**, 20-25.

Guihard, S., Jung, A.C. and Noel, G. (2012) [High-risk human papilloma virus associated oropharynx squamous cell carcinomas: clinical, biological implications and therapeutical perspectives]. *Cancer Radiother*, **16**, 34-43.

Guo, P., Coban, O., Snead, N.M., Trebley, J., Hoeprich, S., Guo, S. and Shu, Y. (2010) Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**, 650-666.

H

Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C.C. and Montesano, R. (1998) IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res*, **26**, 205-213.

Halbert, D.N., Cutt, J.R. and Shenk, T. (1985) Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol*, **56**, 250-257.

Hall, A.H. and Alexander, K.A. (2003) RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J Virol*, **77**, 6066-6069.

Hamid, N.A., Brown, C. and Gaston, K. (2009) The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci*.

Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.

Hammond, S.M. (2006) MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med*, **12**, 99-101.

Hampson, L., Kitchener, H.C. and Hampson, I.N. (2006) Specific HIV protease inhibitors

inhibit the ability of HPV16 E6 to degrade p53 and selectively kill E6-dependent cervical carcinoma cells in vitro. *Antivir Ther*, **11**, 813-825.

Hampson, L., Li, C., Oliver, A.W., Kitchener, H.C. and Hampson, I.N. (2004) The PDZ protein Tip-1 is a gain of function target of the HPV16 E6 oncoprotein. *Int J Oncol*, **25**, 1249-1256.

Handa, K., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. (2007) E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J Virol*, **81**, 1379-1389.

Harada, J.N. and Berk, A.J. (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, **73**, 5333-5344.

Harper, D.M. and Vierthaler, S.L. (2011) Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. *ISRN Obstet Gynecol*, **2011**, 457204.

Harrington, K.J., Hingorani, M., Tanay, M.A., Hickey, J., Bhide, S.A., Clarke, P.M., Renouf, L.C., Thway, K., Sibtain, A., McNeish, I.A., Newbold, K.L., Goldsweig, H., Coffin, R. and Nutting, C.M. (2010) Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res*, **16**, 4005-4015.

Hasan, U.A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T., Sideri, M., Stubenrauch, F. and Tommasino, M. (2007) TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, **178**, 3186-3197.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J*, **8**, 3905-3910.

Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A. and Webster, A. (1995) Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*, **199 (Pt 2)**, 31-48.

Hayes, B.W., Telling, G.C., Myat, M.M., Williams, J.F. and Flint, S.J. (1990) The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species. *J Virol*, **64**, 2732-2742.

Heale, B.S., Soifer, H.S., Bowers, C. and Rossi, J.J. (2005) siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res*, **33**, e30.

Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L. and Shenk, T. (1987) Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol*, **61**, 2555-2558.

Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L. and Kirn, D. (2000) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, **6**, 1134-1139.

Henaff, D., Salinas, S. and Kremer, E.J. (2011) An adenovirus traffic update: from receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol*, **6**, 179-192.

High, K.A. and Aubourg, P. (2011) rAAV human trial experience. *Methods Mol Biol*, **807**, 429-457.

Hillgenberg, M., Schnieders, F., Loser, P. and Strauss, M. (2001) System for efficient helper-dependent minimal adenovirus construction and rescue. *Hum Gene Ther*, **12**, 643-657.

Hippelainen, M., Syrjanen, S., Koskela, H., Pulkkinen, J., Saarikoski, S. and Syrjanen, K. (1993) Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finnish conscripts. *Sex Transm Dis*, **20**, 321-328.

Hong, D., Lu, W., Ye, F., Hu, Y. and Xie, X. (2009) Gene silencing of HPV16 E6/E7 induced by promoter-targeting siRNA in SiHa cells. *Br J Cancer*, **101**, 1798-1804.

Horwitz, M.S., Scharff, M.D. and Maizel, J.V., Jr. (1969) Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres, and morphogenesis of the virion. *Virology*, **39**, 682-694.

Howie, H.L., Katzenellenbogen, R.A. and Galloway, D.A. (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, **384**, 324-334.

Huang, J.T. and Schneider, R.J. (1991) Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell*, **65**, 271-280.

Huang, S., Endo, R.I. and Nemerow, G.R. (1995) Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol*, **69**, 2257-2263.

Huang, S., Kamata, T., Takada, Y., Ruggeri, Z.M. and Nemerow, G.R. (1996) Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene

delivery to hematopoietic cells. *J Virol*, **70**, 4502-4508.

Huang, S.M. and McCance, D.J. (2002) Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol*, **76**, 8710-8721.

Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B. and Karpati, G. (1995) The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*, **2**, 107-115.

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W. and Munger, K. (2007) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol*, **81**, 9737-9747.

Huh, K.W., DeMasi, J., Ogawa, H., Nakatani, Y., Howley, P.M. and Munger, K. (2005) Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11492-11497.

Hung, C.F., Tsai, Y.C., He, L., Coukos, G., Fodor, I., Qin, L., Levitsky, H. and Wu, T.C. (2007) Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice. *Gene Ther*, **14**, 20-29.

Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 22-32.

Hwang, E.S., Nottoli, T. and Dimaio, D. (1995) The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*, **211**, 227-233.

I

Ibeanu, O.A. (2011) Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther*, **11**, 295-306.

Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J.I., Caldecott, K.W. and Stubenrauch, F. (2002) Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo J*, **21**, 4741-4748.

Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., McTiernan, C.F., Kay, M.A. and Nakai, H. (2006) Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, **14**, 45-53.

Invitrogen. (2007) INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy--introgen, RPR/INGN 201. *Drugs R D*, **8**, 176-187.

J

Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L. and Storey, A. (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, **14**, 3065-3073.

Jayshree, R.S., Sreenivas, A., Tessy, M. and Krishna, S. (2009) Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res*, **130**, 286-295.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **61**, 69-90.

Jeong, K.W., Kim, H.Z., Kim, S., Kim, Y.S. and Choe, J. (2007) Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. *Oncogene*, **26**, 487-499.

Jiang, M. and Milner, J. (2002) Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, **21**, 6041-6048.

Jinek, M. and Doudna, J.A. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, **457**, 405-412.

Jing, M., Bohl, J., Brimer, N., Kinter, M. and Vande Pol, S.B. (2007) Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*, **81**, 2231-2239.

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

Jonson, A.L., Rogers, L.M., Ramakrishnan, S. and Downs, L.S., Jr. (2008) Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol*, **111**, 356-364.

Joura, E.A. (2009) Cervical cancer and vaccination--an overview. *Eur J Cancer*, **45 Suppl 1**, 457-458.

Jung, A.C., Briolat, J., Millon, R., de Reynies, A., Rickman, D., Thomas, E., Abecassis, J., Clavel, C. and Wasylyk, B. (2010) Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, **126**, 1882-1894.

K

Kanai, R., Wakimoto, H., Cheema, T. and Rabkin, S.D. (2010) Oncolytic herpes simplex virus vectors and chemotherapy: are combinatorial strategies more effective for cancer? *Future Oncol*, **6**, 619-634.

Kaplan, J.M., Armentano, D., Scaria, A., Woodworth, L.A., Pennington, S.E., Wadsworth, S.C., Smith, A.E. and Gregory, R.J. (1999) Novel role for E4 region genes in protection of adenovirus vectors from lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*, **73**, 4489-4492.

Kaufman, H.L. and Bines, S.D. (2010) OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol*, **6**, 941-949.

Kawakami, S., Higuchi, Y. and Hashida, M. (2008) Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide. *J Pharm Sci*, **97**, 726-745.

Keeler, C.E. (1947) Gene therapy. *J Hered*, **38**, 294-298.

Kelloff, G.J. and Sigman, C.C. (2007) Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventive drug development. *Nat Rev Cancer*, **7**, 508-518.

Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S. and Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, **23**, 222-226.

Kim, D.H., Jarvis, R.M., Xu, Y., Oliver, A.W., Allwood, J.W., Hampson, L., Hampson, I.N. and Goodacre, R. (2010) Combining metabolic fingerprinting and footprinting to understand the phenotypic response of HPV16 E6 expressing cervical carcinoma cells exposed to the HIV anti-viral drug lopinavir. *Analyst*, **135**, 1235-1244.

Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A. and Klingelhutz, A.J. (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, **396**, 84-88.

Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Kariko, K., Ambati, B.K., Wilgus, T.A., DiPietro, L.A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J.R., Taylor, E.W. and Ambati, J. (2008) Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, **452**, 591-597.

Klingelhutz, A.J., Foster, S.A. and McDougall, J.K. (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, **380**, 79-82.

Klingelhutz, A.J. and Roman, A. (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology*, **424**, 77-98.

Klingseisen, L., Ehrenschwender, M., Heigl, U., Wajant, H., Hehlgans, T., Schutze, S. and Schneider-Brachert, W. (2012) E3-14.7K is recruited to TNF-receptor 1 and blocks TNF cytolysis independent from interaction with optineurin. *PLoS One*, **7**, e38348.

Konig, C., Roth, J. and Dobbelstein, M. (1999) Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J Virol*, **73**, 2253-2262.

Kornegay, J.N., Li, J., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Chen, C., Zheng, H., Wang, B., Qiao, C., Howard, J.F., Jr. and Xiao, X. (2010) Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol Ther*, **18**, 1501-1508.

Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, **11**, 597-610.

Kruidering, M. and Evan, G.I. (2000) Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life*, **50**, 85-90.

Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L.M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G.F., Wazer, D.E., Band, H. and Band, V. (2002) Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*, **22**, 5801-5812.

L

Lagrange, M., Boulade-Ladame, C., Mailly, L., Weiss, E., Orfanoudakis, G. and Deryckere, F. (2007) Intracellular scFvs

against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **361**, 487-492.

Lagrange, M., Charbonnier, S., Orfanoudakis, G., Robinson, P., Zanier, K., Masson, M., Lutz, Y., Trave, G., Weiss, E. and Deryckere, F. (2005) Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6. *J Gen Virol*, **86**, 1001-1007.

Lechner, M.S. and Laimins, L.A. (1994) Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*, **68**, 4262-4273.

Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. and Javier, R.T. (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol*, **74**, 9680-9693.

Lee, S.S., Weiss, R.S. and Javier, R.T. (1997) Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6670-6675.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, **23**, 4051-4060.

Leopold, P.L. and Crystal, R.G. (2007) Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv Drug Deliv Rev*, **59**, 810-821.

Leopold, P.L., Ferris, B., Grinberg, I., Worgall, S., Hackett, N.R. and Crystal, R.G. (1998) Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther*, **9**, 367-378.

Leppard, K.N. and Everett, R.D. (1999) The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol*, **80 (Pt 4)**, 997-1008.

Leto, M., Santos Junior, G.F., Porro, A.M. and Tomimori, J. (2011) Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*, **86**, 306-317.

Levine, A.J. (2009) The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*, **384**, 285-293.

Lexchin, J., Arya, N. and Singh, S. (2010) Gardasil(R) - The New HPV Vaccine: The Right Product, the Right Time? A Commentary. *Healthc Policy*, **5**, 26-36.

Li, E., Brown, S.L., Stupack, D.G., Puente, X.S., Cheresh, D.A. and Nemerow, G.R. (2001) Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol*, **75**, 5405-5409.

Li, E., Stupack, D., Klemke, R., Cheresh, D.A. and Nemerow, G.R. (1998a) Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol*, **72**, 2055-2061.

Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. and Garcea, R.L. (1998b) Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol*, **72**, 2160-2167.

Lieber, A., He, C.Y., Meuse, L., Schowalter, D., Kirillova, I., Winther, B. and Kay, M.A. (1997) The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*, **71**, 8798-8807.

Limberis, M.P. (2012) Phoenix rising: gene therapy makes a comeback. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **44**, 632-640.

Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R. and Hannon, G.J. (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, **7**, 1261-1266.

Liu, Q. and Muruve, D.A. (2003) Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther*, **10**, 935-940.

Liu, S.H., Patel, S., Gingras, M.C., Nemunaitis, J., Zhou, G., Chen, C., Li, M., Fisher, W., Gibbs, R. and Brunicardi, F.C. (2011) PDX-1: demonstration of oncogenic properties in pancreatic cancer. *Cancer*, **117**, 723-733.

Liu, T.C., Galanis, E. and Kirn, D. (2007) Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*, **4**, 101-117.

Liu, T.C. and Kirn, D. (2008) Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, **15**, 877-884.

Liu, X., Clements, A., Zhao, K. and Marmorstein, R. (2006) Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*, **281**, 578-586.

Liu, Y., Liu, Z., Androphy, E., Chen, J. and Baleja, J.D. (2004) Design and characterization of helical peptides that inhibit the E6 protein of papillomavirus. *Biochemistry*, **43**, 7421-7431.

Liu, Y.P. and Berkhout, B. (2011) miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions. *Biochim Biophys Acta*, **1809**, 732-745.

Lutschg, V., Boucke, K., Hemmi, S. and Greber, U.F. (2011) Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithelial cells. *Nat Commun*, **2**, 391.

Lutz, P. and Kedinger, C. (1996) Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J Virol*, **70**, 1396-1405.

Lutz, P., Rosa-Calatrava, M. and Kedinger, C. (1997) The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol*, **71**, 5102-5109.

Lytle, J.R., Yario, T.A. and Steitz, J.A. (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9667-9672.

M

Machitani, M., Katayama, K., Sakurai, F., Matsui, H., Yamaguchi, T., Suzuki, T., Miyoshi, H., Kawabata, K. and Mizuguchi, H. (2011) Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release*, **154**, 285-289.

MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V. and Doudna, J.A. (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 512-517.

Maglennon, G.A., McIntosh, P. and Doorbar, J. (2011) Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, **414**, 153-163.

Maier, O., Galan, D.L., Wodrich, H. and Wiethoff, C.M. (2010) An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature. *Virology*, **402**, 11-19.

Maizel, J.V., Jr., White, D.O. and Scharff, M.D. (1968) The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, **36**, 115-125.

Mannervik, M., Fan, S., Strom, A.C., Helin, K. and Akusjarvi, G. (1999) Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virology*, **256**, 313-321.

Mantovani, F. and Banks, L. (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, **20**, 7874-7887.

Martinez-Rivera, M. and Siddik, Z.H. (2012) Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol*, **83**, 1049-1062.

Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Wadell, G. and Arnberg, N. (2005) CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*, **79**, 14429-14436.

Masson, M., Hindelang, C., Sibler, A.P., Schwalbach, G., Trave, G. and Weiss, E. (2003) Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*, **84**, 2099-2104.

Maufort, J.P., Shai, A., Pitot, H.C. and Lambert, P.F. (2010) A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*, **70**, 2924-2931.

Maxfield, F.R. and McGraw, T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 121-132.

McCart, J.A., Ward, J.M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H.R., Libutti, S.K., Moss, B. and Bartlett, D.L. (2001) Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res*, **61**, 8751-8757.

McLaughlin-Drubin, M.E. and Munger, K. (2009) The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, **384**, 335-344.

McMurray, H.R. and McCance, D.J. (2003) Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*, **77**, 9852-9861.

Mellman, I. (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol*, **172**, 39-45.

Minakuchi, Y., Takeshita, F., Kosaka, N., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Kouno, M., Honma, K., Nagahara, S., Hanai, K., Sano, A., Kato, T., Terada, M. and Ochiya, T. (2004) Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, **32**, e109.

Miyagishi, M. and Taira, K. (2002) U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted

gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 497-500.

Miyazawa, N., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Ferris, B., Worgall, S., Falck-Pedersen, E. and Crystal, R.G. (1999) Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol*, **73**, 6056-6065.

Monie, A., Hung, C.F., Roden, R. and Wu, T.C. (2008) Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics*, **2**, 97-105.

Monroy-Garcia, A., Gomez-Lim, M.A., Weiss-Steider, B., la Rosa, G.P., Hernandez-Montes, J., Perez-Saldana, K., Tapia-Guerrero, Y.S., Toledo-Guzman, M.E., Santiago-Osorio, E., Sanchez-Pena, H.I. and Mora-Garcia Mde, L. (2011) A novel HPV 16 L1-based chimeric virus-like particle containing E6 and E7 seroreactive epitopes permits highly specific detection of antibodies in patients with CIN 1 and HPV-16 infection. *Virol J*, **8**, 59.

Moody, C.A. and Laimins, L.A. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, **10**, 550-560.

Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A. and Benoit, J.P. (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, **29**, 3477-3496.

Muller, T., Hamm, S. and Bauer, S. (2008) TLR9-mediated recognition of DNA. *Handb Exp Pharmacol*, 51-70.

Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M. and Zacny, V.L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, **20**, 7888-7898.

Munger, K., Werness, B.A., Dyson, N., Phelps, W.C., Harlow, E. and Howley, P.M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J*, **8**, 4099-4105.

Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J. and Meijer, C.J. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, **348**, 518-527.

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

N

Nakagawa, S. and Huibregtse, J.M. (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*, **20**, 8244-8253.

Nayak, S. and Herzog, R.W. (2010) Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther*, **17**, 295-304.

Neves, S., Faneca, H., Bertin, S., Konopka, K., Duzgunes, N., Pierrefite-Carle, V., Simoes, S. and Pedroso de Lima, M.C. (2009) Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response. *Cancer Gene Ther*, **16**, 91-101.

Nevins, J.R. (1981) Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell*, **26**, 213-220.

Nevins, J.R. and Darnell, J.E. (1978) Groups of adenovirus type 2 mRNA's derived from a large primary transcript: probable nuclear origin and possible common 3' ends. *J Virol*, **25**, 811-823.

Nguyen, M.L., Nguyen, M.M., Lee, D., Griep, A.E. and Lambert, P.F. (2003) The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol*, **77**, 6957-6964.

Nilsson, E.C., Storm, R.J., Bauer, J., Johansson, S.M., Lookene, A., Angstrom, J., Hedenstrom, M., Eriksson, T.L., Frangsmyr, L., Rinaldi, S., Willison, H.J., Pedrosa Domellof, F., Stehle, T. and Arnberg, N. (2011) The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat Med*, **17**, 105-109.

Nomine, Y., Charbonnier, S., Ristriani, T., Stier, G., Masson, M., Cavusoglu, N., Van Dorsselaer, A., Weiss, E., Kieffer, B. and Trave, G. (2003) Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain. *Biochemistry*, **42**, 4909-4917.

Nomine, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckere, F., Sibler, A.P., Desplancq, D., Atkinson, R.A., Weiss, E., Orfanoudakis, G., Kieffer, B. and Trave, G. (2006) Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of

human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell*, **21**, 665-678.

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

Norrby, E. (1969) The structural and functional diversity of Adenovirus capsid components. *J Gen Virol*, **5**, 221-236.

O

Ohlenschlager, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., Baum, M., Korbas, M., Meyer-Klaucke, W., Durst, M. and Gorlach, M. (2006) Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene*, **25**, 5953-5959.

Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001008.

P

Pages, J.C. and Bru, T. (2004) Toolbox for retrovectorologists. *J Gene Med*, **6 Suppl 1**, S67-82.

Pan, H. and Griep, A.E. (1995) Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev*, **9**, 2157-2169.

Papanicolaou, G.N. (1949) Cytologic diagnosis of uterine cancer by examination of vaginal and uterine secretions. *Am J Clin Pathol*, **19**, 301-308.

Park, J.S., Kim, E.J., Kwon, H.J., Hwang, E.S., Namkoong, S.E. and Um, S.J. (2000) Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*, **275**, 6764-6769.

Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, **434**, 663-666.

Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A. and Graham, F.L. (1996) A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13565-13570.

Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A. and McCance, D.J. (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J*, **18**, 5061-5072.

Patrick, D.R., Oliff, A. and Heimbrook, D.C. (1994) Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem*, **269**, 6842-6850.

Pim, D. and Banks, L. (1999) HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene*, **18**, 7403-7408.

Pim, D., Bergant, M., Boon, S.S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Subbaiah, V.K., Thomas, M., Tomaic, V. and Banks, L. (2012) Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *Febs J*, **279**, 3530-3537.

Pim, D., Tomaic, V. and Banks, L. (2009) The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein. *J Virol*, **83**, 9863-9874.

Place, R.F., Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J. and Dahiya, R. (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1608-1613.

Poljak-Blazi, M., Jaganjac, M., Sabol, I., Mihaljevic, B., Matovina, M. and Grce, M. (2009) Effect of ferric ions on reactive oxygen species formation, cervical cancer cell lines growth and E6/E7 oncogene expression. *Toxicol In Vitro*, **2010**, 28.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. and June, C.H. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, **365**, 725-733.

Prchla, E., Plank, C., Wagner, E., Blaas, D. and Fuchs, R. (1995) Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J Cell Biol*, **131**, 111-123.

Puhlmann, M., Brown, C.K., Gnant, M., Huang, J., Libutti, S.K., Alexander, H.R. and Bartlett, D.L. (2000) Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther*, **7**, 66-73.

Purwar, R., Campbell, J., Murphy, G., Richards, W.G., Clark, R.A. and Kupper, T.S. (2011) Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity,

function, and antigen specificity. *PLoS One*, **6**, e16245.

Q

Qian, X., Lu, Y., Liu, Q., Chen, K., Zhao, Q. and Song, J. (2006) Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of an HPV-16mE6Delta/mE7/TBhsp70Delta fusion protein vaccine in an animal model. *Immunol Lett*, **102**, 191-201.

R

Ramirez-Salazar, E., Centeno, F., Nieto, K., Valencia-Hernandez, A., Salcedo, M. and Garrido, E. (2011) HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virol J*, **8**, 247.

Rao, D.D., Maples, P.B., Senzer, N., Kumar, P., Wang, Z., Pappen, B.O., Yu, Y., Haddock, C., Jay, C., Phadke, A.P., Chen, S., Kuhn, J., Dylewski, D., Scott, S., Monsma, D., Webb, C., Tong, A., Shanahan, D. and Nemunaitis, J. (2010) Enhanced target gene knockdown by a bifunctional shRNA: a novel approach of RNA interference. *Cancer Gene Ther*, **17**, 780-791.

Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M. and Batshaw, M.L. (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, **80**, 148-158.

Rasmussen, U.B., Benchaibi, M., Meyer, V., Schlesinger, Y. and Schughart, K. (1999) Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells. *Hum Gene Ther*, **10**, 2587-2599.

Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A. and Schwartz, A. (2000) Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*, **19**, 5944-5950.

Rekosh, D.M. and Russell, W.C. (1977) Processing of the precursor to the major core polypeptide of adenovirus type 5 removes a region near the amino terminus. *Virology*, **82**, 513-517.

Ristriani, T., Fournane, S., Orfanoudakis, G., Trave, G. and Masson, M. (2009) A single-codon mutation converts HPV16 E6 oncoprotein into a potential tumor suppressor, which induces p53-dependent senescence of HPV-positive HeLa cervical cancer cells. *Oncogene*, **28**, 762-772.

Ristriani, T., Masson, M., Nomine, Y., Laurent, C., Lefevre, J.F., Weiss, E. and Trave, G. (2000) HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J Mol Biol*, **296**, 1189-1203.

Robb, G.B., Brown, K.M., Khurana, J. and Rana, T.M. (2005) Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 133-137.

Roberts, R.J., O'Neill, K.E. and Yen, C.T. (1984) DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J Biol Chem*, **259**, 13968-13975.

Robinson, A.J. and Bellett, J.D. (1975) A circular DNA-protein complex adenoviruses and its possible role in DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **39 Pt 1**, 523-531.

Roden, R. and Wu, T.C. (2006) How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer*, **6**, 753-763.

Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I. and Wickham, T.J. (1998) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, **72**, 7909-7915.

Roelvink, P.W., Mi Lee, G., Einfeld, D.A., Kovesdi, I. and Wickham, T.J. (1999) Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science*, **286**, 1568-1571.

Rogers, G.L., Martino, A.T., Aslanidi, G.V., Jayandharan, G.R., Srivastava, A. and Herzog, R.W. (2011) Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front Microbiol*, **2**, 194.

Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M. and Howley, P.M. (1998) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, **12**, 2061-2072.

Rosen, L. (1960) A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Am J Hyg*, **71**, 120-128.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous

degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, **84**, 570-573.

Russell, W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, **81**, 2573-2604.

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

Ryo, A., Uemura, H., Ishiguro, H., Saitoh, T., Yamaguchi, A., Perrem, K., Kubota, Y., Lu, K.P. and Aoki, I. (2005) Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 7523-7531.

S

Saban, S.D., Nepomuceno, R.R., Gritton, L.D., Nemerow, G.R. and Stewart, P.L. (2005) CryoEM structure at 9A resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells. *J Mol Biol*, **349**, 526-537.

Saha, B., Adhikary, A., Ray, P., Saha, S., Chakraborty, S., Mohanty, S., Das, K., Mukherjee, S., Mazumdar, M., Lahiri, L., Hossain, D.M., Sa, G. and Das, T. (2012) Restoration of tumor suppressor p53 by differentially regulating pro- and anti-p53 networks in HPV-18-infected cervical cancer cells. *Oncogene*, **31**, 173-186.

Saphire, A.C., Guan, T., Schirmer, E.C., Nemerow, G.R. and Gerace, L. (2000) Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J Biol Chem*, **275**, 4298-4304.

Sapp, M. and Bienkowska-Haba, M. (2009) Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *Febs J*, **276**, 7206-7216.

Sapp, M. and Day, P.M. (2009) Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*, **384**, 400-409.

Schaack, J., Ho, W.Y., Freimuth, P. and Shenk, T. (1990) Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev*, **4**, 1197-1208.

Scheffner, M. and Whitaker, N.J. (2003) Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol*, **13**, 59-67.

Schlecht, N.F., Kulaga, S., Robitaille, J., Ferreira, S., Santos, M., Miyamura, R.A., Duarte-Franco, E., Rohan, T.E., Ferenczy, A., Villa, L.L. and Franco, E.L. (2001) Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama*, **286**, 3106-3114.

Schmid, S.I. and Hearing, P. (1998) Cellular components interact with adenovirus type 5 minimal DNA packaging domains. *J Virol*, **72**, 6339-6347.

Schultz, B.R. and Chamberlain, J.S. (2008) Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther*, **16**, 1189-1199.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.

Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, **314**, 111-114.

Sedman, S.A., Barbosa, M.S., Vass, W.C., Hubbert, N.L., Haas, J.A., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1991) The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol*, **65**, 4860-4866.

Seiradake, E., Lortat-Jacob, H., Billet, O., Kremer, E.J. and Cusack, S. (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. *J Biol Chem*, **281**, 33704-33716.

Shamanin, V.A., Sekaric, P. and Androphy, E.J. (2008) hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells. *J Virol*, **82**, 3912-3920.

Shayakhmetov, D.M., Eberly, A.M., Li, Z.Y. and Lieber, A. (2005) Deletion of penton RGD motifs affects the efficiency of both the internalization and the endosome escape of viral particles containing adenovirus serotype 5 or 35 fiber knobs. *J Virol*, **79**, 1053-1061.

Sheppard, D. (2003) Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease. *Physiol Rev*, **83**, 673-686.

Shi, L., Sings, H.L., Bryan, J.T., Wang, B., Wang, Y., Mach, H., Kosinski, M., Washabaugh, M.W., Sitrin, R. and Barr, E. (2007) GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side. *Clin Pharmacol Ther*, **81**, 259-264.

Shin, M.K., Sage, J. and Lambert, P.F. (2012) Inactivating all three Rb family pocket proteins is insufficient to initiate cervical cancer. *Cancer Res*.

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, **62**, 10-29.

Silverman, R.H., Nguyen, C., Weight, C.J. and Klein, E.A. (2010) The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Urol*, **7**, 392-402.

Sima, N., Wang, W., Kong, D., Deng, D., Xu, Q., Zhou, J., Xu, G., Meng, L., Lu, Y., Wang, S. and Ma, D. (2008) RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis*, **13**, 273-281.

Simmonds, M. and Storey, A. (2008) Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis. *Int J Cancer*, **123**, 2260-2266.

Simoes, S., Filipe, A., Faneca, H., Mano, M., Penacho, N., Duzgunes, N. and de Lima, M.P. (2005) Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, **2**, 237-254.

Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R.K., Rath, S.K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S.N., Bunz, F., Watson, W.H., Gabrielson, E., Feinstein, E. and Biswal, S. (2008) RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res*, **68**, 7975-7984.

Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.

Smith, J.G., Cassany, A., Gerace, L., Ralston, R. and Nemerow, G.R. (2008) Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J Virol*, **82**, 6492-6500.

Smith, J.G. and Nemerow, G.R. (2008) Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins. *Cell Host Microbe*, **3**, 11-19.

Smith, J.G., Silvestry, M., Lindert, S., Lu, W., Nemerow, G.R. and Stewart, P.L. (2010) Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathog*, **6**, e1000959.

Soifer, H.S., Rossi, J.J. and Saetrom, P. (2007) MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*, **15**, 2070-2079.

Song, E., Zhu, P., Lee, S.K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D.M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D.B., Shankar, P., Marasco, W.A. and Lieberman, J. (2005) Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, **23**, 709-717.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.

Song, S., Pitot, H.C. and Lambert, P.F. (1999) The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol*, **73**, 5887-5893.

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M. and Cantley, L.C. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*, **275**, 73-77.

Spanos, W.C., Hoover, A., Harris, G.F., Wu, S., Strand, G.L., Anderson, M.E., Klingelhutz, A.J., Hendriks, W., Bossler, A.D. and Lee, J.H. (2008) The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol*, **82**, 2493-2500.

Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D. and Doerfler, W. (1995) The complete nucleotide sequence of the DNA of human adenovirus type 12. *Curr Top Microbiol Immunol*, **199 (Pt 2)**, 189-274.

Srivenugopal, K.S., Mullapudi, S.R. and Ali-Osman, F. (2002) Phosphorylation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: experience with a GST-fusion protein and a new pull-down assay. *Cancer Lett*, **181**, 87-93.

Stanley, M.A. (2012a) Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*, **25**, 215-222.

Stanley, M.A. (2012b) Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol*, **93**, 681-691.

Steben, M. and Duarte-Franco, E. (2007) Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*, **107**, S2-5.

Stewart, P.L., Fuller, S.D. and Burnett, R.M. (1993) Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J*, **12**, 2589-2599.

Stone, D., Liu, Y., Li, Z.Y., Tuve, S., Strauss, R. and Lieber, A. (2007) Comparison of adenoviruses from species B, C, E, and F after intravenous delivery. *Mol Ther*, **15**, 2146-2153.

Storrs, C.H. and Silverstein, S.J. (2007) PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol*, **81**, 4080-4090.

Strunze, S., Trotman, L.C., Boucke, K. and Greber, U.F. (2005) Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol Biol Cell*, **16**, 2999-3009.

Sullivan, K.D., Gallant-Behm, C.L., Henry, R.E., Fraikin, J.L. and Espinosa, J.M. (2012) The p53 circuit board. *Biochim Biophys Acta*, **2012**, 7.

Sundstrom, K., Eloranta, S., Sparen, P., Arnheim Dahlstrom, L., Gunnell, A., Lindgren, A., Palmgren, J., Ploner, A., Sanjeevi, C.B., Melbye, M., Dillner, J., Adami, H.O. and Ylitalo, N. (2010) Prospective study of human papillomavirus (HPV) types, HPV persistence, and risk of squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **19**, 2469-2478.

T

Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S. and Muramatsu, T. (2004) A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*, **64**, 3365-3370.

Takeshita, F. and Ochiya, T. (2006) Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*, **97**, 689-696.

Tan, S., Hougardy, B.M., Meersma, G.J., Schaap, B., de Vries, E.G., van der Zee, A.G. and de Jong, S. (2012) HPV16 E6 RNA Interference Enhances Cisplatin and Death Receptor-mediated Apoptosis in Human Cervical Carcinoma cells. *Mol Pharmacol*, **2012**, 10.

Tang, S., Tao, M., McCoy, J.P., Jr. and Zheng, Z.M. (2006) The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol*, **80**, 4249-4263.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, **455**, 1124-1128.

Thaci, B., Ulasov, I.V., Wainwright, D.A. and Lesniak, M.S. (2011) The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. *Oncotarget*, **2**, 113-121.

Thomas, M. and Banks, L. (1998) Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, **17**, 2943-2954.

Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L. and Banks, L. (2002) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, **21**, 5088-5096.

Thomas, M., Massimi, P., Jenkins, J. and Banks, L. (1995) HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene*, **10**, 261-268.

Thomas, M., Narayan, N., Pim, D., Tomaic, V., Massimi, P., Nagasaka, K., Kranjec, C., Gammoh, N. and Banks, L. (2008) Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, **27**, 7018-7030.

Thorland, E.C., Myers, S.L., Persing, D.H., Sarkar, G., McGovern, R.M., Gostout, B.S. and Smith, D.I. (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res*, **60**, 5916-5921.

Todorovic, B., Hung, K., Massimi, P., Avvakumov, N., Dick, F.A., Shaw, G.S., Banks, L. and Mymryk, J.S. (2012) Conserved region 3 of human papillomavirus 16 E7 contributes to deregulation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol*.

Tollefson, A.E., Hermiston, T.W., Lichtenstein, D.L., Colle, C.F., Tripp, R.A., Dimitrov, T., Toth, K., Wells, C.E., Doherty, P.C. and Wold, W.S. (1998) Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature*, **392**, 726-730.

Tomaic, V., Gardiol, D., Massimi, P., Ozbun, M., Myers, M. and Banks, L. (2009) Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene*, **28**, 1-8.

Tommasino, M., Adamczewski, J.P., Carlotti, F., Barth, C.F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T. and Crawford, L. (1993) HPV16 E7 protein associates with

the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*, **8**, 195-202.

Tong, X. and Howley, P.M. (1997) The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4412-4417.

Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P. and Greber, U.F. (2001) Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol*, **3**, 1092-1100.

Trus, B.L., Roden, R.B., Greenstone, H.L., Vrhel, M., Schiller, J.T. and Booy, F.P. (1997) Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 A resolution. *Nat Struct Biol*, **4**, 413-420.

Tungteakkhun, S.S. and Duerksen-Hughes, P.J. (2008) Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*, **153**, 397-408.

U

Umana, P., Gerdes, C.A., Stone, D., Davis, J.R., Ward, D., Castro, M.G. and Lowenstein, P.R. (2001) Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol*, **19**, 582-585.

Underbrink, M.P., Howie, H.L., Bedard, K.M., Koop, J.I. and Galloway, D.A. (2008) E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*, **82**, 10408-10417.

Uversky, V.N., Roman, A., Oldfield, C.J. and Dunker, A.K. (2006) Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs. *J Proteome Res*, **5**, 1829-1842.

V

Van Doorslaer, K. and Burk, R.D. (2012) Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology*, **433**, 216-219.

Vellinga, J., Rabelink, M.J., Cramer, S.J., van den Wollenberg, D.J., Van der Meulen, H., Leppard, K.N., Fallaux, F.J. and Hoeben, R.C. (2004) Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J Virol*, **78**, 3470-3479.

Vetrini, F. and Ng, P. (2010) Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. *Viruses*, **2**, 1886-1917.

Vigneault, F., Zaniolo, K., Gaudreault, M., Gingras, M.E. and Guerin, S.L. (2007) Control of integrin genes expression in the eye. *Prog Retin Eye Res*, **26**, 99-161.

W

Wade, R., Brimer, N. and Vande Pol, S. (2008) Transformation by bovine papillomavirus type 1 E6 requires paxillin. *J Virol*, **82**, 5962-5966.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Munoz, N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, **189**, 12-19.

Wall, N.R. and Shi, Y. (2003) Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet*, **362**, 1401-1403.

Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J. and Welsh, M.J. (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, **110**, 789-799.

Wamai, R.G., Ayissi, C.A., Oduwo, G.O., Perlman, S., Welty, E., Manga, S. and Ogembo, J.G. (2012) Assessing the Effectiveness of a Community-Based Sensitization Strategy in Creating Awareness About HPV, Cervical Cancer and HPV Vaccine Among Parents in North West Cameroon. *J Community Health*, **2012**, 3.

Wang, H., Li, Z.Y., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Moller, T., Koyuncu, D., Drescher, M.R., Strauss, R., Zhang, X.B., Wahl, J.K., 3rd, Urban, N., Drescher, C., Hemminki, A., Fender, P. and Lieber, A. (2011) Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med*, **17**, 96-104.

Wang, Q. and Finer, M.H. (1996) Second-generation adenovirus vectors. *Nat Med*, **2**, 714-716.

Wang, X. and Jiang, X. (2012) Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Lett*, **586**, 1390-1396.

Wanichwatanadecha, P., Sirisrimangkorn, S., Kaewprag, J. and Ponglikitmongkol, M. (2012) Transactivation activity of human

papillomavirus type 16 E6*I on AKR1C enhances chemoresistance in cervical cancer cells. *J Gen Virol*, **2012**, 25.

Weaver, B.A., Feng, Q., Holmes, K.K., Kiviat, N., Lee, S.K., Meyer, C., Stern, M. and Koutsky, L.A. (2004) Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human papillomavirus DNA in men. *J Infect Dis*, **189**, 677-685.

Weigel, S. and Dobbelstein, M. (2000) The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol*, **74**, 764-772.

Wickham, T.J., Carrion, M.E. and Kovesdi, I. (1995) Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*, **2**, 750-756.

Wickham, T.J., Filardo, E.J., Cheresh, D.A. and Nemerow, G.R. (1994) Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol*, **127**, 257-264.

Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L. and Nemerow, G.R. (2005) Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol*, **79**, 1992-2000.

Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-Morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C.M. and Kremer, E.J. (2010) A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS Pathog*, **6**, e1000808.

Worgall, S., Worgall, T.S., Kostarelos, K., Singh, R., Leopold, P.L., Hackett, N.R. and Crystal, R.G. (2000) Free cholesterol enhances adenoviral vector gene transfer and expression in CAR-deficient cells. *Mol Ther*, **1**, 39-48.

Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D.J., Mullen, T.M., Mikyas, Y., Stewart, P.L. and Nemerow, G.R. (2003) Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol*, **77**, 7225-7235.

Y

Yamato, K., Yamada, T., Kizaki, M., Ui-Tei, K., Natori, Y., Fujino, M., Nishihara, T., Ikeda, Y., Nasu, Y., Saigo, K. and Yoshinouchi, M. (2008) New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther*, **15**, 140-153.

Yang, H.G., Hu, B.L., Xiao, L. and Wang, P. (2011) Dendritic cell-directed lentivector vaccine induces antigen-specific immune responses against murine melanoma. *Cancer Gene Ther*, **18**, 370-380.

Ye, Y., Xu, W., Zhong, W., Li, Y. and Wang, C. (2012) Combination treatment with dihydrotanshinone I and irradiation enhances apoptotic effects in human cervical cancer by HPV E6 down-regulation and caspases activation. *Mol Cell Biochem*, **363**, 191-202.

Yoshinouchi, M., Yamada, T., Kizaki, M., Fen, J., Koseki, T., Ikeda, Y., Nishihara, T. and Yamato, K. (2003) In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther*, **8**, 762-768.

Yu, J.Y., DeRuiter, S.L. and Turner, D.L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6047-6052.

Yu, S.F., von Ruden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F. and Gilboa, E. (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3194-3198.

Yugawa, T. and Kiyono, T. (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*, **19**, 97-113.

Z

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.

Zanier, K., Charbonnier, S., Sidi, A.O., McEwen, A.G., Ferrario, M.G., Poussin-Courmontagne, P., Cura, V., Brimer, N., Babah, K.O., Ansari, T., Muller, I., Stote, R.H., Cavarelli, J., Vande Pol, S. and Trave, G. (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science*, **339**, 694-698.

Zanier, K., ould M'hamed ould Sidi, A., Boulade-Ladame, C., Rybin, V., Chappelle, A., Atkinson, A., Kieffer, B. and Trave, G. (2012) Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-

mediated degradation of p53. *Structure*, **20**, 604-617.

Zeng, Y., Yi, R. and Cullen, B.R. (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J*, **24**, 138-148.

Zhao, C.Y., Szekely, L., Bao, W. and Selivanova, G. (2010) Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Res*, **70**, 3372-3381.

Zhou, J., Peng, C., Li, B., Wang, F., Zhou, C., Hong, D., Ye, F., Cheng, X., Lu, W. and Xie, X. (2012) Transcriptional gene silencing of HPV16 E6/E7 induces growth inhibition via apoptosis in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*, **124**, 296-302.

zur Hausen, H. (1976) Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*, **36**, 794.

zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, **2**, 342-350.

zur Hausen, H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, **384**, 260-265.

zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. and Bornkamm, G.W. (1974) Attempts to detect virus-secific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*, **13**, 650-656.

Zwerschke, W., Mannhardt, B., Massimi, P., Nauenburg, S., Pim, D., Nickel, W., Banks, L., Reuser, A.J. and Jansen-Durr, P. (2000) Allosteric activation of acid alpha-glucosidase by the human papillomavirus E7 protein. *J Biol Chem*, **275**, 9534-9541.

Annexes

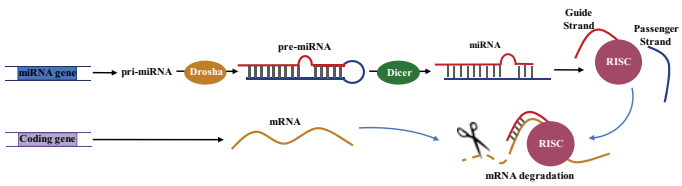
Adenovirus-mediated RNA interference as a new therapeutic tool against cervical cancer

FRE 3211 - IREBS - Equipe Oncoprotéines - Illkirch, France
Anaëlle Bonetta, François Deryckère

Introduction :

Cervical cancer is essentially linked to an infection by DNA viruses known as high risk human papillomavirus (HPV16 and 18). Oncogenic transformation of infected cells is mainly due to expression of two viral proteins E6 and E7, which interfere with the tumour suppressors p53 and pRB, thus deregulating the cell cycle. E6 is able to induce polyu-biquitination of p53, triggered by the cellular ubiquitin ligase E6AP via formation of a trimeric complex with E6 and p53. Inhibition of the two oncoproteins E6 and E7 is a very promising therapeutical way for reestablishing normal expression levels of p53 and pRb in cancerous cells, this way driving them towards death by apoptosis. We chose to target the expression of E6 by RNA-interference using adenovirus-mediated expression of micro-RNA (miRNA).

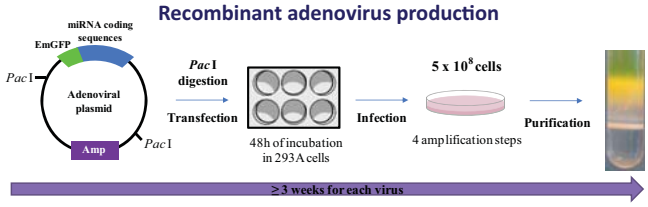
RNA interference



Small Interfering RNA (siRNA)	Micro RNA (miRNA)
Short synthetic oligos of dsRNA	Expressed naturally in cells
Needs to be synthesized	Cloned into a plasmid or a viral vector
Delivered by electroporation or lipid mediated transfection	Expressed from a plasmid or a virus
Introduced in cells	Transcribed by polymerase II
Perfect complementarity : mRNA degradation Partial complementarity : translational repression	Degree of homology determines mRNA degradation or translational repression
Short term knockdown	Long term knockdown

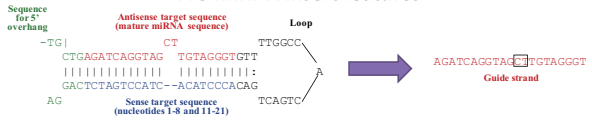
MicroRNAs are small regulatory RNAs, composed of 21-23 nucleotides and implicated in the RNA-mediated gene silencing. They are transcribed by polymerase II or III in pri-miRNA, processed in pre-miRNa by Drosha and exported out of the nucleus by exportin 5. Internal loop is then cleaved by Dicer, resulting in a mature miRNA composed of a guide strand and a passenger strand. The antisense guide strand is incorporated in the RISC complex, and guides it to the complementary mRNA and binds to the 3' untranslated region (UTR) of its target mRNA. Degree of complementarity of the seed sequence (nucleotides 2 to 8) determine the silencing mechanism, direct translational repression or mRNA degradation.

Recombinant adenovirus production



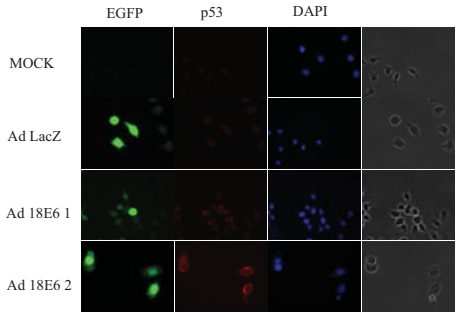
The miRNA expression cassette is dependent of the CMV promoter and contains also the EmGFP coding sequence, thus allowing expression of both the miRNA of interest and of the fluorescent protein as a tracer reporter gene. This di-cistronic transcription unit is cloned into the Adenovirus 5 genome in replacement of the E1 region. All the cloning steps are performed in a plasmid, thereafter the recombinant adenovirus genome is released from the plasmid backbone using the *Pac I* restriction enzyme and transfected into 293A cells (Adenovirus E1 stable transfectants: packaging cell line). Four amplification steps are necessary to obtain viruses in a high quantity and quality.

Pre-miRNA insert features



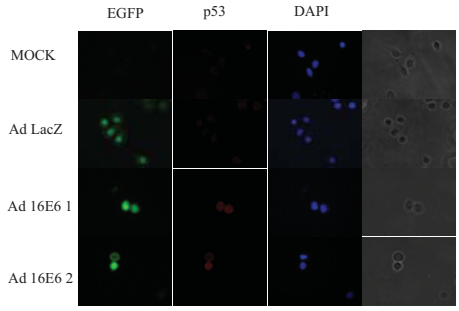
The miRNA were designed thanks to the invitrogen designer tool and chosen to target the open reading frame. Additional features ensure efficient knockdown.

Immunofluorescence analysis



HeLa (HPV 18) after 3 days of transduction

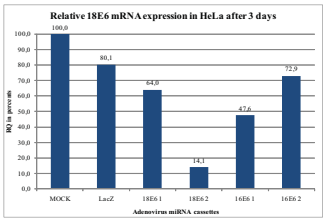
After 3 days of action we can observe an increase of p53 expression level for the 2 adenoviruses encoding miRNA targeting 18E6, but Ad 18E6 2 is the more efficient one. Negative control LacZ and non transduced MOCK were negative for p53 increase.



SiHa (HPV 16) after 3 days of transduction

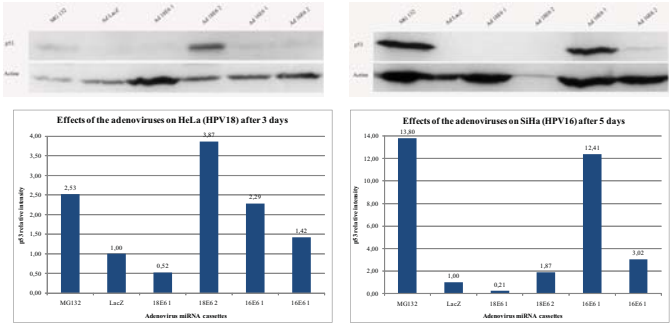
After 3 days of action the 2 adenoviruses encoding miRNA directed against 16E6 showed an increased p53 expression and the controls were negative.

E6 messenger RNA expression level



To analyze knockdown efficiency of the designed miRNAs, a quantitative PCR was done on 18E6 in HeLa cells after 3 days of transduction. The results revealed a remaining expression of 14,1 % for Ad 18E6 2. Negative control miRNA LacZ resulted in 80,1 % remaining.

p53 protein expression level



Increase of p53 level was observed after 3 days of transduction for HeLa cells with the adenovirus encoding miRNA 18E6 2 and after 5 days for SiHa cells transduced with adenovirus 16E6 1.
Other p53 increases were observed due to sequence homologies between HPV 16 and 18. Results were in agreement with those obtained in the mRNA expression analysis, knockdown of mRNA E6 resulted in p53 protein expression increase.

Conclusion :

The results obtained with the miRNA expressing adenoviruses are so far very encouraging. The efficiency of transduction (as easily checked with EGFP fluorescence) is, in all cases, reaching very close to 100% (data not shown). Transduction of cells with the control adenovirus (miRNA against LacZ) did not influence expression of either E6 or p53. On the contrary, adenoviruses targeting efficiently E6 mRNA (quantitative RT-PCR analyses) by RNA interference provoke the increase of p53 levels in HPV-positive cells (Western-Blotting and immunofluorescence experiments). We will soon test, with our system, the effect of the upregulation of p53 on the survival, growth or death of HPV-positive cells in vitro and also in vivo in a mouse model.

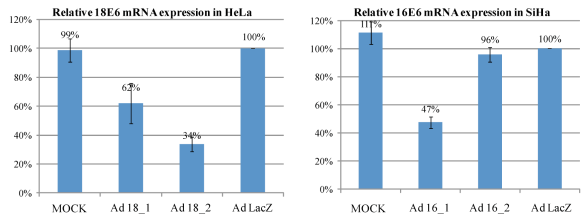
Adenovirus-mediated RNA interference as a new therapeutic tool against cervical cancer

§ UMR 7242 - IREBS - Equipe Oncoprotéines - Illkirch, France
* Inserm U748 - Institut de Virologie - Strasbourg, France
Anaëlle Bonetta§, Laurent Mailly*, Eric Robinet*, François Deryckère§

Introduction :

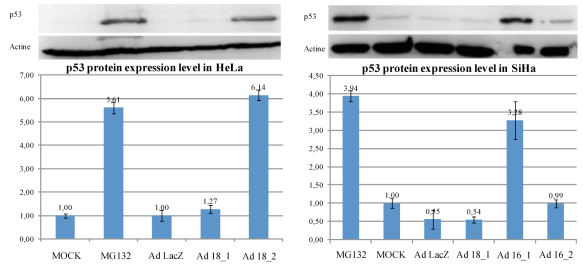
Cervical cancer is essentially linked to an infection by DNA viruses known as high risk human papillomavirus (HPV16 and 18). Oncogenic transformation of infected cells is mainly due to expression of two viral proteins E6 and E7, which interfere with the tumour suppressors p53 and pRB, thus deregulating the cell cycle. E6 is able to induce polyubiquitination and subsequent degradation of p53, triggered by the cellular ubiquitin ligase E6AP via formation of a trimeric complex with E6 and p53. Inhibition of the two oncoproteins E6 and E7 is a very promising therapeutical way for reestablishing normal expression levels of p53 and pRb in cancerous cells, this way driving them towards death by apoptosis. We chose to target the expression of E6 by RNA-interference using adenovirus-mediated expression of artificial micro-RNA (miRNA).

1) Effects of the miRNAs on E6 mRNA



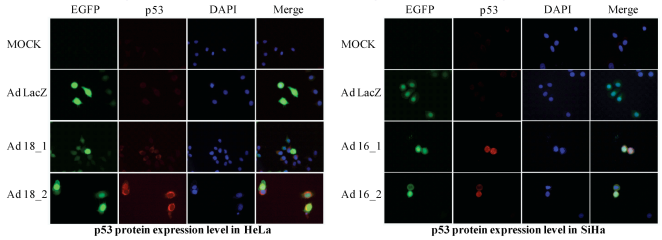
After production of our recombinant adenoviruses, we analyzed knockdown efficiency of the designed miRNAs. A quantitative PCR was done on 18E6 in HeLa cells and on 16E6 in SiHa cells after 3 days of transduction. The results revealed a remaining expression of 34% for the miRNA 2 (Ad 18_2) in HeLa cells and 47% for the miRNA 1 (Ad 16_1) in SiHa cells. Negative control miRNA LacZ and non transduced sample MOCK had no effect.

2) Effects of the miRNAs on the expression level of the p53 protein



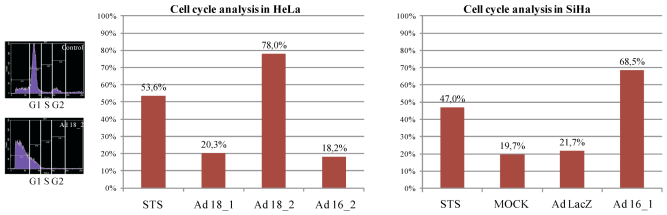
We focused on indirect effect of our miRNA on the protein expression of their targets. Increase of p53 level was observed after 3 days of transduction for HeLa cells with the adenovirus encoding miRNA 18E6 2, and in SiHa cells with Ad 16E6 1. Positive control MG132 is a proteasome inhibitor reducing degradation of ubiquitinated protein.

2) Effects of the miRNAs on the expression level of proteins



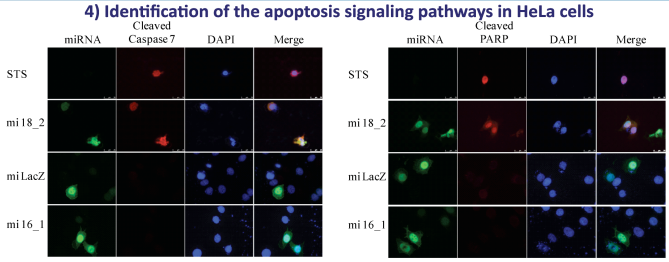
After 3 days of treatment in HeLa cells, we can observe an increase of p53 expression level for the 2 adenoviruses encoding miRNA targeting 18E6, and Ad 18E6 2 is the most efficient one. Negative control LacZ and non transduced MOCK were negative for p53 increase. In SiHa cells, concerning the 2 adenoviruses encoding miRNA directed against 16E6 an increased p53 expression was observed and the controls were negative.

3) Effects of the miRNAs on the cell cycle



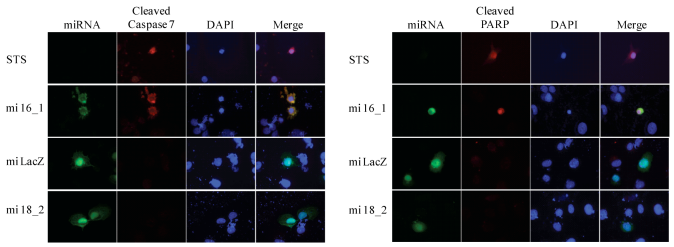
To correlate decrease of E6 expression, increase of p53 level and cell death, we analyzed cell cycle after cell staining with propidium iodide. Apoptosis corresponds to the sub G1 peak, and apoptotic cells have a displaced peak. After 3 days of treatment with Ad 18_2 in HeLa cells, we observed 78% of apopototic cells, in comparison to positive control STS (staurosporine, 53% apopototic cells). In SiHa cells, 68% of apoptotic cells are observed after action of Ad 16_1 in comparison 53% for the control.

4) Identification of the apoptosis signaling pathways in HeLa cells



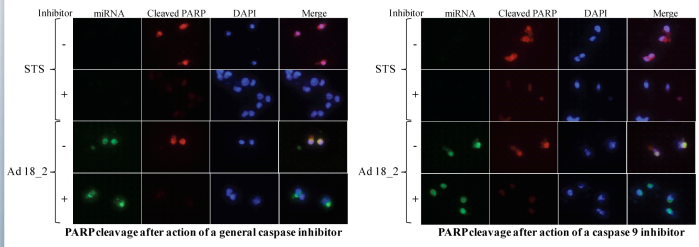
To investigate pathways responsible for apoptosis, we transfected plasmids encoding miRNAs into HeLa cells. Results indicated caspase 7 cleavage after 24h of staurosporine treatment, and the nuclei are condensed. The same observation can be made for miRNA 18_2, whereas treatment with negative control mi LacZ and miRNA 16_1 had no effect on HeLa cells. We also observed PARP cleavage, both for the positive control and miRNA 18_2.

4) Identification of the apoptosis signaling pathways in SiHa cells



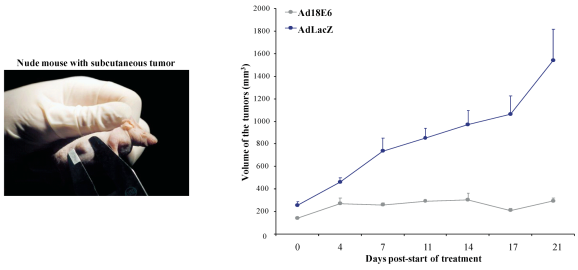
The same observations were made in SiHa cells. Treatment with the positive control staurosporine induced caspase 7 cleavage, PARP cleavage and nucleus condensation. MiRNA 16_1 induced caspase 7 and PARP cleavage, whereas negative control LacZ and miRNA 18_2 had no effects.

5) Caspases signaling pathways



To confirm our hypothesis, we used peptides inhibiting caspase activation and visualized the effect on PARP cleavage. After 3 days of treatment of the miRNAs in HeLa cells, in samples treated with STS, PARP is cleaved as expected, but in samples where inhibitors were added no PARP cleavage was observed. The same observations were made after treatment with Ad 18_2, in comparison with negative control Ad LacZ. Apoptosis is dependant of the activation and the cleavage of the caspases.

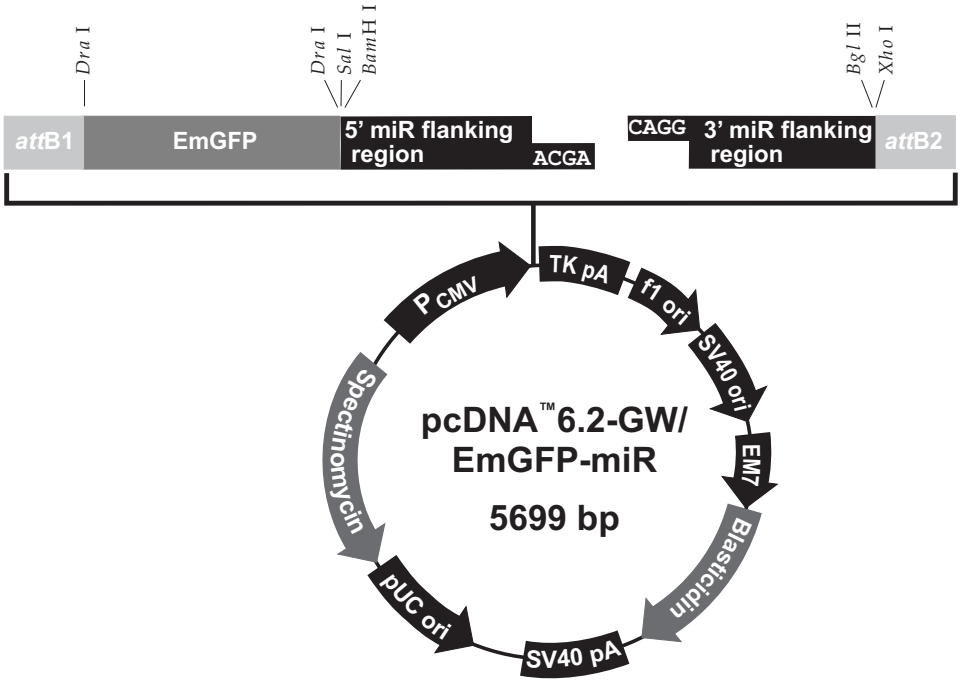
6) In vivo studies on xenotransplants in nude mice



Preliminary *in vivo* tests confirmed the *in vitro* tests. Recombinant adenovirus Ad 18_2 and Ad LacZ were injected (one injection each day during 5 days) in nude mice xenotransplanted with HeLa Luciferase cells. The location of the viruses could be monitored by GFP emission. After 21 days, we could observe a growth inhibition (constant size around 200 mm3) of the tumors injected with Ad 18_2, whereas tumors injected with Ad LacZ continued to growth (up to 1600 mm3).

Conclusion :

The results obtained with the miRNA expressing adenoviruses are so far very encouraging. The efficiency of transduction (as easily checked with EGFP fluorescence) is, in all cases, reaching very close to 100% (data not shown). Transduction of cells with the control adenovirus (miRNA against LacZ) did not influence expression of either E6 or p53, or induce cell death. On the contrary, adenoviruses targeting efficiently E6 mRNA (quantitative RT-PCR analyses) by RNA interference provoke the increase of p53 levels in HPV-positive cells (Western-Blotting and immunofluorescence experiments). In addition, upregulation of p53 induces cell death via activation of the caspases pathway. After *in vivo* studies on xenotransplants in nude mice, we could observe cell growth inhibition on solid tumors after 21 days of treatment.



Comments for pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR
5699 nucleotides

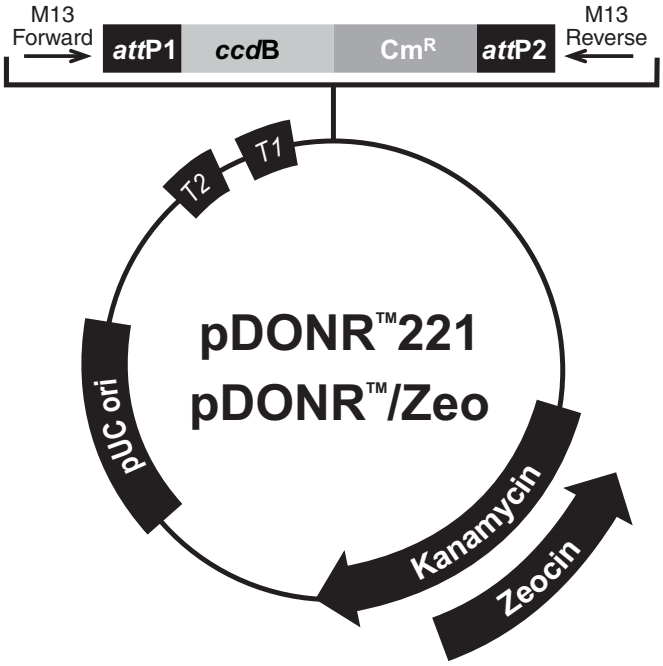
CMV promoter: bases 1-588
*att*B1 site: bases 680 - 704
EmGFP: bases 713-1432
EmGFP forward sequencing primer site: bases 1409-1428
5' miR flanking region: bases 1492-1518
5' overhang (C): bases 1515-1518
5'overhang: bases 1519-1522
3' miR flanking region: bases 1519-1563
*att*B2 site (C): bases 1592-1616
miRNA reverse sequencing primer site (C): bases 1607-1626
TK polyadenylation signal: bases 1645-1916
f1 origin: bases 2028-2456
SV40 early promoter and origin: bases 2483-2791
EM7 promoter: bases 2846-2912
Blasticidin resistance gene: bases 2913-3311
SV40 polyadenylation signal: bases 3469-3599
pUC origin (C): bases 3737-4410
Spectinomycin resistance gene (C): bases 4480-5490
Spectinomycin promoter (C): bases 5491-5624

(C) = Complementary strand

invitrogen™

```
                 CAAT                                          TATA        3' end of
                                                                         CMV promoter
531   CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCTC
      GGTAACTGCG TTTACCCGCC ATCCGCACAT GCCACCCTCC AGATATATTC GTCTCGAGAG

          Putative
      transcriptional start
591   TGGCTAACTA GAGAACCCAC TGCTTACTGG CTTATCGAAA TTAATACGAC TCACTATAGG
      ACCGATTGAT CTCTTGGGTG ACGAATGACC GAATAGCTTT AATTATGCTG AGTGATATCC

                                                                  Dra I
                                          attB1
651   GAGTCCCAAG CTGGCTAGTT AAGCTATCAA CAAGTTTGTA CAAAAAAGCA GGCTTTAAAA
      CTCAGGGTTC GACCGATCAA TTCGATAGTT GTTCAAACAT GTTTTTTCGT CCGAAATTTT

                 EmGFP coding sequence
                                         EmGFP forward sequencing primer site
711   CC ATG GTG AGC AAG GGC --- --- --- GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA
      GG TAC CAC TCG TTC CCG     EmGFP   CCG TAC CTG CTC GAC ATG TTC ATT
         Met Val Ser Lys Gly --- --- --- Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys ***

                                                Dra I        Sal I        BamH I
1433    GCTAAGCA CTTCGTGGCC GTCGATCGTT TAAAGGGAGG TAGTGAGTCG ACCAGTGGAT
        CGATTCGT GAAGCACCGG CAGCTAGCAA ATTTCCCTCC ATCACTCAGC TGGTCACCTA

                5' miR flanking region                  3' miR flanking region
1491  CCTGGAGGCT TGCTGAAGGC TGTATGCTG pre-miRNA CA GGACACAAGG CCTGTTACTA
      GGACCTCCGA ACGACTTCCG ACATACGAC ds oligo GT CCTGTGTTCC GGACAATGAT

                                      Bgl II          Xho I
1541  GCACTCACAT GGAACAAATG GCCCAGATCT GGCCGCACTC GAGATATCTA GACCCAGCTT
      CGTGAGTGTA CCTTGTTTAC CGGGTCTAGA CCGGCGTGAG CTCTATAGAT CTGGGTCGAA

      attB2   miRNA reverse                                start TK polyadenylation signal
              sequencing primer site
1601  TCTTGTACAA AGTGGTTGAT CTAGAGGGCC CGCGGTTCGC TGATGGGGGA GGCTAACTGA
      AGAACATGTT TCACCAACTA GATCTCCCGG GCGCCAAGCG ACTACCCCCT CCGATTGACT
```

invitrogen™



Comments for:	**pDONR™221** **4762 nucleotides**	**pDONR™/Zeo** **4291 nucleotides**
*rrn*B T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
rrnB T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
*att*P1:	570-801	570-801
*ccd*B gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1847-2506	1847-2506
*att*P2 (c):	2754-2985	2754-2985
T7 Promoter/priming site (c):	3000-3019	3003-3022
M13 Reverse priming site:	3027-3043	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3156-3965	---
EM7 promoter (c):	---	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	---	3111-3485
pUC origin:	4086-4759	3615-4288

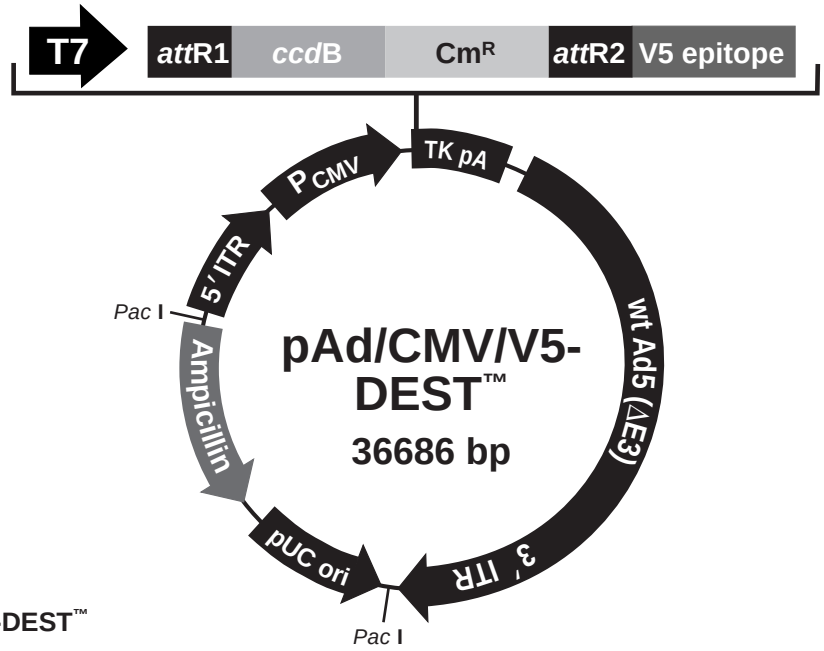
invitrogen™

The recombination region of the expression clone resulting from pDONR™221 × entry clone or pDONR™/Zeo × entry clone is shown below.

Features of the Recombination Region:

- Shaded regions correspond to DNA sequences transferred from the *att*B substrate into pDONR™221 or pDONR™/Zeo by recombination. Non-shaded regions are derived from the pDONR™221 or pDONR™/Zeo vector.
- Bases 651 and 2897 of the pDONR™221 or pDONR™/Zeo vector sequence are marked.

```
                M13 Forward (-20) priming site
531   GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT TTATTTTGAC
                                        AGCCCGGGGT TTATTACTAA AATAAAACTG

591   TGATAGTGAC CTGTTCGTTG CAACACATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATG CCA ACT
      ACTATCACTG GACAAGCAAC GTTGTGTAAC TACTCGTTAC GAAAAAATAT TAC GGT TGA
                                        attL1
      651                                                       2897
650   TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN --- --- --- NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA
      AAC ATG TTT TTT CGT CCG ANN ---  Gene  --- NTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT

2907  GTT GGC ATT ATAAGAAAGC ATTGCTTATC AATTTGTTGC AACGAACAGG TCACTATCAG
      CAA CCG TAA TATTCTTTCG TAACGAATAG TTAAACAACG TTGCTTGTCC AGTGATAGTC
                                        attL2

2966  TCAAAATAAA ATCATTATTT GCCATCCAGC TGATATCCCC TATAGTGAGT CGTATTACAT
      AGTTTTATTT TAGTAATAAA CGGTAGGTCG

          M13 Reverse priming site
3026  GGTCATAGCT GTTTCCTGGC AGCTCTGGCC CGTGTCTCAA AATCTCTGAT GTTACATTGC
```



Comments for pAd/CMV/V5-DEST™
36686 nucleotides

Human Ad5 sequences (wt 1-458; includes 5′ L-ITR and packaging signal): 1-458
pAd forward priming site: bases 361-384
CMV promoter: bases 728-1315
T7 promoter/priming site: bases 1359-1378
*att*R1 site: bases 1407-1531
*ccd*B gene: bases 1960-2265 (C)
Chloramphenicol resistance gene (Cm^R): bases 2607-3266 (C)
*att*R2 site: bases 3547-3671
V5 epitope: bases 3697-3738
TK polyadenylation signal: bases 3765-4036
Human Ad5 sequences (wt 3513-35935; E3 region deleted, includes 3′ R-ITR): bases 4056-34604
pAd reverse priming site: bases 4059-4082
pUC origin: bases 34781-35442 (C)
Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 35568-36428 (C)
bla promoter: bases 36429-36527 (C)
Pac I restrictions sites: bases 34610 and 36684

(C) = complementary strand

Invitrogen™
life technologies

Invitrogen™
life technologies

```
                                                                                  3´end of   Putative
                                                                                  CMV promoter transcriptional start
                CAAT                                                   TATA
1261 TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCTCTCTGG CTAACTAGAG

                                                T7 promoter/priming site
1331 AACCCACTGC TTACTGGCTT ATCGAAATTA ATACGACTCA CTATAGGGAG ACCCAAGCTG GCTAGTTAAG
                    1414                                                        3657
                          attB 1                                   attB 2
1401 CTATCAACAA GTTTGTACAA AAAAGC AGG CTN ___ ___ ___ NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA
     GATAGTTGTT CAAACATGTT TTTTCG TCC GAN ___ GENE___ NTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT
                                                          Pro Ala Phe Leu Tyr Lys
                                                   V5 epitope   V5(C-term) reverse priming site
3667 GTG GTT GAT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC
     CAC CAA
     Val Val Asp Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu

3724 GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT TAG TAA TGA GTTT AAACGGGGGA GGCTAACTGA
     Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly *** *** ***
```

Anaëlle BONETTA

Exploration de nouvelles voies thérapeutiques contre le cancer du col de l'utérus : approche combinée par adénovirus et ARN interférence

Résumé

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus fréquent chez la femme, dont l'agent étiologique majeur est l'infection par les virus du papillome humain (HPV16 et 18 principalement), qui sont de petits virus infectant les épithéliums muqueux et cutanés, et pouvant induire la formation de tumeurs. Suite à l'infection, les oncoprotéines E6 et E7 interfèrent avec le cycle cellulaire et induisent notamment l'immortalisation, voire la transformation des cellules. Les fonctions les plus connue de ces deux oncoprotéines sont la dégradation des suppresseurs de tumeur p53 et pRb, respectivement. Mon travail de thèse à consisté en la mise au point des vecteurs adénoviraux exprimant des miARN dirigés contre l'oncoprotéine E6. Exprimés *in vitro* ils induisent l'apoptose des cellules tumorales traitées, et *in vivo* permettent le ralentissement de la croissance de tumeurs xénogreffées à des souris Nude. Ces adénovirus ont également montré leur potentiel dans d'autres types de cancers.

Mots-clés : Papillomavirus, Cancer du col de l'utérus, Adénovirus, ARN interférence, Oncoprotéine E6, Thérapie génique, Phase préclinique, Knockdown

Résumé en anglais

Cervical cancer is the third most common female cancer. Infection by human papillomavirus (mainly HPV-16 and 18), with tropisms for mucosal or cutaneous squamous surfaces, is the major etiological agent implicated in cancer and tumor development. After infection, E6 and E7 oncoproteins interfere with the cell cycle and induce immortalization and cell transformation. The best known function of these two oncoproteins is degradation of tumors suppressors p53 and pRb respectively. My thesis project consisted in the development of adenoviral vectors expressing miRNA directed against the oncoprotein E6. Their *in vitro* expression resulted in cellular death by apoptosis of the treated tumor cells, and allowed reduction of tumor growth *in vivo* in nude mice xenografts. These adenoviruses have also demonstrated their therapeutical potential in other types of HPV-positive cancers, and their novel therapeutical molecules expression potential.

Mots-clés : Papillomavirus, Cervical cancer, Adenovirus, RNA interference, E6 oncoprotein, Preclinical phase, Knockdown