



Modification des dodécaèdres bases de l'adénovirus de sérotype 3 : design et caractérisation d'un nouveau vecteur multi-épitopique polyvalent

Charles Vagniau

► To cite this version:

Charles Vagniau. Modification des dodécaèdres bases de l'adénovirus de sérotype 3 : design et caractérisation d'un nouveau vecteur multi-épitopique polyvalent. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV061 . tel-02110396

HAL Id: tel-02110396

<https://theses.hal.science/tel-02110396>

Submitted on 25 Apr 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité Nanobiologie et Biologie Structurale

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Charles VRAGNIAU

Thèse dirigée par **Pascal FENDER**, Directeur de Recherche 2^{ème} Classe, Centre National de la Recherche Scientifique

Préparée au sein du **Laboratoire de Microscopie Électronique et Méthode**
Dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences de Vivant**

Modification des dodécaèdres bases de l'adénovirus de sérotype 3 : Design et caractérisation d'un nouveau vecteur multi-épitopique polyvalent

Thèse soutenue publiquement le 20 Septembre 2018,
devant le jury composé de :

Professeur Karim BENIHOUD

Pr de l'Université Paris Sud, Rapporteur

Docteur Saw-see HONG

CR à Institut National de la Recherche Agronomique de Lyon, Rapporteur

Docteur Frédéric ISENI

DR à Institut de Recherche Biomédicale des Armées de Brétigny-sur-Orge, Examineur

Professeur Pascal POIGNARD

Pr de l'Université Grenoble Alpes, Examineur et Président du jury

Docteur Pascal FENDER

DR à l'Institut de Biologie Structural de Grenoble, Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mes travaux : le Professeur Karim Benihoud et le Docteur Saw-See Hong, rapporteurs de ma thèse ainsi qu'au Docteur Frédéric Iseni et au Professeur Pascal Poignard, examinateurs de ce travail.

Je remercie profondément mon directeur de thèse le Docteur Pascal Fender. Pascal, notre première rencontre remonte à plus de 12 ans maintenant. Tu m'as déjà accompagné pendant mon BTS et mon master et aujourd'hui je suis comblé d'avoir pu faire ma thèse à tes côtés. Merci pour la qualité de ta formation, pour ta patience, ton écoute, tes encouragements, tes précieux conseils et ton professionnalisme qui m'ont permis de réaliser et de concrétiser mon parcours. Sache que je suis profondément admiratif de ta personne, tant sur le plan personnel que professionnel. Les mots n'existent pas pour te remercier autant que je le voudrais !

Je tiens également à remercier très chaleureusement Émilie Stermann, la Mme Parfaite du labo. Merci pour ta bonne humeur constante, pour ces discussions scientifiques (ou pas), merci pour toutes ces gommettes que tu colles partout ... Tu es une vraie source d'inspiration pour le travail bien fait. Je ne suis jamais arrivé à avoir une paillasse aussi bien rangée que la tienne, je vais essayer de le faire à l'avenir, ça doit être tellement agréable.

Merci au Professeur Imre Berger ainsi qu'à Frédéric Garzoni sans qui ce projet n'aurait jamais commencé. J'espère que vous et Pascal allez l'amener le plus loin possible parce que moi j'y crois.

Je veux remercier aussi toutes les personnes qui m'ont "supporté" dans le cadre du labo durant ces trois années et plus particulièrement Laura, Caroline, Philippe et Sébastien. Vous avez pris le temps pour découvrir qui je suis... c'est rigolo hein ?! Merci pour ces partages de connaissances professionnelles et personnelles au labo. Merci d'avoir été présents pour ces échanges, d'avoir écouté mes inquiétudes, des doutes et mon humour (Parfois un peu lourd je vous l'accorde) ! Vous m'avez beaucoup apporté et vous êtes de belles personnes !

Merci aussi à toutes les personnes de l'ex UVHCI et notamment Amélie, Anaïs, Audrey, Carla, Claire, Francine, Marlyse, Romy, Sabrina, Jean-Marie, Nicolas T., Nicolas P. et Wim.

Si je suis ici aujourd'hui, c'est aussi grâce à vous : Marie-Jeanne, Marie-Pierre, Virginie et Harald. Merci de m'avoir permis de retourner sur les bancs de la fac et de m'avoir soutenu et aidé dans mes démarches.

Une forte pensée et un grand merci à toutes les personnes qui m'entourent et avec qui le mot apéro prend tout son sens : Pépette, Crécelle, Marjo, Mélaine, Jojo, Kiche, Lulu, Sylvain (Hein quoi ? Moi ? Alors la...) et Tom.

A toi aussi Julien, mon ami de toujours, personne sur qui j'ai toujours pu compter, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci profondément d'avoir été et d'être toujours mon ami et d'un soutien sans faille.

A toi aussi Maman, je voulais te remercier de m'avoir toujours dit « d'aller au bout de mes rêves » et de m'avoir soutenu de façon inconditionnelle. Merci d'être forte, merci d'être un peu (beaucoup) dans la lune, merci d'être celle que tu es et ce que tu as fait de moi. J'en suis si fier aujourd'hui !

Merci aussi à Charlotte, ma sœur que j'aime tant. Je n'ai que trop peu de mot pour qualifier tout l'amour que je te porte. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Charlotte, devient la femme que tu souhaites et sache que je serai éternellement à tes côtés.

Pour finir, merci à ma Tchérrie Tchérrie ! Je souhaite par ces quelques mots te dire que je t'aime profondément, merci d'être celle que tu es, d'avoir été compréhensive et merci de partager ma vie. Tu es franchement une femme extraordinaire... Je te aime !



Et rien que pour toi : je passe mon tour...

Résumé

Certains adénovirus humains (HAdV) comme le sérotype 3 (appartenant au sous-groupe B) sont capables de former des particules pseudo-virales composées des deux protéines impliquées dans l'entrée virale : la base du penton et la fibre (= penton). En effet, 12 pentons sont capables de s'auto-assembler de manière symétrique pour former des particules appelées dodécaèdres (Dd). Dans le présent travail, nous avons modifié et caractérisé les dodécaèdres bases (c'est à dire des Dds sans fibres) de l'HAdV3 afin d'en faire une plateforme vectorielle multi-épitopique versatile appelée ADDomer (**AD**enovirus **D**odeca**mer**). Pour cela, nous avons identifié des régions de la base du penton permettant l'insertion de peptides d'intérêt et créé une plateforme génétique générique permettant l'insertion facile de ceux-ci par biologie synthétique. L'insertion de séquences codant un peptide d'intérêt directement dans le gène de l'ADDomer, résulte dans son exposition de manière multivalente à la surface de la VLP du fait de la pentamérisation puis de la dodécamérisation de la base. L'ADDomer a été produit et caractérisé afin d'évaluer sa capacité à vectoriser des épitopes linéaires ou structuralement complexes. Nous avons ensuite conçu une deuxième stratégie de vectorisation, toujours basée sur l'ADDomer mais cette fois-ci en utilisant l'interaction base/fibre. Un peptide mimant la partie de la fibre de l'HAdV3 (les 20 résidus N-terminaux) interagissant avec la base du penton a été élaboré pour servir d'adaptateur formant des liaisons covalentes avec l'ADDomer.

Le comportement de l'ADDomer *in vivo* a été étudié dans un contexte vaccinal. Pour cela, nous avons injecté l'ADDomer chez la souris afin de valider son transport vers le système lymphatique. Nous avons également démontré que l'ADDomer était capable de s'internaliser dans les monocytes et dans des cellules dendritiques dérivées de monocytes et d'induire les caractères spécifiques de maturation de ces dernières. Fort de ces résultats, nous avons généré un ADDomer vectorisant un épitope du virus Chikungunya décrit pour être la cible d'anticorps neutralisants de patients infectés par ce virus. Pour finir cette étude *in vivo*, nous avons évalué la capacité de l'ADDomer-TevChik à induire la réponse anti-épitopique et nous avons ainsi démontré que la façon dont l'épitope est présenté à la surface de l'ADDomer était importante pour obtenir une réponse significative.

Mots Clés : Adénovirus, Particule pseudo-virales, Dodécaèdre, Vectorisation, Plateforme multi-épitopique

Abstract

Some human adenoviruses (HAdV) such as adenovirus derived from serotype 3 (belonging to subgroup B) are able to form virus-like particles composed of the two proteins involved in viral entry: the penton base and the fiber (= penton). Indeed, 12 pentons are able to self-assemble in a symmetrical manner to form penton dodecahedron (PtDd). In the present work, we modified and characterized the base dodecahedron (BsDd = PtDd without fiber) of HAdV3 in order to create a versatile multi-epitopic platform named ADDomer (ADenovirus Dodecamer). We have created a genetic platform allowing easy insertion of epitope(s) of interest (s) thanks to synthetic biology. The insertion of sequences encoding a peptide of interest in the ADDomer gene enable a multivalent exposure at the surface of the VLP due to the pentamerization then to the dodecamerization of the penton base. ADDomer has been produced and characterized to assess its ability to vectorize linear or structurally complex epitopes. We then designed a second vectorization strategy, still based on the ADDomer, but using the interaction penton base / fibre. A peptide mimicking the part of the Ad3 fiber interacting with the penton base (the 20 N-terminal residues) has been designed to serve as an adaptor forming covalent bonds with the ADDomer.

The behavior of the ADDomer *in vivo* has been studied in a vaccine context. For this, we injected the ADDomer in mice to validate its transport to the lymphatic system. We have also demonstrated that ADDomer is able to internalize monocytes and dendritic cells derived from monocytes (MoDC) and induces the specific characters of MoDC maturation. Based on these results, we generated an ADDomer vectorizing an epitope of the Chikungunya virus (ADDomer TevChik) described to be the target of neutralizing antibodies of patients who have been infected by this virus. To conclude this *in vivo* study, we assessed the ability of ADDomer TevChik to induce the anti-epitopic response and thus demonstrated that the way the epitope is displayed on the surface of the ADDomer was important to obtain a meaningful response.

Key words: Adenovirus, Virus Like Particle, Penton Dodecahedron, Vectorization, Multi-epitopic Platform

Liste des abréviations

Å :	Angström
Ad :	adénovirus
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BSA :	bovine serum albumine
CAR :	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CD :	cluster de différenciation
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
Da :	dalton
Dd(s) :	dodécaèdre(s)
DF :	dodécaèdre fibre
DSG2 :	desmoglérine2
E :	early
HAdV(s) :	human adenovirus(es)
IPTG :	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITR :	inverted terminal repeat
kDa :	kilo dalton
kpb :	kilo paire de bases
L :	late
PAGE :	polyacrilamide gel electrophoresis
PBS :	phosphate buffered saline
PDB :	protein data bank
rpm :	rotation par minute
SDS :	sodium dodécyl sulfate
Tev :	Tabacco Etch Virus
TLR :	toll like receptor
YFP :	yellow fluorescent protein

INTRODUCTION	1
I. Les adénovirus	3
1. Généralités	3
2. Taxonomie	4
3. Epidémiologie	6
4. La structure des adénovirus	7
4.1. Les protéines majeures	8
4.1.1. <i>L'hexon</i>	8
4.1.2. <i>La base du penton</i>	10
4.1.3. <i>La fibre</i>	11
4.1.4. <i>L'interaction base du penton + fibre : le penton</i>	12
4.2. Les protéines mineures	13
4.3. La protéine IX (pIX)	14
4.3.1. <i>La protéine VI (pVI)</i>	15
4.3.2. <i>La protéine VIII</i>	15
4.3.3. <i>La protéine IIIa</i>	15
4.4. Les protéines du nucléoïde	15
5. La réplication virale	16
5.1. La phase d'entrée du virus	18
5.2. La phase de réplication de l'ADN viral	18
5.2.1. <i>La phase précoce de la réplication</i>	19
5.2.2. <i>La phase tardive de la réplication</i>	20
5.3. La phase terminale du cycle viral	21
6. Les récepteurs primaires des adénovirus	22
6.1. Le « coxsackie and adenovirus receptor »	22
6.2. L'acide sialique (SA)	23

6.3.Le CD46	23
6.4.Le CD80 et CD86.....	23
6.5.Le « Major Histocompatibility Complex class I » (MHC-I).....	24
6.6.Le « Vascular Cell Adhesion Molecule I » (VCAM-I).....	24
6.7.Les Protéoglycanes à Héparanes Sulfates (HSPG)	24
6.8.La desmogléine de type 2 (DSG2)	24
7. Les adénovirus en thérapie.....	25
7.1.Les vecteurs non réplicatifs.....	26
7.2.Les vecteurs réplicatifs.....	27
7.2.1. <i>Déficient pour le gène E1B-55K</i>	27
7.2.2. <i>Spécifique d'un type cellulaire</i>	28
7.3.La dernière génération de vecteur adénovirale.....	29
II. Les dodécaèdres des adénovirus.....	31
1. Les dodécaèdres naturels	31
2. Les dodécaèdres recombinants	32
3. La structure des dodécaèdres	33
4. Propriétés biologiques des dodécaèdres.....	35
4.1.Synthèse et localisation au cours du cycle viral	35
4.2.Attachement et internalisation.....	36
4.3.Dans le remodelage cellulaire	36
4.4.Un piège à défensines.....	37
5. Les dodécaèdres en biotechnologie	38
5.1.En vecteur d'ADN.....	38
5.2.En vecteur de protéines	38
5.3.En vaccinologie	40

III. Contexte et objectifs de la thèse42

MATERIELS ET METHODES.....43

I. Biologie cellulaire45

1. Culture cellulaire..... 45

1.1.Cellules HeLa 45

1.2.Cellules d'insecte 45

2. Production de protéines..... 45

2.1.En système baculovirus 45

2.1.1. Transformation bactérienne 45

2.1.2. Sélection des colonies d'intérêt et pré-culture 46

2.1.3. Purification du bacmide, transfection des cellules SF21 et amplification du baculovirus..... 46

2.1.4. Production en Hi5 47

2.2.Culture bactérienne..... 47

2.2.1. Les bactéries 47

2.2.2. Le milieu de culture 48

2.2.3. La transformation bactérienne 48

2.2.4. L'amplification, la pré-culture et la production..... 48

3. Production de cellules dendritiques dérivées de monocytes. 49

3.1.Isolement de la population monocyttaire 49

3.2.Différentiation des monocytes en cellules dendritiques 50

II. Biochimie51

1. Analyse des protéines 51

1.1.Électrophorèse des protéines 51

1.2.Westernblot 51

1.2.1. Transfert des protéines 51

1.2.2. Saturation de la membrane 51

1.2.3. Détection des protéines	52
2. Purification des protéines.....	53
2.1.Produites en cellules d'insectes.....	53
2.1.1. Purification par ultracentrifugation sur gradient de saccharose	53
2.1.2. Chromatographie échangeuse d'anions.....	53
2.2.Produites en bactéries.....	54
3. Test “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“ (ELISA)....	54
4. Immunofluorescence.....	55
4.1.Internalisation de l'ADDomer dans les cellules HeLa	55
4.2.Internalisation de l'ADDomer par les monocytes et MoDC	56
4.2.1. Marquage de l'ADDomer.....	56
4.2.2. Suivi de l'internalisation par cytométrie en flux	56
4.2.3. Microscopie de fluorescence	57
5. La microscopie électronique par coloration négative	57
III. Biophysique	58
1. La résonance des plasmons de surface (SPR).....	58
2. Chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALLS)	58
3. Spectrométrie de masse.....	59
IV. Expérimentations animales.....	59
1. Biodistribution	60
2. Immunisation	60
V. Analyses statistiques.....	60
RESULTATS	61
I. Modification du dodécaèdre base de l'HAdV3.....	63

1. Design d'une plateforme versatile : L'ADDomer	63
2. Tests d'expression en système baculovirus et purification ...	65
3. L'ingénierie des boucles de l'ADDomer	71
3.1.L'ADDomer "Extended Loop"	72
3.2.L'ADDomer "VL _{2X} "	75
3.3.L'ADDomer "Swapped"	76
4. Les ADDomers d'intérêt	78
4.1.Les ADDomers "ovalbumine"	79
4.2.Les ADDomers "Poxvirus"	79
4.3.Les ADDomers Chikungunya	80
4.4.Les ADDomers "captifs"	81
II. Vectorisation de protéines d'intérêt.....	85
1. Les ADDomers mutants "cystéine"	85
2. Vectorisation de protéines structurales complexes	90
3. Vectorisation <i>via</i> la queue et la tige de la fibre.....	94
III. Caractérisation de l'ADDomer en immunologie	98
1. Biodistribution de l'ADDomer chez la souris	98
1.1.Dans les organes.....	98
1.2.Dans les ganglions lymphatiques	100
2. Comportement de l'ADDomer dans les cellules de l'immunité humaine.....	103
2.1.Internalisation dans les monocytes.....	103
2.2.Internalisation dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	106
2.3.Maturation des MoDC.....	108

3. Preuve de principe dans le contexte du Chikungunya	111
3.1.Caractérisation de l'ADDomer TevChik.....	111
3.2.Étude de la réponse anti-épitopique	115
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	119
BIBLIOGRAPHIE	129
ARTICLES.....	145
ANNEXES	201

Liste des figures

Figure 1 : Les vecteurs utilisés en essais cliniques de thérapie génique en 2017	4
Figure 2 : Arbre phylogénétique des adénovirus en fonction de la séquence en acide aminé de l'hexon.....	6
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation structurale d'un Ad	8
Figure 4 : Structure cristallographique de l'hexon de l'HAdV5 et représentation schématique de l'organisation protéique d'une face de l'adénovirus	10
Figure 5 : Structure cristallographique de la base du penton de l'HAdV2	11
Figure 6 : Structure de la fibre de l'HAdV2.....	12
Figure 7 : Interaction base du penton / fibre	13
Figure 8 : Représentation schématique de la localisation des protéines mineures des Ads	14
Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation générale du génome de HAdV2 sauvage.....	19
Figure 10 : Représentation du cycle viral lytique des Ads.....	17
Figure 11 : Le monde et les essais cliniques utilisant les HAdVs tant que vecteur	26
Figure 12 : Représentation schématique du génome d'HAdV-RD.....	27
Figure 13 : Représentation schématique du génome de ONYX-15	28
Figure 14 : Représentation schématique du génome d'un HAdV-RC spécifique d'un type cellulaire	29
Figure 15 : Génération de vecteur « gutless » utilisant le système Cre / loxP	30
Figure 16 : Apparence générale des Dds naturels par microscopie électronique.....	32
Figure 17 : Apparence générale du DF et DB produits en cellules d'insecte vue par microscopie électronique	33
Figure 18 : Étude structurale par cryo microscopie du DF et DB de l'HAdV3	34
Figure 19 : Points d'interaction entre 2 bases du penton adjacentes.....	35
Figure 20 : La TEM induite par le DF sur des tumeurs BT474-M1 potentialise l'effet de l'Herceptine.....	37
Figure 21 : Interaction du domaine WW avec la base du penton.....	39
Figure 22 : Le Dd en vaccinologie	41
Figure 23 : Les boucles hypervariables de la base du penton	64
Figure 24 : Représentation schématique du gène codant l'ADDomer	65
Figure 25 : Alignement de séquence de la base du penton de l'HAdV3 versus celle de l'ADDomer	66

Figure 26 : Création d'un baculovirus recombinant codant l'ADDomer.....	67
Figure 27 : Tests d'expression de l'ADDomer et caractérisation de l'ADDomer	70
Figure 28 : Caractérisation biochimique de l'ADDomer "Extended Loop"	74
Figure 29 : Caractérisation de l'ADDomer VL _{2X}	76
Figure 30 : Caractérisation de l'ADDomer Swapped	78
Figure 31 : Reconstruction à l'échelle atomique des épitopes ovalbumine insérés dans l'ADDomer	79
Figure 32 : Les domaines E9i3 et Esp3	80
Figure 33 : Reconstruction à l'échelle atomique des épitopes du ChikV insérés dans l'ADDomer	81
Figure 34 : Reconstruction à l'échelle atomique des protéines captives insérés dans l'ADDomer	82
Figure 35 : Étude de l'affinité du peptide StickChik-Biot pour la base du penton de l'ADDomer par résonance plasmonique de surface	86
Figure 36 : Les ADDomers "cystéine"	88
Figure 37 : Confirmation de la formation de pont disulfure par méthode biophysique	89
Figure 38 : Conception du Stick mutant en fusion avec la mCherry et co-production avec l'ADDomer.....	91
Figure 39 Purification et analyse de la co-expression ADDomer cystéine / Stick mutant mCherry.....	93
Figure 40 : Étude de l'interaction HAdV5FT / ADDomer	96
Figure 41 : Biodistribution de l'ADDomer dans les organes	100
Figure 42 : Biodistribution de l'ADDomer dans les ganglions lymphatiques	102
Figure 43 : Internalisation de l'ADDomer en monocytes	105
Figure 44 : : Internalisation de l'ADDomer en MoDC	107
Figure 45 : Étude de la maturation des MoDC.....	110
Figure 46 : Caractérisation biochimique de l'ADDomer TevChik.....	112
Figure 47 : Etude de l'ADDomer TevChik Cut et Uncut	114
Figure 48 : L'ADDomer TevChik in vivo	117
Figure 49 : Thermostabilité de l'ADDomer.....	127

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des adénovirus humains.....	5
Tableau 2 : Protéines principales codées durant la phase tardive	21
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des récepteurs primaires de chaque sous-groupe d’HAdV .	25
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des ADDomers d’intérêt produits et de leurs solubilités : ..	83

INTRODUCTION

I. Les adénovirus

1. Généralités

Les adénovirus (Ads) ont été découverts au début des années 50. Rowe *et al.* (Rowe et al. 1953) ont observé au cours de leurs recherches, une dégénérescence spontanée de cellules en culture isolées à partir d'amygdales d'enfants. Ils en isolèrent le virus infectieux en 1953, et un peu plus tard, en 1954, une deuxième équipe mit en évidence à son tour ce virus chez des militaires souffrant de maladies respiratoires aiguës (Hilleman & Werner 1954). Dénommé d'abord « Adenoid Degenerating », « Acute Respiratory Disease » (Hilleman et al. 1957), ou encore « Adenoidal Pharyngeal Conjunctival » (Parrott 1955) (Hurst 1957), cet agent pathogène est désigné depuis 1956 sous le nom d'adénovirus du fait de sa présence dans les amygdales, « adeno » signifiant glande en grec (Enders et al. 1956). La famille des *Adenoviridae* est apparue un peu plus tard, en 1976 (Norrbj et al. 1976).

L'usage de plus en plus important des Ads en laboratoire ont permis de les comprendre d'une manière beaucoup plus précise, notamment concernant l'organisation générale du génome, le cycle viral ou encore l'agencement des protéines dans la capside. Une avancée majeure dans le domaine de la biologie cellulaire a été réalisée grâce à l'étude des adénovirus. En effet, le mécanisme de l'épissage de l'ARN a été découvert en 1977 chez ce virus (Chow et al. 1977) (Berget et al. 1977). Richard Roberts et Phillip Sharp, découvreurs de ce mécanisme essentiel de la Biologie ont été nobélisés en 1993.

Depuis les années 80, la plupart des travaux sont réalisés sur les Ads Humains (HAdVs) de type C (HAdV1, 2, 5, et 6), mais il existe aussi des Ads infectant d'autres espèces telles que le chien, les bovins, les canards. Ces recherches ont permis de comprendre plus précisément les HAdVs et ont abouti à la modification génétique de ces virus qui en font un vecteur privilégié pour la thérapie génique (Ginn et al. 2013). En tête devant les autres vecteurs utilisés (Figure 1), l'adénovirus possède plusieurs caractéristiques qui lui permettent de se positionner comme le plus adapté à ce type de traitement (Lee et al. 2014):

- C'est un virus ubiquitaire : les adénovirus ont été isolés à partir de nombreuses espèces et plus d'une soixantaine de sérotypes humains ont été répertoriés.
- Les vecteurs adénoviraux sont capables d'infecter un large type de cellules humaines et possèdent un rendement de transfert très élevé comparé aux autres vecteurs.
- Les adénovirus sont très peu pathogènes chez l'homme.

- Le génome de ces vecteurs est très malléable : des gènes allant jusqu'à 7,5kpb peuvent être insérés dans différents locus tels que E1, E3 ou E4.
- Ils sont très faciles à manipuler et productibles à très haut titre (jusqu'à 10^{12} virus par mL).
- Ce sont des virus non intégratifs.

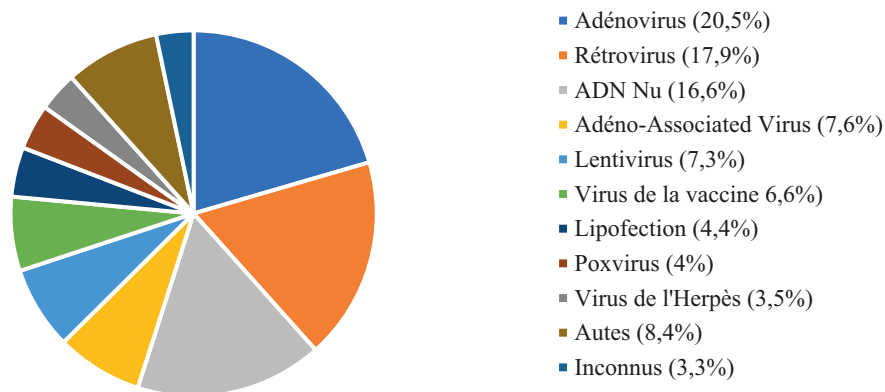


Figure 1 : Les vecteurs utilisés en essais cliniques de thérapie génique en 2017

Parmi tous les vecteurs utilisés en thérapie génique, les adénovirus arrivent en tête avec plus de 20% des essais cliniques réalisés en 2017. Derrière, on retrouve les rétrovirus et les Acides Désoxyribo-Nucléiques (ADN) nus avec respectivement 17,9 et 16,6%. Les autres vecteurs viraux et non viraux oscillant entre 3,3 et 8,4%. Diagramme extrait de <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

Cependant, les essais de thérapie génique utilisant les HAdVs ont été stoppés à la suite du décès d'un patient de 18 ans, Jesse Gelsinger, après une injection à haute dose du vecteur ayant provoquée une très forte inflammation systémique. Suite à cela, l'institut national de la santé américain (NIH) a publié un rapport sur l'évaluation de la toxicité des HAdVs (NIH 2002) et a commandé des études pour comprendre la réaction immunitaire liée à une infection aux HAdV. Malgré cet événement malheureux, les avantages des HAdVs et spécialement le développement des adénovirus oncolytiques font que ce virus reste en 2017 le leader des vecteurs utilisés chez l'homme toutes catégories confondues (virus, ADN nu, transfert chimique électrique ou mécanique). De plus, il est à noter que les HAdVs modifiés sont approuvés en Chine depuis 2005 en tant que virus oncolytiques dans les indications de cancers "tête et cou" (Garber 2006).

2. Taxonomie

Les Ads appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Cette famille est sous-divisée en 4 genres : les Mastadénovirus, les Aviadénovirus, les Atadénovirus et les Siadénovirus. Les HAdVs appartiennent au genre Mastadenovirus et ont pour hôte naturel les mammifères tels

que, l'Homme, le cheval, le chien, les ovins, les bovins... Ce genre comprend aujourd'hui plus d'une centaine de sérotypes dont plus d'une soixantaine est répertorié chez l'Homme (Tableau 1). Les sérotypes Humains sont classés en 7 sous-groupes allant de A à G, leurs différences se faisant grâce à des critères biologiques, génétiques, biochimiques et structuraux.

Sous-Groupe	Sérotipe	Nombre de répétition de motif dans la fibre	Tropisme
A	12,18,31	23	Entérique Respiratoire
B1	3, 7, 16, 21, 50	6	Respiratoire Oculaire
B2	11, 14, 34, 35	6	Rénal Respiratoire Oculaire
C	1, 2, 5, 6	22 / 18 (Ad6)	Respiratoire Oculaire Lymphoïde Hépatique
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36- 39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	8	Oculaire Entérique
E	4	12	Respiratoire Oculaire
F	40, 41	12 pour la fibre courte 22 pour la fibre longue	Entérique
G	52	9 pour la fibre courte 17 pour la fibre longue	Entérique

Tableau 1 : Classification des adénovirus humains

De nos jours, une soixantaine de sérotypes humains sont répertoriés et classés en fonction de critères biologiques, biochimiques et structuraux. Le nombre de motif fibre est expliqué en page 10. (extrait et modifié de « Adenovirus receptors: Implications for targeting of viral vectors » (Arnberg 2012))

Le genre Aviadénovirus est un adénovirus aviaire. Il a notamment servi de vecteur dans des essais précliniques chez les souris et les volailles visant à vacciner contre le virus de la grippe H5N1 (Soloff et al. 2006).

Les Atadénovirus ont pour hôte plusieurs classes de vertébrés dont les serpents, les lézards, les oies... Ils se caractérisent par un fort pourcentage en A et T dans leur génome d'où leur nom d'Atadénovirus (Dán et al. 1998).

Pour finir, quelques espèces connues de Siadénovirus dont, par exemple, l'adénovirus de grenouille de type 1 ou encore l'adénovirus de pingouin ont été découverts (Lee et al. 2014).

Cependant, en étudiant la séquence en acide aminé (aa) de l'hexon du seul adénovirus connu pour infecter les poissons, une équipe de chercheurs (Davison et al. 2003) a permis de mettre en évidence un possible 5^{ème} genre, le plus éloigné génétiquement des 4 premiers (Figure 2) ne contenant toujours à ce jour qu'un seul virus retrouvé chez l'esturgeon.

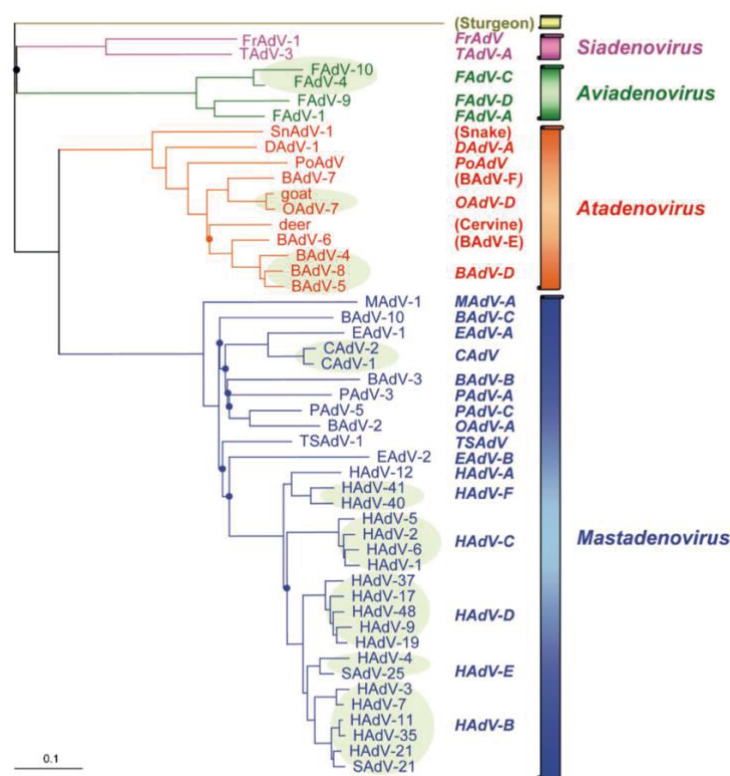


Figure 2 : Arbre phylogénétique des adénovirus en fonction de la séquence en acide aminé de l'hexon
Les membres des différents genres sont indiqués avec différentes couleurs, et les virus appartenant à la même espèce sont regroupés dans les cercles verts. Le nom abrégé du virus est indiqué à la fin de chaque branche avec le nom de l'espèce à droite en italique : B-bovin ; C-canin ; D-canard (Duck) ; E-equin ; F-volaille (fowl) ; Fr-grenouille ; H-humain ; M-murin ; O-ovin ; P-porcine ; Po-opossum ; Sn- serpent (Snake) ; T-dinde (turkey) ; S-primate et TS-scandentien (tree shrew). (Davison et al. 2003).

3. Epidémiologie

Les adénovirus humains sont souvent responsables de fièvre, de problèmes au niveau des voies respiratoires et de conjonctivites (Gordon et al. 1996) (Butt & Chodosh 2006). Ils

provoquent des infections dont les signes cliniques passent assez souvent inaperçus chez les personnes en bonne santé. On estime même que plus de 80% de la population humaine infantile a déjà été infectée par un des sérotypes communs du sous-groupe C (HAdV1, 2, 5, 6) (Garnett et al. 2002). Cependant, certains sérotypes sont liés à des infections plus importantes pouvant aboutir à de graves infections voire au décès chez des personnes immunodéprimées (Lee et al. 2014) (Li et al. 1991) (Kojaoghlanian et al. 2003) (Binder et al. 2017) ou chez les nourrissons.

Les infections des voies respiratoires aiguës sont peu fréquentes et le plus souvent causées par les HAdV3, HAdV5 et HAdV7. Les HAdV 40 et 41 sont eux connus pour être responsables de gastroentérites aiguës et persistantes chez l'enfant (Uhnou et al. 1984). Pour finir, certains sérotypes appartenant au sous-groupe D tels que l'HAdV 8, 19a et 37 possèdent un tropisme oculaire déclenchant chez les personnes infectées des conjonctivites ainsi que des kérato-conjonctivites aiguës.

Chez certains sérotypes, le tableau clinique de l'infection peut varier en fonction de la voie d'entrée du virus. C'est le cas de l'HAdV7 qui inhalé provoque de graves problèmes de l'appareil respiratoire alors que s'il est transmis par voie orale, l'infection passe quasi inaperçue.

4. La structure des adénovirus

Malgré 5 genres différents, un nombre d'hôtes conséquent, ainsi qu'une diversité dans le tropisme de chaque adénovirus, il existe une grande similitude structurale entre tous les adénovirus. En effet, ce sont des virus non enveloppés et leurs capsides sont de formes icosaédriques (Figure 3A), c'est à dire qu'ils sont composés de 20 faces et 12 sommets. Leur diamètre est d'environ 70 à 90 nanomètres (nm), et chez la plupart les Ads on dénombre :

- 3 protéines structurales majeures : l'hexon, la base du penton et la fibre
- 4 protéines dites mineures : pIIIa, pVI, pVIII et pIX. Cette dernière n'est retrouvée que chez les Mastadenovirus.
- 6 protéines formant le cœur du virus : pV, pVII, Mu, la protéine terminale, pIVa2 et une protéase.

Les protéines les plus étudiées sont les trois protéines structurales majeures, mais grâce à la publication de la structure d'adénovirus entiers par cristallographie ou cryo-microscopie électronique de plus en plus de structures sont disponibles pour les autres protéines (Liu et al. 2010)

A)



B)

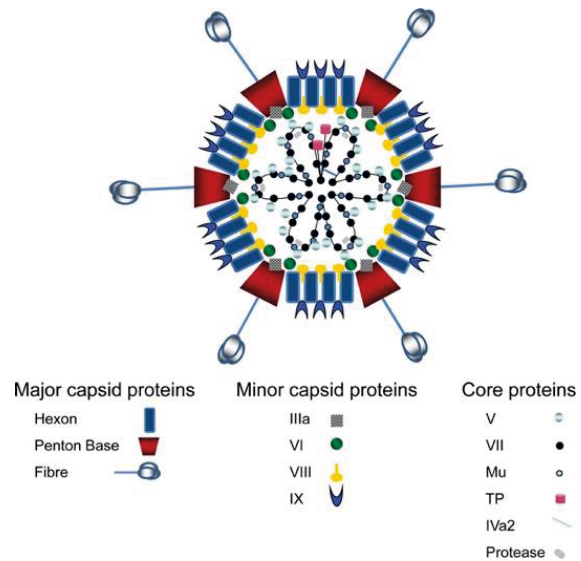


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation structurale d'un Ad

A) La capside des Ad est de forme icosaédrique. C'est à dire qu'elle est composée de 20 faces, 30 arêtes et 12 sommets. B) Les Ads sont composés de douze protéines structurales au total. La capside est formée par 240 trimères de la protéine hexon (12 par face), 12 pentamères de protéine base du penton (à chaque sommet) et 12 trimères de la protéine de la fibre qui interagissent avec la base du penton de manière non covalente. Image extraite de (Hall et al. 2010).

4.1. Les protéines majeures

4.1.1. L'hexon

La protéine hexon est présente en 720 copies à la surface du virus, ce qui en fait la protéine la plus abondante des protéines structurales. C'est un monomère (Figure 4A) N-acétylé d'environ 105 kDa pour l'HAdV5 (Grutter & Franklin 1974) (Boulanger & Puvion 1974) (Jörnvall et al. 1974) qui en se trimérisant forme les 240 capsomères qui composeront les 12 faces du virus. De par sa masse moléculaire élevée ainsi que le grand nombre de copie de cette protéine, elle représente environ de 80% de la masse totale d'un virus (Rux & Burnett 2004). C'est d'ailleurs cette forte présence qui en fait la protéine la plus ciblée par le système immunitaire pour se défendre contre une infection à l'HAdV. En effet, les anticorps anti hexon sont responsables d'une part très importante dans la neutralisation de l'activité du virus *in vitro* (Wohlfart 1988) (Toogood et al. 1992). Il a aussi été prouvé qu'il existait sur chaque monomère d'hexon de l'HAdV2 et HAdV5 sept boucles hypervariables (Rux & Burnett 2000) associées à la forte antigénicité de cette protéine, et pour finir, c'est contre cette protéine que sont dirigés préférentiellement les anticorps qui sont produits lors de vaccination utilisant comme vecteur les HAdVs (Sumida et al. 2005).

On attribue aussi la responsabilité du tropisme hépatique lors d'une injection systémique des HAdVs à l'hexon du fait de son interaction avec certains facteurs de coagulation (Waddington et al. 2008). Cette interaction pourrait avoir lieu avec les régions hypervariables (HVR pour Hyper Variable Regions) et plus particulièrement l'HVR5 (Vigant et al. 2008). Cette découverte a permis de reconsidérer le ciblage des vecteurs adénoviraux car les travaux précédents ne s'intéressaient qu'à la modification du tropisme *via* la modification de la fibre, responsable de l'interaction avec les récepteurs primaires.

La structure cristallographique de l'hexon fut résolu pour la première fois chez l'HAdV2 puis plus tard chez l'HAdV5 (Burnett 1985) (Roberts et al. 1986) (Rux & Burnett 2000). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la forme triangulaire du sommet du trimère alors que sa base a une forme hexagonale lui donnant son nom (Figure 4B). Cette forme géométrique lui procure une capacité d'interaction avec 6 voisins. Parmi tous les hexons qui composent la capside virale, on en distingue 2 classes au sein d'un même virus : ceux qui composent le groupe de neuf (GON : Group Of Nine) qui est au centre de chaque face (Everitt et al. 1975) et les hexons péri-pentonaux qui sont au sommet de la capside (Figure 4C). Le GON a été découvert en 1974 en dissociant la capside virale sous l'effet du désoxycholate de sodium à 56°C (Pereira & Wrigley 1974). Sa stabilité est liée à la protéine pIX (Colby & Shenk 1981) (Furcinitti et al. 1989) (Liu et al. 2010) tandis que la stabilité des hexons péri-pentonaux est due aux protéines pV, VI et VIII (Figure 8).

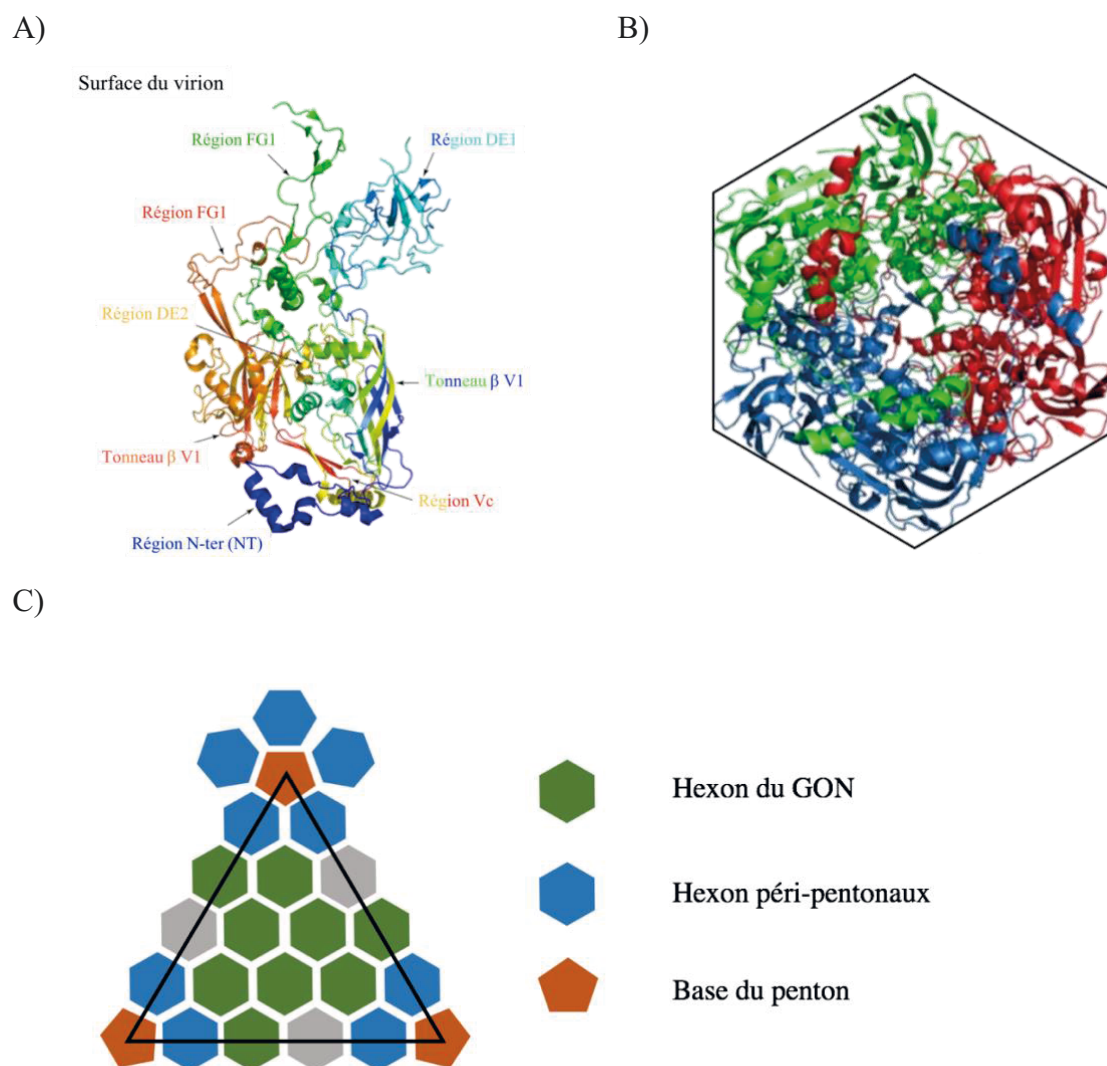


Figure 4 : Structure cristallographique de l'hexon de l'HAdV5 et représentation schématique de l'organisation protéique d'une face de l'adénovirus

A) Monomère de la protéine hexon montrant les différentes régions qui la composent. Les 7 boucles hyper variables ne sont pas visibles car trop flexibles. B) Vue de dessous du capsomère. L'oligomérisation de la protéine aboutit à la formation d'une base hexagonale d'où est tiré son nom. (code PDB : 1P30) (Extrait et modifié de « Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods » (Rux & Burnett 2000)) C) Le GON de chaque face de l'adénovirus est composé de 6 hexons centraux ainsi que d'un des deux hexons de l'arête pour atteindre 9 au total (en vert). Les hexons péri-pentonaux sont eux au nombre de 5 par sommet (en bleu), et ils encadrent la base du penton (en orange).

4.1.2. La base du penton

La base du penton est une protéine homopentamérique (Figure 5A) et B). Chaque virus possède 12 bases du penton, une à chaque sommet de la capside. Le monomère de base possède une masse moléculaire d'environ 60 kDa et est présent 60 fois dans chaque virus (5 X 12).

En analysant la séquence en acide aminé du monomère de la base du penton de différents sous-groupes et sérotypes d'adénovirus, on retrouve une homologie de près de 70%. Les

différences majeures entre les séquences primaires sont situées dans 2 boucles hypervariables appelées boucle variable et boucle RGD (Arginine - Glycine - Acide Aspartique) très exposées à la surface du virion. Dans cette seconde boucle, on retrouve ce motif décrit pour interagir avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ provoquant ainsi l'internalisation de l'HAdV (Belin & Boulanger 1993) (Wickham et al. 1993) (Bai et al. 1993) (Murakami et al. 2007). Cependant, et bien que hautement conservé, on ne le retrouve pas chez l'HAdV40 et l'HAdV41 (Albinsson & Kidd 1999) (Zubieta et al. 2005), mais la perte totale de ce motif n'engendre pas une perte totale d'infectivité. En effet, l'interaction fibre/récepteur est suffisante pour engendrer la pénétration du virus dans la cellule et donc sa réplication (Rux & Burnett 2004).

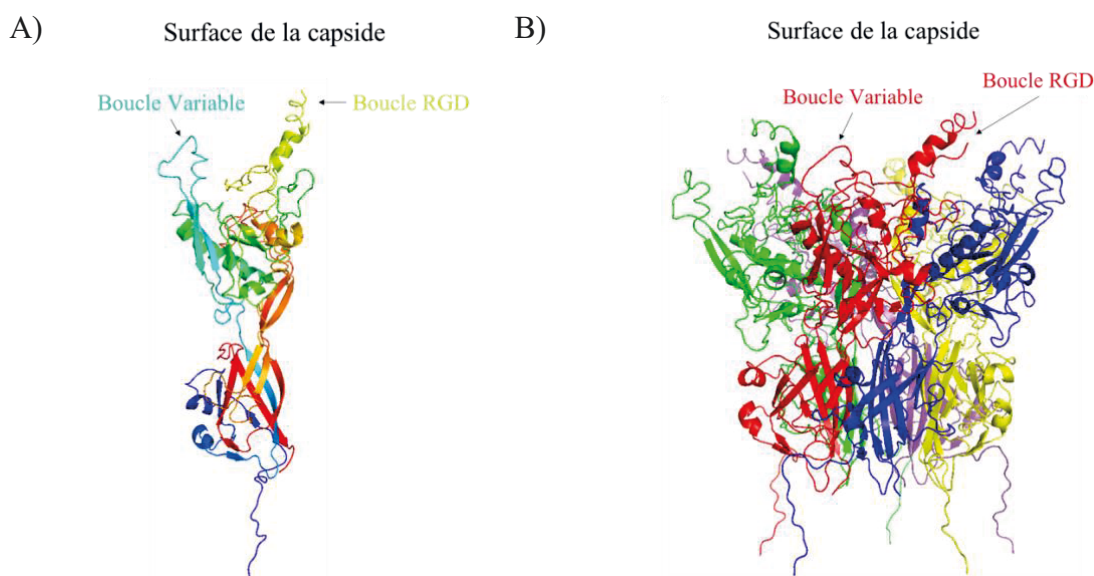


Figure 5 : Structure cristallographique de la base du penton de l'HAdV2

A : Structure du monomère de base de la base du penton. Les 2 boucles hypervariables sont indiquées par une flèche. La boucle RGD est absente de la structure certainement à cause d'une coupure protéique ou d'une flexibilité trop importante. **B :** Vue de côté de la base du penton. (Code PDB : 1X9P) (Extrait et modifié de « The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton » (Zubieta et al. 2005))

4.1.3. La fibre

La fibre est la dernière protéine structurale majeure de la capside des HAdVs. Il y en a 12 par virus, une à chaque sommet de l'icosaèdre. C'est un homotrimère exposé vers l'extérieur du virus. Elle est divisée en 3 parties : la queue, la tige et la tête (Figure 6A). La queue de la fibre correspond à la partie N-ter de la protéine. C'est avec ce domaine que la fibre interagit de manière non covalente avec un domaine connu de la base du penton (Zubieta et al. 2005). La tige est la partie centrale et est plus ou moins allongée selon les sérotypes. Elle est composée

de motifs répétés de 15 acides aminés, et du nombre de répétition dépend la taille de la tige. Elle est par exemple de 9nm pour l'HAdV3 et de 36nm pour l'HAdV40. La tête de la fibre correspond au domaine globulaire C-terminal de la protéine (Figure 6B). Elle est responsable de l'interaction avec le récepteur primaire et de l'attachement du virus à la surface des cellules (Louis et al. 1994). Par conséquent, c'est elle qui détermine le tropisme de chaque virus. D'un point de vue purement structural, toutes les têtes et tiges de fibres montrent un repliement analogue (Figure 6C) (Van Raaij et al. 1999).

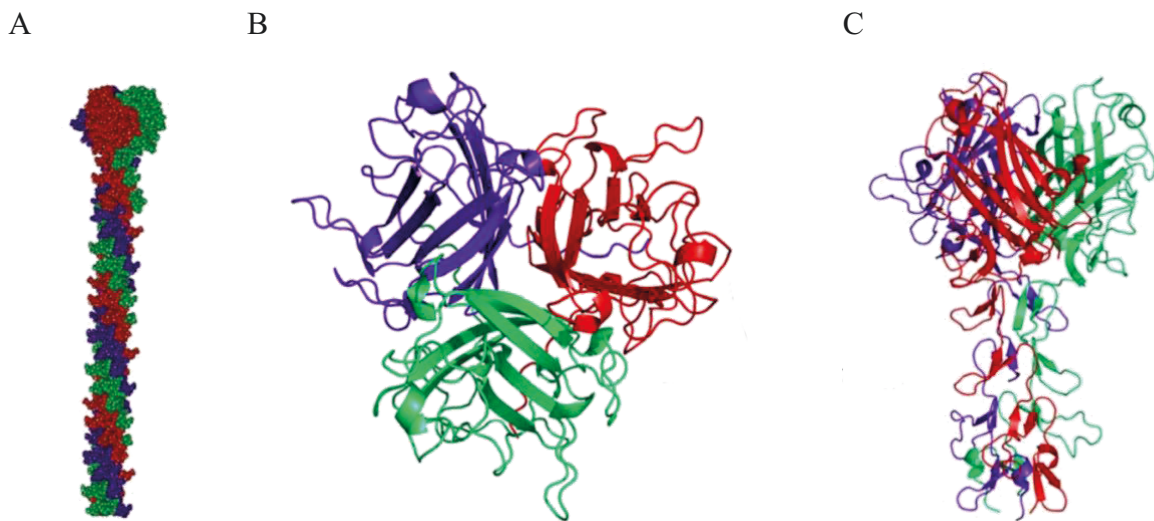


Figure 6 : Structure de la fibre de l'HAdV2

A : Modèle de la fibre proposé par van Raaij vue de côté. **B** : Structure atomique de la tête de la fibre de l'HAdV2 vue du dessus avec chaque monomère coloré d'une manière différente. **C** : Structure atomique de la tête de la fibre ainsi que d'une partie de la tige de l'HAdV2 vue de côté avec chaque monomère coloré d'une manière différente (Extrait de « Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution » (Van Raaij et al. 1999))

4.1.4. L'interaction base du penton + fibre : le penton

Le penton est un complexe protéique formé par l'interaction non covalente entre la base du penton pentamérique et la fibre trimérique que l'on retrouve à chaque sommet de la capside icosaédrique du virus. Ce complexe contient toutes les informations nécessaires à l'attachement ainsi qu'à l'internalisation du virus dans les cellules. La détermination de la structure cristallographique de la base du penton de l'HAdV2 a permis de montrer que sa formation est due à l'interaction entre un motif conservé dans la queue de la fibre (FNPVYPY) (Figure 7A) avec l'interface entre 2 monomères adjacents de la base du penton (Figure 7B) (Zubieta et al. 2005). La faible affinité entre le peptide responsable de l'interaction et la base du penton pentamérique laisse penser que la forte affinité base du penton/fibre est liée à un phénomène

d'avidité. Il est intéressant de noter que cette interaction base du penton / fibre ne dépend pas du sérotype. Ce motif a permis de créer des protéines chimériques dans lesquelles la base du penton de l'HAdV3 interagit avec la fibre de l'HAdV2 (Fender et al. 1997) ou la fibre courte de l'HAdV41 (Siqueira-Silva et al. 2012).

A)

Ad2	M-KRARP-----SED	FNPVYPY	DTETGPPTVPFLTPPFVSPNGFQES
Ad3	MAKRAR-----LST	FNPVYPY	EDES-SSQHPFINPGFISPDGFTQS
Ad7	MTKRVR-----LSD	FNPVYPY	EDES-TSQHPFINPGFISPDGFTQS
Ad11	MTKRVR-----LSD	FNPVYPY	EDES-TSQHPFINPGFISPDGFTQS
Ad12	M-KRSRTQYAEETEEND	FNPVYPY	OPFD-TSDVPFVTPPFVSSDGLQEK
Ad17	MSKRLR-----VED	FNPVYPY	GYAR-NQNIPFLTTPPFVSSDGFKNF
Ad25	MSKKRVR-----VDD	FNPVYPY	DADN-APTVPFINPPFVSSDGFQEK
Ad37	MSKRLR-----VED	FNPVYPY	GYAR-NQNIPFLTTPPFVSSDGFKNF
Ad41 (s)	M-KRTR-----IED	FNPVYPY	DTFS-TPSIPYVAPPFVSSDGLQEK
Ad41 (l)	M-KRAR-----LED	FNPVYPY	EHYN-PLDIPFITPPFASSNGLQEK

B)

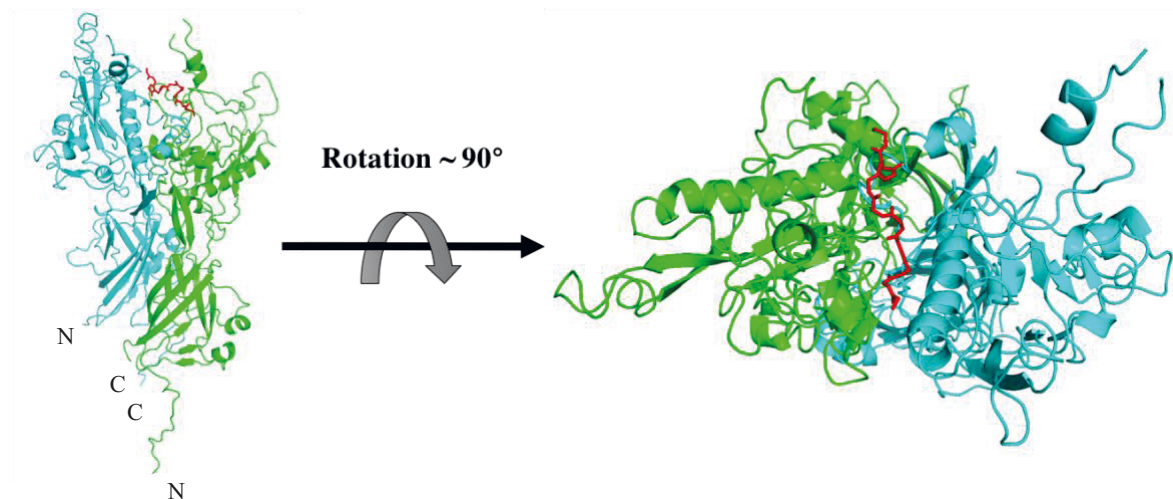


Figure 7 : Interaction base du penton / fibre

A) Alignement des séquences peptidiques de la queue N-terminale de la fibre de différents sérotypes représentatifs des différents sous-groupes. En jaune sont surlignés les acides aminés conservés et notamment la séquence FNPVYPY (encadrée en rouge) responsable de l'interaction avec la base du penton. B) Représentation à l'échelle atomique du peptide conservé (en rouge) en complexe avec 2 monomères adjacents de la base du penton (en bleu et en vert) vue de face (panel de gauche) et du dessus (panel de droite). (Extrait et modifié de « The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton » (Zubieta et al. 2005))

4.2. Les protéines mineures

Les protéines mineures des HAdVs ont été étudiées assez tardivement en comparaison avec les protéines structurales majeures. En effet, jusqu'à la fin des années 2000, aucunes structures atomiques de ces protéines n'étaient disponibles. C'est seulement au milieu des années 2000, grâce à la cryo-EM, que plusieurs reconstructions 3D de l'HAdV ont été résolues

(Fabry et al. 2005) (Saban et al. 2005) (Saban et al. 2006) et ont permis de positionner de manière assez précise les différentes protéines mineures. Jusqu'alors, seules des études structurales par microscopie électronique avaient été faites et avaient tout juste permis de les localiser (van Oostrum & Burnett 1985). Plus récemment, une équipe a obtenu une structure d'un adénovirus recombinant à 3,5Å de résolution permettant de comprendre les interactions entre les différentes protéines de la capside (Reddy et al. 2010), et un autre groupe a résolu les structures à 3,2 Å de résolution par cryo-EM des protéines pVI et pVII. Cette étude a permis de mettre en évidence une forme tronquée du côté N-ter des précurseurs pVI et pVII ainsi que de localiser précisément pVI dans la cavité de l'hexon (Dai et al. 2017).

Le rôle des protéines mineures des Ads est de cimenter la capside et elles sont situées à l'intérieur et/ou l'extérieur de celle-ci. Ainsi, la protéine IIIa et la protéine VIII sont localisées à l'intérieur de la capside (Fabry et al. 2005) alors que la protéine pIX est quant à elle à l'extérieur.

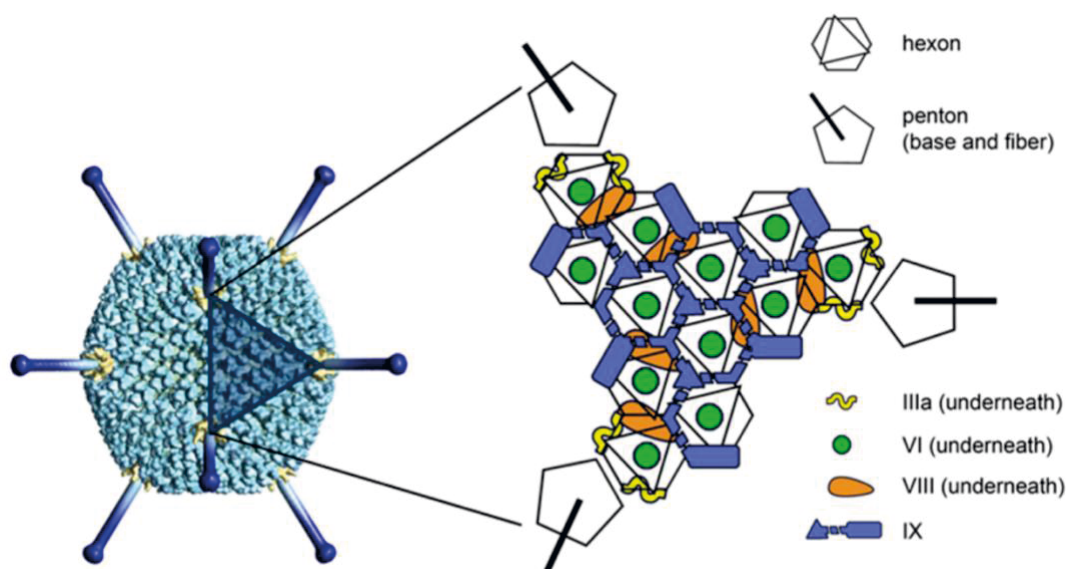


Figure 8 : Représentation schématique de la localisation des protéines mineures des Ads
Extrait de « *Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly* » (Martín 2012)

4.3. La protéine IX (pIX)

La pIX est la plus petite (14,3kDa) des protéines mineures codées par les Ads et est codée uniquement par le genre Mastadénovirus. C'est cette protéine qui cimente les faces des Ads (Akalu et al. 1999) et qui est responsable de la formation des GONs (Everitt & Philipson 1974). On retrouve 4 trimères de pIX par face du virus entre les hexons (Furcinitti et al. 1989). Elle est composée de trois domaines conservés et notamment un domaine C-Ter riche en leucines impliquées dans son oligomérisation (Stewart et al. 1991). Dans le virion mature, pIX

est situé à l'extérieur de la capsid. Sa région N-Ter est associée à la stabilisation inter-hexon des GONs et la queue C-Ter est exposée vers l'extérieur (Akalu et al. 1999).

4.3.1. *La protéine VI (pVI)*

La protéine pVI mature est issue du clivage d'un précurseur d'environ 27kDa. Sa maturation libère un pro peptide N-terminal de 33 acides aminés ainsi qu'un peptide C-terminal de 11 acides aminés responsable de l'augmentation de l'activité catalytique de la protéase virale (Ding et al. 1996). Il est important de noter que pVI est un des facteurs responsable de la rupture de endosomes (Wiethoff et al. 2005). En effet, la partie N-Ter de la protéine pVI, une hélice alpha amphipathique de 20 acides aminés, s'intégrerait avec la membrane des endosomes fragilisant ainsi leurs structures (Maier et al. 2011). Plusieurs études par cryo-EM l'ont située du côté interne de la capsid au cœur des hexons (Saban et al. 2006) (Pérez-Berná et al. 2009) (Liu et al. 2010).

4.3.2. *La protéine VIII*

La protéine pVIII est située dans la partie interne de la capsid. Elle a pour fonction de cimenter les hexons adjacents entre 2 GON, de relier entre eux les hexons d'un même GON et aussi ceux du GON et du GOS (Liu et al. 2010).

4.3.3. *La protéine IIIa*

La protéine pIIIa mature possède une masse moléculaire qui avoisine 60kDa et elle résulte la protéolyse d'un précurseur de 65kDa. Cette protéine monomérique cimente les 5 hexons péri pentonaux à la base du penton. On en retrouve donc 60 copies par virus et c'est grâce à cette protéine que se forment les groupes de six (GOS : Group Of Six) composés d'une base du penton avec les 5 hexons adjacents.

4.4. Les protéines du nucléoïde

Le nucléoïde des Ads est formé d'un double brin d'ADN dont la taille varie en fonction du genre et du sérotype ainsi que de plusieurs protéines appelées protéines du cœur des Ads : les protéines V, VII, TP, μ , Iva2 et une protéase. Chaque extrémité 5' de la molécule d'ADN est liée de manière covalente à la "Terminal Protein" (TP) (Rekosh et al. 1977). Cette protéine de 70kDa a pour rôle d'initier la réplication mais aussi protège le génome de la dégradation.

Ensuite, tout le long de la molécule on retrouve la protéine pVII qui permet le compactage de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid lors de la réplication du virus tout comme la protéine μ (Anderson et al. 1989). La dernière protéine du nucléoïde, pV n'est présente que chez les *Mastadenovirus* (Davison et al. 2003). Cette protéine de 40 kDa serait impliquée dans le maintien du nucléoïde au niveau de la capsid. En effet, la protéine V semble relier la protéine VII à la base du penton et la protéine VI.

5. La réplication virale

Les Ads sont capables de réaliser 3 cycles viraux différents. Le premier est le cycle lytique : il aboutit à la formation de nouvelles particules virales et à la lyse de la cellule infectée. Celui-ci ne peut se dérouler que dans des cellules dites permissives. Lorsque le virus rentre dans une cellule dite non permissive, il lui est impossible de se répliquer. Aucune nouvelle particule virale n'est alors produite, c'est ce que l'on appelle le cycle abortif. Le troisième cycle décrit chez les Ads est le cycle dit transformant. Ce cycle qui a lieu dans une cellule non permissive, et plus rarement permissive, immortalise la cellule infectée et déclenche le développement de tumeurs cancéreuses.

Le cycle lytique (Figure 9) étant le seul à aboutir à la formation de nouvelles particules virales, seul celui-ci sera décrit. L'infection d'une cellule HeLa par les Ad dure environ 24h. Le cycle est divisé en 3 phases : la phase précoce, intermédiaire et tardive. La phase d'entrée s'étend de l'attachement du virus à la surface de la cellule jusqu'au début de la réplication de l'ADN. La phase de réplication correspond à la phase de réplication de l'ADN viral, et pour finir, la phase terminale commence à la fin de la réplication et se finit lors de la lyse de la cellule et du relargage des nouveaux virions.

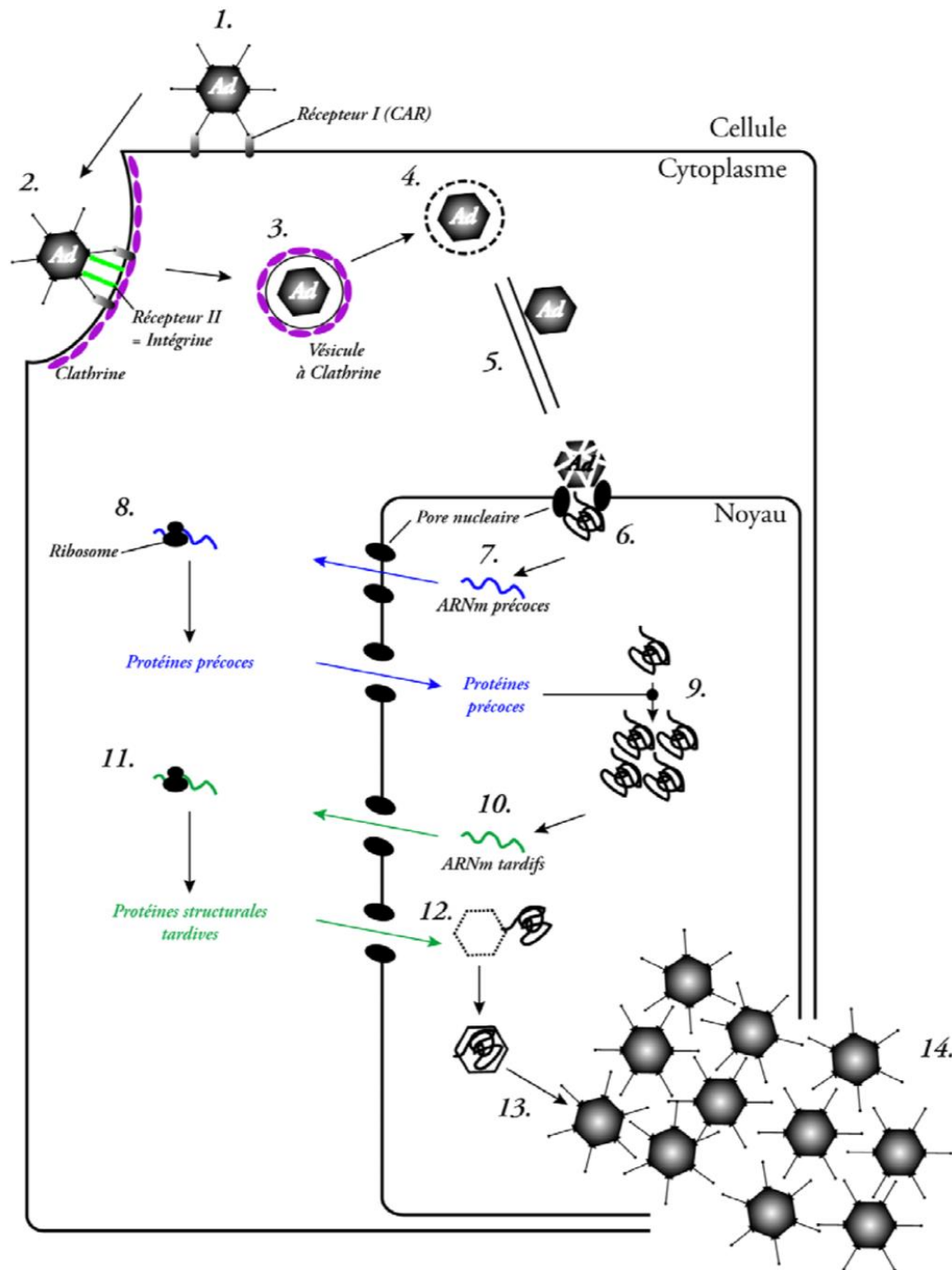


Figure 9 : Représentation du cycle viral lytique des Ads

1. Les Ads reconnaissent le récepteur primaire à la surface des cellules via la fibre 2. La base du penton interagit grâce au motif RGD avec les intégrines ce qui provoque l'internalisation 3. Dans les vésicules, le virus perd ses fibres et commence à exposer pVI 4. Rupture des endosomes par acidification du milieu et grâce à l'action de pVI sur la membrane des endosomes 5. Transport du matériel génétique encapsidé jusqu'au noyau via les microtubules 6. Injection de l'ADN dans le noyau 7. Transcription des ARNm précoces 8. Traduction des ARN précoces en protéines précoces 9. Certaines protéines précoces retournent dans le noyau pour activer la réplication virale 10. Transcription des ARNm tardifs 11. Traduction des ARN tardifs en protéines tardives 12. Les protéines tardives (structurales) retournent dans le noyau pour s'assembler 13. Les virions matures se forment grâce à la protéolyse des précurseurs 14. Les néo virions sont libérés par lyse de la cellule infectée. (Extrait de la thèse de Céline Fabry)

5.1. La phase d'entrée du virus

La première étape de la phase d'entrée du virus consiste en la reconnaissance du récepteur primaire *via* la tête de la fibre. Ensuite, il est nécessaire qu'une interaction entre le motif RGD de la boucle externe du penton et une intégrine de type αv se produise (Nemerow & Stewart 1999). Cette double reconnaissance tête / récepteur et motif RGD / intégrine permet l'endocytose du virus dans la cellule par la voie des vésicules à manteau clathrine. Après internalisation, les vésicules d'endocytoses subissent une acidification de leurs milieux provoquant une modification de l'organisation des protéines de la capsid. Les pentons ainsi que les hexons péripentonaux vont se détacher ce qui libère les protéines pIIIa, pVI et pVIII (Greber et al. 1993) et fragilise la paroi des vésicules (Wiethoff et al. 2005). Toutes ces étapes aboutissent à la rupture de la membrane de endosomes et donc au relargage du reste de la capsid et du cœur de la particule virale dans le cytoplasme. Dès lors, ils migrent vers le centrosome de la cellule le long des microtubules et se retrouvent à proximité des pores nucléaires. Les hexons se fixent alors aux protéines des pores nucléaires permettant au génome viral associé aux protéines du cœur de traverser la membrane grâce à la nucléoporine CAN/Nup214 (Trotman et al. 2001). Une fois dans le noyau, la transcription et la réplication du génome viral débutent : c'est la phase de réplication de l'ADN viral.

5.2. La phase de réplication de l'ADN viral

La phase de réplication de l'ADN viral correspond à la réplication des gènes des HAdVs. Elle se fait en deux phases : la phase précoce, divisée en deux avec la phase très précoce 'Early' (E1A) et la phase intermédiaire (E1B à E4), et la phase tardive 'Late' (L1, L2, L3, L4, L5). Les différents gènes tardifs sont organisés en unité de transcription (figure 10) et chacune de ces unités est contrôlée par un unique promoteur appelé Major Late Promotor 'MLP'. Celles-ci sont ensuite transcrites en Acide Ribo-Nucléique (ARN) et l'épissage alternatif de ces ARN aboutit à la formation de plusieurs brins d'ARN messagers (ARNm) codant toutes les différentes protéines de l'HAdV.

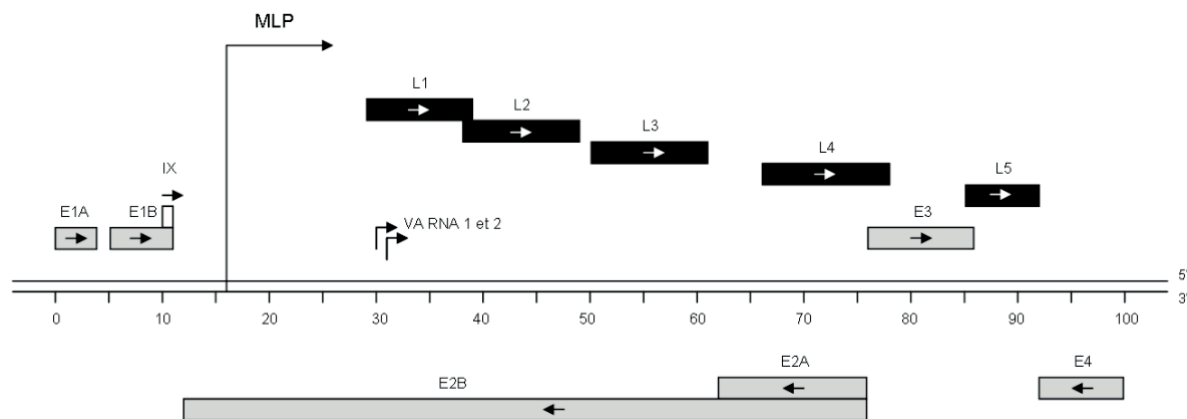


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation générale du génome de HAdV2 sauvage

Le génome des HAdVs est un ADN double brin linéaire dont les deux brins sont codants. Durant la phase précoce de l'infection (4 à 6 heures post-infection) les unités de transcription E1 à E4 (en gris) codent pour différentes protéines non structurales nécessaires à la réplication virale. Lors de la deuxième phase de l'infection (environ 8h post-infection) les protéines codées par les unités de transcription tardive, de L1 à L5 (en noir), sont produites et permettent l'assemblage des nouvelles particules virales. Les flèches indiquent la direction de la transcription, VA RNA 1 et 2 (viral associated RNA) sont deux régions transcrites en deux ARN. (Akusjärvi G., Pettersson U. 1986)

5.2.1. La phase précoce de la réplication

Entre quatre et six heures post-infection, lors de la phase très précoce, la seule unité de transcription à être activée est celle codante pour les protéines de la famille E1A. Les protéines majeures de cette famille (289R et 243R) jouent un rôle indispensable dans l'initiation de l'infection. En effet, celles-ci induisent le passage en phase S de la cellule hôte en interagissant avec une protéine suppresseur de tumeur. En forçant ce passage en phase S le virus se crée par la même occasion un environnement favorable à la réplication de son ADN. C'est pour cette raison que contrairement à d'autres virus comme les rétrovirus, les HAdVs sont capables d'infecter des cellules qui ne sont pas en division. Ces deux protéines activent ensuite les unités de transcription de la phase précoce.

Les protéines codées par les gènes de la phase dite intermédiaire ont trois fonctions majeures : l'inhibition de l'apoptose, la réplication de l'ADN viral et le blocage des défenses immunitaires de l'hôte. Les deux protéines de l'unité E1B (E1B-19K et E1B-55K) inhibent dans un premier temps l'apoptose. E1B-19K est un homologue de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ((Sundararajan & White 2001) (Cuconati et al. 2003) (Perez & White 2000)). Comme elle, elle se lie à la protéine pro-apoptotique Bax et elle inhibe la capacité de sécrétion du cytochrome C par les mitochondries, connu pour être un promoteur de la voie intrinsèque de l'apoptose cellulaire. La protéine E1B-55K joue un rôle majeur pour prévenir l'empêchement

de la réplication du virus en inhibant le facteur de transcription de la protéine pro-apoptotique p53. Elle se lie pour cela à son domaine de transactivation.

La seconde unité de transcription de la phase précoce (E2A et E2B) code pour trois protéines indispensables à la réplication de l'ADN viral (Hay et al. 1995). Lors de cette phase sont produites l'ADN polymérase (ADN pol), la protéine pré-Terminale (pTP) et enfin la protéine de liaison à l'ADN (DBP pour « DNA Binding Protein »). L'ADN pol sert à la catalyse de la réplication de l'ADN viral. La pTP se lie de façon covalente à l'extrémité 5' des doubles brins d'ADN viral à la fin de la réplication. Elle est ensuite digérée par une protéase virale dans les virions néo-formés, aboutissant à la forme mature appelée protéine terminale (TP) La TP servira alors d'amorce à la réplication en se fixant sur une cytosine qui lui permettra de jouer le rôle de 'primer' de réplication. La dernière protéine codée par l'unité E2, la DBP, se lie à l'ADN simple brin pour les séparer de l'ADN double brin. Une fois la séparation effectuée, l'ADN simple brin s'enroule autour de la DBP et sert de matrice à la synthèse de l'ADN double brin.

La région précoce 3 (E3) des HAdVs code pour un certain nombre de protéines immuno-modulatrices dont la protéine gp19kDa qui interfère avec la présentation d'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des cellules (Brodsky et al. 2016). D'autres, telles que les protéines 10,4 kDa, 14,5 kDa, 14,7 kDa confèrent aux HAdVs une résistance à l'apoptose induite par les cytokines dans les cellules infectées par le virus (Ginsberg et al. 1989).

La dernière unité de transcription précoce (E4) produit un ensemble de protéine qui sont impliquées dans une multitude de processus cruciaux pour la croissance du virus. Ce gène code notamment pour deux protéines (E4-ORF3 et E4-ORF6) ayant une action sur l'initiation de la transcription de l'ARN viral (Huang & Hearing 1989) (Bridge & Ketner 1989), le transport des ARNm (Goodrum & Ornelles 1999), l'épissage de l'ARNm et l'expression des protéines.

5.2.2. La phase tardive de la réplication

Environ huit heures post-infection, c'est la phase tardive de la réplication qui commence. Les unités de transcription tardives codent les protéines structurales majeures du virus ainsi que les protéines non structurales permettant l'assemblage final des virions. La transcription de ces gènes est contrôlée par le promoteur tardif majeur (MLP), et chaque région code différentes protéines structurales et/ou non structurales dont un récapitulatif des plus importantes est décrit dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Gène	Nom de la (des) protéine(s) codée(s)	Localisation	Fonction
L1	pIIIa	Associée à la base du penton	Stabilise la base du penton avec les cinq hexons péri-pentonaux par l'intérieur du virus
L2	pIII	Monomère de la base du penton	Pentamérisé, il forme les sommets du virus
	pVII	Cœur des HAdVs	« Histone-like »
	pV	Cœur des HAdVs	Point de liaison entre l'ADN viral et la capside
L3	pVI	Associée à l'hexon	Facteur viral lytique des endosomes
	pII	Monomère de l'hexon	Trimérisé, il compose les faces du virus
L4	pVIII	Associée à l'hexon	Stabilise les cinq hexons péri-pentonaux entre eux
L5	pIV	Monomère de la fibre	Trimérisé et associé à pIII, elle sert à la reconnaissance du récepteur à la surface des cellules

Tableau 2 : Protéines principales codées durant la phase tardive

La phase tardive est composée de cinq unités de transcription (L1 à L5). Chaque unité code pour une ou des protéine(s) structurale(s) et/ou non structurale(s) qui permettent l'assemblage final des virions néoformés.

5.3. La phase terminale du cycle viral

La phase terminale du cycle viral correspond à la formation de néo virions puis à la lyse de la cellule. Pour former de nouveaux virions, les protéines de structures synthétisées dans le cytoplasme retournent dans le noyau où s'effectue l'assemblage final. La fibre possède un signal de localisation nucléaire qui permet son entrée dans le noyau après synthèse. L'import de l'hexon se fait quant à lui grâce à la protéine L4-100K et à la protéine pVI (Hong et al. 2005) (Wodrich et al. 2003). A partir de ce moment, un modèle propose que, dans un premier temps, les capsides vides se forment grâce aux protéines structurales majeures et mineures. Le génome viral est ensuite capé par plusieurs protéines (pIVa2, L4 33K, L1 52/55K, et L4 22K) entre les paires de bases 220 et 400 en amont de la région E1A ce qui induit l'encapsidation dans le virion vide grâce à une protéine « portail » située à un sommet du virus. De façon concomitante ou après l'internalisation du génome, les protéines du cœur s'incorporent et les protéines L4 33K et L4 22K sont relarguées. Pour finir, la protéase codée par le génome clive tous les

précurseurs protéiques non matures (pIIIa, L152/55K, pVI, pVII, pVIII, mu et la pTP) ce qui conduit à la restructuration de la capside et donc à la formation de néo virions matures (Ahi & Mittal 2016).

La dernière étape du cycle lytique des Ads est la destruction de la cellule infectée. Cette dernière étape est indispensable à la libération des néo virions formés car les HAdVs sont incapables de sortir de la cellule par « budding » comme le virus de l'immunodéficience humaine, le virus de l'herpès ou le pox-virus ou encore par exocytose comme le virus de la varicelle. Il est observé la formation de nombreuses vacuoles autophagiques qui engendrent la destruction des structures cellulaires aboutissant à sa lyse et donc à la dissémination des virions (Jiang et al. 2011). La protéine "Adenovirus Death Protein" jouerait également un rôle dans la lyse ainsi que dans le processus de l'apoptose cellulaire (pour revues voir (Russell 2000) et (Lichtenstein et al. 2004)).

6. Les récepteurs primaires des adénovirus

Un tableau récapitulatif des récepteurs des HAdVs en fonction de leurs sous-groupes est présenté à la fin de cette section (Tableau 3).

6.1. Le « coxsackie and adenovirus receptor »

En 1976, une équipe de chercheurs a découvert que la fibre soluble de l'HAdV2 était capable de bloquer l'infection de cellules par les Coxsackievirus B1 et B3, indiquant un récepteur commun à ces 2 virus (Lonberg-Holm et al. 1976). En 1997, le récepteur est identifié et appelé CAR (pour "coxsackie and adenovirus receptor") (Bergelson et al. 1997). Il est connu pour être le récepteur des HAdVs de plusieurs sérotypes appartenant au sous-groupe A, et des sous-groupes C à F (Roelvink et al. 1998). C'est une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des immunoglobulines (Igs). Elle forme des homodimères assurant les jonctions intercellulaires au niveau du pôle basolatéral des cellules épithéliales. On la retrouve dans différents tissus tels que les testicules, la prostate, le cœur, le pancréas, le cerveau, l'intestin, mais elle est très peu exprimée dans les lymphocytes B et T, les reins, les poumons, les ovaires, la rate. Elle est constituée d'un domaine intracellulaire, d'un domaine extracellulaire séparé par un domaine transmembranaire. Seul le domaine extracellulaire est nécessaire pour l'infection par l'HAdV. Celui-ci est composé de 2 domaines Igs, D1 et D2 (Meier & Greber 2003) dans lequel seul D1 est responsable de la liaison récepteur/tête de la fibre.

La structure atomique de D1 de CAR en complexe avec la tête HAdV12 (Bewley 1999), la tête HAdV37 et celle du CAV-2 (Seiradake et al. 2006) fut résolue par cristallographie et par résonance magnétique nucléaire. Ces structures ont mis en lumière une interaction fibre / récepteur avec un ratio de 3 récepteurs par tête de fibre trimérique.

6.2. L'acide sialique (SA)

L'acide sialique est un dérivé d'un sucre à onze atomes de carbone. Ce sont des molécules communément présentes chez les organismes vivants. Le SA est notamment utilisé comme récepteur par les HAdVs appartenant au sous-groupe D (HAdV8, 19 et 37). La résolution des structures atomiques du SA avec les têtes de l'HAdV37 et HAdV19 a permis de déterminer que l'interaction entre la tête de la fibre et le SA est de nature charge dépendante (Burmeister et al. 2004).

6.3. Le CD46

La protéine CD46 a été découverte comme récepteur des HAdVs en 2003 (Gaggar et al. 2003). C'est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans la majorité des tissus cellulaires humains. Sa partie extracellulaire (N-terminale) est constituée de 4 répétitions du domaine SCRs (SCR1- SCR4 ; "Short Consensus Repeats"). Les domaines SCR1 et SCR2 sont nécessaires et suffisants pour une liaison optimale de l'HAdV3, 7, 11 et 35 à la surface de la cellule (Fleischli et al. 2007) (Sakurai et al. 2006).

CD46 est un récepteur pour de nombreux autres pathogènes humains aussi bien viraux comme la rougeole (Naniche et al. 1993) et l'herpès (Greenstone et al. 2002) que pour certaines bactéries comme le streptocoque (Giannakis et al. 2002)).

6.4. Le CD80 et CD86

Les CD80 et CD86 sont 2 protéines exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes appartenant à la super famille des immunoglobulines. Elles sont connues pour engendrer un signal nécessaire à l'activation des cellules T. Une étude a démontré que l'HAdV 3 avait pour récepteur ces 2 protéines tout en signalant qu'il existait un autre récepteur (Short et al. 2004) qui fut découvert en 2011 (cf le point 6.8 ci-dessous).

6.5. Le « Major Histocompatibility Complex class I » (MHC-I)

Le rôle du MHC-I en tant que récepteur primaire des HAdVs reste encore à éclaircir. En effet, plusieurs travaux de la fin des années 90 sont en contradiction quant à son utilisation dans le cycle viral de l'HAdV (Hong et al. 1997) (McDonald et al. 1999). Une hypothèse a émergé disant que le MHC-I pourrait jouer un rôle dans l'attachement et l'internalisation des HAdVs seulement en absence du récepteur CAR ou lorsque celui-ci est très faiblement exprimé à la surface cellulaire (Davison et al. 1999).

6.6. Le « Vascular Cell Adhesion Molecule I » (VCAM-I)

Le VCAM-I (ou CD106) est une immunoglobuline qui peut être reconnue par l'HAdV5. En effet, une étude prouve que la transduction de l'HAdV est plus efficace dans les tissus sur exprimant cette protéine comme par exemple les vaisseaux athérosclériques (Chu et al. 2001).

6.7. Les Protéoglycanes à Héparanes Sulfates (HSPG)

Les HSPG possèdent un domaine protéique et des sucres sulfatés qui servent de point d'ancrage à la surface cellulaire à de nombreux organismes. L'HAdV2 et 5 sont capables d'interagir avec les HS probablement *via* la tige de la fibre (Dehecchi et al. 2000) (Dehecchi et al. 2001). Il est à noter que les HSPG sont également capables de fixer les bases du penton l'HAdV3 sous forme dodécaédrique mais pas l'HAdV3 entier (Vivès et al. 2004) (Fender et al. 2008).

6.8. La desmogléine de type 2 (DSG2)

La DSG2 a été identifiée comme récepteur primaire des HAdV appartenant au sous-groupe B en 2011 (Wang et al. 2011). C'est une protéine d'adhésion similaire au récepteur CAR mais celle-ci appartient à la superfamille des cadhérines. On la retrouve au niveau des desmosomes des cellules épithéliales polarisées ce qui la rend peu accessible. Parmi le sous-groupe B, seuls les HAdV3, 7, 11 et 14 sont capables d'interagir *in vitro* avec la DSG2 alors que les HAdV16, 21, 35 et 50 utilisent exclusivement le CD46 (Tuve et al. 2006). Un travail réalisé au laboratoire par le Dr Emilie Stermann sur la résolution structurale du complexe entre la tête de la fibre de l'HAdV3 et la DSG2 auquel j'ai participé est présenté à la page 147 (Article I).

Sous-Groupe	Sérotype	Récepteur(s)
A	12,18,31	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	CD46, DSG2, CD80, CD86
B2	11, 14, 34, 35	
C	1, 2, 5, 6	CAR, VCAM-I, HS, MHC-I
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56, 58-60, 63-67	SA, CD46, CAR
E	4	CAR
F	40, 41	CAR
G	52	SA

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des récepteurs primaires de chaque sous-groupe d'HAdV
Extrait et modifié de « Adenovirus receptors: Implications for targeting of viral vectors » (Arnberg 2012).

7. Les adénovirus en thérapie

Au jour d'aujourd'hui, plus de 400 essais cliniques sont effectués dans le monde en utilisant les HAdVs. Ces essais sont réalisés dans 75% des cas aux États-Unis et en Europe (Figure 11). Les indications ainsi que la nature des vecteurs sont extrêmement diverses et variées et on remarque que les études sont effectuées sur la totalité du globe. Dans cette section, je décrirai les principaux types de vecteurs adénoviraux en sachant que la plupart sont issus de l'HAdV5 et sont de 2 types : soit déficients soit compétents au niveau de leurs répliquons. Le choix d'un type de vecteur par rapport à l'autre se fait en fonction de l'indication médicale dans laquelle le vecteur sera utilisé. En effet, si l'on cherche une correction génétique, il ne faut pas détruire la cellule. On utilisera alors un vecteur déficient pour la répliquon, alors que, dans le traitement de tumeurs, la fonction lytique sera extrêmement importante et on pourra donc utiliser un vecteur répliquatif.

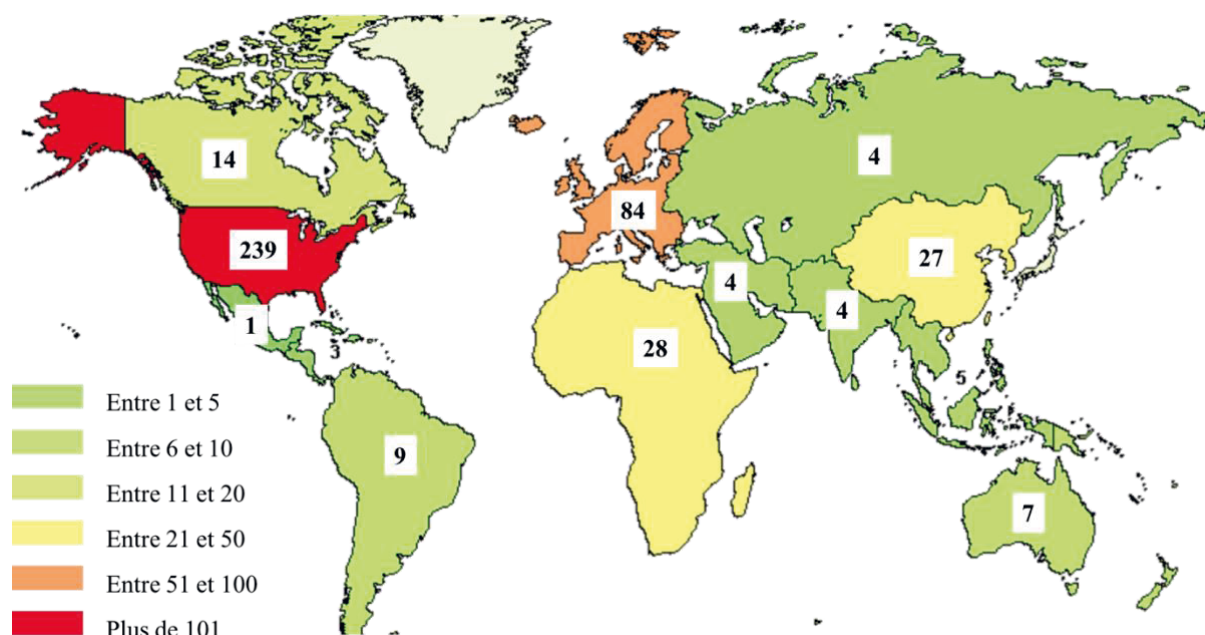


Figure 11 : Le monde et les essais cliniques utilisant les HAdV en tant que vecteur

Plus de la moitié des essais cliniques utilisant les HAdVs s'effectuent aux États-Unis et près d'1/4 en Europe. En Afrique 28 études sont actuellement menées et dont la principale indication est le VIH. En Chine, beaucoup d'études concernent les cancers "tête et cou".

(Extrait de : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?cond=&term=adenovirus&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search> : Le chiffre indique le nombre exacte d'étude par région)

7.1. Les vecteurs non répliquatifs

Les HAdVs-RD (RD pour « replication defective ») sont des HAdVs que l'on a créé pour être déficients au niveau de leur réplication. Pour cela, on enlève les gènes E1A et E1B que l'on remplace par une cassette codant un gène d'intérêt précédé par un promoteur fort tel que cytomégalovirus (CMV) par exemple (Figure 12). La plupart des vecteurs HAdVs sont aussi déficients pour la région E3 qui participe au camoufrage de l'infection au système immunitaire et qui n'est pas nécessaire à la réplication virale en culture cellulaire. Les gènes E1A et E1B étant eux indispensables à l'initiation de la réplication virale, les HAdVs-RD sont produits à partir d'ADN complétant le génome manquant de l'HAdV dans des lignées cellulaires telles que HEK293, PER.C6 ou encore N52.E6 qui expriment intrinsèquement E1A et E1B (Heise et al. 1997). Plusieurs études ont été menées avec des HAdV-RD en thérapie génique. Ce fut notamment le cas pour corriger différents gènes tel que le gène codant le « cystic fibrosis transductance regulator » dans le cadre du traitement de la mucoviscidose, ou encore la « *E. Coli* cytosine deaminase » pour traiter le déficit immunitaire combiné sévère (Harvey et al. 2002).

Les HAdVs-RD ont aussi été testés en tant que vaccin car ils sont connus pour induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire extrêmement forte. Plusieurs vaccins anti-virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont été testés sans grandes réussites. Par exemple, un vaccin HAdV5-RD codant pour plusieurs protéines du VIH fut injecté à près de 3000 patients avant d'être arrêté parce que les patients vaccinés avec le vecteur montraient un taux d'infection au HIV plus important que ceux vaccinés avec le placebo (Wold, WSM & Ison 2013). Cependant, un vaccin HAdV5-RD codant pour un antigène fort de la tuberculose a démontré une immunogénicité intéressante lors d'une étude clinique de phase I menée sur 26 patients naïfs ou déjà immunisés avec le Bacille Calmette-Guerin (Smaill et al. 2013).

Au total, un très grand nombre de vecteurs HAdVs-RD exprimant différents types de transgènes ont déjà été testés en essais cliniques et un seul d'entre eux a malheureusement connu une fin dramatique avec le décès de Jess Geslinger. Cet événement a eu pour conséquence une remise en question de l'utilisation de vecteur adénoviraux à des fins thérapeutiques qui, malgré tout, reste le plus utilisé en thérapie génique.



Figure 12 : Représentation schématique du génome d'HAdV-RD

Les régions E1A et E1B (unités de transcription) sont supprimées et remplacées par une cassette d'expression codant un gène d'intérêt avec un promoteur exogène entraînant l'expression du gène thérapeutique. Les vecteurs délétés de la région E1 sont déficients au niveau de leurs répliquons. Les protéines E1A et E1B étant indispensables pour la répllication virale, les vecteurs sont produits dans des lignées cellulaires telles que HEK293 ou PER.C6, qui expriment les protéines E1A et E1B. (Wold & Toth 2013)

7.2. Les vecteurs répliatifs

7.2.1. Déficiant pour le gène E1B-55K

Les vecteurs HAdVs-RC (RC pour « replication competent ») sont surtout utilisés en tant que virus oncolytiques. Les HAdVs-RC ont pour but final de lyser les cellules cancéreuses. Pour cela, une cellule infectée par une particule virale aboutira à la formation de plusieurs milliers de néo virions qui seront à leur tour capables d'infecter les cellules voisines et de les détruire. Le premier HAdV oncolytique (appelé ONYX-015) a été créé déficient pour le gène E1B-55K (Figure 13), protéine indispensable à la répllication virale dans les cellules saines car

elle se lie à p53 qui est facteur de transcription régulant, entre autres, la mort cellulaire programmée. Sachant que dans près de 60% de cancers, les cellules tumorales synthétisent une p53 non fonctionnelle, une injection intra tumorale de ONYX-015 permet une réplication ciblée dans les cellules malignes et très peu dans les cellules saines (p53 fonctionnelle) (O'Shea et al. 2004). Dès lors, plusieurs HAdVs-RC ont été créés déficients pour le gène E1B-55K et un HAdV-RC (Oncorine) a déjà conduit la Chine à approuver ce vecteur en thérapie anti cancéreuse dans le traitement du carcinome nasopharyngé combiné à de la chimiothérapie grâce à son efficacité précise conjuguée à son excellente tolérance (Jia & Kling 2006) (Liang. M. 2012). De nombreux autres vecteurs oncolytiques dérivés d'HAdV ont un design similaire (par exemple Oncorine), et certains d'entre eux codent un gène thérapeutique (flèche orange de la figure 13) incorporé dans la région E3 et exprimé à partir du promoteur E3. On parle alors de vecteurs armés. Cette région a notamment été utilisée pour exprimer la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex, qui, en phosphorylant l'acyclovir, permet de le convertir en une drogue phosphorylée toxique.

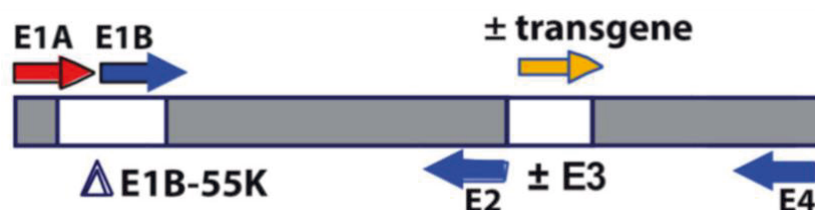


Figure 13 : Représentation schématique du génome de ONYX-15

ONYX-015 est le premier HAdV-RC. Le génome des HAdVs-RC est déficient pour le gène E1B-55K ainsi qu'un gène de 14.7kpb dans la région E3B mais ONYX-015 n'a pas de transgène dans cette région. En raison de la délétion E1B-55K, ce vecteur se réplique dans les cellules cancéreuses (Wold & Toth 2013). L'ajout d'un transgène permet "d'armer" le virus

7.2.2. Spécifique d'un type cellulaire

Il est aussi possible de contrôler la réplication des HAdVs-RC dans certains tissus grâce à l'insertion d'un promoteur spécifique de la cellule ciblée (Figure 14). C'est le cas de CV706, utilisé dans le traitement du cancer de la prostate, dans lequel les promoteurs des régions E1A et E1B ont été remplacés par un promoteur spécifique des cellules prostatiques (DeWeese et al. 2001) ou encore par un promoteur de la télomérase humaine permettant une réplication efficace du virus uniquement dans les cellules avec une activité de télomérase élevée (Hemminki et al. 2012). Ce traitement fut administré à plusieurs patients et sa faible toxicité ainsi que la

diminution d'un marqueur tumoral montrent que ce type de design est encourageant pour le futur.

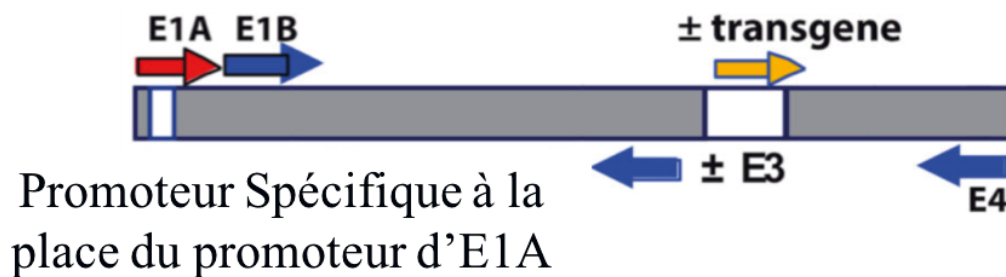


Figure 14 : Représentation schématique du génome d'un HAdV-RC spécifique d'un type cellulaire

De nombreux HAdVs-RC ciblent les cellules cancéreuses par remplacement du promoteur E1A par un promoteur spécifique du cancer. Ces vecteurs se développent dans les cellules cancéreuses dans lesquelles le promoteur est actif. Certains de ces vecteurs ont un transgène thérapeutique dans la région E3. (Wold & Toth 2013)

7.3. La dernière génération de vecteur adénovirale

La dernière génération de vecteurs adénoviraux est appelée les « helper-dependent » ou encore « gutless » adénovirus. Cette approche de thérapie génique consiste à utiliser toute la capacité génomique d'un HAdV pour coder un transgène de grande taille (30 kpb) et surtout éliminer toutes les séquences virales codantes qui pourraient déclencher une réponse immunitaire. Pour ce faire, seules sont conservées les ITR et la séquence d'encapsidation Ψ . Cependant, un génome d'HAdV ne possédant que ces séquences est bien entendu incapable de se multiplier et c'est grâce à l'utilisation d'un virus auxiliaire (helper) modifié, codant toutes les protéines de la capsid, que la production de ce vecteur est possible.

Le premier problème pointé dans la génération de ces vecteurs est de différencier les virus auxiliaires des virus thérapeutiques (Sandig et al. 2000). Pour contourner cela, la première stratégie a été de retirer la séquence Ψ des virus auxiliaires ainsi que de réduire le génome au strict minimum afin de pouvoir les séparer grâce à leurs densités respectives. Malgré tout, la contamination des vecteurs thérapeutiques par les vecteurs auxiliaires restait trop importante. Alba et collaborateurs ont alors encadrés la séquence d'encapsidation du génome avec des séquences *loxP* ou *frrt* ce qui a permis de réduire la contamination en produisant les vecteurs dans des lignées exprimant Cre en réalisant des cycles itératifs de production (Figure 15). La génération de ce type de vecteur permet l'expression d'un ou de plusieurs transgènes de très grande taille (jusqu'à 30 kpb) mais sont tout de même contraints à certaines obligations concernant la composition du génome. Il est par exemple indispensable que la pTP soit codée

pour que le génome thérapeutique persiste dans les cellules (Lieber et al. 1997). De plus, le génome ne doit pas être plus petit que 27 kpb sous peine de ne pas avoir d'encapsidation efficace. Il est donc important d'incorporer au génome des séquences d' « ADN de remplissage » (stuffer DNA).

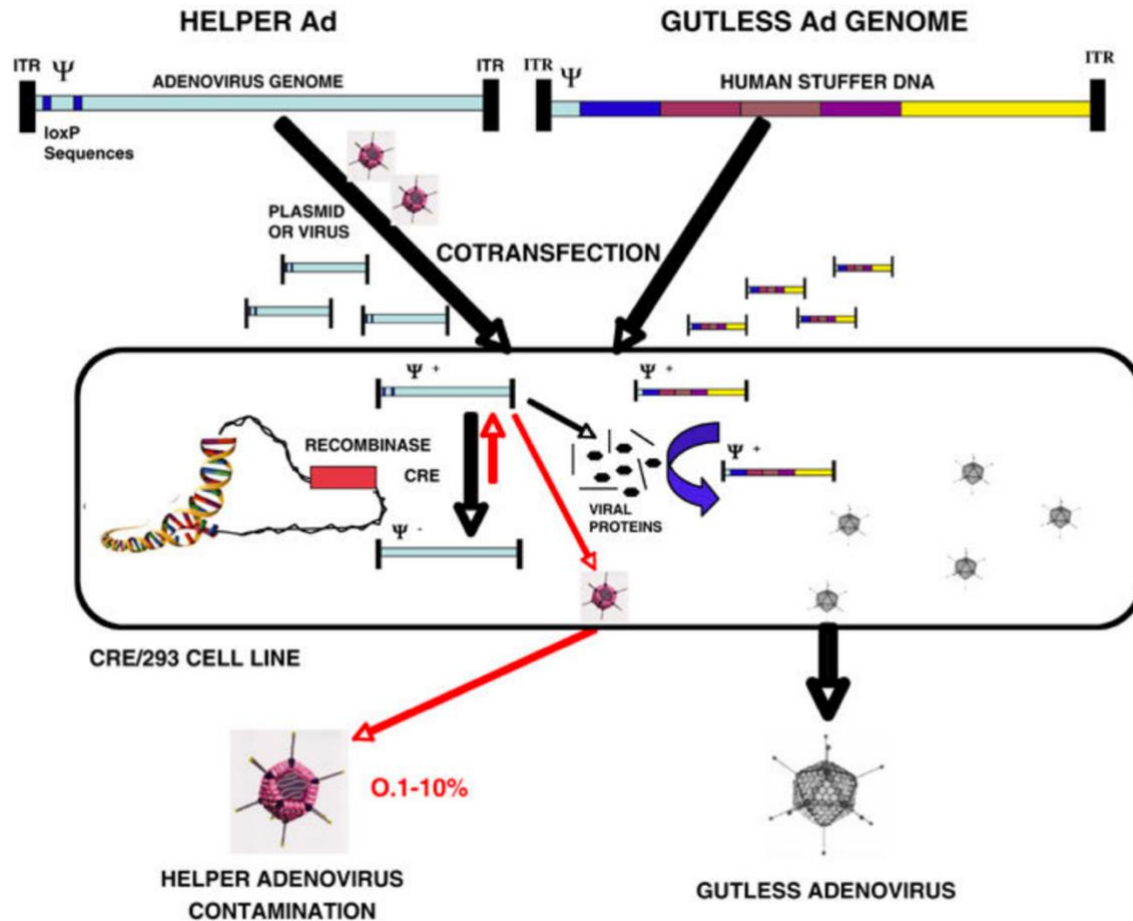


Figure 15 : Génération de vecteur « gutless » utilisant le système Cre / loxP

Les génomes gutless et helper sont co-transfectés dans des cellules 293 permissives exprimant Cre, où les deux génomes sont amplifiés et les protéines virales produites. Ensuite, le signal d'encapsidation du génome du virus auxiliaire est clivé par la recombinaise Cre, empêchant son encapsidation au contraire du génome thérapeutique. L'efficacité du processus permet d'obtenir une pureté de 90-99,9% de vecteur thérapeutique. (Alba et al. 2005)

II. Les dodécaèdres des adénovirus

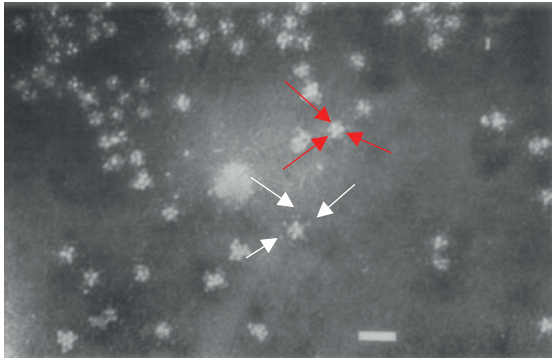
Les dodécaèdres des AdVs résultent de l'assemblage symétrique de 12 pentons ou bases du penton pentamériques entre elles. Dans ce chapitre, je vais m'attacher à décrire le dodécaèdre depuis sa découverte jusqu'à ses potentielles applications.

1. Les dodécaèdres naturels

La première mise en évidence des dodécaèdres adénoviraux (Dd) date de 1966. En purifiant les antigènes solubles produits lors d'une infection de cellules humaines par un HAdV3, Norrby a observé des structures symétriques en forme d'étoile à 5 ou 6 branches : les dodécaèdres. Il a décrit cette protéine comme étant de forme tubulaire autour de laquelle on retrouve des points (Norrby. 1966) (Figure 16). Aujourd'hui, on associe la forme tubulaire aux pentons et les points aux domaines tête de la fibre. Pour purifier ces antigènes solubles, il purifia tout d'abord le virus entier par centrifugation en gradient de chlorure de césium afin de les éliminer et ne conserva que le matériel situé au-dessus des bandes de virus. Ce matériel a ensuite été purifié sur gradient de saccharose. En le fractionnant, il remarqua que les fractions lourdes possédaient des propriétés hémmagglutinantes et il en a déduit que l'antigène recherché se trouvait à l'intérieur de ces fractions. Il évalua le coefficient de sédimentation de la particule aux alentours de 50-60 S. Dans cette étude, il détermina aussi que la taille des Dds était comprise entre 22,5 et 27,5 nm et de 40 à 50 nm entre 2 têtes de fibres.

Par la suite plusieurs travaux ont mis en évidence la présence ou l'absence de formation de Dds dans des cellules humaines infectées par différents sérotypes d'HAdV. Ainsi, pour le sérotype 4 (Norrby & Wadell 1967), le sérotype 7 (Neurath & Rubin 1968), le sérotype 11 (Norrby. 1968), et les sérotypes 9 et 15 (Norrby et al. 1967), il a été mis en évidence leurs capacités à former des Dds. Au contraire, d'autres études n'ont pu mettre en évidence leurs présences pour les sérotypes 1, 2, 5 et 6 (Wadell et al. 1969), le sérotype 12 (Norrby. 1969), et le sérotype 16 (Norrby & Skaaret 1968) ainsi que pour les virus entériques HAdV40 et 41 (observation au laboratoire).

A)



B)

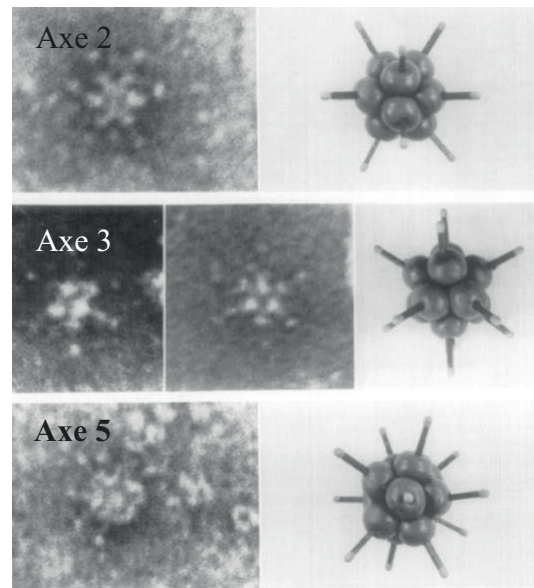


Figure 16 : Apparence générale des Dds naturels par microscopie électronique

Norrby purifia les Dds comme cité ci-dessus et les a imagés en coloration négative au grossissement X18000. On distingue les bases du penton pentamérique (flèches rouges) ainsi que les têtes de fibre (flèches blanches). B) Le modèle proposé par Norrby pour la structure de ces particules est présenté selon l'axe de symétrie 2, 3 et 5. (La barre d'échelle représente 50nm). (Erling & Norrby 1966)

Les dodécaèdres sont produits de manière naturelle lors du cycle d'infection de cellules par les HAdVs. Au cours du cycle viral, les bases du penton commencent à être synthétisées dans le cytoplasme de cellules 12 heures après infection par le virus entier. Dès lors, elles sont transportées et s'accumulent dans le noyau et ce jusqu'à 20 heures post infection. Après cela, on observe un réarrangement des bases du penton (donc probablement des Dds) tout autour de la membrane nucléaire interne avant la lyse de la cellule infectée. Lors d'une infection de cellules humaines *in vitro* par l'HAdV3, on estime que $7,5 \times 10^5$ Dds sont produits par cellule, ce qui représente environ 3750 fois plus de Dd que le nombre de néo virions infectieux formés (environ 200) (Fender et al. 2005).

2. Les dodécaèdres recombinants

Jusqu'aujourd'hui, plusieurs travaux ont été menés afin de caractériser de manière structurale, biologique et biochimique le dodécaèdre dans le but de comprendre les éléments nécessaires à sa formation ainsi que son rôle potentiel. La co-expression de la base du penton et de la fibre de l'HAdV3 dans un système baculovirus a permis d'obtenir après purification sur gradient de saccharose, une particule dodécamérique formée de 12 bases du penton

pentamériques interagissant avec les fibres trimériques projetées vers l'extérieur nommées dodécaèdre fibre (DF). De plus, l'expression simple de la base du penton de l'HAdV3 a permis de purifier une seconde particule dodécamérique nommée dodécaèdre base (DB) résultant de l'assemblage symétrique de 12 bases du penton pentamériques (Fender et al. 1997) (Figure 17). Ce travail démontre que l'information de dodécamérisation est donc contenue uniquement dans la base du penton de certains sérotypes et qu'aucun autre élément adénoviral n'est requis pour la formation des dodécaèdres.

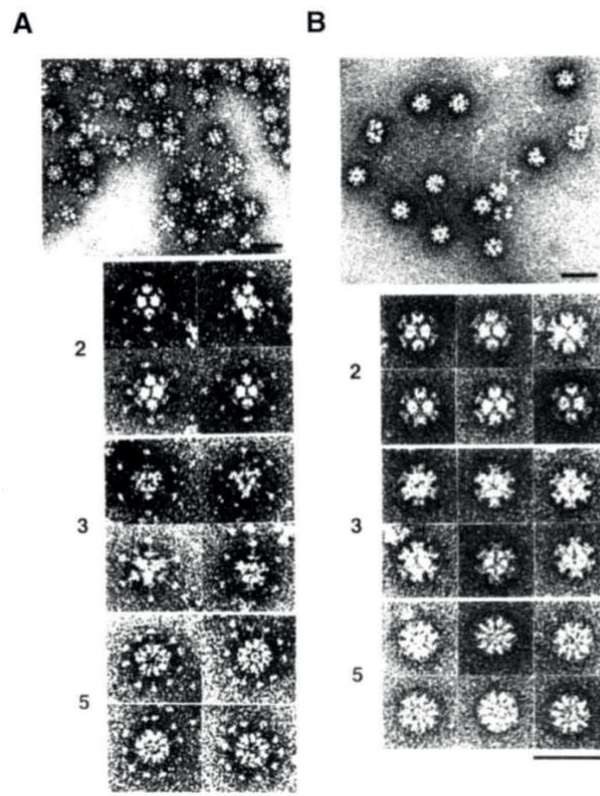


Figure 17 : Apparence générale du DF et DB produits en cellules d'insecte vue par microscopie électronique

Les images du haut montrent les DF (A) et les DB (B) dans différentes orientations et celles du bas montrent les Dds selon leurs axes de symétrie 2, 3 et 5. (La barre d'échelle représente 50nm). (Extrait de Fender et al., 1997)

3. La structure des dodécaèdres

La première structure des DF et DB de l'HAdV3 a tout d'abord été résolue par cryo-microscopie et reconstruction en 3 dimensions en 1996 (Schoehn et al. 1996). La résolution du DF a été obtenue à 25 Å et celle du DB à 20 Å de résolution (Figure 18A). Dans cette étude, il est démontré que la fibre induit un changement conformationnel au niveau de la boucle RGD (Figure 18B) et il a été montré la présence d'une cavité interne d'environ 350 nm³. La boucle

RGD se déplace de 15 Å vers l'extérieur de la structure sans que cela n'affecte l'interaction base du penton / intégrine.

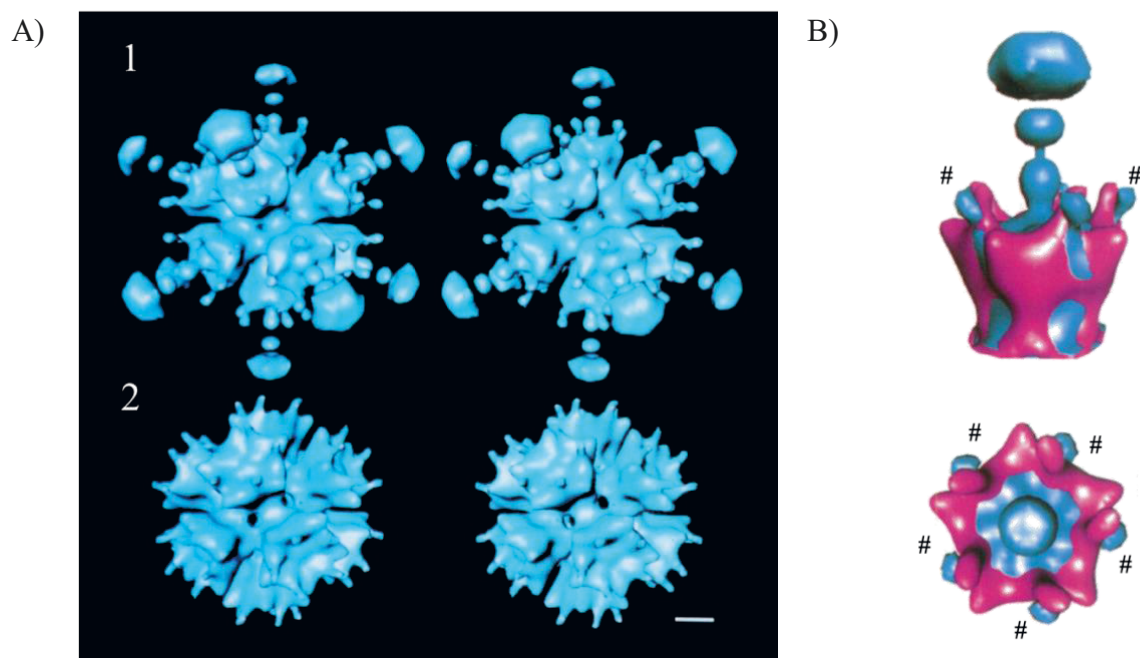


Figure 18 : Étude structurale par cryo microscopie du DF et DB de l'HAdV3

A) Reconstruction en 3 dimensions du DF (1) et du DB (2). B) Superposition du penton (en bleu) et de la base du penton (en rose) rapportant les modifications structurales au niveau de la boucle RGD vue de côté (1) et du dessus (2). (# : Boucle RGD)

Un peu plus tard, en 2004, l'équipe de Stephen Cusack a résolu la structure par cristallisation aux rayons X de la base du penton de l'HAdV2 déletée de 49 acides aminés du côté N-ter (Zubieta et al. 2005). De manière surprenante, cette base du penton connue pour ne pas être capable de former des Dd naturellement, a cristallisé sous forme dodécamérique. Par homologie, cette structure à 3,3 Å de résolution a permis de mettre en évidence les points de contact entre 2 pentamères adjacents de l'HAdV3. En superposant cette structure cristallographique avec un modèle du DB obtenue par cryo-EM à 9 Å de résolution, 3 points de contact ont été mis en évidence entre 2 ces bases du penton (P. Fuschiotti et al. 2006). En se basant sur la séquence en acide aminé de la base HAdV3 de 1994 (Cuzange et al. 1994), les points de contact sont : la séquence ⁵⁸SDSV⁶¹ d'un penton « A » qui interagit avec la séquence homologue d'un penton « B » et la séquence ⁹⁹NDFT¹⁰² d'un penton « A » qui interagit avec la séquence ⁴²⁵RSTR⁴²⁸ du penton « B » et *vice versa* (Figure 19). En 2010, la structure cristallographique du Dd de l'HAdV3 a été résolue confirmant l'importance des régions décrites précédemment. Grâce à ces travaux, il a été possible de créer un virus mutant incapable

de produire des Dds de manière naturelle (Lu et al. 2013) ce qui a permis de mettre en lumière quelques-uns des rôles du Dd décrit ci-après.

Pour finir, un clivage de la partie N-ter du monomère au niveau de E37-A38 aboutit à une forme plus stable des Dds. En effet, cette coupure entraînant la perte de 2220 résidus au total par Dd permettrait de réduire l'encombrement stérique dans la cavité interne stabilisant le complexe protéique.

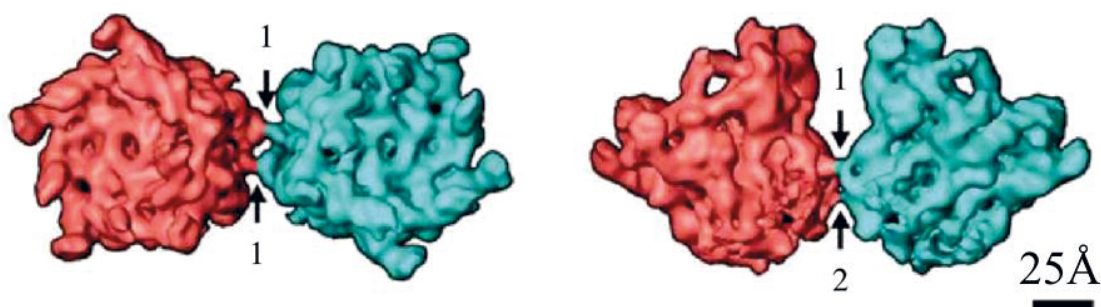


Figure 19 : Points d'interaction entre 2 bases du penton adjacentes

Représentation des points de contact sur une carte de densité à 11 Å. La vue de dessus (à gauche) montre les interactions entre les séquences ⁹⁹NDFT¹⁰² et ⁴²⁵RST⁴²⁸ (notée 1) et la vue de côté (à droite) montre l'interaction entre 2 séquences ⁵⁸SDSV⁶¹ (notée 2). (La barre représente 25 Å)

4. Propriétés biologiques des dodécaèdres

4.1. Synthèse et localisation au cours du cycle viral

La synthèse naturelle des bases du penton au cours du cycle viral a été étudiée en cellule HeLa. Au cours d'une infection par l'HAdV3, les bases du penton ne sont détectables qu'à partir de la 12^{ème} heure post-infection et on ne les retrouve que dans le cytoplasme des cellules infectées. De manière intéressante, l'analyse du contenu cytoplasmique à 12 heures post-infection par gradient de saccharose ne montre pas de dodécamérisation des bases du penton. A la fin du cycle viral (24 heures post infection), celles-ci ne sont détectables qu'autour de la membrane nucléaire interne et plus du tout dans le cytoplasme de la cellule infectée. De plus, beaucoup de bases du penton ne sont pas co-localisées avec les néo virion qui sont eux présents sous forme d'inclusion nucléaire, indiquant une forte sur-production de cette protéine au cours du cycle viral. L'analyse du contenu protéique cellulaire à 24 heures post-infection par gradient de saccharose a démontré la présence de forme dodécamérique de la base du penton indiquant clairement que la dodécamérisation de la base du penton a lieu dans le noyau des cellules infectées (Fender et al. 2005).

4.2. Attachement et internalisation

Les DF sont composés des 2 protéines indispensables à l'internalisation du virus entier : la base du penton et la fibre. Dès lors, il a été démontré qu'à 4°C, ces particules possèdent des propriétés d'attachement aux membranes des cellules. A 37°C, il a été observé sur cellules permissives telles que des cellules HeLa ou A549 que les DF s'internalisent dans des vésicules et migrent jusqu'au noyau (Fender et al. 1997). Il est fort envisageable que le mécanisme d'endocytose soit donc le même que le virus entier. Cependant, les DF ne semblent pas sortir des vésicules de manière active. Ils ne peuvent pas pénétrer dans le noyau et restent majoritairement à l'intérieur des vésicules au contraire du virus qui s'échappe rapidement.

Le DB n'est quant à lui composé que de la base du penton. Il manque donc à cette particule la protéine responsable de l'attachement au récepteur primaire à la surface de la cellule. Malgré cela, les DB sont tout de même capables de s'internaliser suggérant un mécanisme à une étape. Cependant, une étude montre que ce mécanisme n'est pas uniquement lié à l'interaction base du penton / intégrine, mais est aussi médié par les héparanes sulfates. Ces polysaccharides présents à la surface cellulaire attachés à des récepteurs nommés protéoglycanes à héparanes sulfates pourraient, dans ce cadre-là, jouer le rôle de récepteur d'attachement facilitant l'interaction secondaire avec les intégrines (Vivès et al. 2004). Les DB sont également incapables de s'échapper de manière active des endosomes.

4.3. Dans le remodelage cellulaire

La DSG-2 est un des composants des desmosomes responsables des jonctions cellule-cellule (Syed et al. 2002). Son domaine extracellulaire forme des hétérodimères entre 2 cellules adjacentes avec la desmocolline-2. Ceux-ci peuvent être clivés lorsque le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) est activé (Klessner et al. 2009).

Lors de la découverte de la DSG-2 comme récepteur de certains sérotypes d'HAdVs, il a été démontré que sa reconnaissance par la fibre de l'HAdV3 induisait une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) sur les cellules B474 (cellules épithéliales issues d'un cancer du sein Humain) (Wang et al. 2011). Les cellules en TEM perdent leur adhésion cellule-cellule par une diminution de l'expression des E-cadhérines et acquièrent des propriétés adhésives nouvelles vis-à-vis de la matrice extracellulaire. Cette ouverture transitoire des jonctions cellulaires permet l'exposition de récepteurs inaccessibles à l'interface des cellules adjacentes. Cette transition peut également être induite en culture cellulaire et *in vivo* par contact des cellules

avec le DF seul. La TEM liée à la reconnaissance tête de la fibre / DSG-2 utilise la voie des « mitogen-activated protein » kinases (MAPK). En réponse à cette interaction, il y a phosphorylation d'une MAPK qui déclenche l'activation de la métallopeptidase ADAM17 qui va alors cliver le domaine extracellulaire de la DSG-2 qui relie les cellules épithéliales ensemble (Wang et al. 2015). Cette découverte a ouvert la voie à une potentialisation de l'effet des vecteur adénoviraux et des traitements anti cancéreux. Ainsi, la TEM induite par le DF rend le récepteur Her2/*neu* plus accessible à l'Herceptine dans des tumeurs induites par les cellules BT474 chez la souris (Figure 20) (Wang et al. 2011). De ce fait, le DF est un outil très intéressant pour améliorer l'efficacité des traitements anti-tumoraux (Wang et al. 2011).

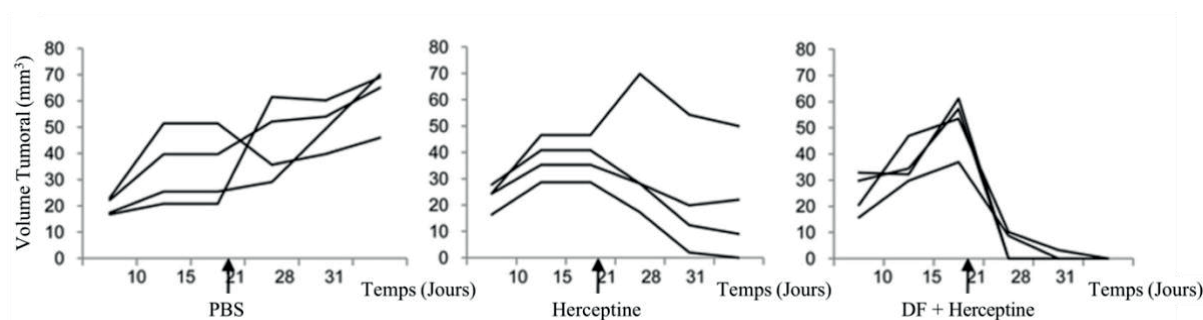


Figure 20 : La TEM induite par le DF sur des tumeurs BT474-M1 potentialise l'effet de l'Herceptine
 Une diminution du volume tumoral beaucoup plus importante est observée lorsque les souris ont été traitées avec l'Herceptine combiné au DF. Le volume tumoral de chaque souris est indiqué à différents temps après l'injection de cellules BT474-M1. (La flèche indique le jour de l'injection)

4.4. Un piège à défensines

En plus de permettre l'ouverture des jonctions desmosomales de certaines tumeurs cancéreuses, un des rôles des Dds est de piéger les défensines et notamment la « Human Defensin 5 » (HD5). HD5 est un petit peptide antimicrobien capable de neutraliser les sous-groupe A, B, C et E des HAdVs. Pour cela, HD5 se lie à la capsid des HAdVs en créant un pont stabilisant la base du penton et la fibre empêchant ainsi l'exposition de pVI lors du déshabillage du virus (Smith et al. 2010) (Flatt et al. 2013). Cette non présentation de pVI à la membrane des endosomes bloque le virus dans la vésicule après internalisation. L'étude du rôle des Dds dans la propagation de l'HAdV3 dans des cellules tumorales sécrétant ou non HD5 m'a permis de démontrer lors de mon stage de master 2 dans le groupe du Pr Lieber à Seattle (Washington, USA) que les Dds sont capables de capter les défensines HD5 sécrétées sous forme active et de les neutraliser. Cela ayant pour conséquence de prévenir la stabilisation du virus HAdV3 alors que, dans les mêmes conditions, la propagation de l'HAdV5 (ne produisant

pas de Dds) se trouve très limitée (Vragliau et al. 2017). La publication associée à ce travail est présentée à la page 159 (Article II).

5. Les dodécaèdres en biotechnologie

5.1. En vecteur d'ADN

De par sa capacité à s'internaliser très rapidement dans les cellules, et du fait qu'il ne possède pas d'acide nucléique comme le virus, le Dd est un excellent moyen de vectoriser un gène d'intérêt à l'intérieur d'une cellule. Cependant, le dodécaèdre seul (qu'il soit base ou fibre) est incapable de le faire car la cavité interne de 350nm^3 est trop petite pour pouvoir encapsider des acides nucléiques. Face à cela, il a donc été conçu un peptide composé des 20 acides aminés du côté N-ter de la fibre prolongé par une séquence polylysine de 20 acides aminés capable de :

1. Interagir avec la base du penton (*via* les acides aminés de la queue N-ter de la fibre)
2. Interagir avec l'ADN (*via* l'interaction entre le groupement NH_3^+ des lysines et le groupe PO_3^- de l'ADN).

Ce mix entre DF ou DB + peptide + ADN a démontré une efficacité dans le transport d'un plasmide codant la luciférase dans les cellules (Fender et al. 1997). Ainsi, un signal bioluminescent spécifique est détectable au bout de 9 heures d'incubation, rapportant le passage de l'ADN de la vésicule d'endocytose vers le noyau afin d'être transcrit puis traduit. En sachant que les Dd sont incapables de s'échapper seuls de la vésicule endosomale, on peut imaginer qu'une lyse passive s'est déroulée à l'intérieur de la cellule, permettant la libération et le transport de la molécule d'ADN dans le noyau.

5.2. En vecteur de protéines

La découverte de protéines et de petits peptides cationiques qui traversent la membrane (appelés domaines de transduction des protéines (PTD)) à la fin des années 1980 a ouvert la porte au transport cellulaire de grandes molécules bioactives. De manière remarquable, beaucoup de ces protéines ou peptides sont dérivés de virus comme par exemple les peptides issus de la protéine « Trans-Activator of Transcription » (TAT) du virus de l'immunodéficience humaine ou encore la protéine VP22 du virus de l'Herpès Simplex (Dilber et al. 1999). La conjugaison de fragments peptidiques dérivés de la protéine TAT du VIH a montré qu'elle permettait la livraison cellulaire de protéines fonctionnelles complètes en 1994, démontrant le potentiel des peptides TAT à être utilisés comme agent de distribution cellulaire pour les grosses molécules (Fawell et al. 1994). De nos jours, les PTD sont largement utilisés comme

outils de recherche, et de multiples essais cliniques testent la délivrance médiée par PTD de conjugués de médicaments macromoléculaires chez des patients atteints de diverses maladies.

Le Dd des HAdVs présentant les mêmes capacités d'endocytose que le virus entier et étant dépourvu de tout matériel génétique, ils sont donc un sérieux candidat pour la transduction de protéines à l'intérieur des cellules. Leur capacité de transduction de protéines biologiquement actives a été démontrée au début des années 2000 dans le cadre de la transduction d'anticorps (Fender et al. 2003). Dans ce travail, les Dds de l'HAdV3 (DF ou DB) ont été « décorés » avec des anticorps monoclonaux (reconnaissant la base de l'HAdV3) puis incubés sur des cellules. En quelques minutes, les anticorps ont été retrouvés dans les cellules alors que les anticorps anti-base HAdV3 seuls ont été incapables de s'internaliser, démontrant ainsi la capacité transductionnelle des Dds.

Cependant, pour le transport de protéine d'intérêt, il a fallu mettre au point un système plus universel d'attachement ce qui a été fait en utilisant les propriétés d'interaction entre le motif « PPxY » doublement conservé dans le monomère de la base du penton et les domaines « WW » (Galinier et al. 2002) (Figure 21). En exprimant les domaines WW 2, 3 et 4 de l'ubiquitine ligase NEDD4 en fusion avec une protéine d'intérêt comme la MBP, il a été prouvé que celle-ci est efficacement transduite dans les cellules où elle colocalise avec le vecteur dodécaédrique qui l'a délivrée (Garcel et al. 2006) (Villegas-Méndez et al. 2012) démontrant le fort potentiel de Dds dans le domaine de la transduction de protéines.

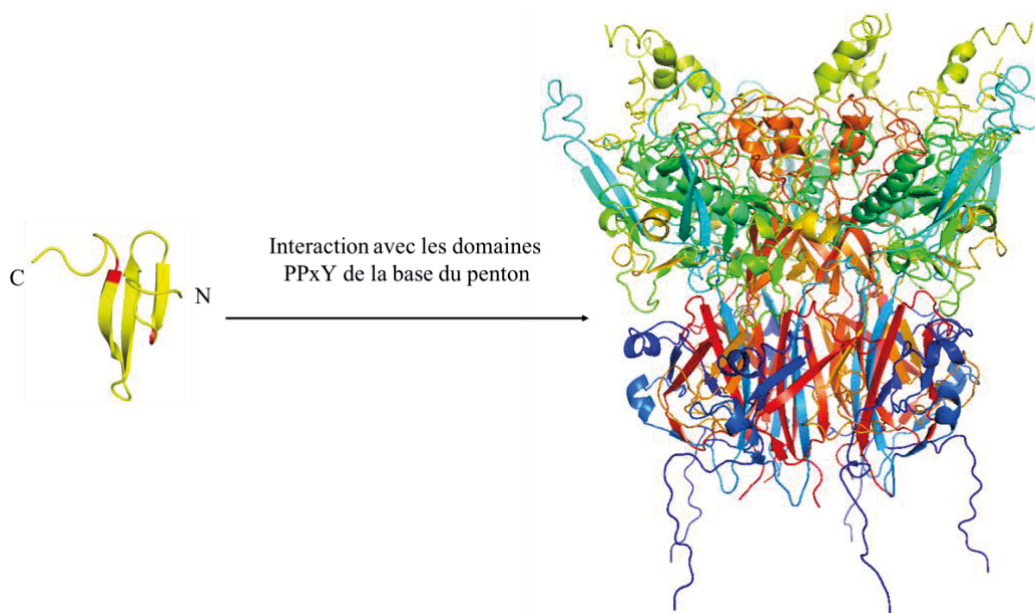


Figure 21 : Interaction du domaine WW avec la base du penton

Le domaine WW est un des plus petits composés qui régule les interactions avec des protéines contenant des motifs PPxY. Il se replie selon un feuillet bêta antiparallèle à trois brins et tire son nom de 2 résidus tryptophanes (en rouge sur la figure) hautement conservés. Ce domaine peut servir d'accroche universelle aux Dds possédant 2 motifs PPxY par monomère de la base du penton. (PDB : 1E0M)

5.3. En vaccinologie

Les vaccins sont la plupart du temps des virus vivants inactivés (souvent chimiquement ou par chauffage), atténués (perte naturelle ou artificielle de leur virulence). Ils contiennent de vrais virus et possèdent donc un risque de réactivation. L'intérêt du Dd est qu'il ne peut pas être réactivé puisqu'il est dépourvu de matériel génétique. De plus, du fait de la possibilité de pouvoir accrocher de grosses protéines fonctionnelles *via* l'interaction entre les domaines WW et les motifs PPxY du Dd (Garcel et al. 2006), cela en fait un très bon candidat vaccin.

Afin d'évaluer son potentiel en vaccinologie, Villegas-Mendez et al., ont décidé de produire les domaines WW 2, 3 et 4 de NEDD4 avec l'antigène modèle "ovalbumine" pour le fixer au Dd (WW-OVA/Dd) (Figure 22A). Tout d'abord, des souris naïves ont été immunisées avec le complexe WW-OVA/Dd. Ces souris ont déclenché une réponse lymphocyte CD8+ spécifique dirigée contre l'antigène OVA (Figure 22B). De plus, ces lymphocytes ont eu un effet cytotoxique spécifique dirigé contre les cellules de mélanome B16 exprimant à leurs surfaces l'antigène OVA (B16-OVA). Afin de tester l'efficacité de ce vaccin, de nouvelles souris ont été immunisées par 2 injections 14 et 7 jours avant une injection de cellules cancéreuses B16 exprimant ou non l'antigène OVA (B16-OVA). De manière remarquable, dans le groupe essai, 1 seule souris sur les 10 immunisées avec le complexe a développé une tumeur et les 9 autres ont survécu plusieurs mois alors que dans le groupe contrôle négatif, la survie ne dépassait pas 20 jours (Figure 22C) (Villegas-Mendez et al. 2010). Ces expériences mettent en avant le fort potentiel du Dd dans le domaine vaccinal.

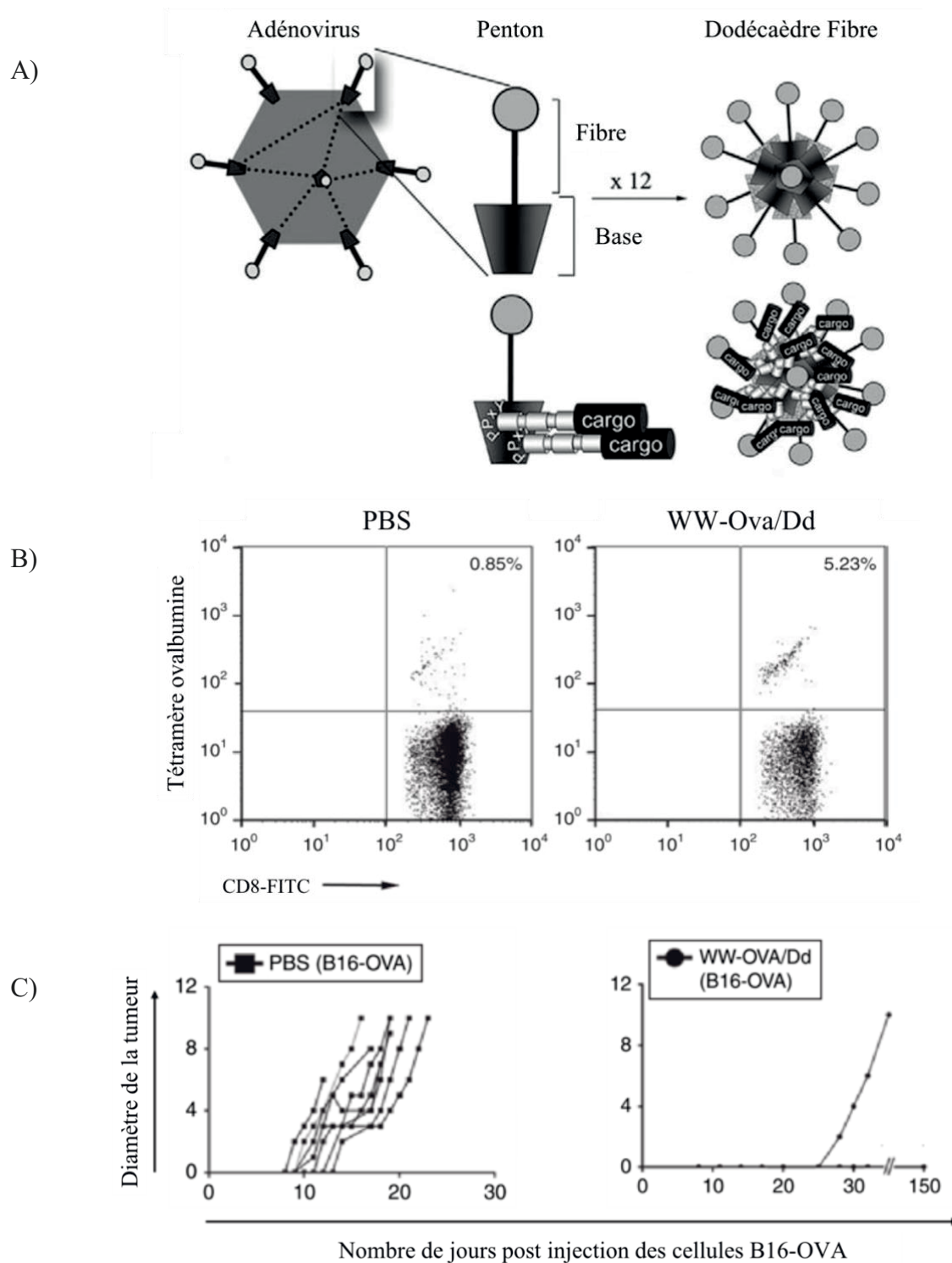


Figure 22 : Le Dd en vaccinologie

A) Fabrication du vecteur WW-OVA/Dd : Trois des 4 domaines WW de NEDD4 ont été fusionnés à l'antigène $^{248}\text{OVA}^{376}$ (noté « cargo ») afin d'être porté et présenté par le DF de façon multivalente. B) Évaluation du nombre de lymphocyte CD8⁺ spécifique de l'antigène OVA dans les splénocytes de souris immunisée avec du PBS (à gauche) ou WW-OVA/Dd (à droite). C) Suivi de la croissance tumorale : Toutes les souris ayant été traitées avec du PBS développent des tumeurs quelques jours seulement après injection des cellules B16-OVA. Chez les souris immunisées avec WW-OVA/Dd, seule une souris sur 10 en développe et beaucoup plus tardivement (J25 post injection) (Extrait et modifié de (Villegas-Mendez et al. 2010) et (Villegas-Méndez et al. 2012))

III. Contexte et objectifs de la thèse

Les dodécaèdres des HAdV est un sujet qui est étudié de manière intensive au laboratoire depuis une vingtaine d'années. Plusieurs travaux ont abouti à la résolution de la structure des dodécaèdres de différents sérotypes d'HAdV. Malgré tous, le rôle de cette protéine produite naturellement au cours du cycle viral de certains adénovirus reste très peu décrit dans la littérature. Plusieurs études ont toutefois permis de démontrer que les dodécaèdres issus de l'HAdV3 possèdent un fort potentiel en tant que vecteur de protéines ou d'acide nucléique. La vectorisation de protéine d'intérêt thérapeutique grâce aux Dds a même démontré une grande efficacité dans le domaine de l'immunothérapie anti cancéreuse. Cependant, plusieurs faiblesses limitent jusqu'aujourd'hui son application thérapeutique à l'Homme notamment à cause de l'utilisation de domaine WW d'origine humaine et l'impossibilité de maîtriser la valence des ligands à la surface du Dd. Dans ce cadre-là, mes travaux de thèse ont consisté à concevoir un vecteur destiné à présenter des ligands de manière multivalente et dont le mode d'attachement et l'indice de valence sont connus et maîtrisés. Au cours de ces 3 années, nous nous sommes donc attachés à modifier et caractériser les dodécaèdres bases issus de l'HAdV3 afin de produire un vecteur multi-épitopique stable pouvant être utilisé dans plusieurs domaines tel que la vaccinologie et l'immunothérapie appelé ADDomer (Adénovirus Dodécamère)

MATERIELS ET METHODES

I. Biologie cellulaire

1. Culture cellulaire

1.1. Cellules HeLa

Les cellules HeLa, cellules issues d'un carcinome humain du col de l'utérus, ont été cultivées en flasques en plastique de 75 cm² (Falcon™) à bouchons ventilés dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du « dulbecco's modified eagle's medium » (DMEM, Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, GE Healthcare Life Sciences) et de 2 antibiotiques : de la pénicilline à 50 unités par mL et de la streptomycine à 50 µg/mL (Gibco®). Les cellules sont divisées par traitement à la trypsine contenant 0,25% d'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA, Gibco®) toutes les 48-72h au 1/10^{ème}.

1.2. Cellules d'insecte

Au cours de cette étude, nous avons utilisé 2 types de cellules d'insecte. Les cellules SF21, cellules issues du tissu ovarien de nymphes du légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*), et les cellules Hi5 qui sont des cellules d'insectes issues du tissu ovarien de la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*). Les cellules de lépidoptères (papillons) ont été cultivées en flasque en verre sous agitation dans une pièce thermostatée à 26°C. Le milieu de culture utilisé est du Sf-900™ II SFM (Gibco®) pour les SF21 et du Express Five™ SFM (Gibco®) supplémenté avec de la L-Glutamine (Gibco®) à 15 mM. Elles ont été divisées toutes les 48-72h afin de maintenir une densité comprise entre 0,5 et 3 X 10⁶ cellules / mL.

2. Production de protéines

2.1. En système baculovirus

2.1.1. Transformation bactérienne

50 µL de bactéries compétentes DH10EMBacY (fournis par l'European Molecular Biology Laboratory EMBL) ont été incubé avec 1 µg de plasmide pACEBac (fourni par l'EMBL) codant pour le gène d'intérêt ½ heure à 4°C. Le choc thermique est effectué en plaçant

le mix à 42°C pendant 45 secondes avant de le remettre à 4°C pour 2 minutes. 400 µL de LB sont alors rajoutés au mix puis placés à 37°C sur la nuit et sous agitation.

2.1.2. Sélection des colonies d'intérêt et pré-culture

135 µL de dilution allant de 10^0 à 10^{-3} de la transformation bactérienne sont étalés sur LB agar + kanamycine + tétracycline + gentamicine + IPTG + BluOgal et incubés sur la nuit à 37°C. Le lendemain 5 colonies blanches et 1 colonie bleue sont repiquées sur LB agar + kanamycine + tétracycline + gentamicine + IPTG sur la nuit à 37°C pour confirmer le phénotype. Ensuite, les colonies d'intérêt sont à nouveau repiquées et mises en pré-culture dans 3mL de LB liquide contenant + kanamycine + tétracycline + gentamicine sur la nuit sous agitation à 37°C dans des tubes falcon de 14mL stériles.

2.1.3. Purification du bacmide, transfection des cellules SF21 et amplification du baculovirus

Pour purifier le bacmide, les tubes de pré-culture sont centrifugés 10 minutes à 4000 tours par minute (rpm pour rotation par minute) et le milieu de culture est jeté afin de ne garder que les bactéries. La procédure de purification du bacmide se fait alors comme ceci :

- Remettre le culot en suspension dans 300 µL de tampon P1 (QIAamp DNA Mini Kit, Quiagen) et transférer dans un tube eppendorf de 1,5mL propre.
- Ajouter 300 µL de tampon P2 (QIAamp DNA Mini Kit, Quiagen) et retourner délicatement le tube 5 fois.
- Ajouter 300 µL de tampon N3 (QIAamp DNA Mini Kit, Quiagen) et retourner délicatement le tube 5 fois.
- Centrifuger 10 minutes à vitesse maximum.
- Récupérer le surnageant en une fois et le transférer dans un tube eppendorf de 1,5mL propre.
- Centrifuger 5 minutes à vitesse maximum.
- Récupérer le surnageant en une fois et le transférer à nouveau dans un tube eppendorf de 1,5mL propre.
- Ajouter 700 µL d'isopropanol 100% et centrifuger 10 minutes à vitesse maximum.
- Éliminer délicatement le surnageant et ajouter goutte à goutte 200 µL d'éthanol 70% en tenant le tube de manière à ce que le culot soit sur le côté opposé (de là où les gouttes arrivent).

- Centrifuger 5 minutes à vitesse maximum.
- Retirer l'éthanol et ajouter de nouveau 50 μL d'éthanol de la même façon que précédemment.

Une fois le bacmide purifié, il faut le transfecter dans les cellules SF21 afin de créer le baculovirus codant le gène d'intérêt. Pour cela :

- Retirer sous hotte à flux laminaire les 50 μL d'éthanol, laisser sécher 10 minutes puis ajouter 20 μL d'eau stérile.
- Remettre en suspension le culot en tapotant le tubes 10 fois sur la hotte puis ajouter 200 μL de milieu Sf-900™ II SFM (Gibco®) (= tube 1).
- Dans un tube stérile, préparer un mix contenant 200 μL de milieu + 20 μL de « XtremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent » (Sigma-Aldrich) (= tube 2).
- Ajouter 100 μL du tube 2 dans le tube 1 (= tube 3).
- Déposer goutte à goutte et de manière homogène 150 μL du tube 3 sur 3 mL de cellules SF21 à $0,5 \times 10^6$ cellules par mL en culture dans une boîte 6 puits (falcon) et laisser incubé 60 heures à 26°C à l'abri de la lumière.
- Au bout de 60h, récupérer les 3 mL de milieu de culture (= V_0) et ensemencer 25 mL de cellules Hi5 à $0,5 \times 10^6$ cellules par mL dans un flasque en verre.
- Toutes les 24 heures, faire un compte des cellules et ajuster la densité à $0,5 \times 10^6$ cellules par mL dans 50 mL final jusqu'à ce que les cellules arrêtent de se diviser.
- 24 heures après l'arrêt de la division, récupérer les 50 mL de culture, centrifuger 10 minutes à 100g et récupérer le surnageant (= V_1)

2.1.4. *Production en Hi5*

Pour produire la protéine d'intérêt, les cellules Hi5 à une densité de $0,5 \times 10^6$ cellules par mL sont infectées avec 8 μL de V_1 pour 10^6 cellules. Trois jours après l'infection, 100mL de cellules sont culottées dans des tubes en polystyrène de 50 mL (Becton-Dickinson) par centrifugation 15 minutes à 1000g puis congelées à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2. Culture bactérienne

2.2.1. *Les bactéries*

L'amplification de plasmide s'est effectuée dans d'*Escherichia Coli* DH5 α , tandis que la production des protéines recombinantes s'est faite en BL21-DE3.

2.2.2. *Le milieu de culture*

Dans les 2 cas, les cellules ont été cultivées dans du milieu liquide Luria-Bertani (LB : 10 g/L de peptone, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de chlorure de sodium). Pour la sélection antibiotique des bactéries ayant intégré le plasmide, nous avons utilisé du milieu LB agar (LB + 15 g/L d'agar) supplémenté avec l'antibiotique nécessaire (à 100 µg/mL pour l'ampicilline, 50 µg/mL pour la kanamycine et 35 µg/mL pour le chloramphénicol) en fonction du plasmide.

2.2.3. *La transformation bactérienne*

50 µL de bactéries compétentes ont été incubé avec 100ng de plasmide d'intérêt pendant ½ heure à 4°C. Le choc thermique est effectué en plaçant le mix à 42°C pendant 45 secondes avant de le remettre à 4°C pour 5 minutes. Après addition de 950 µL de LB, les bactéries ont été incubées 1 heure à 37°C sous agitation puis 100 µL ont été étalés sur une boîte de LB agar contenant l'antibiotique approprié à la sélection.

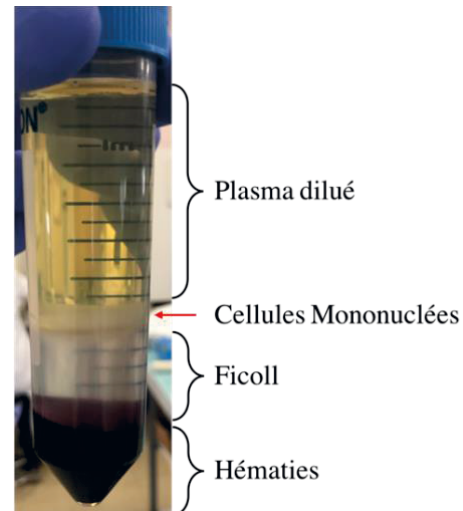
2.2.4. *L'amplification, la pré-culture et la production*

Pour amplifier le plasmide ou préparer une pré-culture, 3 colonies différentes ayant incorporé le plasmide ont été piquées dans 3mL de LB + antibiotique à 37°C sous agitation à 180 rpm durant 16 heure. Pour produire la protéine recombinante, 3mL de pré-culture sont ensemencés dans 2L de LB + antibiotique puis placés sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} soit comprise entre 0,6 et 0,8. La production a été réalisée à 16°C sous agitation durant 16 heures après induction à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1mM. Une fois la production terminée, les bactéries sont culottées par centrifugation à 1000g pendant 10 minutes puis congelées à -20°C si l'utilisation est différée de la production.

3. Production de cellules dendritiques dérivées de monocytes

3.1. Isolement de la population monocyttaire

Afin d'étudier le comportement de l'ADDOmer dans les cellules de l'immunité, nous avons travaillé avec des monocytes humains de donneurs sains. Pour cela, un prélèvement de sang total a été fait sur un donneur volontaire à l'Établissement Français du Sang de Grenoble (EFS) et les cellules mononuclées ont été isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll. Le gradient de Ficoll permet la séparation de la population mononuclée des autres composants du sang en fonction de leurs densités. En effet, la solution de



*Gradient de Ficoll après centrifugation :
Les cellules du sang ont été séparées
suivant leurs densités.*

Ficoll est de densité égale à 1,077 tandis que celles des lymphocytes, monocytes, plaquettes est $< 1,077$ et celle des hématies et granulocytes neutrophiles est $> 1,077$. Cette caractéristique va permettre de retrouver les cellules mononuclées et les plaquettes à la surface du Ficoll tandis que les hématies vont sédimenter dans le fond du tube. Le protocole de préparation des cellules d'intérêt se fait comme décrit ci-dessous :

- Diluer le sang total volume à volume dans du PBS.
- Déposer 15 mL de Ficoll (Sigma Aldrich) dans un tube Falcon (FalconTM) de 50 mL puis déposer 35 mL de sang dilué à la surface du gradient.
- Centrifuger 20 minutes à 800g à température ambiante puis collecter l'anneau cellulaire contenant les cellules mononuclées dans un tube en polystyrène de 15mL (Falcon).
- Laver les cellules avec 10 mL de PBS puis centrifuger 10 minutes à 400g à 4°C.
- Jeter le surnageant par retournement.
- Laver à nouveau les cellules avec 10 mL de PBS puis centrifuger 10 minutes à 200 g à 4°C, pour éliminer les plaquettes qui resteront à cette étape dans le surnageant.
- Reprendre le culot dans 2 mL de PBS

Une fois les cellules mononuclées collectées, les monocytes sont isolés en utilisant un kit de tri de monocytes humains en suivant les indications du fabricant (EasySep™, Stemcell Technologie). Ce kit permet d'isoler les monocytes CD14 + CD16- des autres cellules mononuclées par sélection immuno-magnétique négative. La procédure consiste à capter les cellules indésirables avec des anticorps couplés à des billes magnétiques. Les cellules retenues magnétiquement sont alors séparées des cellules désirées en utilisant un aimant, ce qui permet de récupérer les monocytes par retournement dans un nouveau tube. La pureté des monocytes a été vérifiée par marquage CD14.

3.2. Différentiation des monocytes en cellules dendritiques

Afin d'étudier le comportement de l'ADDomer sur les cellules dendritiques dérivées de monocytes, nous avons mis en culture 10^7 monocytes dans des flasques en plastique de 75 cm² (Falcon™) à bouchons ventilés dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂. Nous avons utilisé du milieu "Roswell Park Memorial Institute" (RPMI) complet supplémenté de 10% de SVF. Le milieu complet est préparé selon le tableau ci-dessous :

Produit	Dilution	Concentration finale	Fournisseur	Référence
RPMI 1640 GLUTAMAX	-	1x	Invitrogen (GIBCO)	72400-021
MEM (100X) Non essential amino acids	1/100	1X	Invitrogen (GIBCO)	11140-035
Gentamicin (10 mg/ml)	1/500	20 µg/ml	Invitrogen (GIBCO)	15710-049
Sodium Pyruvate (100 mM)	1/100	1 mM	SIGMA	S-8636

Les monocytes sont capables de se différencier en cellules dendritiques en les traitant avec le « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) et l'interleukine-4 (IL-4). Ainsi, les monocytes précédemment isolés ont été mis en culture avec du GM-CSF (100 ng/mL) et de l'IL-4 (25 ng/mL). De l'IL-4 (25ng/mL) a été rajoutée à J4 (25 ng/mL). A J6, les cellules dendritiques dérivées de monocytes ont été collectées dans le milieu de culture et sont

alors à l'état immature. La différenciation des cellules dendritiques a été contrôlée par marquage CD14/CD209

II. Biochimie

1. Analyse des protéines

1.1. Électrophorèse des protéines

L'électrophorèse des protéines sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires. Les protéines sont dénaturées et chargées négativement dans du bleu de Laemmli 4X (Biorad) auquel a été ajouté 10% de β -mercapto-éthanol 14M (β metOH) sous l'action de la chaleur (5 minutes à 95°C), du β metOH et du SDS. Les échantillons sont alors déposés sur un gel d'acrylamide-bis acrylamide (10 ou 12%) pré-coulés (Biorad) puis soumis à un courant électrique constant de 200 volts durant environ 35 minutes. Grâce à ce champ électrique, le complexe chargé négativement migre alors de la cathode vers l'anode et la vitesse de migration est proportionnelle au poids moléculaire. La coloration du gel est faite à l'« InstantBlue » (Expedeon) pendant 1h à température ambiante sous agitation et la décoloration est réalisée à l'eau distillée par 2 bains d'une heure chacun.

1.2. Westernblot

1.2.1. *Transfert des protéines*

Pour détecter les protéines par westernblot, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose après séparation sur gels SDS-PAGE puis détectées à l'aide d'anticorps spécifiques. Nous avons pour cela utilisé le kit « Trans-Blot Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Packs » (Biorad) et le Trans-Blot® Turbo™ (Biorad) avec le programme « mixed Molecular weight » : 7 minutes, 1.3 Ampère, 25 Volts.

1.2.2. *Saturation de la membrane*

Afin de limiter la reconnaissance non spécifique de protéine sur la membrane par les anticorps, celle-ci est rincée à l'eau distillée 2 fois puis saturée avec des protéines de lait. La saturation est faite à température ambiante et sous agitation durant 45 minutes avec du PBS-

Tween (137mM NaCl, 10mM PO₄³⁻, 2,7mM KCl, pH 7,4 + 0,05% Tween20 (Sigma)) supplémentée de 10% de poudre de lait (Régilait). Ensuite, la membrane est rincée par 3 cycles de 10 minutes dans du PBS-Tween sous agitation à température ambiante.

1.2.3. *Détection des protéines*

➤ Les dodécaèdres

Pour détecter les Dds par westernblot, les étapes sont les suivantes :

- Incuber la membrane avec un sérum polyclonal de lapin immunisé avec le Dd dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween. Ce premier anticorps a été incubé 1 heure à température ambiante et sous agitation.
- Rincer par 3 cycles de 10 minutes la membrane dans du PBS-Tween sous agitation à température ambiante.
- Incuber la membrane avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre les anticorps de lapin (MαR) couplé au fluorochrome alexa488 (Thermofisher) ou Cyanine-3 (Thermofisher) (MαR-alexa488 ou MαR-Cyanine-3) dilué au 1/5000^{ème} dans du PBS-Tween 30 minutes à température ambiante.
- Rincer par 3 cycles de 10 minutes la membrane dans du PBS-Tween sous agitation à température ambiante.
- La détection des anticorps est finalement réalisée sur un « Typhoon Trio Imager Scanner Fluorescence » (GE HealthCare) grâce au logiciel ImageQ.

➤ La biotine

Pour détecter la biotine par westernblot, les étapes sont les suivantes :

- Incuber la membrane de l'avidine couplée à de l'alexa488 dilué au 1/50000^{ème} dans du PBS-Tween.
- Rincer par 3 cycles de 10 minutes la membrane dans du PBS-Tween sous agitation à température ambiante.
- La détection des anticorps est finalement réalisée sur un « Typhoon Trio Imager Scanner Fluorescence » (GE HealthCare) grâce au logiciel ImageQuant (GE HealthCare).

2. Purification des protéines

2.1. Produites en cellules d'insectes

2.1.1. *Purification par ultracentrifugation sur gradient de saccharose*

La purification de Dd se fait sur gradient discontinu de saccharose. Des solutions contenant 20, 25, 30, 35, 40% de saccharose sont préparées dans du tampon 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10% glycérol. Le gradient est ensuite coulé dans des tubes UltraClear de 13,2mL (Beckman-Coulter) par couches successives de 1,8 mL en partant de 40 jusqu'à 20%.

100 mL de cellules Hi5 sont lysés par 3 cycles de congélation/décongélation (Azote liquide / 37°C) dans 3 mL de tampon « phosphate buffer saline » (PBS) hypotonique : 46mM NaCl, 3,3mM PO_4^{3-} , 0,9mM KCl, pH 7,4 + un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Un cycle de décongélation prend fin dès que le dernier glaçon a fondu. Le lysat est ensuite centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La fraction soluble, contenant la protéine d'intérêt, est alors récupérée et déposée délicatement sur le haut du gradient de saccharose. Le tube est alors monté sur un rotor SW41Ti (Beckman-Coulter) puis centrifugé 18 heures à 41000 rpm à une température de 4°C.

Après ultracentrifugation, le gradient est divisé en ~ 12 fractions de 1,1mL. 20µL de chaque fraction sont alors déposés sur un gel SDS-PAGE 12% précasté (Biorad) pour déterminer quelles sont celles qui contiennent les Dds. Les fractions d'intérêt sont réunies dans un boudin de dialyse ayant un seuil de 10 kDa (SpectrumLabs) puis dialysées contre du tampon 10mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,4. Deux bains de 1L sont nécessaires pour enlever tout le saccharose. Ils sont réalisés à 4°C et à l'abri de la lumière, le premier dure 4 heures et le second toute la nuit.

2.1.2. *Chromatographie échangeuse d'anions*

A pH 7,4, les dodécaèdres sont chargés négativement ($\text{pH}_i = 5,4$). Une chromatographie d'affinité échangeuse d'anions sur colonne de Q Sepharose (Mini Macro-Prep Hi-Q, Biorad) a donc été utilisée pour purifier dans un 2^{ème} temps les Dds. La matrice Q Sepharose est un composé chimique chargé positivement qui va donc être capable de retenir les Dds passant à travers. Une élution par gradient salin est réalisée pour les décrocher. Elle est réalisée sur un automate « NGC™ Medium-Pressure Liquid Chromatography Systems » (Biorad). La solution

de Dd dialysée est chargée sur la colonne à un débit de 1mL / minute préalablement équilibrée en tampon 10mM HEPES, 50mM NaCl (TpA) (filtré et dégazé). Il faut ensuite faire passer 10mL de TpA à travers la colonne afin de décrocher le maximum de protéines contaminantes possible. Ensuite, l'élution par gradient salin est réalisée en 2 étapes : Le gradient 1 allant de 0 à 500mM NaCl durant 30 minutes et le gradient 2 allant de 500mM à 1M NaCl pendant 10 minutes. La collection se fait par fraction de 1mL et la détection des protéines et/ou acides nucléiques élués est faite par un spectrophotomètre lisant les absorbances à $\lambda = 280$ et 260nm.

2.2. Produites en bactéries

La purification de la protéine HAdV5 Fibre TRAIL (HAdV5FT) se fait par chromatographie d'affinité sur colonne contenant 1mL de résine nickel (Biorad) grâce la présence sur le côté N-Terminal d'une étiquette poly-histidine (His-Tag). Le His-Tag possède une affinité de l'ordre du micromolaire pour les ions nickels ce qui va retenir la protéine dans la résine. La résine est ensuite lavée puis la protéine est éluée plusieurs lavages avec du tampon contenant différentes concentrations d'imidazole.

Tout d'abord, les bactéries ont été remises en suspension dans 50mL de tampon de lyse (10mM Hepes, 150mM NaCl, 10mM Imidazole, inhibiteur de protéases (Roche)). La lyse a été effectuée à 4°C par 3 cycles de sonication (2 minutes, amplitude 50%, 1 seconde "ON" / 1 seconde "OFF") espacés par 2 minutes de pause. Après sonication, la solution a été centrifugée à 20000 tours/minute pendant 20 minutes et la fraction soluble a été déposée sur colonne de nickel préalablement équilibrée en tampon 10mM Hepes, 150mM NaCl, 10mM Imidazole. La colonne a été lavée une première fois avec 5 mL de tampon 10mM Hepes, 150mM NaCl, 20mM Imidazole puis une deuxième fois avec 5mL de tampon 10mM Hepes, 150mM NaCl, 50mM Imidazole. Finalement, la protéine a été éluée avec 10 X 1mL de tampon 10mM Hepes, 150mM NaCl, 250mM Imidazole. Après analyse sur gel SDS-PAGE, les fractions contenant la protéine HAdV5FT ont été rassemblées.

3. Test "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA)

La méthode ELISA est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Nous avons ici cherché à détecter la présence d'anticorps dans le sérum de souris dirigés contre un antigène spécifique. Pour cela, 100 μ L / puits d'une solution à 1 μ g/mL de l'antigène à détecter en PBS (Life Technologies) ont

été déposés dans les puits d'une plaque 96 puits (Maxisorp Nunc) puis incubés sur la nuit à température ambiante. Les puits ont ensuite été saturés avec 200 μ L de lait (Régilait) dilué à 10% dans du PBS (Life Technologies) pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages avec 200 μ L / puit de PBS-Tween 0,05% (Euromedex) ont été effectués puis 100 μ L / puits de sérum de souris préparé comme décrit ci-après (*Préparation du sérum des souris*) ont été déposés dans les puits. Après lavages, 100 μ L / puits d'anticorps anti-souris conjugué à l'enzyme "horseradish peroxidase" (IgG-HRP (South BioTech #1030-05)) et dilué à 0.1 μ g/mL en PBS-BSA 1% (Euromedex) ont été incubés 1 heure à 37°C. Après lavages, la révélation a été effectuée en utilisant le kit "TMB Substract reagent Set" (Becton Dickinson Biosciences #555214) puis stoppée par addition de 100 μ L / puit de H₂SO₄ 1M. La lecture des plaques a été réalisée sur "Multiskan FC" (ThermoScientific) et les graphiques générés sur le logiciel Excel.

- *Préparation du sérum des souris* : Le sang des souris a été prélevé dans la veine rétro-orbitale, puis déposé dans un tube de 1.5mL (Eppendorf). Les tubes ont ensuite été incubés 30 minutes à 37°C et centrifugés 10 minutes à 10000g. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube puis de nouveau centrifugé 10 minutes à 10000g. Le surnageant a ensuite été dilué en fonction du test à réaliser.

4. Immunofluorescence

4.1. Internalisation de l'ADDomer dans les cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été cultivées pendant une nuit dans des boîtes de culture de 35 mm de diamètre à fond en verre de 1cm² (Nunc) de façon à obtenir une confluence de 80%. Le milieu a alors été retiré puis les cellules attachées sur le verre ont été incubées pendant 1 heure à 37°C avec 50 μ L de milieu de culture contenant 1 μ g d'ADDomer. Ensuite, trois lavages au PBS ont été effectués pour ôter le milieu de culture contenant les ADDomers non internalisés. Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées par addition de 1mL de méthanol froid (-20°) à température ambiante durant 10 minutes. Pour détecter les ADDomers dans les cellules, nous avons utilisé une technique d'immunomarquage indirecte. Pour cela, après lavage du méthanol, 1mL d'anticorps de lapin dirigé contre le dodécaèdre de l'HAdV3 et dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS a été incubé pendant 1h à température ambiante. Après lavage, 1mL d'un anticorps de chèvre anti anticorps de lapin conjugué à l'Alexa488 ou à la cyanine5 (Thermofisher Scientific) et dilué au 1/500 a été incubé sur les cellules 1/2 heure à température

ambiante. Après lavage, les noyaux ont été marqués avec 1 mL de colorant de hoechst dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS durant 3 minutes. Les cellules ont finalement été lavées puis observées au microscope inversé (V-M4D, Olympus et Perkin-Elmer). Les images ont été acquises par une caméra sCMOS (Hamamtsu Orca Flash4) et analysées sur le logiciel “Volocity”.

4.2. Internalisation de l’ADDomer par les monocytes et MoDC

4.2.1. *Marquage de l’ADDomer*

Pour suivre l’internalisation de l’ADDomer par cytométrie en flux et par microscopie, nous avons tout d’abord marqué notre ADDomer avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 NHS Ester (ThermoFisher Scientific). L’Alexa Fluor 488 est un colorant brillant, vert fluorescent, avec un niveau d’excitation parfaitement adapté à la ligne laser de 488 nm. L’ester NHS de l’Alexa Fluor 488 permet de conjuguer ce fluorochrome à l’ADDomer en utilisant des amines primaires (R-NH₂) de notre vecteur. Nous avons alors mis en contact 2 heures à température ambiante et à l’abri de la lumière 4 µg d’Alexa Fluor 488 avec 200 µg d’ADDomer. Pour enlever l’Alexa Fluor 488 libre, l’ADDomer-Alexa488 a été dialysé par 6 bains de 12 heures chacun contre du PBS à 4°C et à l’abri de la lumière.

4.2.2. *Suivi de l’internalisation par cytométrie en flux*

La cytométrie de flux est une technique qui permet l’analyse d’une suspension cellulaire concentrée en un flux à cellule unique qui passe à travers une source lumineuse (généralement un rayon laser). La lumière diffusée et émise est ensuite mesurée grâce à un éventail de détecteurs et les mesures obtenues sont utilisées pour générer des ensembles de données à paramètres multiples. Ces paramètres représentent les caractéristiques physiques des cellules et leurs propriétés fluorescentes. La dimension et la granularité des cellules peuvent être appréciées en fonction des caractéristiques de leur dispersion lumineuse frontale et latérale (paramètres fsc et ssc). La caractérisation des cellules et/ou individualisation des diverses protéines peut être rendue encore plus précise par la coloration des cellules avec des anticorps, protéines, ou molécules à marquage fluorescent qui identifient les composants cellulaires et/ou leur intégration. Les marqueurs fluorescents acceptent l’énergie lumineuse à une longueur d’onde donnée (excitation) et émettent à une longueur d’onde plus élevée (émission). La lumière fluorescente, qui est émise par ces marqueurs lorsqu’ils sont excités par une source lumineuse adéquate, est canalisée par des filtres adaptés et les signaux sont récoltés par un

assortiment de détecteurs. Dans notre étude, nous avons précédemment marqué l'ADDomer avec de l'Alexa Fluor 488 et nous avons monitoré l'internalisation de l'ADDomer en utilisant le protocole suivant :

- Mettre en contact 10 µg d'ADDomer avec 10^5 cellules (monocytes ou MoDC).
- Laver les cellules avec 3 mL de PBS 2% SVF puis les centrifuger 5 minutes à 600g à température ambiante.
- Jeter le surnageant par retournement.
- Reprendre le culot dans 500 µL de PBS 2% SVF puis passer les cellules au cytomètre.

Afin de se débarrasser du signal à la surface de la cellule correspondant à l'ADDomer non internalisé, nous avons ensuite traité les cellules précédemment analysées à la trypsine. Pour cela il faut :

- Centrifuger les cellules 5 minutes à 600g à température ambiante.
- Jeter le surnageant par retournement.
- Reprendre le culot dans 500 µL de trypsine puis incubé 5 minutes à 37°C.
- Centrifuger les cellules 5 minutes à 600g à température ambiante.
- Éliminer le surnageant par retournement.
- Reprendre le culot dans 500 µL de PBS 2% SVF puis passer les cellules au cytomètre. 10^4 cellules d'intérêt ont été analysées par acquisition.

Les données ont été acquises sur un cytomètre FACS Canto II (Becton Dickinson) grâce au logiciel "FACS Diva" et traité sur le logiciel "FlowJo".

4.2.3. Microscopie de fluorescence

Avant passage au microscope, les cellules d'intérêt ont été fixées par addition de "FACSLysing" (contenant du formaldéhyde, Becton Dickinson) avant lavage au PBS comme décrit ci-dessus. Les cellules ont ensuite été montées entre lame et lamelle avant observation au microscope inversé (V-M4D, Olympus et Perkin-Elmer). Les images ont été acquises par une caméra sCMOS (Hamamatsu Orca Flash4) et analysées sur le logiciel "Volocity".

5. La microscopie électronique par coloration négative

L'observation des ADDomer a été réalisée au microscope électronique à transmission (MET-JEOL 1200, EXII). Les échantillons protéiques à une concentration d'environ 200 µg/mL

ont été déposés sur une grille de cuivre couverte d'un film carbone et ont été contrastés par une solution d'acétate d'uranyle.

III. Biophysique

1. La résonance des plasmons de surface (SPR)

La SPR est une technique permettant de mesurer en temps réel les interactions protéine/protéine ou protéine/ligand ainsi que les constantes d'affinités en mesurant la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs.

Les mesures ont été réalisées à 25°C sur un automate Biacore 3000 (GE Healthcare). Nous avons utilisé une "sensorchip" CM5 (GE Healthcare) car elle possède une grande capacité d'immobilisation induit par un degré de carboxyméthylation élevé. Les fonctions carboxyles des pistes 1 et 2 ont été activées en fonction esters grâce à l'ajout de 50 µL d'EDC/NHS injectés à 5 µL /min pendant 10 minutes. L'ADDomer a été dilué extemporanément à 30 µg/mL dans du tampon 10mM d'acétate de sodium, pH 4.5 et immobilisé à forte densité (10 000RU) sur la piste 2 dans du tampon HBS-P (10mM HEPES, 145mM NaCl, 0.005% surfactant P20, pH 7.4). Des concentrations croissantes de peptides Stickchik-Biot ont été injectées sur la piste 1 et la piste 2 et les interactions ont été mesurées en tampon HBS-P avec un débit de 15 µL/min. La durée des phases d'association et de dissociation ont été fixées respectivement à 3 minutes et 2,5 minutes. Les surfaces ont été régénérées par des injections brèves de 20 secondes de SDS 0,05%

Les courbes ont été analysées avec le logiciel BIAevaluation (GE Healthcare). Les constantes d'association et de dissociation ont été déterminées en faisant un "fit" global des données et en utilisant le modèle 1:1 de Langmuir avec dérive de la ligne de base.

2. Chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multi-angle (SEC-MALLS)

La diffusion de la lumière multi-angle (MALLS) permet d'estimer la masse moléculaire absolue et la taille moyenne des particules en solution en détectant la manière dont elles diffusent la lumière. Le terme "multi-angle" se réfère à la détection de la lumière diffusée à différents angles discrets. La combinaison de la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) couplée à la diffusion statique en ligne de la lumière laser, à l'indice de réfraction (IR) et à la

détection ultraviolette (UV) est une approche universelle pour déterminer simultanément la masse molaire et la polydispersité de chaque composant d'un échantillon. Indépendamment de la conformation ou des interactions avec la résine des colonnes de chromatographie, la diffusion de la lumière multi-angle fournit une détermination précise du poids moléculaire des protéines et des oligomères et permettent de caractériser la stœchiométrie macromoléculaire.

Avant l'injection, la colonne et les systèmes sont équilibrés dans 5 à 10 volumes de colonne de tampon PBS. 50 µL de l'échantillon protéique concentré à 2 mg/mL ont ensuite été injectés dans une colonne Superdex 200 10/300GL (GE HealthCare). Le débit a été constant et calibré à une vitesse de 0,5 mL/min. La prédiction de masse a été réalisée avec le logiciel Astra (Wyatt Technologies) et les courbes ont été représentées avec Graphpad (Prism).

3. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse des échantillons de protéines ont été mesurés avec un spectromètre de masse Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) fonctionnant en mode ions positifs linéaires. L'étalonnage de masse externe de l'instrument a été effectué en utilisant des étalons de calibrage protéique de Bruker Daltonics fournissant une précision de masse <1000 ppm. Les échantillons de protéines ont été mélangés dans un rapport 1:1 (v:v) avec la matrice d'acide sinapinique (Sigma, 10 mg/mL dans de l'eau / acétonitrile / acide trifluoroacétique, 50/50/0,1 ; v/v/v). 2 µL de ce mélange ont ensuite été déposés sur la cible et laissés sécher à l'air. Les données de spectres de masse ont finalement été traitées avec le logiciel Flexanalysis (v.3.0, Bruker Daltonics).

IV. Expérimentations animales

Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées à l'“Institut for Advanced Biosciences” (Grenoble) ainsi qu'à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (Lyon), deux laboratoires certifiés par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur et régulièrement contrôlés par la Direction Départementale de Protection de la Population (Numéro d'agrément C 69 123 0303 et C38 516 10001). Les expérimentations animales ont été réalisées selon les règles en vigueur et dans le respect de l'éthique de l'expérimentation animale.

1. Biodistribution

Quatre groupes de 4 souris BALB/c (Laboratoires Janvier, Saint Berthevin, France) ont été injectés en sous cutanée ou en intramusculaire avec respectivement 100 et 10 μ L d'ADDomer à 0,1 et 1 mg/mL marqués à l'Alexa680. A T1h ou T5h, les animaux ont été anesthésiés avec un mélange gazeux isoflurane / oxygène (5/95) puis euthanasiés avec un mélange gazeux d'oxygène / dioxyde de carbone (20/80). Ensuite les organes ont été prélevés puis imagés sur l'appareil d'imagerie Fluobeam700 (Fluoptics) en excitant à une longueur d'onde $\lambda_1 = 680\text{nm}$ et en collectant l'émission $\lambda_2 > 700\text{nm}$.

2. Immunisation

Cinq groupes de 8 souris ont été injectées par voie sous cutanée avec soit 100 μ L d'ADDomer, soit 100 μ L d'ADDomer "Uncut", soit 100 μ L d'ADDomer "Cut", soit 100 μ L d'une formulation d'acide polylactique + peptide E2EP3, soit 100 μ L d'une formulation de KLH (Hémocyanine de *Megathura crenulata* = Contrôle positif ; Inject EDC mcKLH Spin Kit #77671 ThermoFisher) + peptide E2EP3. Chaque préparation a été faite de manière à vectoriser 10^{14} épitopes / injection. A J-1 avant injection, un prélèvement sanguin et une préparation des sérums a été faite comme décrit ci-avant (II. 3.). A J0, chaque groupe a reçu une injection de vecteur. A J13, un prélèvement sanguin et une préparation des sérums a été faite avant un "boost" à J14 (=S2). Ce schéma s'est répété jusqu'à S6 et l'euthanasie des animaux. Chaque lot vaccinal a été contrôlé en endotoxines par le test "*Limulus Amebocyte Lysate*" (EndoSafe PTS (Charles River))

V. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en écart-type moyen (SD). Une analyse de variance à deux paramètres (ANOVA) a été utilisée. Les nombres d'animaux et les valeurs de P sont indiqués dans la légende des figures.

RESULTATS

I. Modification du dodécaèdre base de l'HAdV3

1. Design d'une plateforme versatile : L'ADDomer

Depuis une vingtaine d'années, la conception de macromolécules polyfonctionnelles destinées à présenter des ligands de manière multivalente et à vectoriser des molécules d'intérêt a entraîné le développement de supports et de méthodes de conjugaison aussi diverses que variées. Ces vecteurs sont principalement des protéines, des systèmes polymériques, des nanoparticules, des virus ou encore des petites molécules. Ces objets sont utilisés pour présenter de manière multivalente des ligands et vectoriser des éléments thérapeutiques. Dans le cadre de vecteurs protéiques, certaines protéines globulaires (Immunoglobuline, Albumine, Avidine) ont été utilisées comme supports pour la présentation de plusieurs copies d'un ligand et ceux-ci sont typiquement introduits sur les fonctions nucléophiles de la protéine (résidus lysine, histidine, cystéine ou extrémités N-terminales). Cependant, cette approche conduit à une structure non définie avec un indice de valence imprécis, sans contrôle de la distance entre les ligands ou de leur orientation. L'assemblage symétrique et extrêmement ordonné des 60 monomères identiques du Dd de l'HAdV3 font que celui-ci présente un très grand intérêt en tant que vecteur multivalent thérapeutique.

La conception d'un vecteur protéique basé sur les dodécaèdres bases de l'HAdV3 devait posséder plusieurs caractéristiques. Il a fallu trouver une séquence qu'il était potentiellement possible de modifier dans le monomère de la base du penton ne faisant pas partie des séquences responsables de l'état d'oligomérisation (Cf Introduction II.3). En étudiant la structure primaire de la base du penton des HAdVs, nous avons mis en évidence une forte diversité inter sérotypes dans 2 sites bien définis de la protéine. Ces 2 régions, nommées boucle variable et boucle RGD, sont en effet très inégales en ce qui concerne le nombre de résidus qui les compose (Figure 23A). Entre ces 2 boucles, la boucle RGD est celle qui présente le plus de variabilité. Par exemple, celle de l'HAdV12 est composée de 8 acides aminés tandis que celle de l'HAdV2 en contient 72, ce qui représente une différence d'un facteur 5. Par contre, le nombre de résidus dans la boucle variable diffère beaucoup moins d'un sérotype à l'autre. De manière notable, on peut tout de même constater une différence d'un facteur 2 entre la boucle variable de l'HAdV41 (9 acides aminés) versus celle de l'HAdV3 ou 7 (20 acides aminés). L'attrait de ces régions pour l'insertion de séquences peptidiques d'intérêt est d'autant plus

grand que celles-ci sont exposées à la surface des Dds (Figure 23B) et les données structurales disponibles semblent indiquer qu'elles ne contiennent pas de structure secondaire. Ces 2 régions, hyper variables et exposées de manière privilégiée, ont donc été ciblées afin d'être agrandies, rétrécies voire complètement changées en fonction de l'utilisation dont nous aurons besoin au cours de ces travaux.

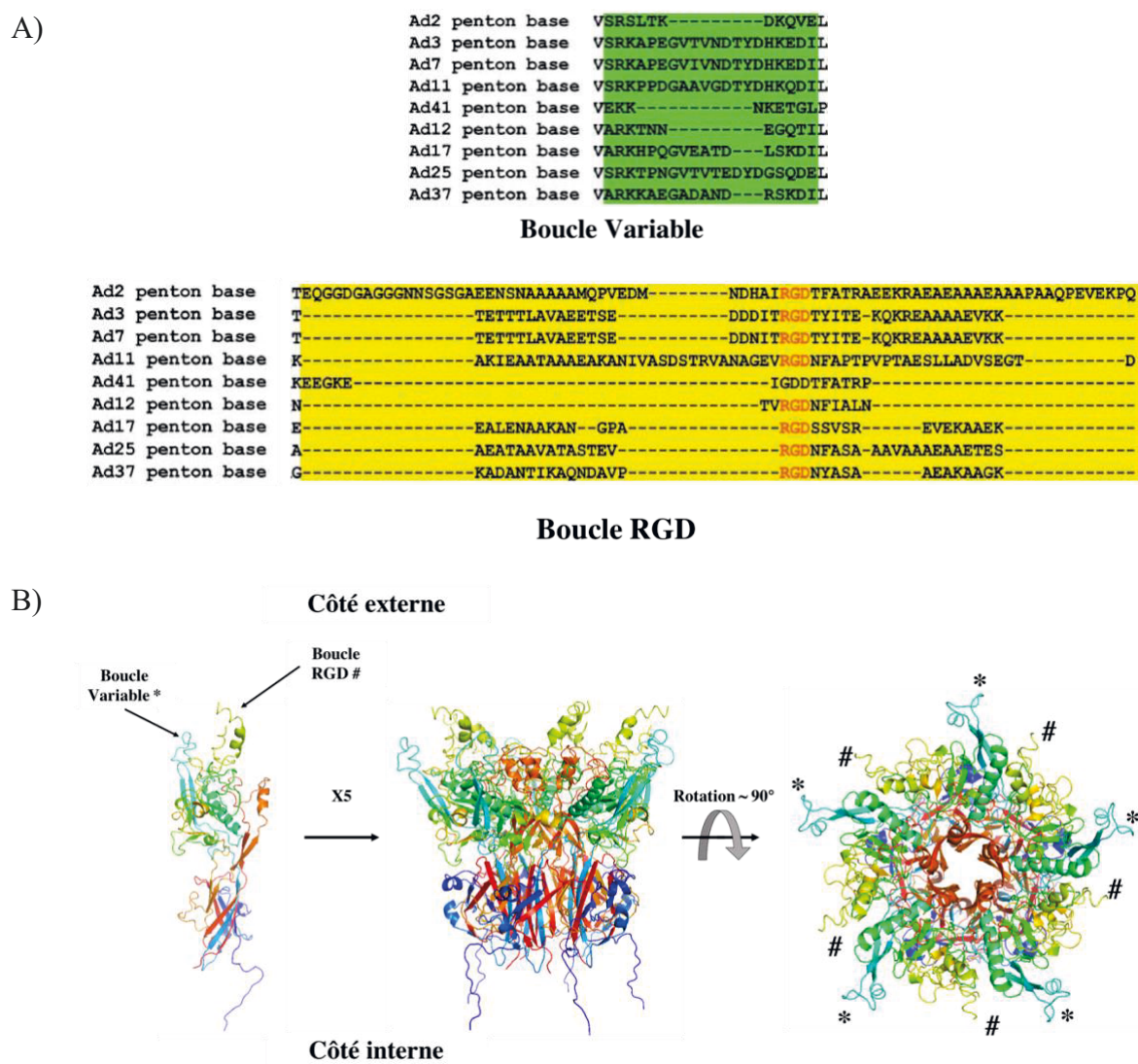


Figure 23 : Les boucles hypervariables de la base du penton

A) Alignement des séquences peptidiques des boucles hypervariables de la base du penton de sérotypes représentatifs des différents sous-groupes d'HAdVs. La région de la boucle variable est surlignée en vert et celle de la boucle RGD en jaune. Le motif RGD est écrit en rouge (Zubieta et al. 2005). B) Structure atomique du monomère du penton de l'HAdV3 vue de côté (PDB : 4AQQ). Les 2 boucles hypervariables mises en évidence lors de l'alignement de séquences se trouvent du côté externe signifiant donc que dans le contexte du dodécaèdre, toutes ces régions seront exposées à sa surface. (* : Boucle variable ; # : Boucle RGD)

Grâce à la mise en lumière de ces 2 régions possédant des caractéristiques de choix pour créer un vecteur, nous avons décidé d'insérer des sites de restrictions à différents endroits

stratégiquement placés dans le gène codant le monomère (Figure 24). Le but de ce design étant de pouvoir remplacer une région codante « sauvage » par un gène d'intérêt grâce à des techniques de biologie moléculaire ou de biologie synthétique. Nous avons donc décidé de créer 3 couples de 2 sites de restrictions : un couple encadre la région codant la boucle variable pour pouvoir la remplacer totalement par un peptide ou une protéine d'intérêt. Concernant la boucle RGD, il nous a semblé intéressant de pouvoir conserver le motif RGD impliqué dans le processus d'internalisation. Pour cette raison, nous avons placé un couple de sites avant le motif RGD et un couple après. Ce design permet alors d'ôter si besoin la boucle entière abolissant le pouvoir endocytaire de la particule (Gout et al. 2010). Ce dodécaèdre ainsi dessiné a été renommé ADDomer (ADD).

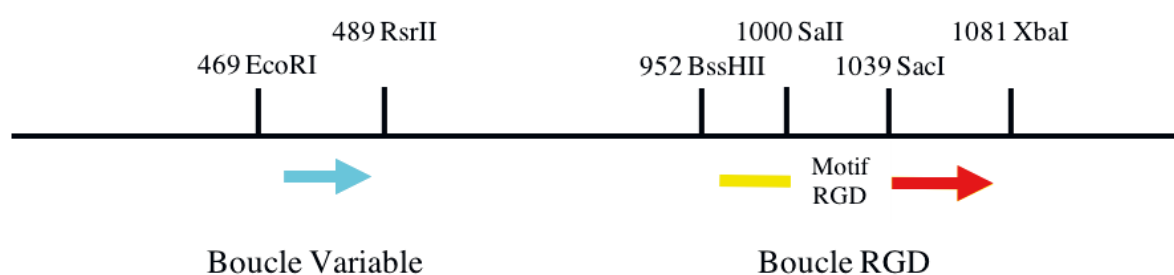


Figure 24 : Représentation schématique du gène codant l'ADDomer

L'ADDomer est un Dd de l'HAdV3 dans lequel ont été insérés de manière ciblée et stratégique 6 sites de restriction. Les sites EcoRI et RsrII encadrent la boucle variable, BssHII et XbaI encadrent la boucle RGD tandis que SalI et SacI se trouvent en amont et en aval du motif RGD. Grâce à eux, il est possible d'insérer de manière contrôlée 1, 2 ou 3 peptides d'intérêt qui se retrouveront exposés à la surface de l'ADDomer. (Les nombres représentent la position des nucléotides dans le gène où le site a été inséré)

2. Tests d'expression en système baculovirus et purification

L'insertion de sites de restriction dans le gène codant la base du penton de l'HAdV3 ayant mécaniquement engendré la modification de la séquence en acide aminé de la base du penton de l'HAdV3 (Figure 25), il a fallu contrôler que les modifications que nous avons imposées n'ont pas entraîné une perte de solubilité ou d'expression de la protéine. De plus, nous avons vérifié que l'état d'oligomérisation ainsi que la capacité d'endocytose ont été conservés malgré les modifications.

Base du penton HAd3	1	MRRRAVLGGAVVYPEGPPPSYESVMQQQAAMIQPPLEAPFVPPRYLAPTEGRNSIRYSEL
Base du penton ADDomer	1	MRRRAVLGGAVVYPEGPPPSYESVMQQQAAMIQPPLEAPFVPPRYLAPTEGRNSIRYSEL

Base du penton HAd3	61	SPLYDTTKLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLTTVVQNNDFTPTEASTQTINFDESRWG
Base du penton ADDomer	61	SPLYDTTKLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLTTVVQNNDFTPTEASTQTINFDESRWG

Base du penton HAd3	121	GQLKTIIMHTNMPNVNEYMFSSNKFKARVMVSRKAPEG--VTVND----TYDHKEDILKYE
Base du penton ADDomer	121	GQLKTIIMHTNMPNVNEYMFSSNKFKARVMVSRKAPEGFVTVNDGPVNDTYDHKEDILKYE

Base du penton HAd3	174	WFEFILPEGNFSATMTIDLNNAIIDNYLEIGRQNGVLESIGVKFDTRNFRLGWDPETK
Base du penton ADDomer	181	WFEFILPEGNFSATMTIDLNNAIIDNYLEIGRQNGVLESIGVKFDTRNFRLGWDPETK

Base du penton HAd3	234	LIMPGVYTYEAFHPDIVLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKHPFQEGFKIMYEDLEGGNIP
Base du penton ADDomer	241	LIMPGVYTYEAFHPDIVLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKHPFQEGFKIMYEDLEGGNIP

Base du penton HAd3	294	ALLDVTAYEESKKDTTT--ETTLVAEETSED--DDITRGDTYITE--KQKREAAAAEV
Base du penton ADDomer	301	ALLDVTAYEESKKDTTTARETTTLVAEETSEVD--DDITRGDTYITELEKQKREAAAAEV

Base du penton HAd3	348	--KKELKIQPLEKDSKRSYNVLEDKINTAYRSWYLSYNYGNPEKGIRSWTLTSDVTC
Base du penton ADDomer	361	SRKKELKIQPLEKDSKRSYNVLEDKINTAYRSWYLSYNYGNPEKGIRSWTLTSDVTC

Base du penton HAd3	406	GAEQVYWSLPDMMQDPVTFRSTRQVNNYPVVGAEELMPVFSKSFYNEQAVYSQQLRQATSL
Base du penton ADDomer	421	GAEQVYWSLPDMMQDPVTFRSTRQVNNYPVVGAEELMPVFSKSFYNEQAVYSQQLRQATSL

Base du penton HAd3	466	THVFNRFENQILIRPPAPTITTVSENVPAITDHGTLPLRSSIRGVQRTVTDARRRTCP
Base du penton ADDomer	481	THVFNRFENQILIRPPAPTITTVSENVPAITDHGTLPLRSSIRGVQRTVTDARRRTCP

Base du penton HAd3	526	YVYKALGIVAPRVLSSTF
Base du penton ADDomer	541	YVYKALGIVAPRVLSSTF

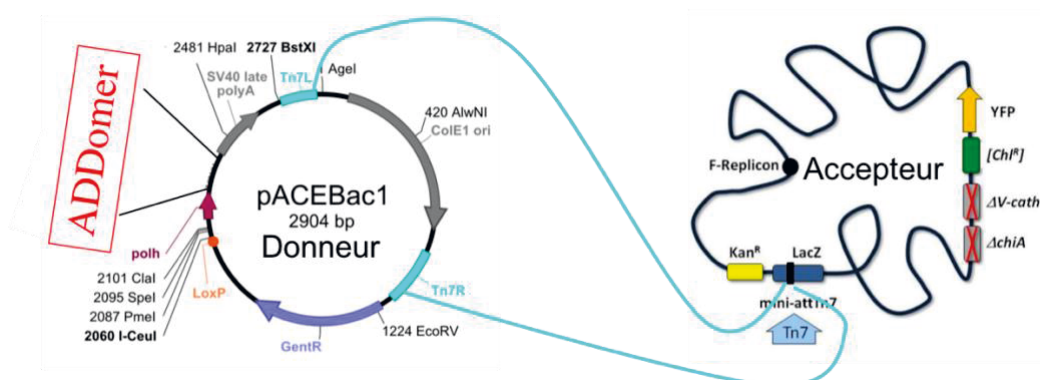
Figure 25 : Alignement de séquence de la base du penton de l'HAdV3 versus celle de l'ADDomer

L'alignement des séquences montre que l'insertion des sites de restrictions nécessaires à la création de l'ADDomer a modifié la séquence primaire (encadré en rouge) de la base du penton de l'HAdV3. (Les étoiles représentent les acides aminés conservés et la séquence RGD est encadrée en orange)

Pour produire la protéine, nous avons décidé d'exprimer l'ADDomer en cellules d'insecte grâce au système baculovirus. En effet, il a été démontré que les Dds de l'HAdV3 étaient productibles sous forme soluble en système baculovirus (Fender et al. 1997). Ce système d'expression est très avantageux par rapport à la production de protéines recombinantes en bactérie car il permet des modifications post traductionnelles telles que les phosphorylations, glycosylations, palmitylations. De plus, un adressage nucléaire, cytoplasmique ou membranaire ou le clivage des polyprotéines peuvent également être réalisés. Cependant, étant donné la taille importante du génome du baculovirus lui-même, le clonage direct de gènes est difficilement envisageable. C'est pourquoi la production de baculovirus recombinants se fait en 2 étapes. Dans un premier temps, le gène codant l'ADDomer a été cloné dans un plasmide donneur (pACEBac1) précédé du promoteur de la protéine polyédrique (polh). Cette protéine, non indispensable à la répllication des baculovirus *in vitro*, est exprimée en très grande quantité au cours de la phase tardive du cycle viral des baculovirus. Ce promoteur fort doit donc induire une surexpression du monomère de la base du penton de l'ADDomer. Le plasmide donneur a été ensuite transformé dans des bactéries DH10EMBacY possédant un plasmide contenant le génome du baculovirus (bacmide). Une recombinaison entre les 2 plasmides va avoir lieu *via*

les transposons Tn7L et Tn7R (Left et Right) (Figure 26A). Le bacmide code également une protéine fluorescente, la « yellow fluorescent protein » (YFP), qui permet de suivre la production du baculovirus recombinant dans les cellules d'insecte SF21. Lors de l'amplification virale et afin de pouvoir maîtriser l'obtention du maximum de baculovirus recombinants, une étude cinétique de la production de YFP a été faite (Figure 26B). Chaque jour, un compte des cellules SF21 a été effectué afin de récupérer 10^6 cellules. Celles-ci ont ensuite été lysées par sonication afin de libérer la YFP produite, et pouvoir ainsi mesurer l'émission de la protéine. L'atteinte du plateau d'émission de la YFP indique que les baculovirus sont prêts à être collectés pour infecter des cellules productrices. Le milieu de culture contenant les baculovirus était alors collecté puis conservé à 4°C.

A)



B)

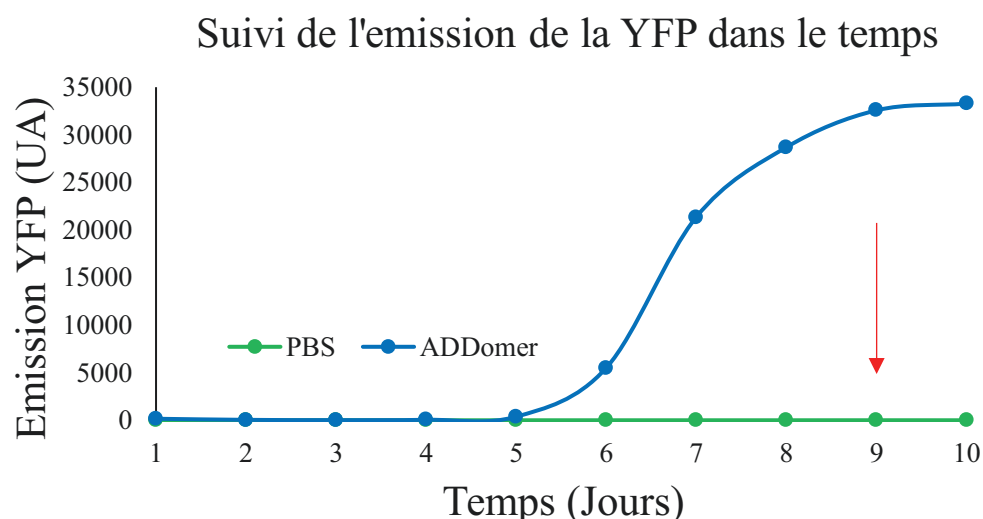


Figure 26 : Création d'un baculovirus recombinant codant l'ADDomer

A) Le gène codant l'ADDomer est cloné dans un plasmide donneur qui, grâce aux sites Tn7L et Tn7R, va recombiner avec le plasmide accepteur contenant le génome du baculovirus contenu dans les bactéries DH10EMBaY. B) La production du baculovirus est faite en cellule SF21. Une fois transfectées, les cellules SF21 produisent le baculovirus recombinant et lorsque le plateau d'émission de YFP est atteint, le surnageant de culture contenant le baculovirus est collecté (La flèche rouge indique le jour où les baculovirus ont été collectés).

Un test de production à petite échelle en cellules Hi5 a ensuite été effectué afin de vérifier que l'ADDomer était productible sous forme soluble. Le milieu de culture contenant le baculovirus recombinant "Stock" est alors ajouté aux cellules Hi5. Celles-ci ont été collectées 3 jours après l'infection. Un million de cellules ont alors été lavées puis lysées par sonication. Le contenu protéique de la fraction totale (SNP « supernatant and pellet ») et soluble (SN « supernatant ») ont été déposées sur gel SDS-PAGE 12%. Les 2 fractions ont été analysées pour permettre un contrôle de la production. En effet, une bande de surexpression doit être présente à la taille attendue au moins dans la fraction totale, quel que soit l'état de la protéine produite. Après coloration et décoloration du gel, on remarque une surexpression à la taille attendue (63,5kDa) dans les 2 fractions (Figure 27A). Cet essai de production à petite échelle nous permet de conclure que les modifications que nous avons apportées au gène codant le monomère de la base du penton sauvage pour créer l'ADDomer ne modifie ni sa production ni sa solubilité. Dès lors, il a fallu démontrer que les sites de restrictions introduits n'altéraient pas non plus l'état d'oligomérisation général du vecteur, c'est à dire qu'il y avait bien production d'un 60mers. Pour cela, nous avons produit l'ADDomer à plus grande échelle afin de pouvoir le purifier sur gradient de saccharose. 100mL de cellules Hi5 ont été infectées par le baculovirus recombinant durant 3 jours. La fraction soluble a été déposée sur le haut du gradient puis ultracentrifugée. Le gradient a été ensuite fractionné et son contenu analysé, par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Cette vérification nous a permis d'affirmer que l'état d'oligomérisation du monomère de l'ADDomer était élevé car la protéine surexprimée se retrouvait dans les fractions lourdes du gradient (~30 - 40% de saccharose) (Figure 27B). A partir de ce moment-là, il ne restait plus qu'à confirmer que les ADDomer possédaient la même structure que les Dd issus de l'HAdV3. Tout d'abord, après mise en commun et dialyse des dernières fractions du gradient contre un tampon HEPES 10mM NaCl 150mM, nous avons purifié les protéines par chromatographie échangeuse d'ion sur une colonne de Q-Sepharose. Le profil d'élution nous montrait alors 3 pics distincts les uns des autres (Figure 27C). Un gel SDS-PAGE représentatif de toutes les fractions contenant du matériel a été fait afin d'estimer dans lesquelles est présente la protéine recherchée (Figure 27C). L'analyse du gel, en corrélation avec le profil d'élution, permet de constater que la protéine est éluée dans tous les pics et qu'elle est très peu contaminée par d'autres protéines. Grâce à la valeur d'absorbance à 260nm, on remarque aussi que les pics #1 et #2 ne sont pas non plus contaminés en acide nucléique contrairement au pic #3. Afin de finir la caractérisation de la protéine produite, nous avons contrôlé quel était l'état d'oligomérisation dans chacun des pics. Pour cela, nous avons rassemblé les fractions d'élution

de 30 à 36mL (pic #1), de 37 à 42mL (pic #2) et de 43 à 50mL (pic #3) afin de les analyser par microscopie électronique en coloration négative. Cette analyse montre que le pic #1 contient uniquement des formes pentamériques de la protéine, le pic #2 contient quant à lui des formes dodécaédriques ayant les mêmes caractéristiques de symétrie que le DB de l'HAdV3 (Figure 27C).

Pour faire la caractérisation la plus complète possible de l'ADDomer, la dernière étape a été de s'assurer que la modification du gène n'a pas entraîné la perte de sa capacité d'endocytose. Pour cela, nous avons essayé de détecter la présence de l'ADDomer dans des cellules HeLa grâce à un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la base du penton puis une anti-anticorps de lapin couplé à la FITC (Figure 27D). Après une heure d'incubation avec l'ADDomer puis fixation de cellules, nous avons été capables de détecter l'ADDomer dans des vésicules d'endocytose tel que décrit dans la littérature (Fender et al. 1997).

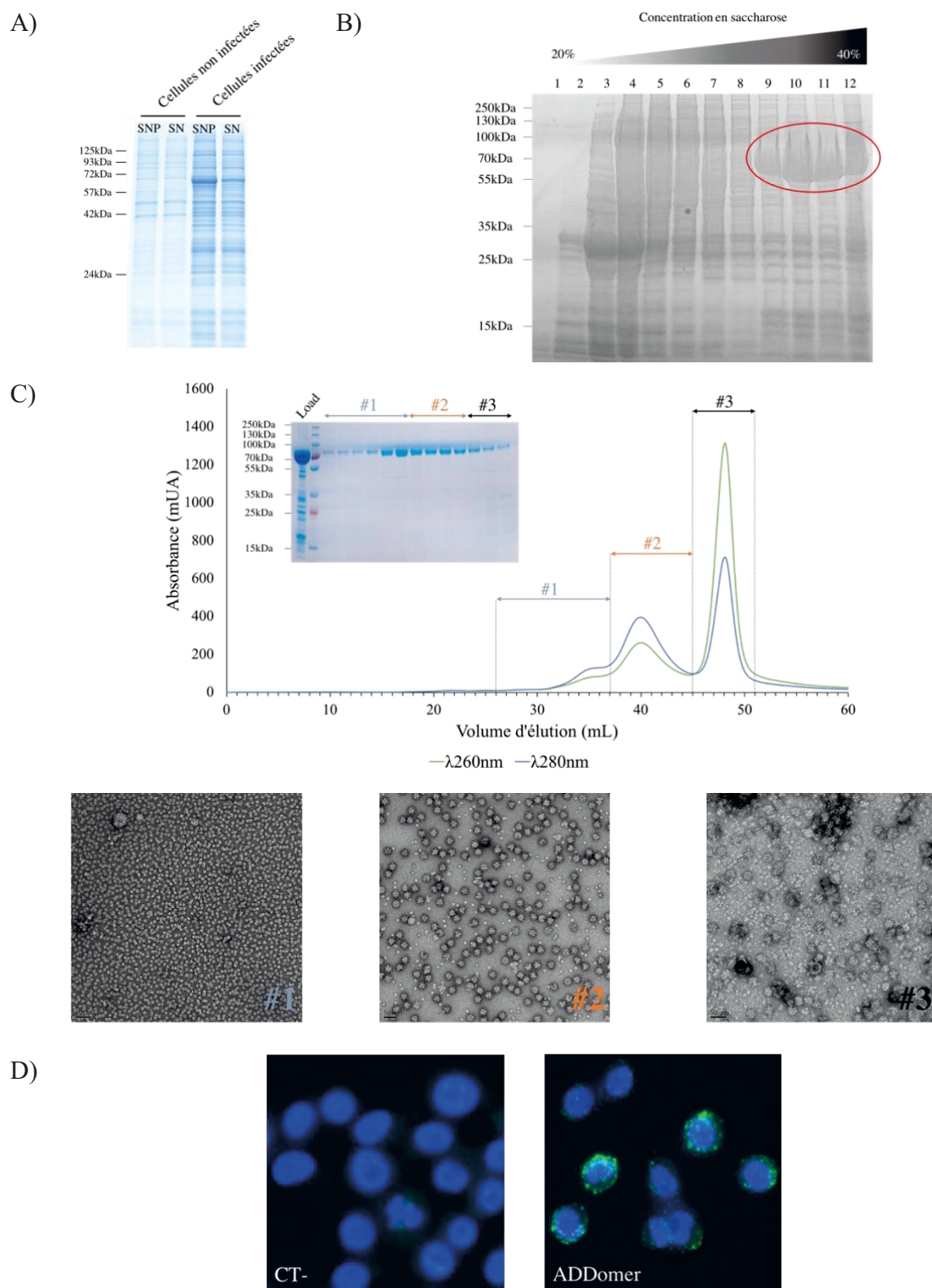


Figure 27 : Tests d'expression de l'ADDomer et caractérisation de l'ADDomer

A) Les fractions totale et soluble de 10^6 cellules Hi5 infectées ou non sont déposés sur gel SDS-PAGE afin de vérifier la productibilité et la solubilité du monomère de l'ADDomer. B) Évaluation du degré d'oligomérisation de l'ADDomer (entouré en rouge) par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. C) Profil d'élution de la protéine surexprimée sur colonne de QSepharose et confirmation de l'état d'oligomérisation de l'ADDomer par microscopie électronique. D) Internalisation de l'ADDomer : A l'instar du DB de l'HAdV3, l'ADDomer est capable de s'internaliser dans les cellules HeLa.

Au cours de ce premier travail, nous avons cherché à produire un vecteur basé sur les DB de l'HAdV3 dans lequel des séquences étrangères pourraient être insérées facilement. Pour cela, nous avons modifié le gène codant le monomère de la base du penton afin d'ajouter des sites de restriction dans 2 régions ciblées puis nous l'avons surexprimé en cellules d'insectes Hi5 grâce au système baculovirus. Ces modifications n'ont eu aucune incidence sur la production de particules dodécamériques solubles appelées dès lors ADDomer. Ces particules sont particulièrement bien surexprimées en cellules d'insecte. En effet, nous avons pu quantifier de manière relative le rendement d'expression de protéine produite par gel SDS-PAGE. Pour cela, nous avons déposé sur gel une gamme de dilution de BSA ainsi que différentes quantités d'ADDomer et nous avons pu estimer qu'en infectant 1L de cellules (soit environ 5×10^8 cellules au total) nous sommes capables de récupérer 80mg de protéine après purification sur gradient de saccharose et dialyse (Données non montrées). Après chromatographie, la quantité d'ADDomer purifiée dans le pic #2 est alors d'environ 10mg. Cette méthode de production et de purification en 2 étapes (Gradient de saccharose + chromatographie échangeuse d'ions) a été utilisée pour toutes les nouvelles constructions que nous avons testées au cours de ces travaux. Toutes les expériences ont été réalisées avec les protéines du pic #2 correspondant aux particules dodécaédriques. Pour finir, les ADDomers ainsi produits conservent leurs capacités d'internalisation signifiant que la modification des acides aminés autour de la boucle RGD n'affecte pas l'exposition du motif responsable de l'interaction avec le récepteur endocytaire.

3. L'ingénierie des boucles de l'ADDomer

En amont du travail de modification des boucles de l'ADDomer, nous avons réfléchi à une stratégie permettant de vérifier la présence de notre insert dans un ADDomer modifié. En effet, il était tout à fait envisageable que le gène étranger inséré code un peptide de même taille que celui qui a été ôté de l'ADDomer lors du clonage. Ce type d'ADDomer mutant aboutirait alors à une migration sur gel SDS-PAGE au même niveau que l'ADDomer rendant donc impossible la certitude de la présence l'insert. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux propriétés de la protéase du virus de la gravure du tabac (appelé par la suite Tev pour Tobacco Etche Virus). La TEV est une protéase qui catalyse l'hydrolyse de liaisons peptidiques entre la Glutamine et la Sérine de la séquence ENLYFQ/S. En pratique, la digestion à la TEV d'une protéine contenant "n" motif ENLYFQS implique que celle-ci sera coupée en "n+1" fragments. Cet outil nous a semblé intéressant pour valider la présence d'un peptide étranger

dans un ADDomer mutant, c'est pourquoi nous avons pris la décision que certains gènes étrangers que nous allions cloner dans l'ADDomer seraient précédés d'une séquence codant le motif spécifique de coupure par TEV.

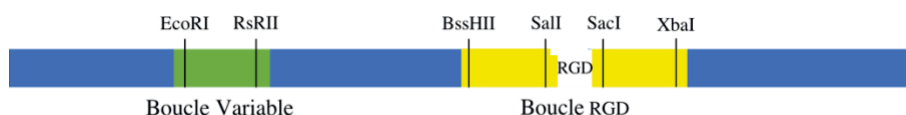
3.1.L'ADDomer "Extended Loop"

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modification de la boucle RGD. Cette région de la base du penton est celle dans laquelle il existe naturellement la plus grande variabilité. En effet, elle est par exemple composée de 15 résidus chez l'HAdV41 et d'environ 5 fois plus chez l'HAdV2. La boucle RGD de l'ADDomer elle, possède une séquence de 44 acides aminés. La première modification que nous avons tentée a été d'allonger la boucle RGD naturelle de l'ADDomer (ADDomer Extended Loop) afin de : (1) Valider la faisabilité de produire un ADDomer mutant en insérant des gènes étrangers et en utilisant les sites de restriction du gène de l'ADDomer et (2) estimer la capacité de variation dont dispose cette boucle. Afin de limiter le risque lié à l'insolubilité de l'ADDomer mutant à cause du fragment inséré, nous avons choisi de créer une séquence peptidique constituée de 3 boucles RGD provenant de 3 HAdVs différents (HAdV11, HAdV2 et HAdV3) et flanquées de séquences codant un motif Glycine-Sérine-Sérine-Glycine (GSSG). Cette séquence de 200 acides aminés au final a été insérée entre SacI et XbaI (Figure 28A). L'ADDomer ainsi modifié aurait en théorie une masse moléculaire (MM) de 81,7kDa ($63,5 + 19,5 - 1,3$). En effet, la MM ADDomer = 63,5 kDa, la MM de l'insert = 19,5 kDa et MM de la région supprimée comprise entre SacI et XbaI = 1,3 kDa.

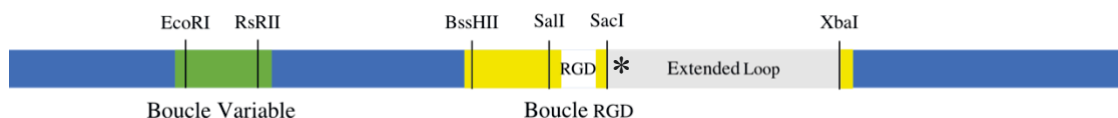
La surexpression de l'ADDomer a été faite comme décrite précédemment et a abouti à la formation d'une protéine soluble. De plus, le test de solubilité montre une différence de migration sur gel SDS-PAGE, l'ADDomer Extended Loop migrant à une taille supérieure à celle l'ADDomer. Cette différence peut probablement être expliquée par la présence de l'insert dans la boucle RGD. Cependant, le test de solubilité ne traduisant ni l'état d'oligomérisation de la protéine ni la certitude de l'extension de la boucle par la séquence d'intérêt, nous avons procédé à la caractérisation biochimique de la protéine surexprimée. Lors de l'analyse du gel SDS-PAGE (Figure 28B), on constate tout d'abord que la digestion à la TEV de l'ADDomer contrôle ne modifie pas son profil de migration. Ce qui est tout à fait normal puisqu'il ne contient pas naturellement de séquence "ENLYFQS". Par contre, l'ADDomer Extended Loop migre lui au-delà de 100kDa alors que celui-ci est censé migrer à 81,5kDa et le traitement à la TEV abouti à la formation de 2 fragments d'environ 50 et 60 kDa. Or, si le gène a bien été

traduit et inséré entre SacI et XbaI, la digestion par la TEV doit résulter en théorie à la formation de 2 fragments de 40,5 et 41,2kDa. Devant ce résultat, nous avons cherché à comprendre les raisons de cette migration aberrante. Dans un premier temps, le séquençage du plasmide a permis de confirmer que le gène exprimé par le baculovirus était bien celui de l'ADDomer Extended Loop. Nous avons alors fait une expérience de spectrométrie de masse afin de déterminer la MM exacte de la protéine produite (Figure 28D). L'analyse des spectres a permis de confirmer que la protéine exprimée a bien une MM de 81,7kDa comme attendu. Nous pensons que cette migration aberrante pourrait être due à la composition en acide aminé de l'insert (Annexe I page 203). Afin de finir la caractérisation biochimique de l'ADDomer Extended Loop et surtout vérifier son état d'oligomérisation, nous l'avons alors analysé par microscopie électronique en coloration négative (Figure 28D). Ces clichés montrent que, similairement à l'ADDomer, il est lui aussi capable de former une structure semblable au DB naturels (Figure 28C).

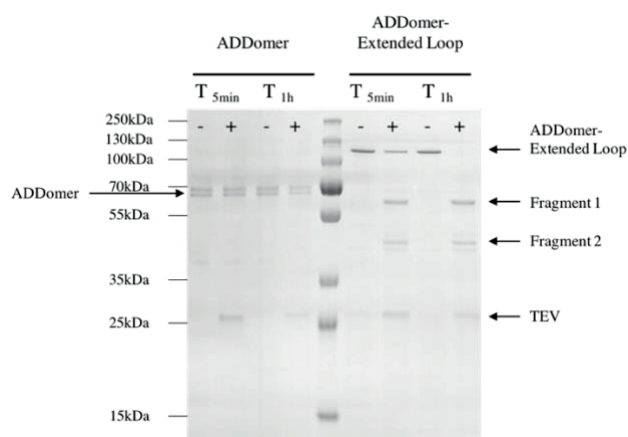
A) ADDomer



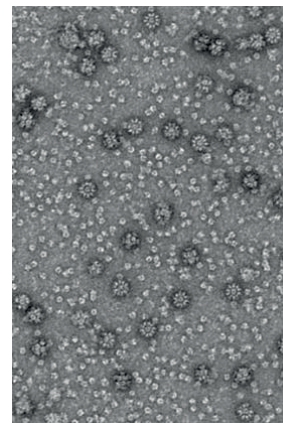
ADDomer Extended Loop



B)



C)



D)

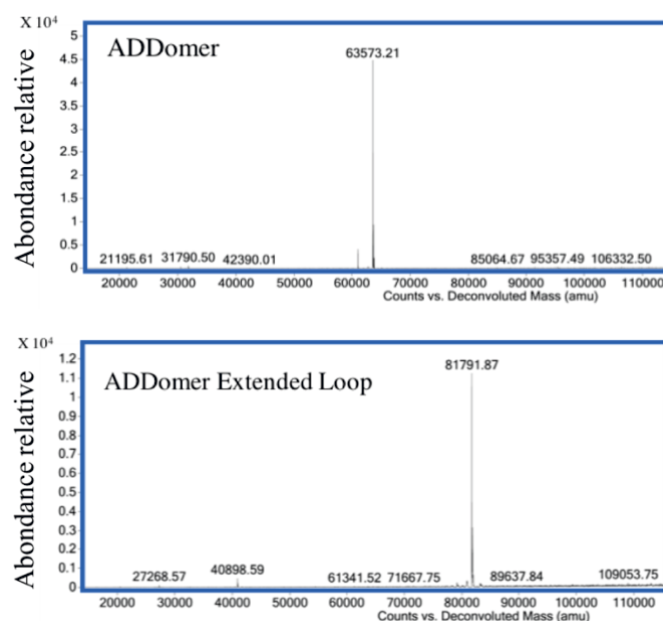


Figure 28 : Caractérisation biochimique de l'ADDomer "Extended Loop"

A) Représentation schématique du gène de l'ADDomer versus ADDomer Extended Loop, l'insertion du gène étranger a été faite entre *SacI* et *XbaI*, le site TEV se trouve au début de la séquence d'intérêt (*). B) Gel SDS-PAGE de l'ADDomer versus ADDomer Extended Loop, l'ADDomer Extended Loop digéré ou non par la TEV abouti à une migration aberrante. C) Confirmation de l'état d'oligomérisation de la protéine, l'ADDomer Extended Loop forme des dodécaèdres comme l'ADDomer. D) Spectre de masse de l'ADDomer et de l'ADDomer Extended Loop : L'analyse des spectres confirme que l'ADDomer Extended Loop possède effectivement la masse moléculaire attendue.

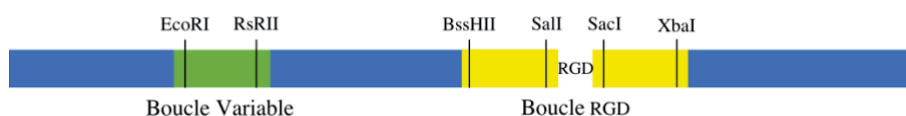
Au cours de ce premier travail de modification de la séquence primaire des boucles de l'ADDomer, nous avons décidé d'agrandir la boucle RGD pour former l'ADDomer Extended Loop. Pour cela, nous avons inséré une séquence nucléotidique étrangère grâce aux sites de restrictions et codant un polypeptide dont les propriétés physico-chimique limitaient le risque d'insolubilité. Il s'avère que la production de l'ADDomer modifié en système baculovirus est soluble, avec une MM correspondant à celle attendue et sous forme dodécaédrique. Cela valide (1) la possibilité d'utiliser les sites de restriction de l'ADDomer pour insérer des gènes étrangers et (2) que l'extension de la boucle RGD (dans le cas de l'ADDomer Extended Loop) n'a pas d'influence sur l'état d'oligomérisation de la protéine. L'ADDomer Extended Loop possède au final une boucle RGD composée de 211 acides aminés, c'est 3 fois plus que celle de l'HAdV2 (72 résidus). Cela représente environ 5 fois la taille de la boucle RGD initiale de l'ADDomer et une augmentation de près de 36% du nombre d'acide aminé contenu dans un monomère. De plus, cette variation d'ordre 10 entre la boucle RGD de l'ADDomer Extended Loop (200 acides aminés) et celle de l'HAdV41 (20 acides aminés) met en lumière une capacité de variation de taille beaucoup plus importante que ne le laisse penser l'étude des séquences primaires des boucle RGD de base du penton naturelle puisque celle-ci ne varie que d'un ordre 5.

3.2.L'ADDomer "VL_{2X}"

La création de l'ADDomer VL_{2X} a été faite dans le but d'abolir l'internalisation de la particule. En effet, il nous a semblé intéressant de posséder un vecteur dépourvu de capacité endocytaire comme peuvent l'être les nanoparticules par exemple. Pour cela, nous avons décidé d'insérer entre les sites BssHII et XbaI une séquence nucléotidique ne codant pas le motif RGD nécessaire à la reconnaissance des intégrines à la surface des cellules. Cette fois-ci, nous avons remplacé la totalité de la boucle RGD de l'ADDomer en clonant une séquence nucléotidique étrangère entre les sites BssHII et XbaI (Figure 29A). Nous avons alors décidé de cloner la séquence codant la VL de l'ADDomer pour 2 raisons. La première a été de limiter le risque d'insolubilité, et la deuxième a été de se rapprocher de la taille des boucles existant dans la nature, en effet, sa taille (20 résidus) correspond exactement à la taille d'une des plus petites boucles RGD naturelles (Celle de l'HAdV41). La surexpression de l'ADDomer VL_{2X} en système baculovirus mène à l'association symétrique de 12 bases du penton comme précédemment obtenues. La migration sur gel n'étant pas aberrante, nous nous sommes alors consacrés à l'étude fonctionnelle de l'ADDomer VL_{2X}.

Afin de savoir si cette particule avait perdu sa capacité d'internalisation, nous avons incubé avec l'ADDomer VL_{2X} dans des cellules HeLa en culture puis nous avons essayé de détecter sa présence en immunofluorescence. Après 1 heure d'incubation, il est impossible de détecter du signal dans le cytoplasme des cellules au contraire de l'ADDomer non modifié ce qui signifie que la particule n'a pas été internalisée (Figure 29B).

A) ADDomer



ADDomer VL_{2X}



B)

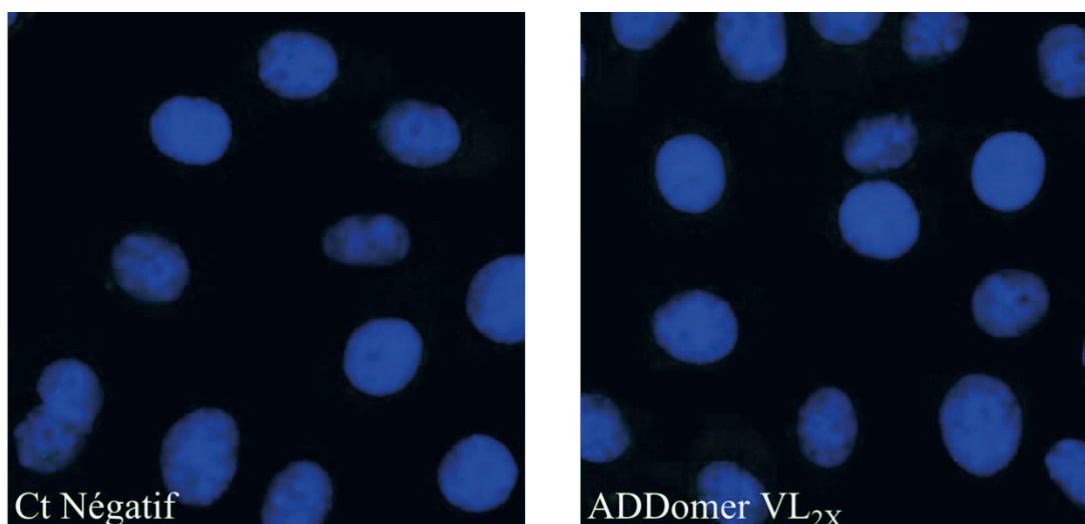


Figure 29 : Caractérisation de l'ADDomer VL_{2X}

A) Représentation schématique du gène de l'ADDomer versus l'ADDomer VL_{2X} : La boucle variable a été clonée à la place de toute la boucle RGD entre les sites de restriction BssHII et XbaI. B) Vérification de l'abolition de l'internalisation : Aucun signal n'est détectable dans les cellules HeLa après 1 heure d'incubation avec l'ADDomer VL_{2X}.

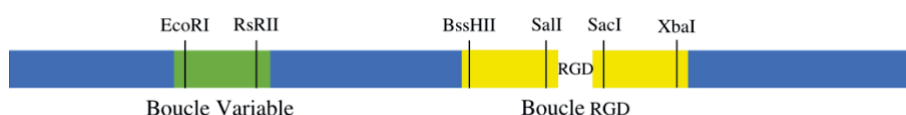
3.3. L'ADDomer "Swapped"

Naturellement, la boucle RGD est celle dont le nombre de résidus est le plus variable et surtout le plus important comparé à la boucle variable. C'est donc en théorie dans cette région que l'insertion de peptide ou protéine d'intérêt va se faire préférentiellement. Cependant, cela pourrait potentiellement compromettre la disponibilité du motif RGD à la surface de

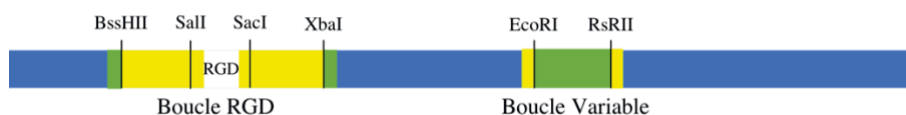
l'ADDomer et ainsi abolir naturellement l'internalisation de la particule. Comme nous souhaitons contrôler chacune des caractéristiques de notre vecteur, il nous a paru intéressant de savoir si la position du motif RGD à la surface de l'ADDomer avait une importance déterminante dans le processus d'endocytose. Pour cela, et toujours dans un souci de solubilité maximale, nous avons décidé d'invertir la boucle variable avec la boucle RGD de l'ADDomer (ADDomer Swapped) (Figure 30A) Nous avons démontré précédemment que l'insertion de la VL à la place de la boucle RGD était possible. Cependant, la plus grande boucle variable naturelle ne contient que 20 résidus alors que la boucle RGD de l'ADDomer en contient 44, c'est pourquoi le risque de produire une protéine insoluble était important mais maîtrisé. Nous avons alors produit l'ADDomer Swapped en système baculovirus, et cette nouvelle particule est elle aussi productible sous forme soluble et dodédaédrique.

Afin de confirmer que la place du motif RGD à la surface de la particule n'affecte pas le pouvoir d'endocytose, nous avons incubé l'ADDomer Swapped sur des cellules HeLa. Après fixation et immuno-détection de la particule, nous remarquons un signal dans les cellules (Figure 30B), ce qui démontre que l'ADDomer Swapped s'est internalisé. Le motif RGD exposé dans la boucle variable semble donc ne pas affecter les propriétés d'internalisation de la particule.

A) ADDomer



ADDomer Swapped



B)

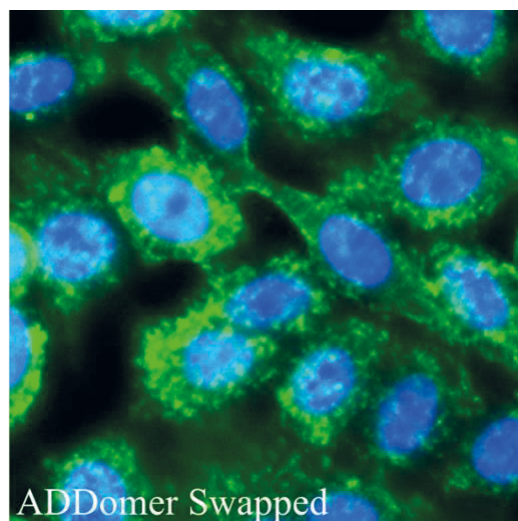
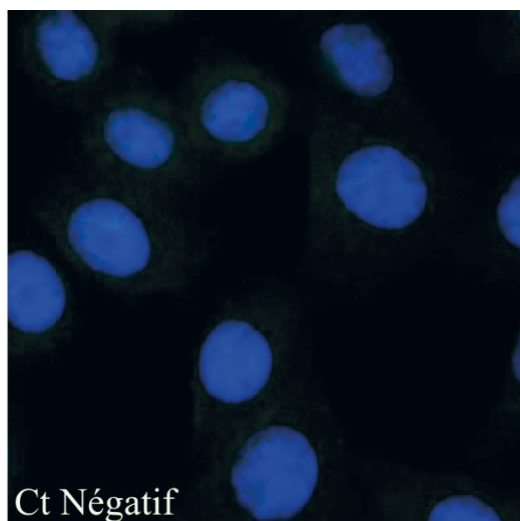


Figure 30 : Caractérisation de l'ADDomer Swapped

A) Représentation schématique du gène de l'ADDomer versus l'ADDomer Swapped : les 2 boucles hypervariables de l'ADDomer ont été inversées. B) Vérification de l'internalisation : Un signal spécifique dans les cellules HeLa est détectable après 1 heure d'incubation avec l'ADDomer Swapped.

4. Les ADDomers d'intérêt

Fort de ces premiers travaux où nous avons démontré la capacité de modification des boucles de l'ADDomer, nous avons décidé de le modifier dans le but de vectoriser des protéines ou fragments de protéines d'intérêt. Nous avons alors créé plusieurs ADDomers dans différents contextes de travail. Dans cette partie, je m'attacherai à décrire tous les ADDomers que nous avons construits et produits. Pour rendre compte des résultats obtenus, j'utiliserai un tableau qui détaillera la taille de l'insert, l'endroit où a été inséré le gène d'intérêt, une évaluation de la complexité structurale de la séquence insérée ainsi que la solubilité de l'ADDomer obtenu (Tableau 4). (Les séquences en acide aminé de chaque insert décrit ci-après ont été compilées en Annexe I page 203)

4.1. Les ADDomers “ovalbumine”

Dans le cadre de la vectorisation de l'épitope ovalbumine (Villegas-Mendez et al. 2010), l'une des faiblesses de ce système était l'utilisation de domaine WW (Cf Introduction II.5.2). En effet, cette protéine est d'origine humaine ce qui potentiellement peut engendrer des risques de réactions auto-immunes. De plus, pour produire les 2 composants du complexe, il fallait utiliser 2 systèmes différents : un organisme procaryote pour le domaine WW en fusion avec la protéine d'intérêt et un organisme eucaryote pour produire le Dd. Pour s'affranchir de cela, nous avons alors décidé d'insérer dans l'ADDomer tout ou partie de l'épitope précédemment utilisé par Villegas-Mendez (Figure 31A) pour créer des ADDomers d'intérêt dans le cadre de l'immunité anti tumorale.

➤ ADDomer LongOva : Dans cet ADDomer, nous avons inséré la même séquence que celle utilisée par Villegas-Mendez dans ses travaux correspondant à la séquence 248-376 de l'ovalbumine.

➤ ADDomer Ova MHC-I et MHC-II (Figure 31B et C) : Les épitopes Ova MHC-I et Ova MHC-II sont 2 séquences de l'épitope “LongOva” (Respectivement les séquences 265-273 et 323-339 de l'ovalbumine) connus pour être présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II par les cellules.

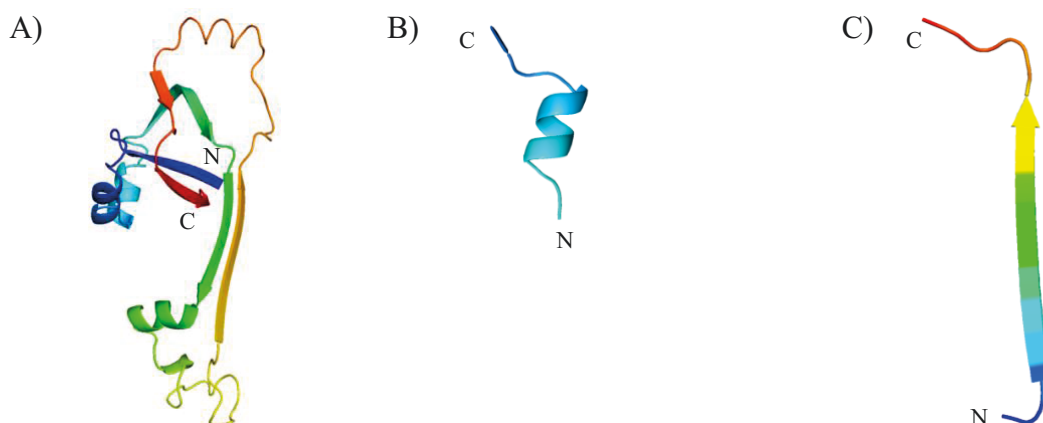


Figure 31 : Structures cristallographiques des épitopes ovalbumine insérés dans l'ADDomer

A) Épitope “LongOva”. B) Épitope Ova MHC-I. C) Épitope Ova MHC-II (pdb : 1OVA)

4.2. Les ADDomers “Poxvirus”

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Frédéric Iseni de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées qui s'intéresse à la polymérase du virus de la vaccine. La résolution de la structure de la polymérase ce virus a permis d'identifier les régions

responsables de l'interaction entre la protéine E9 (polymérase) et A20 (Facteur de processivité) (Figure 32A). Cette interaction, aboutissant à la formation de l'hétérotrimère E9/A20/D4 (D4 étant une uracyl déglycosylase), est indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme virale (Tarbouriech et al. 2017). Ces zones d'interactions, appelées "insert3" (i3) pour E9 et "Esprit3" (Esp3) pour A20/D4, ont été insérées dans l'ADDomer dans le but d'empêcher la formation de la forme active de la polymérase du virus et ainsi bloquer sa réplication.

➤ ADDomer E9i3 et ADDomer E9i3helix : Dans cet ADDomer, nous avons inséré toute la région "insert 3" (E9i3) (Figure 32B) ou seulement l'hélice alpha responsable de l'interaction avec A20 (E9i3helix) (Figure 32C).

➤ ADDomer Esp3 et Esp3helix : De la même façon que précédemment, nous avons cette fois ci cloné tout la région Esprit3 (Esp3) ou seulement l'hélice alpha (Esp3helix) d'A20 responsable de l'interaction avec E9 (Figure 32A).

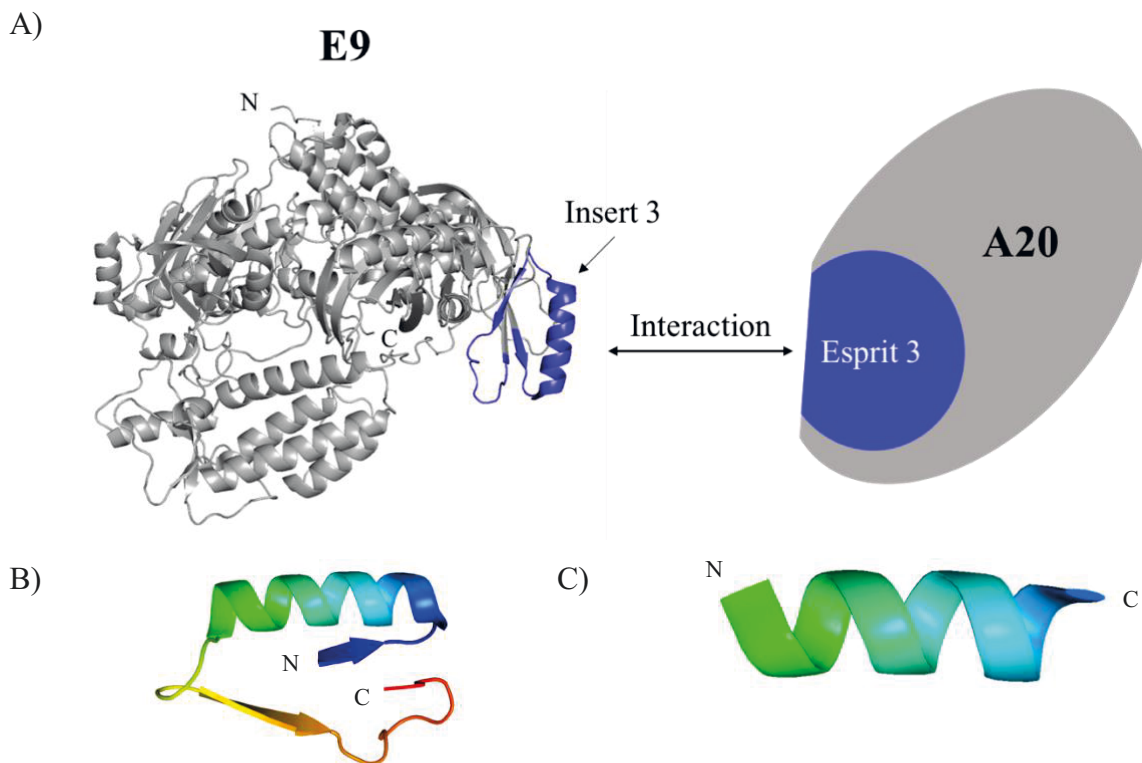


Figure 32 : Les domaines E9i3 et Esp3

A) Reconstitution atomique de E9 (en gris) en complexe avec A20 : Le fragment insert 3 (En bleu) interagirait avec la partie C-ter de A20 dont la structure reste à ce jour inconnue. B) Fragment E9i3. C) Fragment E9i3 helix. (pdb : 5N2E)

4.3. Les ADDomers Chikungunya

Dans le cadre de la vaccination, l'ADDomer est un vecteur extrêmement intéressant puisqu'il permet d'exposer un grand nombre d'épitopes très proches les uns des autres dans un

espace très confiné (30nm). Pour cette raison, nous avons décidé de créer des ADDomers en tant que plateforme vaccinale pouvant vectoriser des épitopes du virus du chikungunya.

➤ ADDomer TevChik : Insertion d'un épitope reconnu par des anticorps neutralisants du virus du Chikungunya (ChikV) de patients ayant contracté la maladie (Figure 33A) (Kam et al. 2012). Cet épitope a aussi été inséré à la fois dans la boucle variable et dans la boucle RGD pour former l'ADDomer TevChik_{2X}.

➤ ADDomer L52-L83 et ADDomer L52-L67 : Insertion dans l'ADDomer d'épitopes connus pour bloquer le cycle viral du ChikV *in vitro* lorsqu'ils sont ciblés par des anticorps thérapeutiques (Fong et al. 2014) (Figure 33B et C respectivement).

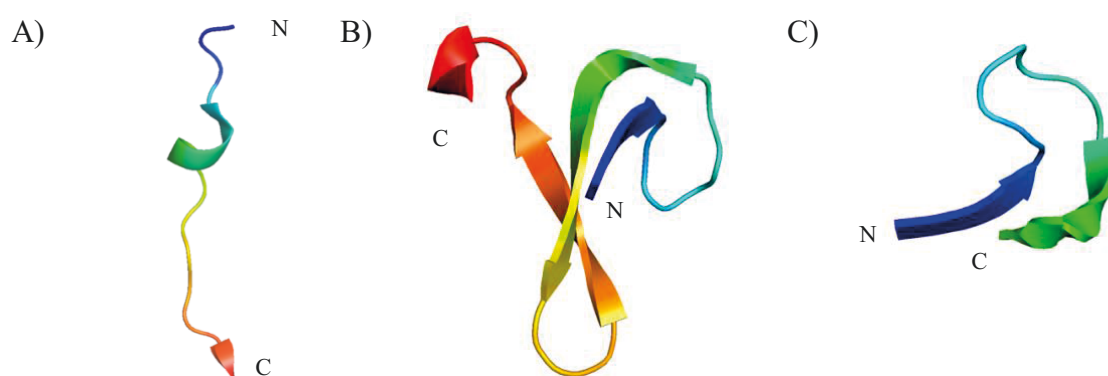


Figure 33 : Structures cristallographiques des épitopes du ChikV insérés dans l'ADDomer
A) Épitope TevChik B) Épitope L52-L83 C) Épitope L52-L67 (pdb : 4N33)

4.4. Les ADDomers “captifs”

Nous avons ici voulu créer des ADDomers capables de porter à leurs surfaces des protéines d'intérêt capables de reconnaître des protéines cibles. Pour cela, nous avons tenté d'insérer 2 types de protéines connues pour interagir de manière spécifique avec une protéine cible.

➤ ADDomer Nanobody (Figure 34A) : Un nanobody est un fragment d'anticorps constitué d'un seul domaine d'anticorps variable monomérique. Comme un anticorps entier, il est capable de se lier à un antigène spécifique. Nous avons inséré un nanobody capable de se lier spécifiquement à protéine A du staphylocoque doré.

➤ ADDomer DARPin (Designed Ankyrin Repeat Proteins) /off7 (Figure 34B). : Les DARPin sont de petites protéines à domaine unique qui sont sélectionnées afin de lier n'importe quelle protéine cible avec une affinité et une spécificité élevée. Nous avons donc créé l'ADDomer DARPin/off7 capable de lier spécifiquement la “maltose-binding protein” (MBP).

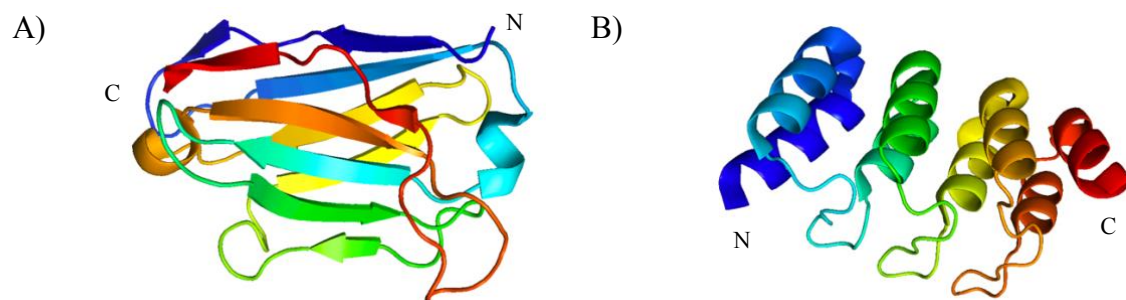


Figure 34 : Structures cristallographiques des protéines captives insérées dans l'ADDomer
A) Nanobody anti protéine A du staphylocoque doré (pdb : 1DEE). B) DARPin/off7 (pdb : 3HG0)

Type d'ADDDomer	Épitope Inséré	Longueur de l'épitope (nb d'acides aminés)	Lieu de l'insertion dans l'ADDDomer					Complexité de l'épitope	Solubilité de l'ADDDomer
			Boucle Variable	BssHII/SalI	SacI/XbaI	Boucle RGD	BssHII/XbaI		
Ovalbumine	Long Ova	144	X					+++	-
	Ova MHC-I	28	X					+	-
	Ova MHC-II	21		X					++
		33	X					-	-
Poxvirus	E9i3	50	X					+++	-
	E9i3 helix	25	X					++	++
	Esp3	129	X						
	Esp3 helix	39	X					Inconnue	+
								Inconnue	-
Chikungunya	TevChik	32	X					+	++
	TevChik _{2x}	32	X					+	+
	L52-L67	31					X	-	++
	L52-L83	47					X	++	-
"Captifs"	Nanobody	134					X	+++	-
	DARPin/off7	179					X	+++	-
		108					X		

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des ADDomers d'intérêt produits et de leurs solubilités :

La complexité de l'épitope est notée (+) lorsque celui-ci est composé d'au moins une structure secondaire type hélice α ou feuillet β

Nous avons au final conçu et produit 21 ADDomers d'intérêt dans différents contextes de recherche. Parmi ces 21 constructions, certaines ont fait l'objet d'une étude systématique de différence de solubilité en fonction de la boucle dans laquelle le gène d'intérêt a été inséré. On remarque alors que si un ADDomer mutant dans la boucle RGD est soluble, alors le même mutant l'est aussi si la même séquence d'intérêt est insérée dans la boucle variable. Seuls 8 ADDomers produits sur 21 le sont sous forme soluble et dodécaédrique ce qui représente tout juste 38% au total. De plus, il est à noter que malgré la solubilité de certains ADDomers, la fonctionnalité de l'insert reste toujours à démontrer.

Conclusion :

Les bases du penton des différents sérotypes d'HAdVs possèdent naturellement 2 régions (Boucle variable et boucle RGD) dont la composition en acides aminés varie d'un sérotype à l'autre. Dans le cadre du DB, ces 2 régions sont exposées à leurs surfaces, c'est pourquoi nous avons décidé de créer une plateforme multi-épitopique basée sur le DB de l'HAdV3. Pour cela, nous avons génétiquement modifié le gène codant la base du penton de l'HAdV3 en insérant des sites de restrictions placés de manière réfléchie (Figure 24). Grâce à cela, il devient possible d'insérer *via* des techniques de biochimie ou de biologie synthétique des séquences d'ADN étrangères. Nous avons dans un premier temps démontré qu'il était possible de produire ce vecteur sous forme soluble et dodécaédrique (Figure 27) que nous avons dès lors nommé ADDomer. Ensuite, nous avons prouvé qu'il était possible d'insérer une séquence définie et réfléchie de 200 acides aminés dans la boucle RGD de l'ADDomer sans que cela n'affecte sa productibilité (Figure 28). Cela donne un aperçu de la capacité d'agrandissement de la boucle et ouvre donc la voie à la vectorisation de protéine d'intérêt. Dans l'optique de maîtriser les caractéristiques de notre vecteur, nous avons ensuite démontré que nous étions capables d'abolir la capacité endocytaire de l'ADDomer en remplaçant la boucle RGD par la boucle variable, et que le motif RGD pouvait-être exposé dans la boucle variable sans que cela ne modifie les propriétés d'internalisation de la particule. Dans le but de valider l'ADDomer en tant que vecteur d'épitope, nous nous sommes alors concentrés sur la création d'ADDomers exposant des protéines entières ou des fragments de protéines d'intérêt. Nous avons produit différents ADDomers avec un succès variable. En mettant en corrélation la solubilité de l'ADDomer avec la complexité de l'épitope d'intérêt inséré, nous nous sommes rendus compte que la plupart du temps, l'insolubilité pouvait être due à une complexité structurale trop importante (Tableau 4). Sachant que la vectorisation de protéines peu

complexes est un facteur limitant des domaines tels que l'immunologie par exemple, nous nous sommes alors intéressés au développement d'un nouveau système de vectorisation toujours basé sur l'ADDomer mais utilisant cette fois-ci une autre stratégie de présentation.

II. Vectorisation de protéines d'intérêt

La vectorisation de protéines d'intérêt grâce à la modification des boucles hypervariables de l'ADDomer bien qu'extrêmement efficace dans certains cas, semble avoir quelques limites notamment concernant la solubilité de l'ADDomer exposant des structures complexes. Afin de nous affranchir de cela, nous avons alors développé un système basé sur l'interaction base du penton / fibre qui permettrait de vectoriser des protéines sans limite de complexité tout en évitant ceux liés à l'insolubilité de l'ADDomer.

1. Les ADDomers mutants "cystéine"

A la fin des années 90, il a été démontré qu'un peptide synthétique composé des 20 derniers acides aminés du côté N-ter du monomère de la fibre de l'HAdV3 était capable d'interagir avec la base du penton (Fender et al. 1997). Cela signifie donc que cette partie de fibre est capable de se lier naturellement à la base du penton, et qu'il n'est pas indispensable qu'elle soit trimérique pour que l'interaction ait lieu. L'idée a donc été d'utiliser ce peptide (Stick) en fusion avec une protéine d'intérêt pour qu'une fois mixé avec l'ADDomer, le peptide joue un rôle de guide et trouve naturellement sa place à la surface l'ADDomer exposant ainsi la protéine d'intérêt.

Il est à noter que l'affinité de la base du penton pour la fibre est de l'ordre du nM. Cependant, la fibre étant un homotrimère, il paraît envisageable que cette forte affinité soit plutôt liée à un phénomène d'avidité qu'à l'affinité de chaque domaine N-ter de la queue de la fibre pour la base du penton. Cela signifierait alors que le peptide Stick puisse interagir avec la base du penton mais seulement de façon furtive. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons alors synthétisé un peptide composé des 20 derniers acides aminés N-terminaux du monomère de la fibre fusionné avec une séquence de 18 acides aminés de la protéine E2 du virus du chikungunya couplé à la biotine (StickChik-Biot : AKRARLSTSFNPVYPYEDES-STKDNFNVYKATRPYLAH-Biot). Pour démontrer l'interaction entre le peptide StickChik-Biot, nous avons procédé à des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR)

(Figure 35). Nous avons immobilisé les bases du penton de l'ADDomer à la surface de la puce puis injecté le peptide StickChik-Biot. L'analyse des résultats montrent clairement qu'il existe une réponse dose-dépendante ce qui confirme l'interaction entre le peptide et la base du penton. Cependant, la phase de dissociation étant extrêmement importante et rapide, cela qui signifie que la liaison semble être de faible affinité. Le calcul de la constante d'affinité nous a donné une valeur de l'ordre du μM confirmant ainsi la faible affinité peptide / base du penton. Cette valeur confirme aussi qu'il existe bien un phénomène d'avidité entre la fibre trimérique et la base du penton.

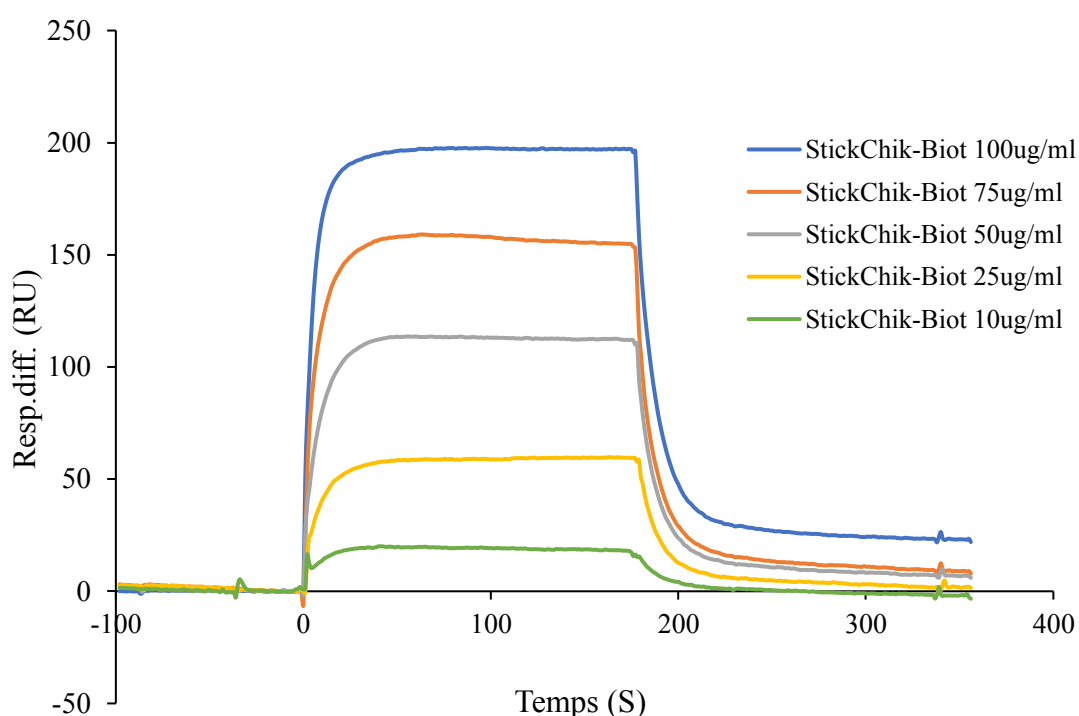


Figure 35 : Étude de l'affinité du peptide StickChik-Biot pour la base du penton de l'ADDomer par résonnance plasmonique de surface

La base du penton de l'ADDomer a été immobilisée à la surface de la puce et différentes concentrations du peptide StickChik-Biot sont injectées pendant 180 secondes.

La faible affinité du peptide pour l'ADDomer nous a amené à essayer d'optimiser ce système ADDomer / peptide car il semble malgré tout que la combinaison des deux puisse résulter dans de nouvelles stratégies de vectorisation. Pour cela, il fallait avant tout trouver un moyen pour augmenter l'affinité entre l'ADDomer et le peptide. Ainsi, nous avons décidé de muter les 2 composants du système dans leurs séquences en acide aminé afin de créer une liaison covalente entre eux. L'une des liaisons covalentes les plus courantes dans le monde protéique est le pont disulfure. Celui-ci se forme entre les atomes de soufre des fonctions thiols de 2 cystéines dans une séquence peptidique. C'est pourquoi nous avons cherché dans la séquence peptidique de l'ADDomer et du peptide, un ou plusieurs couples d'acides aminés qui,

s'ils étaient tous les 2 mutés en cystéine, pourraient potentiellement aboutir à la formation d'un pont disulfure rendant alors l'interaction ADDomer / peptide covalente. Les mutations ont été effectuées de manière rationnelle en étudiant la structure du peptide en complexe avec la base du penton ce qui a permis de mettre en lumière 3 couples d'acides aminés. Ces 3 couples sont : la lysine n°363 (K₃₆₃) de l'ADDomer avec la sérine n° 9 (S₉) du peptide, la glutamine n°476 (Q₄₇₆) de l'ADDomer avec la sérine n° 20 (S₂₀) du peptide et l'alanine n°477 (A₄₇₇) de l'ADDomer avec S₂₀ du peptide. Une fois identifié, nous avons alors produit les 3 ADDomers mutants (ADDomer K₃₆₃C, ADDomer Q₄₇₆C et ADDomer A₄₇₇C) en système baculovirus. Toutes les constructions ont abouti à la formation d'ADDomers sous formes solubles et dodécaédriques (Figure 36A).

Afin de vérifier la possible formation d'un pont disulfure entre les 2 composants, nous avons mis en contact les ADDomers mutants avec le peptide synthétique correspondant (StickS₉C/Chik-Biot ou StickS₂₀C/Chik-Biot) de manière à ce que l'interaction puisse avoir lieu. Les échantillons ont ensuite été traités au bleu de Laemmli avec ou sans β -MéthOH avant électrophorèse sur gel SDS-PAGE puis immunoblot. La révélation de l'ADDomer s'est faite grâce à un sérum polyclonal dirigé contre le dodécaèdre de l'HAdV3 puis un anti lapin-Alexa533 et celle du peptide grâce à de la streptavidine-Alexa488. L'analyse du westernblot permet de montrer que lorsque les échantillons sont traités avec du β -MéthOH (Figure 36B panel du haut), la migration de chaque composant est tout à fait cohérente. Chaque ADDomer (63,5 kDa) et peptide (5,6 kDa) est détecté à la taille attendue. Cependant, lorsque les échantillons n'ont pas été traités au β -MéthOH (Figure 36B panel du bas), nous sommes capables de détecter un signal correspondant à celui du peptide à une taille totalement aberrante par rapport à la taille attendue. En effet, ce signal se trouve au même niveau que celui provenant de l'ADDomer. Ce résultat couplé à celui obtenu en présence d'agent réducteur confirme donc qu'il y a eu création de cette liaison covalente entre le peptide muté et son ADDomer correspondant et que par conséquent, les peptides StickS₉C et StickS₂₀C jouent bien leurs rôles de guide malgré leurs mutations.

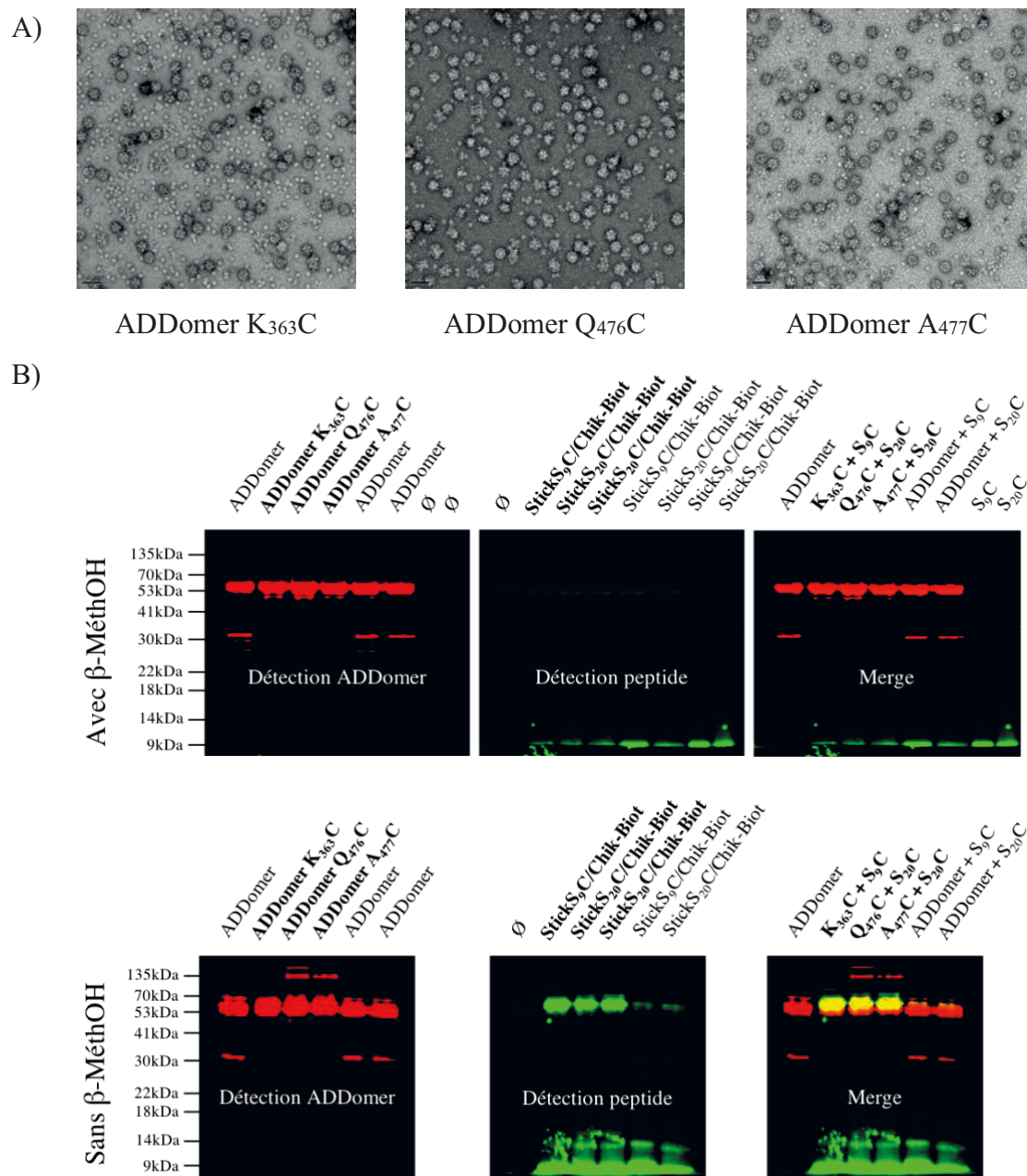


Figure 36 : Les ADDomers “cystéine”

A) Clichés de microscopie électronique des ADDomers cystéines. Les 3 ADDomers mutés ont été produits sous formes solubles et dodécaédriques (Grossissement 20000X). B) Vérification de la formation du pont disulfure : Chaque ADDomer a été incubé avec son peptide mutant correspondant, déposé sur gel SDS-PAGE puis transféré sur membrane. La révélation montre que lorsque les échantillons ne sont pas traités au β -MéthOH, le peptide émet un signal au niveau de la bande de l'ADDomer.

Fort de ces résultats, nous avons souhaité les confirmer par une méthode biophysique. Nous avons donc décidé d'effectuer une expérience de spectrométrie de masse (Figure 37), ce qui permet l'analyse de complexe protéique covalent. Nous avons alors soumis 2 échantillons à cette technique : (1) L'ADDomer A₄₇₇C + peptide StickS₂₀C + β -MéthOH et (2) L'ADDomer A₄₇₇C + peptide StickS₂₀C. L'analyse du spectre de l'ADDomer A₄₇₇C + peptide StickS₂₀C + β -MéthOH révèle un seul pic à 63605 Da tandis que celle du 2^{ème} échantillon met en évidence

2 pics majoritaires : un premier à 63605 Da et un second à 69269 Da. Afin d'attribuer le 2^{ème} pic dans l'échantillon non traité au β -MéthOH, nous avons étudié la différence de masse entre les 2 pics. Celle-ci est de 5664 Da ce qui est très proche de la masse théorique du peptide (5660 Da). Ce résultat suggère que le peptide et l'ADDomer sont liés l'un à l'autre de manière covalente grâce à la formation d'un pont disulfure et que l'ajout du β -MéthOH a "délivré" le peptide de l'ADDomer. Au final, nous avons créé 3 ADDomers mutants "cystéine" auquel il est désormais possible de greffer de manière covalente des peptides. Ce peptide est capable de guider une séquence de 18 acides aminés dans l'espace adjacent entre 2 monomères (Cf Introduction II.3) de l'ADDomer où un acide aminé spécifique a été muté en cystéine afin de se lier l'un à l'autre de manière covalente. Cette découverte ouvre alors la voie à la fusion du peptide avec des protéines structurales complexes afin que celle-ci soit vectorisée par l'ADDomer.

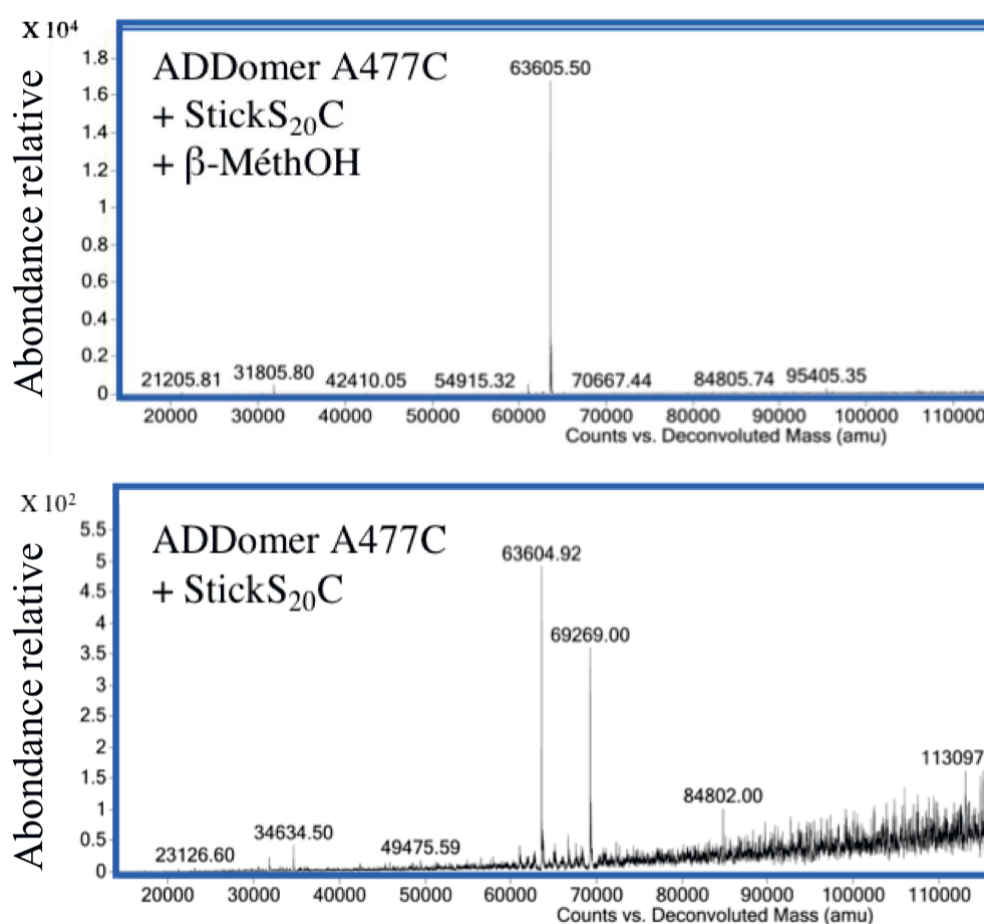


Figure 37 : Confirmation de la formation de pont disulfure par méthode biophysique

Le mix ADDomer A₄₇₇C + StickS₂₀C a été analysé par spectrométrie de masse. Lorsque ce mix est traité au β -MéthOH (panel du haut), le pic obtenu correspond à la masse du monomère, et s'il n'est pas traité (panel du bas), nous obtenons un deuxième pic dont la MM correspond au complexe ADDomer A₄₇₇C + peptide StickS₂₀C.

2. Vectorisation de protéines structurales complexes

Dès lors que nous avons apporté la preuve qu'il était possible de greffer de manière covalente un peptide sur l'ADDomer, nous avons voulu déterminer si celui-ci pouvait aussi se greffer à l'ADDomer lorsqu'il était en fusion avec une protéine structuralement complexe. Pour cela, nous avons décidé d'exprimer le peptide en fusion avec la mCherry. La mCherry est une protéine fluorescente monomérique de 28,8 kDa. Sa structure en tonneau composée de feuillets bêta anti parallèles combinée à sa capacité de fluorescence en fait une protéine de fusion idéale pour démontrer que les ADDomers "cystéine" pouvaient être décoré avec une protéine complexe grâce à l'ajout du peptide adéquat (Figure 38A).

Nous avons donc co-exprimé chaque ADDomers "cystéine" avec son peptide mutant correspondant en fusion avec la mCherry. Pour cela nous avons utilisé le système de la Cre-Lox recombinaise de l'EMBL Grenoble. Pour rappel, les ADDomers sont clonés dans le plasmide pACEBac1 contenant une séquence LoxP. Le peptide StickS₉C/mCherry et StickS₂₀C/mCherry ont eux aussi été clonés dans un plasmide (pDS) contenant une séquence LoxP (Figure 38B). La recombinaison entre les 2 plasmides grâce à la Crelox recombinaise aboutit à la formation d'un plasmide contenant le gène de l'ADDomer mutant en tandem avec son peptide correspondant en fusion avec la mCherry (Figure 38C). Ce plasmide, coexprimant les 2 protéines, a ensuite été transformé en bactérie DH10EMBacY. Dès lors, les baculovirus ont été générés comme décrit précédemment.

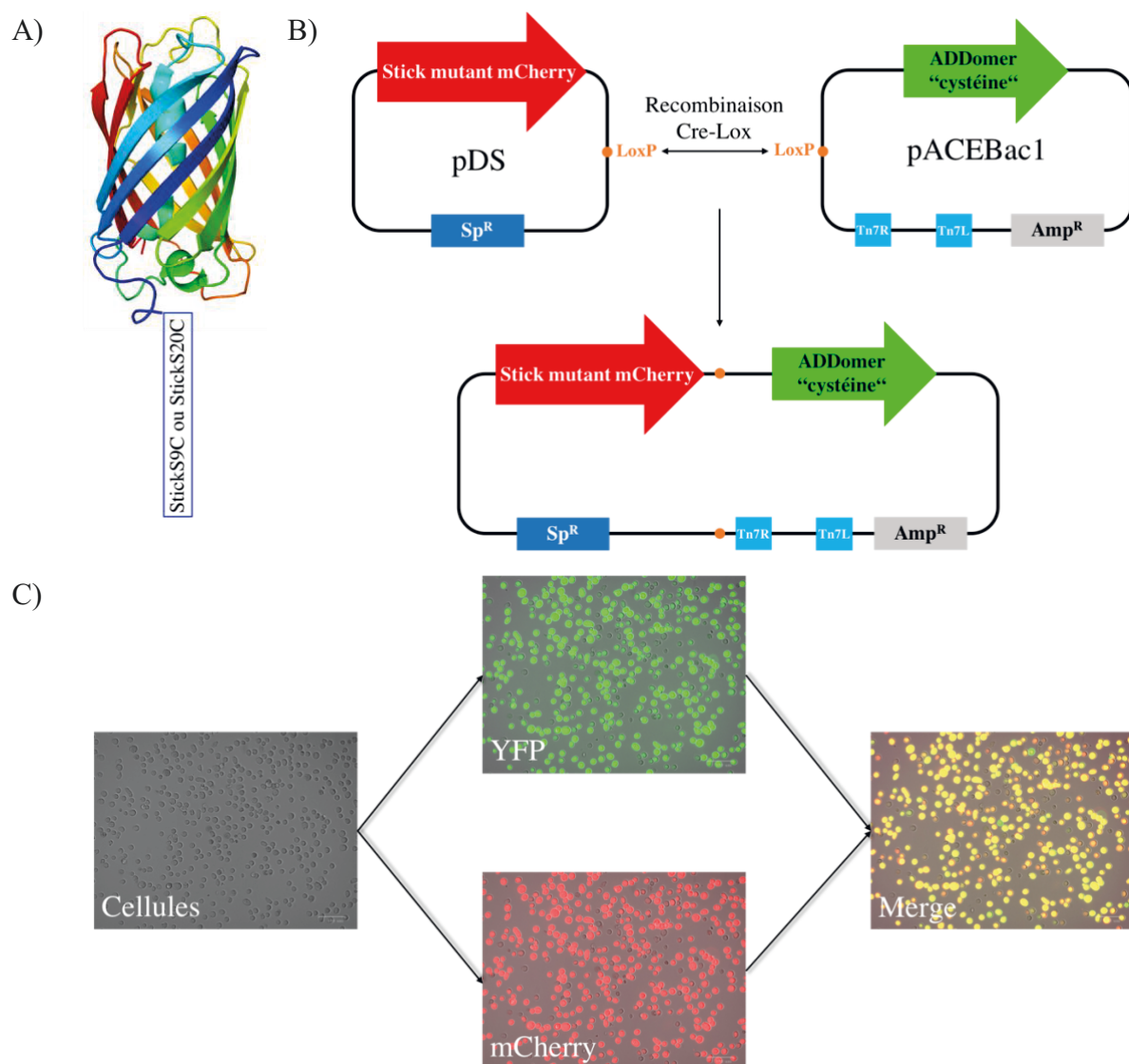


Figure 38 : Conception du Stick mutant en fusion avec la mCherry et co-production avec l'ADDomer
 A) Représentation schématique StickS₉C ou StickS₂₀C en fusion avec la mCherry : le peptide mutant StickS₉C ou StickS₂₀C a été fusionné avec la mCherry dans le but d'être lié de façon covalente et exposé à la surface de l'ADDomer (pdb : 2H5Q). B) Fabrication du bacmide co-exprimant l'ADDomer "cystéine" avec le peptide Stick correspondant : Les plasmides codant chaque ADDomer et le Stick/mCherry ont été fusionnés grâce aux sites LoxP et à la Cre recombinase. C) Vérification de la co-expression : Après infection, les cellules ont été imagées pour la YFP (ici pseudo colorée en vert) et la mCherry montrant la co-expression des ADDomer "cystéines" et de cette dernière.

Chaque ADDomer mutant a été co-exprimé avec son peptide muté fusionné à la mCherry en cellule d'insecte. Après 3 jours d'expression, nous avons collecté les cellules afin de les imager pour vérifier la production. On peut remarquer que les cellules fluorescent dans le vert (pseudo couleur de la YFP), ce qui indique que l'expression des protéines codées par le baculovirus a bien lieu, mais également dans le rouge indiquant que la mCherry est bien produite et fonctionnelle (Figure 38C). Nous avons alors purifié sur gradient de saccharose la

co-production ADDomers “cystéine” / peptide Stick/mCherry. L’analyse par gel SDS-PAGE du gradient (identique pour les 3 constructions) montre que l’on retrouve l’ADDomer uniquement dans les fractions lourdes (Figure 39A). Nous confirmons par cela que la co-expression de l’ADDomer avec le peptide Stick/mCherry n’affecte pas l’état d’oligomérisation de l’ADDomer et que l’ADDomer est bien produit sous forme soluble. De plus, on remarque aussi une forte présence de la protéine Stick/mCherry dans le haut du gradient (Figure 39A). Cette protéine ayant une densité beaucoup moins importante que l’ADDomer, il est normal qu’on la retrouve dans ces fractions du gradient si elle n’est pas liée à l’ADDomer. En revanche, dans cette expérience, on s’attend à ce qu’au moins une partie de celle-ci soit entraînée dans les fractions lourdes puisque les deux composants ont été co-exprimés en cellules d’insecte et que, par conséquent, ils ont été en contact l’un avec l’autre. En analysant le gel SDS-PAGE, cela ne semble pas être le cas, bien que l’on retrouve une coloration correspondant à la mCherry dans le fond du tube.

Afin de vérifier de manière plus précise si le StickmCherry était entraînée dans les fractions lourdes du gradient, nous avons alors cherché à la détecter en excitant chacune d’entre elles à 587nm et en collectant la valeur de l’émission à 610nm (Figure 39B). Dans la fraction 1, on retrouve des valeurs très basses ce qui signifie qu’il y a peu voire pas de mCherry détectable. Au contraire, dans les fractions 2 à 5, on retrouve alors de très fortes valeurs d’émissions pour les 3 constructions. Ce pic correspond à la détection des Stick/mCherry libres contenus dans le haut du gradient visibles sur gel SDS-PAGE et dans le tube après ultracentrifugation. Ensuite, les valeurs diminuent des fractions 7 à 10 jusqu’à avoir des valeurs proches de celle de la fraction 1. Cependant, dans la fraction 9 de l’ADDomer K₃₆₃C/StickS₉CmCherry, nous avons constaté une émission plus importante que dans les autres qui pourrait être reliée à la présence de StickS₉CmCherry. Dans cette fraction, nous avons trouvé une valeur d’émission 2 fois plus élevée que dans les fraction 8 et 10, mais cette augmentation de signal n’était finalement pas significative puisque nous ne sommes pas arrivés à mettre en évidence de mCherry à la surface des ADDomers de cette fraction.

Il semblerait que lors de la co-expression en cellules d’insecte des ADDomers “cystéine” avec leurs StickmCherry correspondants, l’interaction n’ait pas lieu. On peut donc s’interroger sur la possibilité qu’ont les deux composants à créer une liaison covalente dans la cellule. On sait par exemple que le potentiel d’oxydo-réduction du cytoplasme n’est pas favorable à la formation de pont disulfure puisque la concentration en glutathion y est très élevée. Cette hypothèse pourrait expliquer que le StickmCherry ne puisse pas se lier de façon covalente dans la cellule. Afin de vérifier cela, nous avons décidé de laisser la fraction soluble

2 heure à l'air sous agitation après lyse des cellules. Cette méthode permet (1) de maximiser la probabilité d'interaction entre ADDomer "cystéine" et le StickmCherry et (2) d'être dans un environnement oxydant favorable à la formation de pont disulfure. Après purification sur gradient de saccharose, nous avons obtenu le même type de gel, démontrant que, malgré un environnement plus favorable, la liaison covalente entre ADDomer et peptide Stick n'a pas eu lieu (Données non montrées). Dans un deuxième temps, nous avons tenté de modifier le potentiel oxydo-réducteur de la fraction soluble en ajoutant différentes concentrations du couple glutathion oxydé / glutathion réduit. Cette deuxième stratégie n'a pas non plus réussi à lier le StickmCherry à l'ADDomer grâce à la formation d'un pont disulfure (Données non montrées).

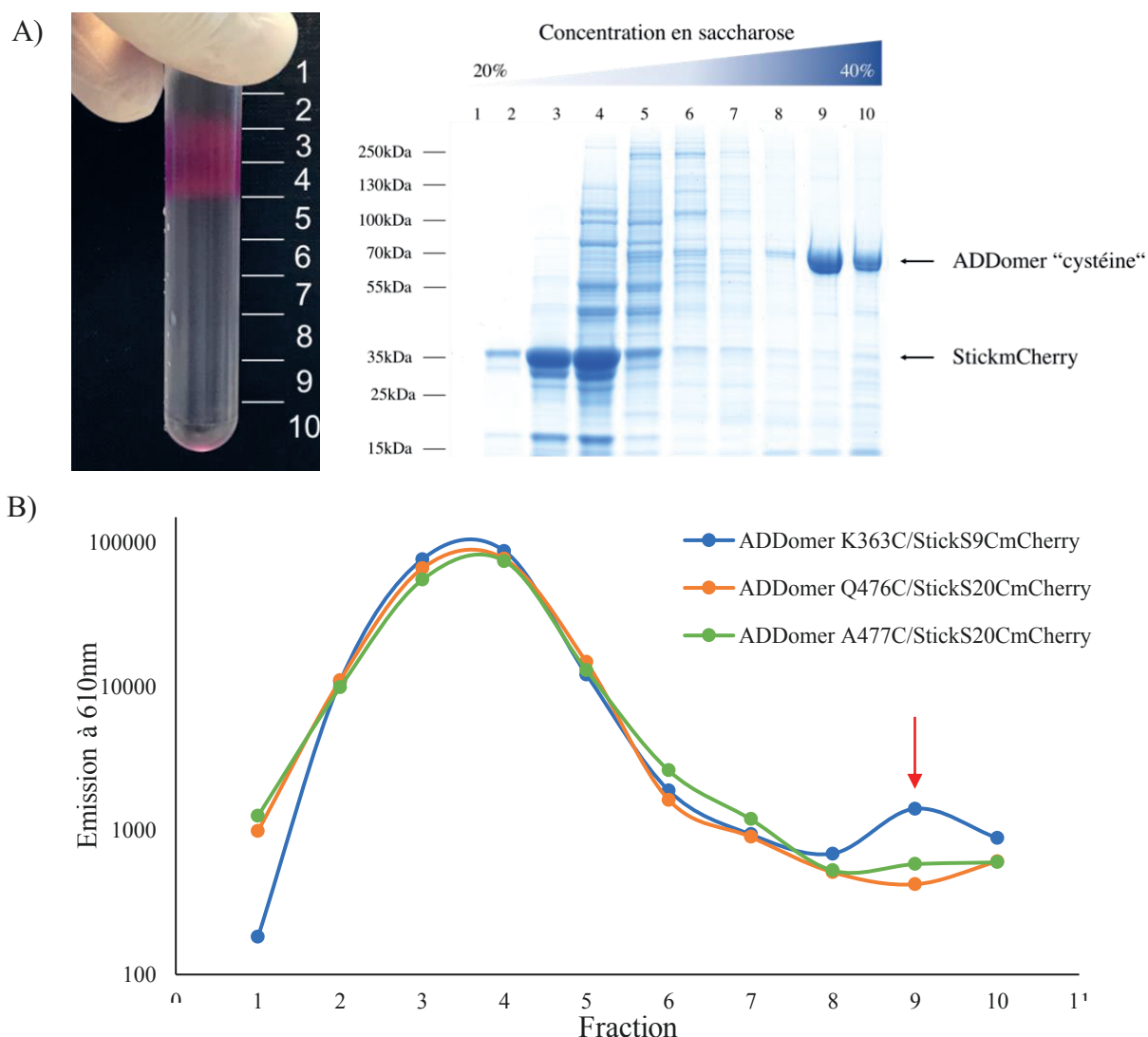


Figure 39 Purification et analyse de la co-expression ADDomer cystéine / Stick mutant mCherry

A) Analyse du gradient de saccharose : A la fin de l'ultracentrifugation, on retrouve beaucoup de StickmCherry dans le haut du gradient (photo de gauche) ; L'analyse du gel SDS-PAGE permet de confirmer la présence de StickmCherry libre ainsi que la présence des ADDomers (image de droite). B) L'émission à 610nm de chaque fraction du gradient retrouve une très forte émission dans les fractions légères (de 1 à 5) du gradient correspondant au StickmCherry libre et un pic dans la fraction 9 du gradient de l'ADDomer K₃₆₃C/StickS₉CmCherry (Flèche rouge).

Malgré plusieurs essais, nous n'avons pas réussi à greffer de manière covalente la mCherry en fusion avec le peptide Stick à la surface de l'ADDomer. Nous avons alors fait séquencer le plasmide "pDS" contenant StickmCherry afin de vérifier que la mutation S9C ou S20C était bien présente. Le résultat du séquençage des 3 plasmides indique la présence de la cystéine où elle était attendue. Nous nous sommes alors intéressés aux fractions hautes du gradient contenant le StickmCherry libre. Théoriquement, si les cystéines étaient bien exposées par le peptide Stick, il devrait y avoir formation de dimères de StickmCherry libres liés de manière covalente grâce à la formation d'un pont disulfure. Nous avons donc tenté de prouver la présence des différentes formes (monomériques et dimériques) sur gel SDS-PAGE en traitant les échantillons de la même façon que précédemment, c'est à dire avec ou sans β -MéthOH. L'analyse du gel ne montre pas de modification dans le profil de migration des protéines, dans les 2 cas, le StickmCherry migre aux alentours 31 kD (données non montrée)a. Cela démontre donc l'absence de pont disulfure. La principale explication que nous avons donnée à ce résultat est le manque d'accessibilité du peptide Stick, celui-ci étant probablement caché à l'intérieur du tonneau de mCherry.

3. Vectorisation *via* la queue et la tige de la fibre

Devant la difficulté rencontrée pour lier de manière covalente grâce au peptide Stick une protéine structurale complexe à la surface de l'ADDomer, nous avons alors réfléchi à une deuxième stratégie de vectorisation. Comme précédemment évoqué, nous savons que la fibre possède une affinité de l'ordre du nM pour la base du penton. Cette affinité est probablement liée à un phénomène d'avidité puisque le motif "FNPVYPY", séquence de la fibre responsable de l'interaction avec la base du penton, est présent en 3 copies par fibre. Le travail a alors consisté à utiliser le trimère que forment la tige et la queue de la fibre des HAdV en fusion avec une protéine d'intérêt afin de l'exposer à la surface de l'ADDomer. En étudiant la littérature, nous avons pris connaissance que Yan et collaborateurs avaient déjà produit une protéine d'intérêt en fusion avec une partie de la tige et la queue de la fibre des HAdV5 (Figure 40A) (Yan et al. 2016). Cette protéine, la "Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing" (TRAIL) est une protéine transmembranaire de type 2 de 281 acides aminés. C'est une cytokine connue pour être capable d'induire l'apoptose. Elle présente une activité optimale sous sa forme homotrimérique dont la conformation et la stabilité dépendent de la présence d'un atome de zinc, ce qui est un élément la différenciant des autres membres de la famille du TNF. La protéine TRAIL est capable de se lier à 5 récepteurs (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-

R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 et l'Ostéoprotégérine). La liaison de TRAIL sur les récepteurs TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5 induit la multimérisation des récepteurs, ainsi que le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protéine with Death Domain) (Schneider et al. 1997) et des pro-caspases initiatrices 8 et 10 (Bodmer et al. 2000) (Kischkel et al. 2001) pour constituer la plateforme d'activation des caspases appelée "Death-Inducing Signaling Complex" (DISC). Ce complexe permet le rapprochement et l'activation par auto-clivage des pro-caspases conduisant à la mort de la cellule par activation de la caspase 3. Dans cette étude, Yan et collaborateurs ont démontré que la protéine TRAIL en fusion avec la tige et la queue de la fibre (HAdV5FibreTRAIL = HAdV5FT (Figure 40A)) est produite sous forme soluble et homotrimérique (Yan et al. 2016). De plus, HAdV5FT a conservé une activité apoptotique similaire à la forme trimérique de TRAIL non fusionné avec la tige de l'HAdV5.

L'intérêt a donc été de démontrer qu'il était possible de vectoriser une protéine d'intérêt (ici TRAIL) en fusion avec la fibre de l'HAdV5 grâce à l'ADDomer. Pour cela, il fallait tout d'abord prouver qu'il existait une interaction entre les 2 composés. Il a déjà été démontré que le dodécaèdre base de l'HAdV3 était capable d'interagir avec les fibres de l'HAdV2 ou de l'HAdV41 (Fender et al. 1997). De plus, malgré une densité plus faible, celles-ci interagissent de manière suffisamment forte avec la base du penton pour qu'elles soient entraînées dans les fractions lourdes du gradient qui contiennent les dodécaèdres (Siqueira-Silva et al. 2012). Dans ce contexte, nous avons alors produit et purifié HAdV5FT (grâce au plasmide généreusement donné par le Dr Bin YU (Université de Jilin, Changchun, Jilin, Chine)) puis nous l'avons incubée avec l'ADDomer. Le mix a ensuite été fractionné par ultracentrifugation en gradient de saccharose puis analysé par gel SDS-PAGE (Figure 40B). Cette analyse permet tout d'abord de retrouver dans le haut du gradient une bande dont la masse moléculaire correspond à celle de l'HAdV5FT. Ceci pouvant être relié à un excès d'HAdV5FT dans le mix ou encore à de la protéine non fixée à la surface de l'ADDomer. De plus, nous retrouvons dans les dernières fractions du gradient une bande correspondant cette fois à la masse moléculaire de l'ADDomer. Cependant, dans ces mêmes fractions, nous sommes capables de détecter qu'une faible bande correspondant à la masse moléculaire de l'HAdV5FT. Cela indique donc que l'interaction entre les 2 protéines n'a pas eu lieu ou alors qu'elle n'est pas assez forte pour que l'HAdV5FT soit entraînée dans les fractions lourdes du gradient. Sachant qu'il existe un phénomène d'avidité qui explique l'affinité de la fibre pour la base du penton, nous avons alors émis l'hypothèse que l'HAdV5FT n'avait pas été produite sous forme trimérique. Afin de s'assurer que la protéine HAdV5FT que nous avons produit était trimérique, nous avons alors procédé à une chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multi-angle. L'analyse

du chromatogramme nous permet d'identifier un pic à la taille correspondant à celle du trimère d'HAdV5FT (88,5 kDa) (Figure 40C). Ce rapport infirme donc notre hypothèse de départ. Cependant, il n'est pas à exclure que seule la partie TRAIL de la protéine soit trimérisée tandis que la tige ne le serait pas. Ceci rendant alors impossible le phénomène d'avidité lié à la trimérisation de la queue de la fibre et donc l'interaction forte entre notre vecteur et l'HAdV5FT.

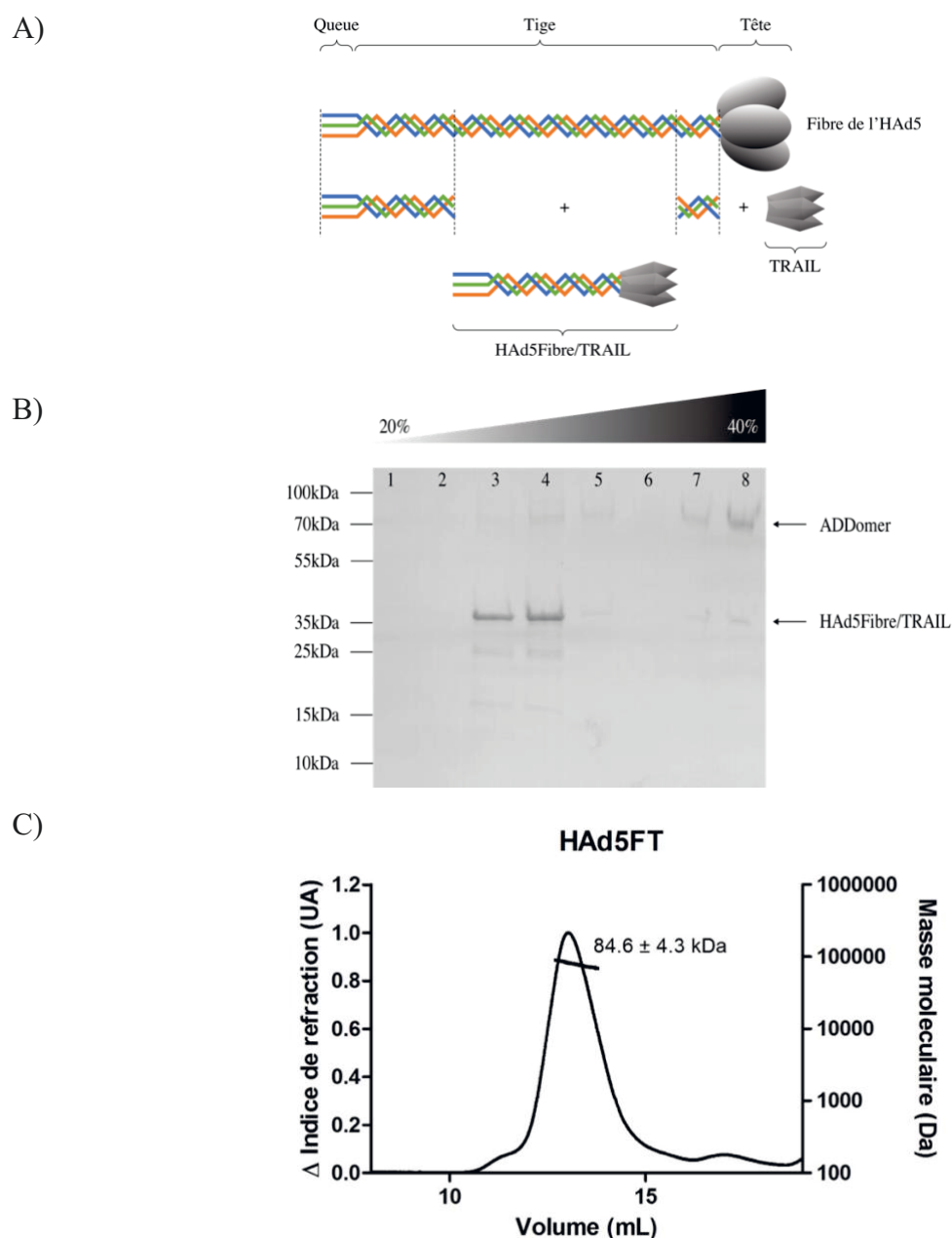


Figure 40 : Étude de l'interaction HAdV5FT / ADDomer

A) La protéine HAdV5FT : La protéine HAdV5FT résulte de la fusion de la protéine TRAIL avec une partie de la tige ainsi que la queue de l'HAdV5. B) Analyse des fractions du gradient de saccharose par gel SDS-PAGE : L'ADDomer et l'HAdV5FT ont été incubés ensemble puis fractionnés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. C) Analyse d'HAdV5FT par chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion de lumière multi-angle : La masse moléculaire calculée confirme l'état trimérique de la protéine.

Conclusion :

Nous avons constaté que la vectorisation de protéines structuralement complexes grâce à la boucle variable et/ou la boucle RGD de l'ADDomer est extrêmement efficace dans certains cas, mais possède cependant quelques limites. Nous avons alors élaboré plusieurs nouvelles stratégies, basées sur la connaissance de l'interaction naturelle entre la fibre et la base du penton. Tout d'abord, nous avons développé une stratégie basée sur la vectorisation grâce à un peptide composé des 20 acides aminés N-terminaux de la fibre et interagissant avec la base du penton. Ce peptide, prolongé de 10 lysines, a été décrit pour être capable d'internaliser des acides nucléiques dans les cellules HeLa (Fender et al. 1997). Dans notre étude nous avons mis en lumière que malgré cette capacité, sa faible affinité pour l'ADDomer pouvait rendre difficile la vectorisation de protéines d'intérêt. Nous avons alors conçu et produit des couples ADDomers "cystéine" / peptides mutants (StickC₉ ou StickC₂₀) capables d'interagir l'un avec l'autre de façon covalente grâce à la formation d'un pont disulfure. Cette découverte a alors ouvert la voie à la co-expression des ADDomers "cystéine" avec leurs "Stick" correspondants en fusion avec la mCherry. Malgré une forte co-production des 2 protéines en cellules d'insecte, nous ne sommes pas parvenus à montrer la formation d'une liaison covalente entre elles. Devant cette difficulté, nous nous sommes alors concentrés sur la possibilité de vectoriser des protéines d'intérêt à la surface de l'ADDomer en fusion avec la tige et la queue de la fibre. Yan et collaborateurs nous ont permis de produire la protéine TRAIL en fusion avec une partie de la fibre de l'HAdV5 (HAdV5FT). Dans ce cas aussi, cette construction n'a pas montré son efficacité. En effet, nous ne sommes pas non plus parvenus à prouver que l'affinité de l'HAdV5FT pour l'ADDomer était suffisante pour que celle-ci soit entraînée dans les fractions lourdes du gradient de saccharose ce qui aurait permis d'affirmer qu'il y avait interaction ADDomer / HAdV5FT. Cette constatation a été faite malgré la certitude que la protéine HAdV5FT est trimérique. Il faudrait certainement continuer ce travail en élaborant de nouvelles constructions se rapprochant plus du contexte naturel comme par exemple la protéine TRAIL avec la tige complète de l'HAdV3.

III. Caractérisation de l'ADDomer en immunologie

Nous avons dans ce chapitre étudié l'aspect immunologique de l'ADDomer, notamment dans le but de l'utiliser en tant que plateforme vaccinale. Dans cette partie sont exposés les résultats découlant de 3 collaborations académiques. La première partie de ce travail a été faite dans le cadre de l'étude de la biodistribution de l'ADDomer avec l'“Institute for Advanced Biosciences” (IAB, Grenoble) et notamment la plateforme d'imagerie optique du petit animal (OPTIMAL) dirigée par le Dr Véronique Josserand. Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement de l'ADDomer dans les cellules de l'immunité humaine grâce à un travail réalisé à l'Établissement Français du Sang (EFS Rhône-Alpes, Site de Grenoble) en collaboration avec l'équipe du Dr Laurence Chaperot. Pour finir, la caractérisation immunologique de l'ADDomer, nous avons étudié la réponse humorale chez la souris contre un peptide inséré dans une des boucles de l'ADDomer en collaboration avec le laboratoire de Dr Bernard Verrier (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon).

1. Biodistribution de l'ADDomer chez la souris

1.1. Dans les organes

La biodistribution consiste à suivre les composés d'intérêt qui circulent dans un animal ou un sujet humain. Dans le cadre du développement de l'ADDomer en tant que plateforme vaccinale, il nous a paru intéressant de savoir comment il se distribue après injection chez la souris BALB/c. En effet, un tropisme naturel très fort de l'ADDomer pour un organe pourrait être un problème majeur pour la mise au point d'un ADDomer à but vaccinal. Nous avons donc dans un premier temps étudié la biodistribution de l'ADDomer dans les principaux organes de la souris. Pour cela, nous avons injecté 10 μ g d'ADDomer marqué avec de l'Alexa633 et puis prélevé et quantifié le signal relatif à l'ADDomer à 1 heure (T1h) et 5 heures (T5h) post-injection (pi). De manière systématique, nous avons aussi regardé s'il y avait une différence majeure de biodistribution en fonction de la route d'injection intramusculaire (IM) versus sous-cutanée (SC).

A T1h pi, on ne retrouve pas d'augmentation significative du signal relatif à la présence de l'ADDomer dans aucun des organes que nous avons étudié sauf dans les reins (Figure 41A). Dans cet organe, le signal du groupe contrôle (non injecté) est aux alentours de 2000 RLU/pix/100ms tandis que l'on retrouve un signal 9 fois plus élevé (aux alentours de 18000

RLU/pix/100ms) dans le groupe injecté en IM et 6 fois plus élevé (aux alentours de 12000 RLU/pix/100ms) dans le groupe injecté en SC. Cependant, à T1h pi, on retrouve également une augmentation du signal dans le sang des souris (Figure 41B). A T5h post injection, on retrouve le même type de données qu'à T1h. En effet, on ne relève pas d'augmentation de signal significatif dans les organes étudiés hormis dans les reins. Dans cet organe, le signal a cependant diminué par rapport à T1h pi, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'accumulation d'ADDomer dans les reins en fonction du temps. Lorsqu'on analyse le signal lié à l'ADDomer dans le sang, on constate aussi que celui-ci est retombé au niveau du bruit de fond. En reliant ces données l'une à l'autre, on peut conclure qu'à T5h pi, qu'il y a une clairance de l'ADDomer circulant dans le sang et on peut spéculer que le signal dans les reins devrait disparaître dans les heures suivantes.

En conclusion, l'ADDomer ne semble pas posséder de tropisme naturel pour les différents organes que nous avons étudiés. Cependant, une quantité détectable d'ADDomer se retrouve dès la première heure post injection dans la circulation sanguine et dans les reins. Comme le sang est filtré par les reins, le fait que l'on retrouve une quantité d'ADDomer significative à T1h et T5h pi dans cet organe ne semble pas étonnant. De plus, la diminution de signal dans cet organe entre les deux temps étudiés semble indiquer que l'ADDomer ne s'accumule pas dans les reins. Cela va dans le sens d'une élimination de l'ADDomer par l'urine. Pour finir, il n'existe pas de différence significative de signal dans les organes en fonction de la route d'injection puisque les deux ne montrent aucune différence notable. L'étude de la biodistribution dans les ganglions lymphatiques de l'ADDomer pourrait mettre en avant une route préférentielle.

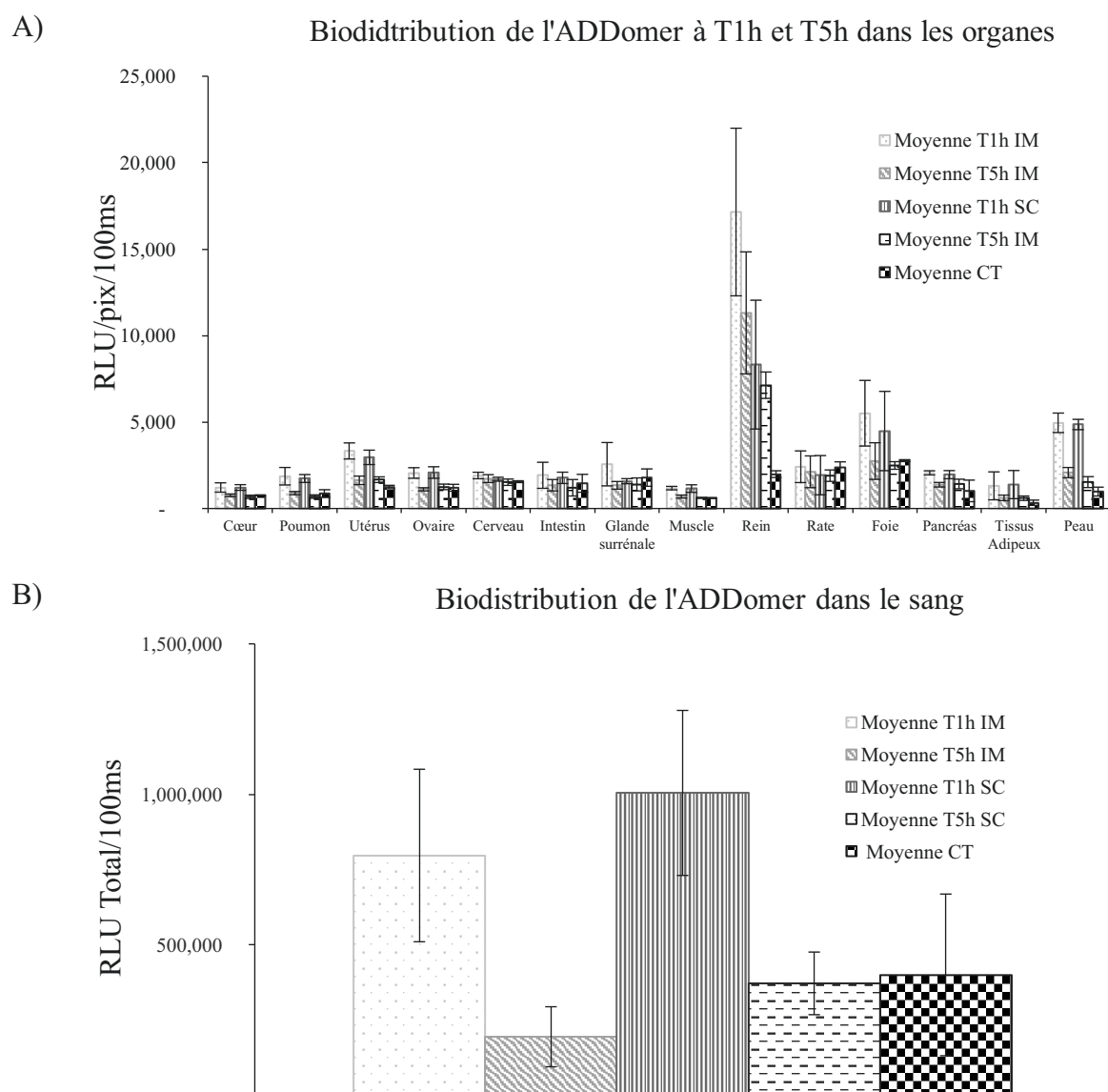


Figure 41 : Biodistribution de l'ADDomer dans les organes

A) Le suivi de l'ADDomer dans les organes de souris montre que sa biodistribution ne semble pas dépendre de la route d'injection et qu'une partie de l'ADDomer est éliminé par les reins. B) La forte présence d'ADDomer dans le sang à T1h pourrait en partie expliquer la présence d'ADDomer dans les reins. (Barre d'erreur +/- déviation standard). (n = 4 souris)

1.2. Dans les ganglions lymphatiques

Le principe de la vaccination consiste à mettre en contact l'organisme avec de très faibles doses de tout ou partie d'un virus ou d'une bactérie de manière à le protéger contre toute attaque future de ces agents pathogènes. Une fois dans le tissu de l'hôte, un antigène reconnu comme du non-soi doit être drainé jusqu'aux ganglions lymphatiques par les cellules dendritiques où ont lieu ensuite la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes et monocytes. Nous avons alors évalué dans un deuxième temps la biodistribution

de l'ADDomer dans les ganglions lymphatiques (GL) afin d'estimer la possible utilisation de cette plateforme en tant que vaccin. Pour cela, de la même façon que précédemment, nous avons récupéré les différents GL puis quantifié le signal lié à la présence de l'ADDomer. Nous avons étudié 5 types de ganglions soit 9 au total : les ganglions axillaires (Axi) droit et gauche, brachiaux (Bra) droit et gauche, sciatiques (Sci) droit et gauche, inguinaux (Ing) droit et gauche et les ganglions mésentériques (Mes).

D'une manière générale, on constate une augmentation de signal dans deux des cinq des GL que nous avons étudiés (Figure 42A). Cette augmentation a lieu que l'ADDomer soit injecté en IM ou en SC. Ces 2 ganglions, dont le signal lié à la présence d'ADDomer est plus important, sont (1) le ganglion inguinal droit et (2) les ganglions mésentériques qui sont les 2 GL les plus proche du site d'injection (injection dans la cuisse droite). On constate dans un premier temps une augmentation de signal très importante à T1h pi ce qui indique que l'ADDomer est reconnu comme un antigène du non soi par le système immunitaire de la souris et est donc transporté par les cellules dendritiques vers les GL. Ensuite, à T5h pi le signal diminue dans les 2 GL ayant capté l'ADDomer. Cette perte de signal peut être expliquée par la digestion de l'ADDomer par les cellules de l'immunité qui procèdent les antigènes du non-soi afin de créer une défense spécifique contre celui-ci. Malgré cette tendance de drainage des ADDomers vers les GL, il est à noter que dans le groupe de souris T1h pi IM, l'ADDomer n'est drainé vers le ganglions Ing droit que chez une seule souris sur les 4 qui composent le groupe (Annexe II page 207), et dont l'imagerie des LN est faite dans la figure 42B. C'est aussi le drainage de l'ADDomer chez une seule souris sur les 4 testées qui explique l'augmentation de signal à T5h IM. Concernant le groupe de souris injecté en SC, là encore, seules 2 souris sur 4 ont montré un drainage de l'ADDomer vers les GL à T1h pi. C'est là encore un signal présent chez 2 individus sur 4 que l'on retrouve à T5h pi (Annexe II page 207). Cela explique l'écart type important des résultats présentés ainsi qu'un test de Student non significatif. Pour tous les autres GL étudié, le signal obtenu est comparable à celui du bruit de fond. L'absence d'ADDomer dans ces GL pourrait être expliquée par l'éloignement physique des GL par rapport au site d'injection.

D'une manière générale, nous ne pouvons pas émettre d'hypothèse sur la meilleure voie d'injection de l'ADDomer entre l'IM et la SC chez la souris devant les résultats obtenus. En effet, les deux donnent des résultats très similaires concernant la biodistribution que ce soit dans les organes ou dans les GL. Ensuite, on peut mettre en évidence un drainage de l'ADDomer vers les ganglions lymphatiques. La diversité dans les réponses pourrait être expliquée par le fait d'avoir utilisé pour cette expérience des souris BALB/c dont la réponse inter individu est

connue pour être très variable. De manière remarquable, ce drainage de l'ADDomer vers les GL se fait sans l'aide d'adjuvant. Cela avait déjà été démontré dans le cadre de la vectorisation de molécule d'intérêt par les Dds de l'HAdV3 (Villegas-Mendez et al. 2010) mais pas encore pour notre plateforme. Ceci donne à l'ADDomer un atout très important dans le domaine vaccinal. Pour finir, le drainage de l'ADDomer dans les GL grâce aux cellules présentatrices d'antigènes va certainement permettre le recrutement des cellules responsables de la réponse B et T ce qui valide le fait que l'ADDomer est un outil très intéressant dans le domaine de la vaccinologie.

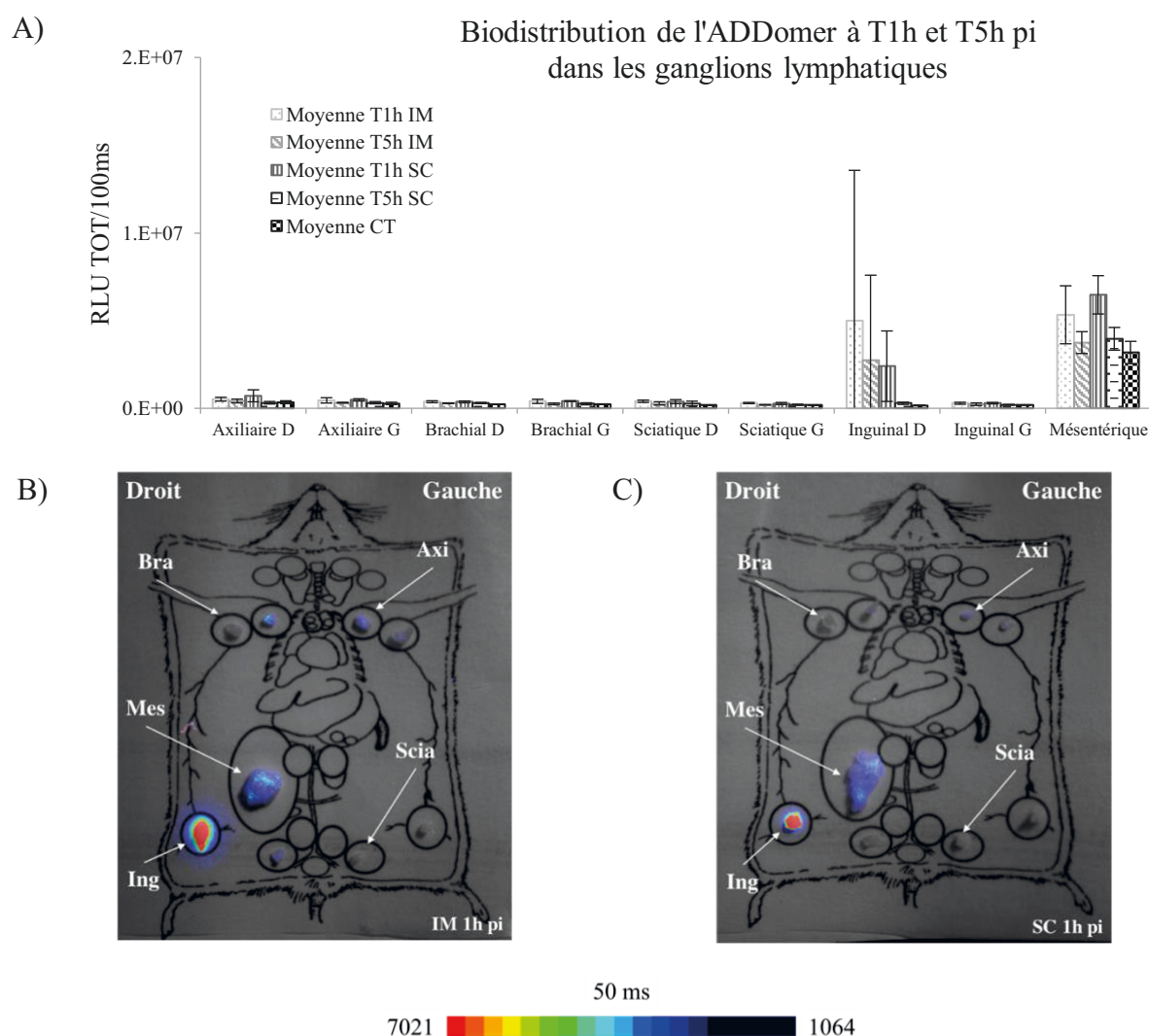


Figure 42 : Biodistribution de l'ADDomer dans les ganglions lymphatiques

A) Biodistribution de l'ADDomer dans le GL : Qu'il soit injecté en IM ou en SC, l'ADDomer semble être drainé de manière préférentielle dans le ganglion inguinal droit ainsi que dans les ganglions mésentériques (Moyenne +/- déviation standard). L'imagerie des GL d'une souris injectée en IM 1h pi (B) et injectée en SC 1h pi (C) montre que l'ADDomer a été drainé dans le ganglion inguinal droit ainsi que dans les ganglions mésentériques. (n = 4 souris). (Axi : Axillaire ; Bra : Brachial ; Sci : Sciatique ; Ing : Inguinal ; Mes : Mésentérique)

2. Comportement de l'ADDomer dans les cellules de l'immunité humaine

Ce travail a été fait dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Laurence Chaperot (Établissement Français du Sang Rhône-Alpes, site de Grenoble). Afin d'utiliser l'ADDomer en tant que vecteur dans le domaine de l'immunologie, il nous a paru intéressant d'étudier son comportement sur les cellules de l'immunité humaine. Nous avons précédemment démontré chez la souris que l'ADDomer était drainé par les cellules présentatrices d'antigènes dans certains ganglions lymphatiques et très peu dans les organes. Les GL sont le lieu de rencontre des cellules qui combattent l'infection et notamment le lieu de présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, permettant l'initiation des réponses immunes adaptatives. Nous avons donc isolé des monocytes à partir d'un prélèvement de sang total d'un patient sain et produit des cellules dendritiques dérivées de monocytes, afin d'étudier la capacité d'internalisation de l'ADDomer par ces cellules présentatrices d'antigènes.

2.1. Internalisation dans les monocytes

Nous avons jusqu'à présent montré que l'ADDomer était capable de s'internaliser dans les cellules HeLa (Partie Résultats I.2). Afin de démontrer que l'ADDomer est également efficacement internalisé dans les cellules de l'immunité, nous avons analysé son comportement une fois en contact avec des monocytes humains isolés. Nous avons alors incubé l'ADDomer couplé à l'Alexa488 à 37°C avec les cellules isolées puis étudié son internalisation dans les monocytes par cytométrie de flux à différents temps (Figure 43A).

Une demie heure après mise en contact de l'ADDomer avec les cellules, on constate une augmentation du signal par rapport à T0. Cela peut signifier que l'ADDomer a été internalisé dans les cellules, ou alors qu'il s'est seulement fixé à la membrane cellulaire. On sait que la trypsine est une protéase à sérine qui hydrolyse les liaisons peptidiques situées côté C-ter d'un résidu lysine ou arginine et que par conséquent, elle va protéolyser les récepteurs des dodécaèdres bases de l'HAdV3 et *à priori* de l'ADDomer à la surface des cellules. Après traitement à la trypsine de ces cellules, le signal relevé est similaire à celui du bruit de fond obtenu à T0. Cela semble donc indiquer qu'au bout d'une demie heure d'incubation, les ADDomers ne sont que très peu internalisés et qu'ils ont plutôt tendance à seulement s'attacher à la surface des cellules. Ceci montre un mécanisme très différent du mécanisme d'internalisation extrêmement rapide observé dans les cellules HeLa. Malgré cela, après une

heure d'incubation, on commence à obtenir un signal spécifique lié à l'entrée de l'ADDomer dans les cellules puisqu'après traitement à la trypsine, le signal relatif à l'ADDomer a quasiment doublé par rapport au bruit de fond. Pour finir, après 90 minutes d'incubation, nous observons que le signal est toujours en train d'augmenter ce qui signifie qu'il reste encore du vecteur libre et que probablement les cellules n'ont pas atteint leurs capacités maximales d'internalisation. Afin de vérifier l'internalisation de notre vecteur, nous avons aussi observé les cellules à T90 minutes au microscope à fluorescence (Figure 43C). On remarque tout d'abord que 100% des cellules de l'échantillon que nous avons observé émettent un signal. Ce signal intense se trouve dans le cytoplasme des cellules ce qui confirme que l'augmentation de signal constatée par cytométrie est effectivement due à une accumulation de l'ADDomer dans le cytoplasme.

Pour conclure, l'imagerie des monocytes nous montre que toutes les cellules ont internalisé l'ADDomer. L'ADDomer s'internalise donc de manière efficace dans les monocytes malgré un temps de latence plus important que dans les cellules HeLa. En effet, nous avons constaté qu'à *priori* la vitesse d'internalisation de l'ADDomer dans les monocytes est relativement faible. En cellules HeLa, il a déjà été démontré que l'internalisation des dodécaèdres de l'HAdV3 commence entre 5 et 10 minutes après incubation.

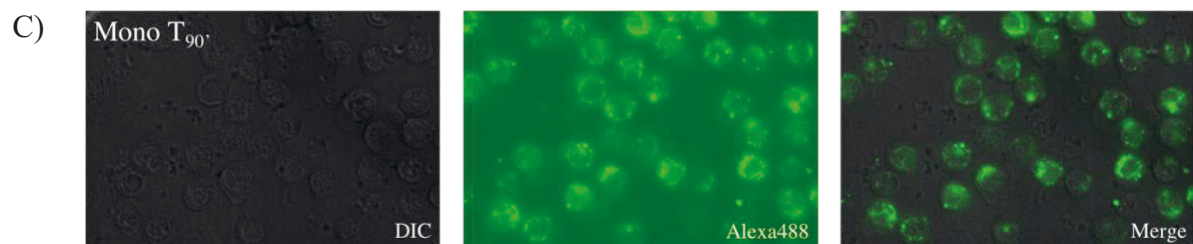
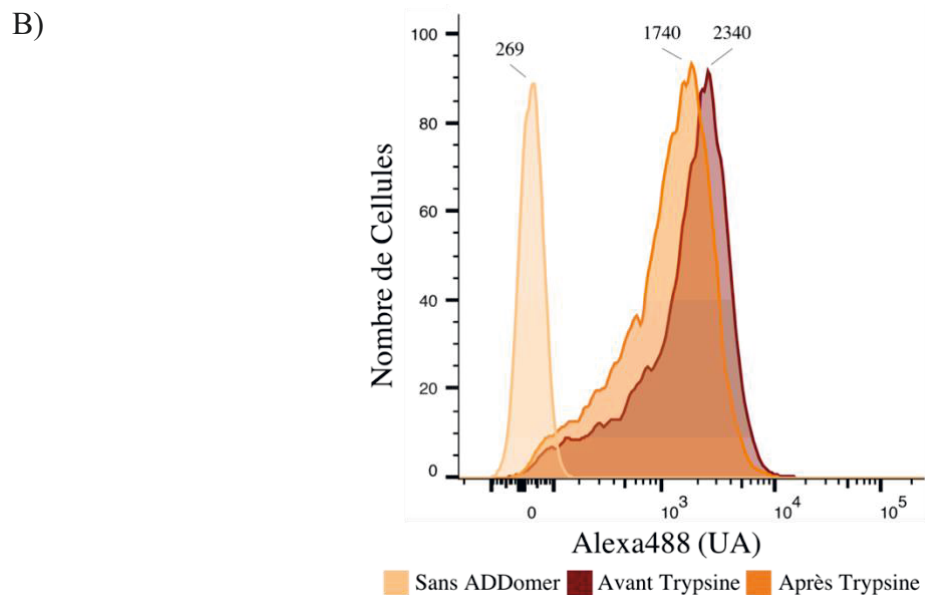
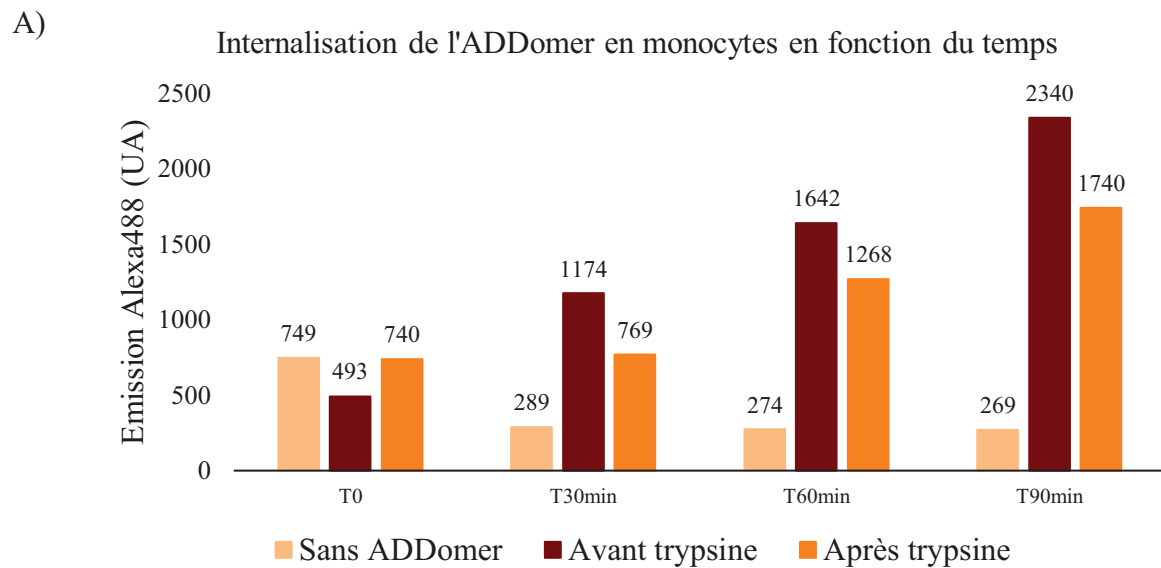


Figure 43 : Internalisation de l'ADDomer en monocytes

A) Suivi de l'internalisation de l'ADDomer dans le temps : La moyenne de fluorescence (MFI) liée à l'internalisation de l'ADDomer a été représentée aux différents temps. B) Analyse par cytométrie de l'internalisation de l'ADDomer dans les monocytes à T₉₀ avant et après traitement par la trypsine : L'internalisation de l'ADDomer a été détectée par l'Alexa488 C) Microscopie à fluorescence de l'ADDomer dans les monocytes après 90 minutes d'incubation : L'ADDomer a été détecté dans les cellules grâce au fluorochrome Alexa488.

2.2. Internalisation dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Les cellules dendritiques ont deux fonctions principales : le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T et les lymphocytes B, et le maintien de la tolérance centrale au « soi » dans le thymus, par le processus impliquant les lymphocytes T régulateurs dits de sélection négative. De plus, après phagocytose d'une particule antigénique, les cellules dendritiques sont responsables de son transport vers les organes lymphoïdes afin de la présenter aux lymphocytes T naïfs. Dans ces conditions il paraît alors intéressant d'étudier le comportement de l'ADDomer avec ce type de cellules, et notamment l'internalisation de notre vecteur.

Pour cela, nous avons tout d'abord traité la population monocyttaire précédemment isolée afin de la dériver dans la voie de différenciation des cellules dendritiques (MoDC). Ensuite, de la même manière que pour étudier l'internalisation dans les monocytes, nous avons incubé l'ADDomer à 37°C avec les MoDC puis analysé son entrée dans les cellules par cytométrie de flux à différents temps (Figure 44A). Après 30 minutes d'incubation avec les cellules, le signal relatif lié à l'ADDomer a été multiplié par 12 par rapport au temps initial. On remarque aussi que le traitement à la trypsine n'a aucun effet à la différence de l'internalisation dans les monocytes. En analysant le niveau de signal aux différents temps après contact, il semblerait que l'ADDomer s'internalise dans les MoDC. Afin de confirmer cette tendance observée en cytométrie de flux, nous avons aussi analysé les cellules par microscopie de fluorescence (Figure 44C). Les clichés montrent clairement que l'ADDomer se trouve dans le cytoplasme des cellules dendritiques confirmant ainsi la capacité d'internalisation de notre particule par ces cellules. Il semble que dans ce type de cellules, l'ADDomer possède une plus grande efficacité d'endocytose que dans les monocytes. En effet, en analysant le niveau de signal lié à la présence de l'ADDomer dans les cellules, on constate qu'il est entre 10 et 15 fois plus élevé que le signal observé dans les monocytes.

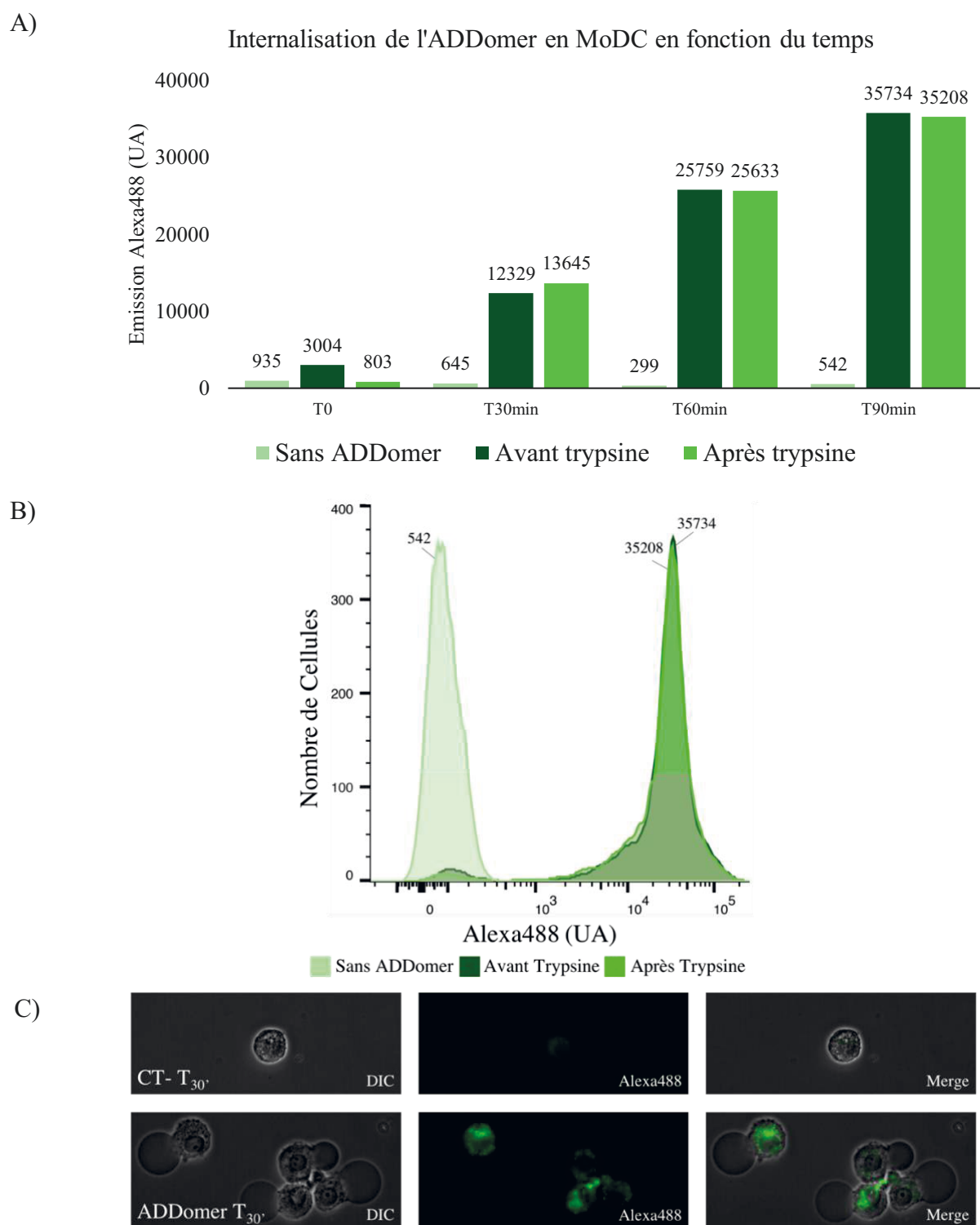


Figure 44 : : Internalisation de l'ADDomer en MoDC

A) Suivi de l'internalisation de l'ADDomer dans le temps : La MFI liée à l'internalisation de l'ADDomer a été représentée aux différents temps. B) Analyse par cytométrie de l'internalisation de l'ADDomer dans les MoDC à T_{90'} minutes avant et après traitement par la trypsine : L'internalisation de l'ADDomer a été détectée par l'Alexa488 C) Images de microscopie de fluorescence de MoDC après 30 minutes sans ou avec l'ADDomer-Alexa488 : le signal est retrouvé dans le cytoplasme de la cellule, confirmant l'internalisation de la particule.

2.3. Maturation des MoDC

Lorsqu'elles sont immatures, les cellules dendritiques possèdent une activité de phagocytose très intense, mais une capacité de présentation des antigènes très faible. À la suite de la phagocytose d'une particule antigénique et/ou de la réception de signaux de danger, les cellules dendritiques migrent alors vers les GL *via* les vaisseaux lymphatiques. Dès lors, les cellules dendritiques commencent à maturer et perdent leurs capacités de phagocytose. Cependant, elles acquièrent alors leurs capacités de présentation d'antigènes grâce à une surexpression de certains récepteurs à leur surface tels que CD80, CD40, CD83 et CD86 qui agissent alors comme des co-récepteurs indispensables à l'activation des lymphocytes T naïfs.

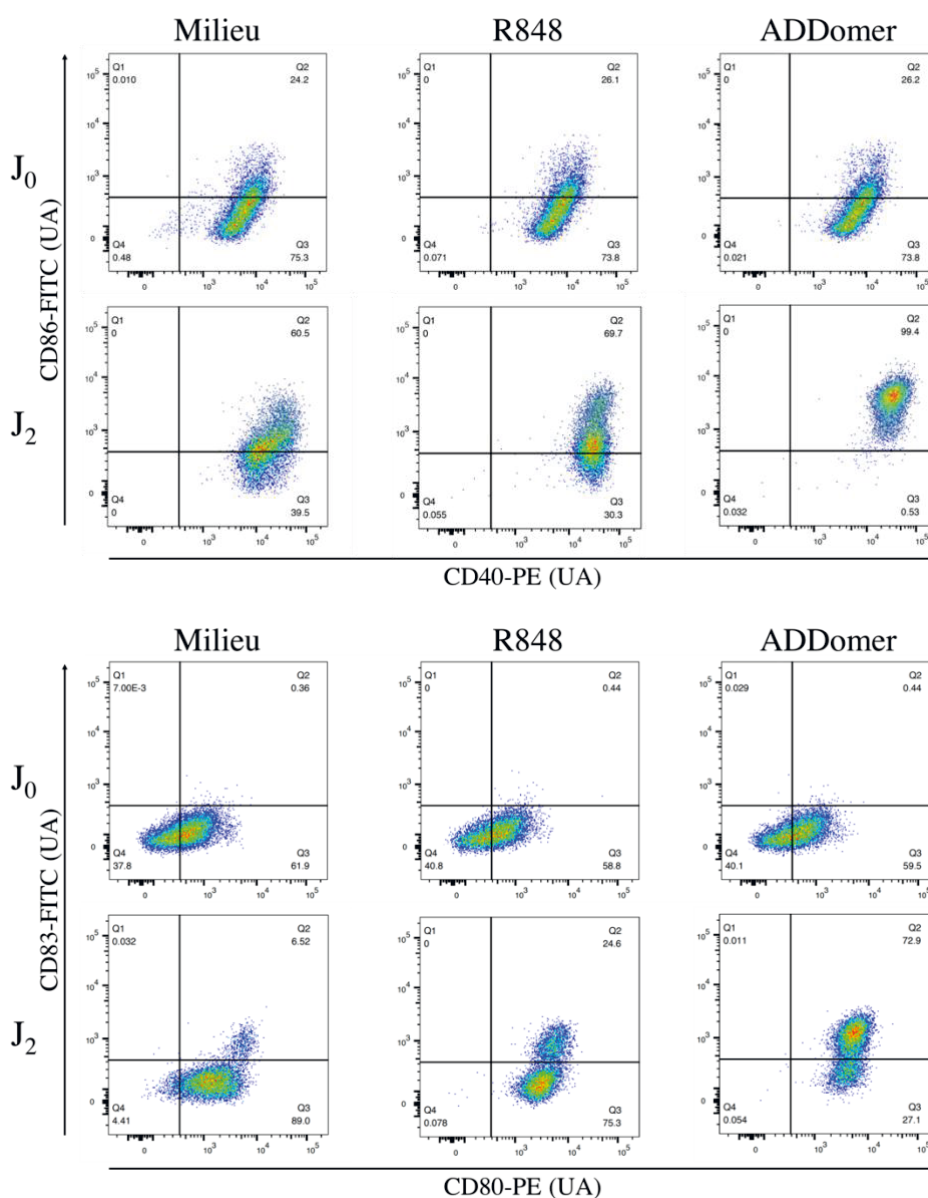
Précédemment, nous avons démontré que les ADDomers étaient drainés dans les GL de souris ayant reçu une injection suggérant leurs capacités à être reconnus en tant que pathogènes par les cellules dendritiques. Nous avons aussi montré que l'ADDomer pouvait être internalisé par certaines cellules de l'immunité humaine telles que les monocytes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes. Afin de finir la caractérisation de l'ADDomer dans les cellules de l'immunité, nous nous sommes alors intéressés à la capacité de l'ADDomer à induire la maturation de MoDC humaines. Pour cela, nous avons effectué un immunophénotypage des marqueurs d'activation suivants : CD40, CD86, CD80, et CD83. Ceci a été fait à J₀ ainsi qu'après 2 jours d'incubation (J₂) avec : du milieu de culture (Témoin négatif), la molécule R848 qui est une molécule synthétique connue pour activer les cellules immunitaires *via* les "Toll Like Receptor" 7 et 8 (Témoin positif) et l'ADDomer.

Une cellule dendritique immature exprime faiblement les récepteurs CD40, CD80 et CD86 à sa surface tandis qu'elle n'exprime pas du tout le récepteur CD83. C'est ce que nous observons à J₀, juste après mise en contact des MoDC avec les différents témoins et l'ADDomer par rapport aux cellules non marquées utilisées pour placer les cadrans (données non montrées). Après 2 jours d'incubation avec l'ADDomer, on remarque une surexpression très forte du co-récepteur CD86 et dans une moindre mesure de CD40 par rapport à J₀ (Figure 45A panel du haut). Les récepteurs CD40 et CD86 font partie des signaux de co-stimulation indispensables à l'activation totale des lymphocytes T. En effet, le CD40 va se lier au CD40-ligand présent à la surface des lymphocytes T tandis que CD86 va lui interagir avec CD28. De la même manière, on observe une très forte surexpression des co-récepteurs CD80 et CD83 à la surface des cellules stimulées. Le CD83 est une protéine de surface qui indique le degré de maturation des MoDC, et on peut remarquer qu'il est plus important dans les cellules incubées avec notre vecteur que celui des cellules incubées avec la molécule R848 utilisée en tant que témoin positif.

Le CD80 va, comme CD86, interagir avec le récepteur CD28 à la surface des lymphocytes T afin de les activer. Ce résultat suggère que notre ADDomer possède une capacité intrinsèque d'activation de la maturation des MoDC, même s'il reste à établir qu'il n'y avait pas de traces d'endotoxine ou d'acide nucléique résiduels.

En parallèle, les cellules ont été observées par microscopie optique (Figure 45B) après 2 jours d'incubation. On remarque que les MoDC incubées avec l'ADDomer présentaient des changements morphologiques identiques à ceux observés à la surface des cellules incubées avec la molécule R848. Cette apparition de dendrites à la surface des cellules est caractéristique des MoDC matures confirmant l'immunophénotypage effectué précédemment.

A)



B)

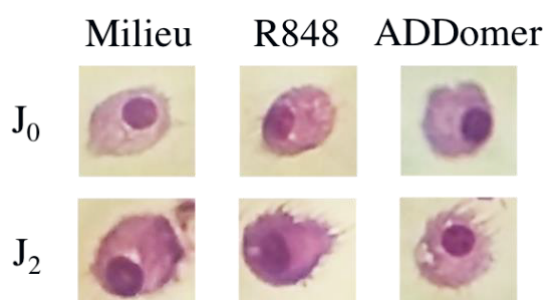


Figure 45 : Étude de la maturation des MoDC

A) Étude des marqueurs cellulaires de la maturation : Les cellules ont été incubées avec soit du milieu de culture, soit la molécule R848, soit l'ADDomer. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps dirigé contre les marqueurs de maturation des cellules immunitaires et analysées au cytomètre à J₀ (panel du haut) et J₂ (panel du bas). B) Morphologie des MoDC après stimulation : A J₀ et J₂ les cellules ont été colorées au MGG puis observées au microscope.

3. Preuve de principe dans le contexte du Chikungunya

Nous avons dans cette dernière partie produit un ADDomer à but vaccinal dans le contexte du chikungunya. Ce travail a été fait dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Bernard Verrier, directeur de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon. Nous avons précédemment montré que l'ADDomer était un candidat vaccin intéressant grâce à sa capacité (1) à être drainé dans les ganglions lymphatiques, (2) à faire maturer les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains et (3) à présenter de manière multivalente à sa surface l'épitope d'intérêt. Dans ce cadre-là, nous avons eu l'opportunité d'évaluer la capacité de l'ADDomer TevChik à induire une réponse anti-épitopique chez la souris.

3.1. Caractérisation de l'ADDomer TevChik

Comme décrit précédemment (Partie Résultats I.4.3 page 80 + Annexe I page 203), l'ADDomer TevChik est un ADDomer dans lequel a été inséré entre les sites EcoRI et RsrII (boucle variable) l'épitope E2EP3 (Epitope 3 de la protéine E2 du virus du Chikungunya (ChikV)) (Figure 46A) reconnu par des anticorps neutralisants de patients ayant contracté la maladie (Y. W. Kam et al. 2012). Cet épitope, très peu structuré, est constitué des 18 acides aminés N-terminaux de la protéine E2 de la capsid du ChikV. Afin de l'insérer dans la boucle variable de l'ADDomer, nous avons encadré l'épitope par une séquence glycine-sérine-glycine-glycine "GSGG". En N-ter de la séquence E2EP3, nous avons ajouté la séquence de coupure à la Tev sans la dernière sérine (ENLYFQ), car celle-ci est apportée par le premier acide aminé de l'épitope E2EP3 (Annexe I page 203). Le gène ainsi conçu code au final une séquence étrangère de 32 acides aminés (appelé TevChik). Nous avons nommé la construction ADDomer TevChik. Celle-ci devrait en théorie avoir une masse moléculaire (MM) de 66,2kDa, ce qui correspond à la somme de la MM de l'ADDomer = 63,5 kDa et de la MM de l'insert = 3,5 kDa déléetée de la MM de la région supprimée comprise entre EcoRI et RsrII = 0,3 kDa. Le gène synthétique a été inséré dans le plasmide navette contenant le gène l'ADDomer *via* les sites de restrictions choisis puis nous avons produit le baculovirus recombinant.

La surexpression de la protéine a été faite comme décrite précédemment et a abouti à la formation d'une protéine soluble. De plus, le test de solubilité montre une différence de migration sur gel SDS-PAGE, l'ADDomer TevChik migrant à une taille supérieure à celle de l'ADDomer. Cette différence peut probablement être expliquée par la présence de l'insert dans la boucle variable de l'ADDomer. Afin d'être certain de la présence de l'épitope dans

l'ADDomer TevChik, nous l'avons alors incubé avec ou sans la protéase Tev. En théorie, le clivage à la Tev de l'ADDomer TevChik doit résulter en l'apparition de 2 fragments : un premier d'environ 47,5 kDa et un second de 18,7kDa. L'analyse du gel SDS-PAGE (Figure 46B) montre tout d'abord que la Tev n'a aucun effet sur l'ADDomer vide même après 2 heures d'incubation. Ceci est un résultat attendu puisqu'il n'existe pas de site spécifique de coupure à la Tev dans la séquence primaire de l'ADDomer. Ensuite, nous pouvons noter que l'ADDomer TevChik migre à la taille attendue et on constate aussi qu'il apparaît une bande d'intensité légère entre 41 et 53 kDa à T₀ lors de la digestion à la Tev de l'ADDomer TevChik. Celle-ci pouvant probablement être liée aux premiers signes de digestion. Après 2 heures d'incubation, on remarque qu'il n'y a quasiment plus aucune bande détectable là où l'ADDomer TevChik est censé migrer, alors qu'il y a apparition de 2 bandes aux tailles théoriques des fragments attendus. On peut alors estimer que la quasi-totalité de l'ADDomer a été digéré par la Tev.

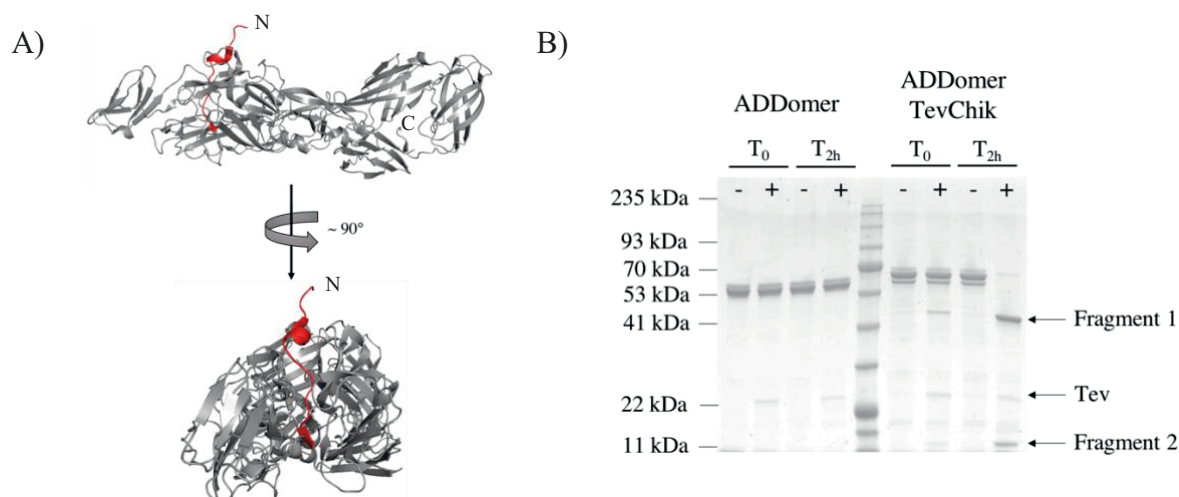


Figure 46 : Caractérisation biochimique de l'ADDomer TevChik

A) Structure tertiaire de la protéine d'enveloppe E2 du ChikV : L'épitope E2EP3 est représenté en rouge de côté et de face (pdb : 3N44). B) Gel SDS-PAGE de l'ADDomer versus ADDomer TevChik traité (+) ou non (-) avec la Tev : Après 2 heures de digestion, l'ADDomer TevChik a été clivé en 2 fragments.

Dans le contexte de la création d'une plateforme vectorisant l'épitope TevChik, nous avons estimé qu'il était intéressant d'étudier l'ADDomer TevChik une fois digéré par la Tev. En effet, l'exposition de l'épitope E2EP3 dans la protéine de capsid E2 du ChikV, semble être linéaire (Figure 46A). Le clivage de l'épitope TevChik pourrait alors résulter en une exposition à la surface de l'ADDomer TevChik semblable à celle retrouvée dans E2 (Figure 47A). C'est pourquoi nous nous sommes alors attachés à caractériser l'ADDomer TevChik non clivé par la Tev (ADDomer TevChik Uncut) mais aussi l'ADDomer clivé (ADDomer TevChik Cut) de manière plus précise. L'un des intérêts majeurs de notre plateforme réside dans le fait de la

multimérisation importante d'un épitope à sa surface. Afin de compléter la caractérisation de l'ADDomer TevChik Uncut et Cut, nous avons étudié son état d'oligomérisation ainsi que sa capacité d'endocytose en cellules HeLa. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé un clivage comme précédemment décrit puis observé les ADDomer obtenus par microscopie électronique (Figure 47B). Il est tout d'abord intéressant de noter que l'ADDomer TevChik Uncut se trouve sous un état oligomérique semblable à celui de l'ADDomer, c'est à dire sous forme dodécaédrique. Cela signifie que malgré l'insertion de l'épitope TevChik dans l'ADDomer, la multimérisation est conservée et celui-ci est exposé en théorie 60 fois à la surface de la particule. Cependant, celui-ci est contraint dans la boucle variable et pourrait ne pas être idéalement exposé pour déclencher une réponse anti-épitopique spécifique efficace. De manière plus surprenante cette fois, l'ADDomer TevChik Cut montre lui aussi un état d'oligomérisation semblable à celui de l'ADDomer malgré la coupure Tev que nous avons effectuée. L'épitope a donc été libéré de la boucle variable et par conséquent, il est *à priori* exposé de manière "linéaire" et attaché à la surface de notre vecteur. Cette modification physique peut laisser supposer que dans cette configuration, l'exposition de l'épitope TevChik que nous avons inséré mimerait mieux l'exposition d'E2EP3 dans le contexte du ChikV.

Pour finir la caractérisation des ADDomers TevChik, la dernière étape consiste à vérifier que nos 2 vecteurs ont conservés leurs capacités d'internalisation dans les cellules HeLa. Pour cela, nous avons incubé l'ADDomer TevChik Cut et TevChik Uncut sur les cellules puis détecté leurs présences par immunomarquage après fixation des cellules (Figure 47C). Après une heure d'incubation, nous sommes capables de détecter dans le cytoplasme des cellules un signal lié à la présence de l'ADDomer TevChik, qu'il ait été préalablement clivé ou non. Cela signifie tout d'abord que l'épitope que nous avons inséré n'affecte pas les capacités d'internalisation de notre vecteur. De plus, nous pouvons aussi affirmer que la coupure à la Tev de l'épitope TevChik inséré dans la boucle variable de l'ADDomer n'a aucune influence sur l'internalisation de la particule dans les cellules HeLa.

En conclusion, nous avons produit de manière soluble puis purifié un ADDomer TevChik vectorisant à la place de sa boucle variable l'épitope E2EP3 du ChikV flanqué de motifs "GSGG", et contenant le motif de coupure à la Tev. En étudiant d'un point de vue structural cet épitope E2EP3, nous nous sommes rendus compte que le site de coupure Tev inséré pour vérifier la présence d'un épitope pourrait devenir un avantage en termes de présentation à la surface de l'ADDomer. En effet, sa coupure permettrait en théorie d'exposer à la surface de l'ADDomer l'épitope TevChik de 2 façons différentes : une exposition contrainte dans la boucle et une exposition linéaire plus proche de celle de E2EP3 dans le contexte naturel

de la protéine E2 de ChikV. Cette coupure Tev n'ayant aucun effet sur l'état d'oligomérisation de l'ADDomer ni sur ses capacités d'endocytose, il nous a alors paru intéressant d'étudier *in vivo* chez la souris la réponse anti-épitopique dirigée contre E2EP3 de l'ADDomer TevChik Uncut mais aussi celle de l'ADDomer TevChik Cut.

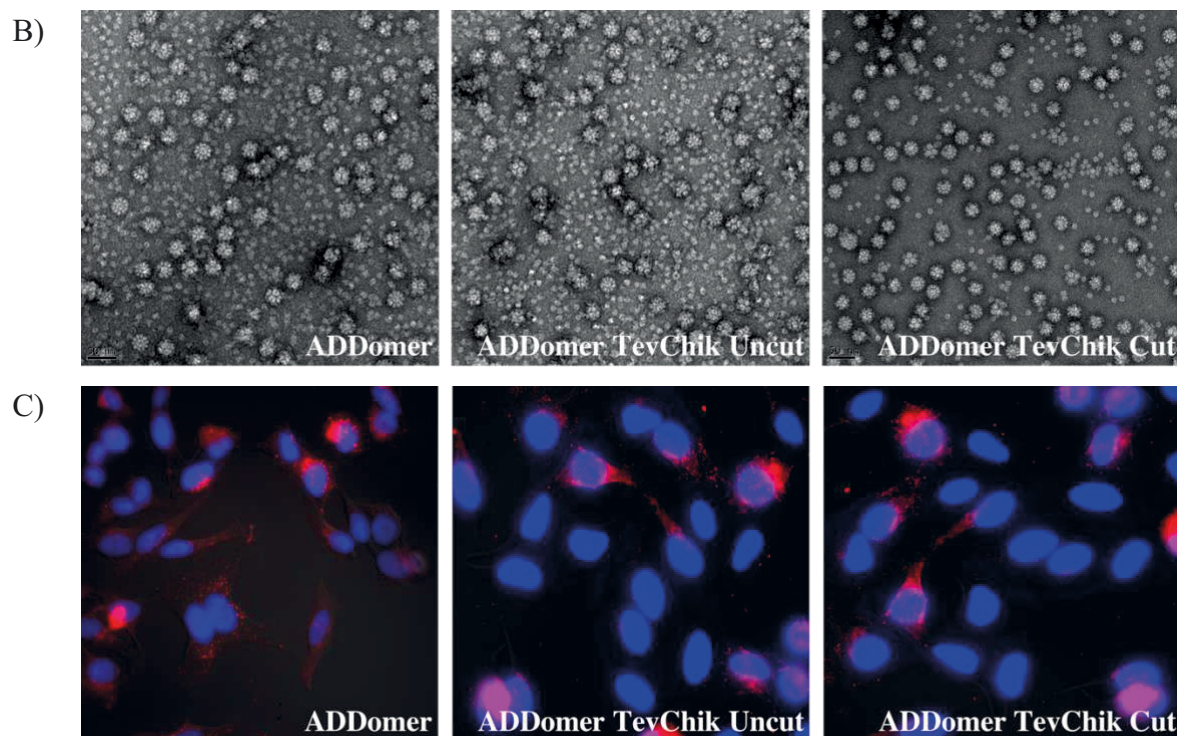
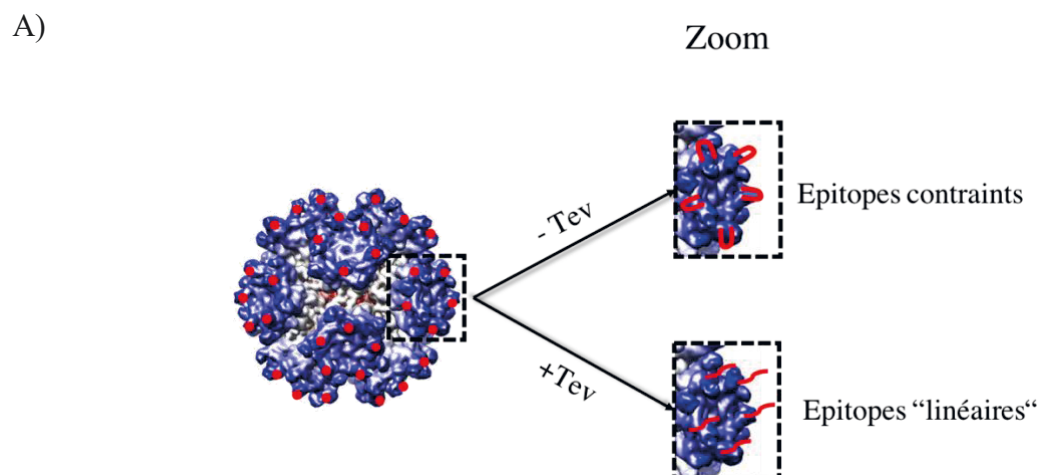


Figure 47 : Etude de l'ADDomer TevChik Cut et Uncut

A) Intérêt du clivage à la Tev : Le clivage de l'ADDomer TevChik pourrait permettre 2 modes d'exposition de l'épitope E2EP3 (en rouge) à la surface de notre vecteur. B) Clichés de microscopie électronique de l'ADDomer TevChik : Traités ou non à la Tev, l'ADDomer TevChik conserve son état d'oligomérisation initial. C) Internalisation de l'ADDomer TevChik : Malgré la coupure Tev, les différents ADDomer sont capables de s'internaliser dans les cellules HeLa.

3.2. Étude de la réponse anti-épitopique

Nous avons précédemment démontré que l'ADDomer présentait une capacité à être reconnu par les cellules présentatrices d'antigènes afin d'être drainé dans les ganglions lymphatiques de souris. De plus, nous avons conçu et caractérisé un ADDomer TevChik vectorisant l'épitope E2EP3 de la protéine d'enveloppe E2 du ChikV connu pour être la cible d'anticorps neutralisants du virus. Nous avons aussi démontré que la coupure par la Tev pouvait potentiellement mimer l'exposition de cet épitope dans le contexte naturel de la protéine E2. Fort de toutes ces constatations, nous nous sommes alors intéressés à la réponse anticorps dirigée contre l'épitope E2EP3 chez la souris. Pour cela, nous avons injecté 10 µg d'ADDomer vide, d'ADDomer "Uncut" et d'ADDomer "Cut" chez la souris BALB/c après un premier prélèvement sanguin (Sérum pré-immun). Les souris ont été injectées toutes les 2 semaines et un prélèvement sanguin était effectué toutes les 2 semaines la veille de l'injection (Figure 48A). Nous avons alors récupéré le sérum de chaque prélèvement et effectué un test "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) afin de détecter la présence d'anticorps dirigée contre le l'épitope E2EP3 (Figure 48B). Tout d'abord, lorsque l'on analyse les résultats obtenus avec l'ADDomer vide, on remarque que nous sommes incapables de détecter du signal lié à la présence d'anticorps anti E2EP3. Ce résultat est tout à fait attendu puisque l'ADDomer vide ne vectorise pas d'épitope. De manière surprenante, la réponse humorale anti E2EP3 de l'ADDomer TevChik Uncut n'est détectable qu'à partir de la 4^{ème} semaine et n'augmente que très peu entre la semaine 4 et la semaine 6. Il est à noter que cette augmentation de signal est à peine plus élevée que le bruit de fond (Qui est représenté par la moyenne des réponses à S0 + 2 X (la déviation standard à S0)) et qu'elle est essentiellement liée à la réponse d'une seule souris du groupe (Annexe III page 213). Ceci explique une déviation standard importante dans les résultats présentés. Dans le groupe de souris ayant reçu une injection d'ADDomer TevChik Cut, aucun signal lié à la présence d'anticorps anti E2EP3 n'est détectable 2 semaines après la première injection. Cependant, deux semaines après la 2^{ème} injection (à S4), le signal lié à la détection d'anticorps anti E2EP3 a, cette fois-ci, été multiplié environ par 6 par rapport à S2, et de manière remarquable le signal à S6 a quasiment doublé par rapport à celui de S4. Dans ce groupe aussi, la diversité des réponses inter individu explique la dispersion importante autour de la moyenne du signal. En effet, à S4, une souris sur 8 répond très fortement et 4 sur 8 répondent moyennement contre l'épitope E2EP3. De la même façon, à S6, deux souris sur 8 répondent très fortement et 4 sur 8 répondent moyennement (Annexe III p213). Quoiqu'il en soit, cette différence significative vient dès lors confirmer l'hypothèse que l'exposition de

l'épitope E2EP3 à la surface de l'ADDomer est primordiale au déclenchement d'une réponse anti épitopique efficace.

Bien que non délétère, la réponse anti vectorielle reste une donnée à analyser afin de caractériser l'ADDomer *in vivo* le plus complètement possible. En effet, il nous a semblé intéressant de connaître son importance car si elle s'avérait trop forte, l'ADDomer pourrait rapidement perdre de son intérêt s'il se retrouve neutralisé trop rapidement par le système immunitaire. Pour cela, nous avons comme précédemment étudié la réponse humorale dirigée contre l'ADDomer par ELISA (Figure 48C) (Les résultats présentés ici sont ceux du groupe de souris ayant reçu une injection d'ADDomer vide et sont représentatifs des 3 groupes (données non montrées)). Tout d'abord, on remarque que la réponse anti ADDomer dans le sérum des souris dilué au 1/800^{ème} n'est pas détectable 2 semaines post-injection à l'instar du signal anti E2EP3 du groupe ayant reçu l'injection de l'ADDomer Cut. Cependant, à S4 et à S6, nous détectons un signal anti ADDomer près de 25 fois plus important que le signal anti E2EP3 du groupe ADDomer Cut. Cela pouvant être expliqué par la petite taille d'E2EP3 (18 acides aminés) comparée à celle du monomère de l'ADDomer (584 acides aminés)

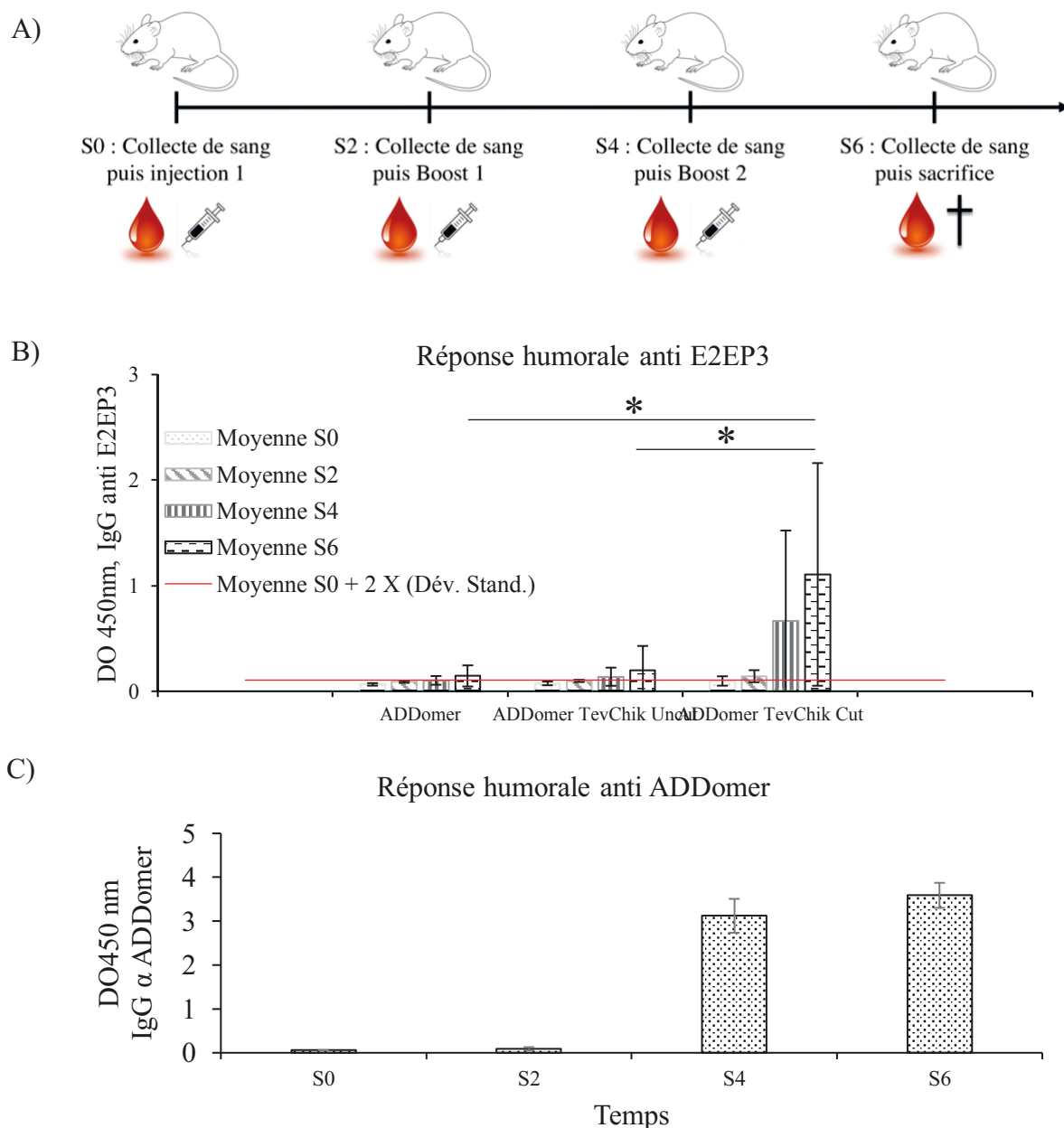


Figure 48 : L'ADDomer TevChik in vivo

A) Planning d'injection des vecteurs : Les souris ont été injectées toutes les 2 semaines après un prélèvement sanguin jusqu'à la 8^{ème} semaine et le sacrifice des animaux. B) Réponse humorale anti E2EP3 : Le sérum des souris dilué au 1/100^{ème} a été testé par ELISA contre E2EP3. C) Réponse humorale anti ADDomer : Le sérum des souris injectées avec l'ADDomer Cut dilué au 1/800^{ème} a été testé par ELISA contre l'ADDomer. (Moyenne +/- déviation standard). (n = 8 souris) (* P < 0,05)

Conclusion :

Nous avons dans cette dernière partie voulu faire une preuve de concept concernant l'utilisation de l'ADDomer en tant que plateforme vaccinale. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié la biodistribution d'un ADDomer dans la souris BALB/c à différents temps. De manière remarquable, notre plateforme est drainée dès la première heure dans le

ganglion lymphatique le plus proche du site d'injection. Il est à noter que ce drainage a été fait sans ajout d'adjuvant dans la préparation. L'absence de signal lié à la présence d'ADDomer dans les organes indique que notre vecteur pourrait être utilisable en tant que vaccin. A une époque où l'utilisation d'adjuvant est de plus en plus controversée à cause de leurs effets secondaires, l'ADDomer présente cet avantage que la plupart des vaccins actuels ne possèdent pas.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'ADDomer dans les monocytes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes. Pour cela, nous avons étudié son internalisation par cytométrie de flux à différents temps. La cinétique d'internalisation dans les monocytes semble être différente comparée à celle de l'ADDomer dans les cellules HeLa. En effet, il faut attendre 1 heure d'incubation pour être capable de détecter un signal lié à la présence d'ADDomer dans le cytoplasme des cellules monocytaires. A l'inverse, dès la première demie heure d'incubation de l'ADDomer sur les MoDC, nous sommes capables de détecter une très grande quantité de signal lié à l'ADDomer dans le cytoplasme des cellules. Cela indique donc que l'ADDomer est capable de s'internaliser dans les cellules de l'immunité humaine par un mécanisme encore non étudié à ce jour. Ensuite, nous avons démontré que l'ADDomer était capable d'induire la maturation des MoDC en étudiant la surexpression de certains récepteurs cellulaires. Cette découverte reste cependant à confirmer puisqu'elle pourrait être liée à la présence d'acide nucléique ou d'endotoxine à la surface de notre vecteur.

Fort de ces premières constatations laissant penser que l'ADDomer est un vecteur intéressant dans le domaine vaccinal, nous avons créé et caractérisé *in vivo* un ADDomer vectorisant l'épitope 3 de la protéine d'enveloppe E2 du virus du chikungunya. Lors de cette caractérisation, nous avons évalué l'importance de l'exposition de cet épitope à la surface de l'ADDomer grâce à la possibilité de libérer E2EP3 de la boucle en utilisant le site de clivage à la Tev. Nous avons alors démontré que l'injection de l'ADDomer TevChik Cut déclenchait une réponse humorale des souris qui permettait de générer des anticorps spécifiques dirigés contre le peptide E2EP3 de manière significative comparé aux souris ayant reçu une injection d'ADDomer contrôle ou d'ADDomer TevChik Uncut. Ces travaux indiquent donc que dans le cadre de l'épitope E2EP3, la façon dont il est exposé à la surface de l'ADDomer revêt une importance primordiale pour déclencher une réponse anti épitopique efficace. Grâce à la conception réfléchie des épitopes, nous avons été capables d'adresser cet écueil.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation de nanovecteurs est de plus en plus recherchée en thérapie car ils présentent des qualités intrinsèques que la plupart des vecteurs utilisés aujourd'hui n'ont pas. Au jour d'aujourd'hui, plusieurs systèmes ont été particulièrement développés pour les applications (1) de thérapie génique et (2) en tant que vecteur protéique et sont aujourd'hui généralisés à toutes les stratégies nécessitant une entrée cellulaire. Les virus, par exemple, présentent l'avantage d'avoir une forte capacité à délivrer leur matériel génétique à l'intérieur de la cellule qu'ils infectent ce qui en fait un parfait vecteur pour une cellule cible. C'est pourquoi les chercheurs les modifient génétiquement afin d'intégrer à leurs génomes un transgène ou encore jouent sur le ciblage des cellules dans lesquelles ils vont être capables de se répliquer. Les approches thérapeutiques utilisant des vecteurs viraux ont montré des résultats très prometteurs *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs essais cliniques. Certains travaux se sont aussi intéressés à la vectorisation d'épitope *via* la modification de protéines de la capsid de virus génétiquement modifiés dans un but vaccinal (Lanzi et al. 2011). Cette stratégie permet un meilleur contrôle de la stoechiométrie mais comporte malgré tout un risque de réactivation du vecteur. Certaines améliorations peuvent encore être apportées au niveau du ciblage cellulaire des vecteurs ainsi que de leurs caractères pro-inflammatoires. Une autre stratégie consiste à utiliser les peptides de translocation qui sont des peptides composés de 10 à 30 résidus et qui proviennent d'origines diverses et souvent virales. Certains sont issus de protéines naturelles ayant la capacité de traverser les membranes cellulaires, et d'autres sont purement synthétiques. Ce sont des objets très intéressants pour la vectorisation car on peut les coupler à une multitude de molécules d'intérêt telles que des acides nucléiques, des protéines ou encore des nanoparticules. Bien que ces systèmes aient montré une certaine efficacité de vectorisation *in vitro* et *in vivo*, ils ne possèdent aucune spécificité cellulaire ce qui les rend inutilisables en thérapie ciblée. Finalement, la vectorisation de principe actif par nanoparticule est aujourd'hui particulièrement étudiée car elle permet de contourner certains des problèmes rencontrés par les vecteurs viraux. Les nanoparticules peuvent être de nature (polymère, nanotube de carbone, liposome) et de taille variée (de 1 à 100nm). Le but est de « cacher » la molécule d'intérêt dans leurs cœurs pour ne la délivrer qu'une fois qu'elles ont atteint leur cible. La plupart de ces vecteurs sont synthétisés chimiquement et selon leurs natures, le composé à délivrer peut-être soit directement greffé au vecteur par lien covalent, soit encapsulé à l'intérieur du vecteur lui-même. De la taille des nanoparticules va dépendre leurs biodistributions. En effet, des particules possédant un diamètre inférieur à 6nm seront rapidement éliminées par les reins tandis qu'un diamètre compris entre 30 et 200nm évite une clairance rénale trop importante et rapide

(Albanese et al. 2012). Par conséquent, celles-ci sont les tailles la plus adaptées pour un nanovecteur et l'ADDomer rentre dans cette gamme (30nm de diamètre).

Les pseudos particules virales ("Virus Like Particle" (VLP)) se situent à l'interface entre un vecteur viral et une nanoparticule. Ce sont des particules virales sans génome obtenues par l'assemblage spontané de protéines de la capsid d'un virus. Les VLP ne contiennent aucun matériel génétique, elles sont donc non-infectieuses et incapables de se multiplier. Il a déjà été décrit que les VLP peuvent être des immunogènes efficaces pour stimuler les cellules de l'immunité innée, en particulier les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Song et al. 2010), ainsi que pour l'induction de la production d'anticorps neutralisants dans le cadre de la vaccination (Kanekiyo et al. 2013). Ainsi, l'utilisation des dodécaèdres de l'adénovirus en tant que vecteur est un sujet très prometteur et étudié depuis plus d'une vingtaine d'années ((Fender et al. 1997) (Fender et al. 2003) (Garcel et al. 2006) (P Fuschiotti et al. 2006) (Naskalska et al. 2009) (Villegas-Mendez et al. 2010) (Villegas-Méndez et al. 2012) (Szurgot et al. 2013)).

Le problème majeur de cette technologie réside dans le fait que jusqu'à présent, le seul moyen de vectoriser des protéines d'intérêt grâce aux Dds était d'utiliser un domaine WW d'origine humaine (Garcel et al. 2006). En plus d'être composée de protéines issues de 2 systèmes d'expressions différents (eu- et procaryote), cette stratégie comporte le risque de développement de réaction auto-immune induite par le domaine de liaison. Dans ce travail de thèse, nous décrivons le design et la caractérisation d'un nouveau vecteur multi-épitopique polyvalent inspiré des dodécaèdres de l'adénovirus de sérotype 3 s'affranchissant de ce problème majeur. Nous avons pour cela créé une plateforme génétique générique donnant naissance à un nouveau vecteur que nous avons appelé ADDomer. Ce type de vecteur, jamais développé jusqu'à aujourd'hui, permet l'insertion facilitée d'un ou plusieurs épitope(s) étranger(s) dans le dodécaèdre base de l'HAdV3. Nous avons alors rationnellement placé des sites de restrictions dans les boucles variable et RGD du DB de l'HAdV3 (Figure 24). Ces 2 sites, naturellement hypervariables (Zubieta et al. 2005) et particulièrement bien exposés à la surface de la particule (Figure 23B), en font des sites de choix pour vectoriser des épitopes d'intérêt. Les avantages des ADDomers proviennent du fait qu'ils sont (1) productibles de manière recombinante en cellules d'insecte (Figure 27), (2) ils intègrent des caractéristiques virales tout en ne portant aucune information génétique, ce qui permettrait la vaccination de femmes enceintes ou de patients immunodéprimés. En effet, l'ADDomer est composé uniquement de 12 copies d'une protéine virale homopentamérique (la base de penton), l'une des deux protéines adénovirales responsables de l'entrée dans les cellules. Finalement, il existe 60 copies du même monomère par ADDomer ce qui permet une maîtrise totale de la valence des

épitopes exposés à sa surface puisque 1 modification va être répétée 60 fois, 2 modifications 120 fois et 3 modifications 180 fois.

Auparavant, il a déjà été démontré qu'il était possible d'inverser la boucle RGD de la base du penton de l'HAdV2 (73 acides aminés) avec celle de l'HAdV12 (8 acides aminés) (Zubieta et al. 2006a). Cette modification a permis de diminuer la taille de la boucle RGD sans pour autant détruire la structure de la protéine. Partant de cette découverte, nous nous sommes alors intéressés à la possibilité d'augmenter la taille de la boucle RGD de l'ADDomer. En effet, il nous a paru important de savoir s'il était possible d'insérer dans la boucle un grand nombre d'acides aminés tout en conservant la structure de l'ADDomer afin de pouvoir vectoriser des protéines d'intérêt. Nous avons alors inséré une séquence de 200 acides aminés dont la structure n'est pas résolue à ce jour à la place de la boucle entière (Figure 28A). Grâce à une caractérisation biochimique et structurale, nous avons démontré que la boucle RGD était capable d'accepter cette séquence sans pour autant détruire l'ADDomer (Figure 28C). Nous avons aussi démontré qu'il était possible de remplacer la boucle variable de l'ADDomer par la boucle RGD complète (c'est à dire 44 acides aminés au lieu de 20), nous avons donc déjà une preuve qu'il est possible d'agrandir la taille de la boucle variable (Figure 30). Cependant, il serait intéressant de produire des ADDomers avec des boucles de plus en plus longues jusqu'à l'obtention d'ADDomer insoluble afin de pouvoir "quantifier" le nombre maximal d'acides aminés susceptibles d'être insérés dans les boucles l'ADDomer. Cette méthode nous apporterait une vue d'ensemble sur la capacité d'insertion dans les boucles. Les résultats obtenus resteront tout de même à prendre avec précautions puisque la complexité structurale de l'insert semble être plus important que le nombre d'acides aminés insérés dans les problèmes liés à l'insolubilité (Tableau 4).

Dans le cadre de l'utilisation d'un ADDomer à but vaccinal vectorisant à sa surface un épitope étranger, cette capacité d'insertion dans les boucles pourrait être une manière efficace de modifier la balance de la réponse humorale anti épitopique versus la réponse humorale anti ADDomer. En effet, en multipliant le nombre d'épitope à la surface de notre vecteur, il se pourrait que la réponse spécifique dirigée contre l'épitope soit alors plus importante. Cela améliorerait alors le taux de la réponse humorale désirée de l'individu et le protégerait de manière plus efficace contre le pathogène. Afin de valider cette hypothèse, nous avons déjà conçu et produit un ADDomer TevChik_{2x}. Cet ADDomer expose à sa surface un épitope E2EP3 dans la boucle variable et un 2^{ème} épitope E2EP3 dans la boucle RGD (inséré entre BssHII et Sall). Nous avons aussi commencé la caractérisation biochimique de ce vecteur comme effectué précédemment. L'ADDomer TevChik_{2x} est produit sous forme soluble et dodécaédrique et la

libération des épitopes à la surface de l'ADDomer grâce à une coupure à la *Tev* n'engendre pas de modification structurale (données non montrées). Il serait maintenant intéressant de vérifier que l'ADDomer *TevChik_{2x}* "Uncut" et de l'ADDomer *TevChik_{2x}* "Cut" ont conservé leurs caractères d'endocytose mais aussi de comparer la réponse humorale anti E2EP3 induite par l'ADDomer *TevChik_{2x}* "Uncut" et "Cut" versus celle déclenchée par l'injection d'ADDomer *TevChik* "Cut".

Toujours dans le but de contourner le problème lié à la forte réponse anti ADDomer, il pourrait être envisageable de créer un ADDomer de 2^{ème} génération en utilisant les dodécaèdres d'un autre adénovirus. Pour cela, il est possible d'envisager 3 solutions : (1) Soit les bases du penton forment naturellement des Dds auquel cas il suffit de caractériser ce nouvel ADDomer afin de vectoriser un épitope. (2) Soit les bases du penton ne s'auto-assemblent pas et dans ce cas-là, il pourrait être intéressant de créer des Dds chimériques possédant les extrémités C-Ter et N-Ter du Dd de l'HAdV3 avec le "corps" d'une autre base du penton. En effet, celles-ci sont connues pour être responsables de la dodécamérisation des bases du penton de l'HAdV3 et de plus sont "cachées" dans le cœur de la particule (P. Fuschiotti et al. 2006). Il est alors envisageable qu'une telle construction se dodécamérise et puisse être utilisée en vecteur de 2^{ème} génération. (3) Il pourrait pour finir être intéressant d'étudier les dodécaèdres des adénovirus non humains. Par exemple, Dicks et collaborateurs ont étudié un Ad de chimpanzé (ChAdY25) ayant une faible séroprévalence dans la population humaine (Dicks et al. 2012), ce qui pourrait être intéressant dans la conception d'un vecteur de 2^{ème} génération. Nous avons alors produit la base du penton du ChAdY25, et nous avons remarqué qu'il y avait formation naturelle de Dds (données non montrées). En modifiant génétiquement cette base du penton comme celle de l'ADDomer, ce type de vecteur 2^{ème} génération pourrait aussi être étudié.

La vectorisation d'épitopes structuralement complexes *via* les boucles de l'ADDomer bien que très efficace a rapidement montré ses limites. En effet, nous avons pu constater que plus l'épitope inséré était structuré plus il était difficile de produire des ADDomers sous forme solubles (Tableau 4). Il est tout de même remarquable que l'ADDomer exposant l'épitope complexe E9i3 helix soit produit sous forme soluble qu'il ait été inséré dans la boucle variable ou dans la boucle RGD. Nous avons étudié le plus souvent possible de manière systématique la solubilité de l'ADDomer en insérant l'épitope étranger dans la boucle variable puis dans la boucle RGD. Malgré cette étude, aucun ADDomer insoluble n'est devenu soluble en changeant de boucle d'insertion. Cependant, il est à noter qu'il existe finalement 6 couples de sites de restrictions entre lesquels il est possible d'insérer un épitope étranger dans la boucle RGD

(BssHII/Sall ; BssHII/ SacI ; BssHII/XbaI ; Sall /SacI ; Sall/ XbaI et SacI/XbaI). Nous n'avons de notre côté étudié un seul des 6 couples pour mener ce travail. Il pourrait être intéressant dès lors d'évaluer lequel de ces 6 couples permettrait d'augmenter la solubilité de l'ADDomer.

Devant la difficulté que représente l'insertion d'épitope structuralement complexe dans les boucles de l'ADDomer, nous avons alors travaillé sur d'autres stratégies de vectorisation. La première a été d'utiliser les 20 acides aminés N-Terminaux de la fibre en fusion avec un peptide d'intérêt appelé StikChik. L'étude par SPR de l'interaction entre la base du penton de l'ADDomer et le peptide a montré une faible affinité (Figure 35). Devant ce constat, nous avons décidé de créer de couple ADDomer "cystéine" / peptide StickS₉C ou StickS₂₀C qui interagissent entre eux de manière covalente (Figure 36B et 37). Nous avons alors fusionné ce peptide avec la protéine mCherry puis co-exprimé les 2 protéines et étudié leurs interactions. Tout au long de ces travaux, il a été impossible de confirmer la présence de lien covalent entre les ADDomers "cystéine " et leurs peptides Stick mutant / mCherry correspondants alors que l'incubation avec le peptide Stick mutant seul se fixe de manière covalente (Figure 36B). Nous avons choisi de fusionner la mCherry au peptide afin d'avoir une lecture de résultat simple. Cependant, ce choix n'est certainement pas le plus adéquate puisque sa structure en tonneau (Figure 38A) pourrait maintenir le peptide à l'intérieur. Il faudrait peut-être concevoir une séquence en acide aminés plus longue entre le peptide Stick et la mCherry afin d'éliminer cette hypothèse. Il est aussi possible de fusionner une autre protéine facilement détectable comme par exemple la "maltose binding protéine" qui, de par sa structure, éviterait ce genre d'éventualité.

Nous avons dans un deuxième temps cherché à utiliser la tige et la queue de la fibre afin de lier grâce à un phénomène d'avidité une protéine d'intérêt à la surface de l'ADDomer. Nous avons pour cela collaboré avec l'équipe du Dr Yu nous permettant de produire la protéine TRAIL en fusion avec une partie de la tige et la queue de la fibre de l'HAdV5. Malgré la certitude de la trimérisation de la protéine HAdV5FT (Figure 40C), et le fait que l'interaction base du penton / fibre semble universelle (Fender et al. 1997), nous avons jusqu'à maintenant été incapables de montrer une interaction avec l'ADDomer. Nous pensons qu'une explication de cet échec serait que seule la partie de la tige située juste après la protéine TRAIL s'est trimérisée tandis que la seconde partie de la tige et la queue ne le sont pas. Comme cette trimérisation est indispensable pour que la fibre puisse se lier à la base du penton, il n'est alors pas étonnant que l'HAdV5FT ne se lie pas à l'ADDomer. Afin de contourner ce problème, nous avons pensé à reconcevoir la protéine HAdV5FT. Tout d'abord, nous pensons qu'il serait judicieux de baser la construction de la protéine TRAIL sur la tige de l'HAdV3 et non plus celle

de l'HAdV5 afin de se placer dans un contexte naturellement favorable à une interaction. De plus, l'utilisation de la totalité de la tige de la fibre de l'HAdV3 au lieu de 2 parties spatialement éloignées pourrait induire une trimérisation complète de la tige. Cette trimérisation pourrait alors permettre l'interaction avec l'ADDomer. La fonctionnalité d'HAdV3FT seule et du complexe ADDomer / HAdV3FT serait alors à démontrer et à comparer entre elles. Il est d'ailleurs probable que l'effet multimérique de la présentation d'HAdV3FT à la surface de l'ADDomer améliore son efficacité apoptotique sur les cellules cancéreuses.

Pour finir, nous avons au cours de ces travaux démontré que notre plateforme vectorisant un épitope d'intérêt pouvait être un excellent candidat-vaccin. Tout d'abord, nous avons démontré que les cellules présentatrices d'antigènes drainent l'ADDomer vers le ganglion lymphatique le plus proche du site d'injection (Figure 42B et 42C). Nous avons également démontré que nous étions capables d'exposer l'épitope de 2 manières différentes à la surface de l'ADDomer (Figure 47), et que dans le contexte de la vectorisation de l'épitope E2EP3, la façon dont il a été exposé à la surface a été déterminante pour obtenir une réponse humorale spécifique (Figure 48). De plus, il est remarquable d'avoir obtenu ce résultat avec une injection d'ADDomer TevChik Cut sans ajout d'adjuvant. Lors de ce travail portant sur la réponse dirigée contre l'épitope E2EP3 vectorisé par l'ADDomer, nous avons aussi injecté un groupe de souris avec un nanovecteur composé de polymère d'acides polylactiques à titre de comparaison. Ce nanovecteur décoré de l'épitope E2EP3, connu pour n'être efficace qu'en présence d'adjuvant, a dans notre étude été injecté sans adjuvant. Aucune réponse humorale spécifique n'a alors été détectable dans le temps pour ce groupe (données non montrées). Cela renforce donc l'idée que l'ADDomer est un vecteur "self-adjuvant" pouvant dès lors potentiellement être utilisé chez la femme enceinte ou encore chez des patients immunodéprimés.

Dans l'avenir, afin de démontrer la fonctionnalité d'un épitope d'intérêt et/ou de s'affranchir de la comparaison "Cut" versus "Uncut" *in vivo*, il pourrait être intéressant d'utiliser la méthode de "reverse vaccinology" (Rappuoli et al. 2016). Cette approche permet l'identification d'antigène ciblé par des anticorps neutralisants. L'idée étant de connaître la fonctionnalité de l'épitope inséré en amont d'une injection. En effet, si l'épitope inséré dans l'ADDomer n'est pas reconnu par l'anticorps que l'on cherche à générer, le risque d'échec de l'immunisation sera *à priori* plus important que s'il est reconnu. C'est dans ce contexte que nous avons produit l'ADDomer L52-L67 contenant la séquence en acide aminé reconnue par l'anticorps IM-CKV063 (Fong et al. 2014), anticorps neutralisant décrit pour cibler cette séquence de la protéine E2 du ChikV et dont le test de fonctionnalité reste encore à effectuer.

Pour conclure, grâce à ses propriétés intrinsèques, l'ADDomer est capable de délivrer plusieurs millions de molécules étrangères à l'intérieure d'une cellule. Nous avons su modifier les boucles hypervariables de notre vecteur afin d'exposer à sa surface des épitopes d'intérêt. Il possède aussi des propriétés immuno-stimulatrices en absence d'adjuvant. De plus, il peut être stocké congelé puis décongelé ou même chauffé jusqu'à 45°C (température de dénaturation) puis laisser à 37°C sans perdre de manière définitive son intégrité structurale (Figure 49). Cette stabilité pourrait alors permettre de s'affranchir de la chaîne du froid, indispensable à la stabilité des vaccins actuels mais très difficile à garantir dans les pays du tiers monde. Sa taille ainsi que la maîtrise de la valence des épitopes vectorisés à sa surface en font donc un vecteur de choix pour l'avenir.

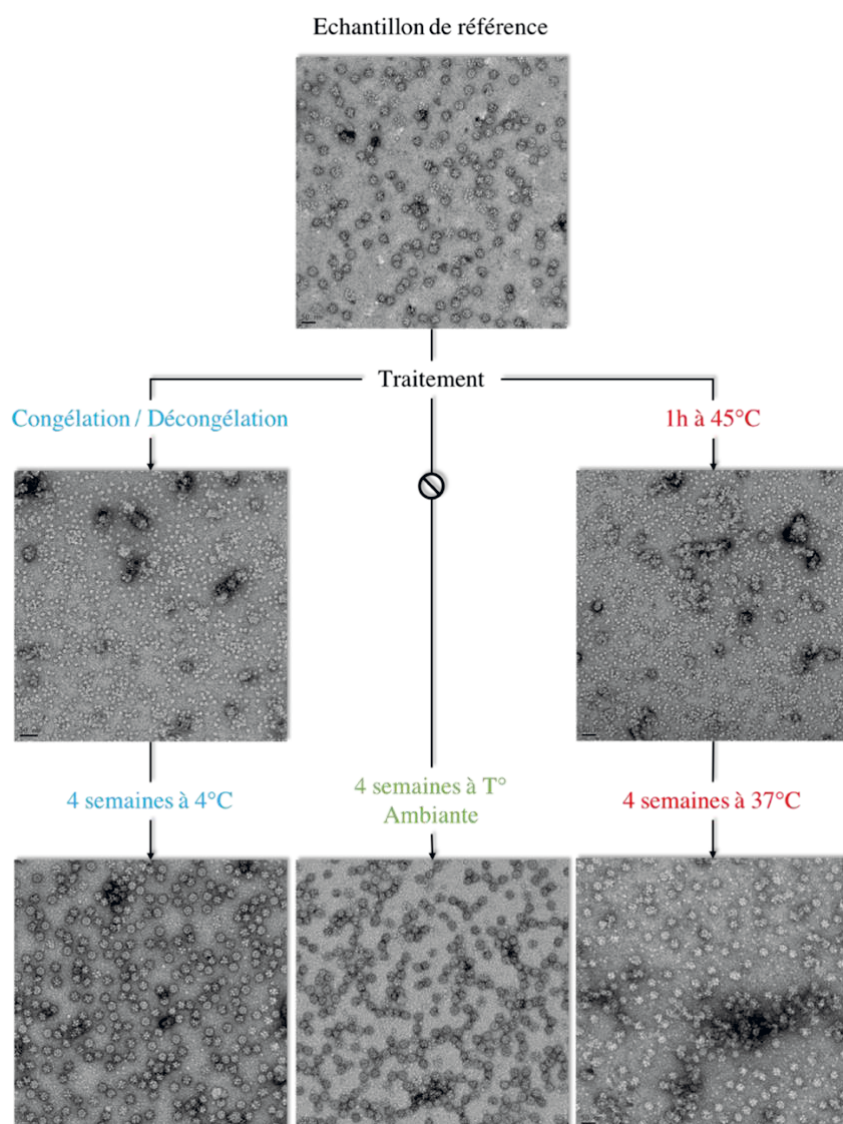


Figure 49 : Thermostabilité de l'ADDomer

Clichés de microscopie électronique en coloration négative de l'ADDomer après différents traitements thermiques. L'ADDomer ne perd son intégrité thermique seulement de manière transitoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahi, Y.S. & Mittal, S.K., 2016. Components of adenovirus genome packaging. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP).
- Akalu, a et al., 1999. The subgenus-specific C-terminal region of protein IX is located on the surface of the adenovirus capsid. *Journal of virology*, 73(7), pp.6182–7.
- Akusjärvi G., Pettersson U., R.R.J., 1986. *Structure and Function of the Adenovirus-2 Genome.*
- Alba, R., Bosch, A. & Chillon, M., 2005. Gutless adenovirus: Last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*, 12, pp.S18–S27.
- Albanese, A., Tang, P.S. & Chan, W.C.W., 2012. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), pp.1–16.
- Albinsson, B. & Kidd, A.H., 1999. Adenovirus type 41 lacks an RGD $\alpha(v)$ -integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Research*, 64(2), pp.125–136.
- Anderson, C.W., Young, M.E. & Flint, S.J., 1989. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, Mu. *Virology*, 172(2), pp.506–512.
- Arnberg, N., 2012. Adenovirus receptors: Implications for targeting of viral vectors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), pp.442–448.
- Bai, M., Harfe, B. & Freimuth, P., 1993. Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *Journal of virology*, 67(9), pp.5198–205.
- Belin, M.T. & Boulanger, P., 1993. Involvement of cellular adhesion sequences in the attachment of adenovirus to the HeLa cell surface. *Journal of General Virology*, 74(8), pp.1485–1497.
- Bergelson, J.M. et al., 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304), pp.1320–1323.
- Berget, S.M., Moore, C. & Sharp, P.A., 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(8), pp.3171–3175.
- Bewley, M.C., 1999. Structural Analysis of the Mechanism of Adenovirus Binding to Its Human Cellular Receptor, CAR. *Science*, 286(5444), pp.1579–1583.
- Binder, A.M. et al., 2017. Human Adenovirus Surveillance - United States, 2003-2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(39), pp.1039–1042.
- Bodmer, J.L. et al., 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature Cell Biology*, 2(4), pp.241–243.
- Boulanger, P.A. & Puvion, F., 1974. Adenovirus Assembly: Cross-Linking of Adenovirus

- Type-2 Hexons in vitro. *European Journal of Biochemistry*, 43(3), pp.465–470.
- Bridge, E. & Ketner, G., 1989. Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *Journal of virology*, 63(2), pp.631–8.
- Brodsky, F.M. et al., 2016. Expression Mechanisms for Affecting Class I MHC Cutting Edge: Adenovirus E19 Has Two Cutting Edge: Adenovirus E19 Has Two Mechanisms for Affecting Class I MHC Expression 1. *J Immunol References The Journal of Immunology*, 162, pp.5049–5052.
- Burmeister, W.P. et al., 2004. Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J Virol*, 78(14), pp.7727–7736.
- Burnett, R.M., 1985. The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture. *Journal of Molecular Biology*, 185(1), pp.125–143.
- Butt, A.L. & Chodosh, J., 2006. Adenoviral keratoconjunctivitis in a tertiary care eye clinic. *Cornea*, 25(2), pp.199–202.
- Chow, L.T. et al., 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12(1), pp.1–8.
- Chu, Y. et al., 2001. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Augments Adenovirus-Mediated Gene Transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(2), pp.238–242.
- Colby, W.W. & Shenk, T., 1981. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. *Journal of virology*, 39(3), pp.977–80.
- Cuconati, A. et al., 2003. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes and Development*, 17(23), pp.2922–2932.
- Cuzange, A., Chroboczek, J. & Jacrot, B., 1994. The penton base of human adenovirus type 3 has the RGD motif. *Gene*, 146(2), pp.257–259.
- Dai, X. et al., 2017. Atomic Structures of Minor Proteins VI and VII in Human Adenovirus. *Journal of Virology*, 91(24), pp.e00850-17.
- Dán, Á. et al., 1998. Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (Atadenovirus). *Journal of General Virology*, 79(6), pp.1453–1460.
- Davison, A.J., Benko, M. & Harrach, B., 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 84(11), pp.2895–2908.
- Davison, E. et al., 1999. The human HLA-A 201 allele, expressed in hamster cells, is not a high-affinity receptor for adenovirus type 5 fiber. *J Virol*, 73(5), pp.4513–4517.
- Dechecchi, M.C. et al., 2000. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus

- type 5 and 2-host cell interactions. *Virology*, 268(2), pp.382–390.
- Dechechi, M.C. et al., 2001. Heparan Sulfate Glycosaminoglycans Are Receptors Sufficient To Mediate the Initial Binding of Adenovirus Types 2 and 5. *Journal of Virology*, 75(18), pp.8772–8780.
- DEWAR, R.L. et al., 1989. Biosynthesis and Processing of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins: Effects of Monensin on Glycosylation and Transport. *J. VIROL.*, 63, p.5.
- DeWeese, T.L. et al., 2001. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer research*, 61(20), pp.7464–7472.
- Dicks, M.D.J. et al., 2012. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: Improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PLoS ONE*, 7(7).
- Dilber, M.S. et al., 1999. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Therapy*, 6(1), pp.12–21.
- Ding, J. et al., 1996. Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *The EMBO journal*, 15(8), pp.1778–83.
- Enders, J.F. et al., 1956. “Adenoviruses”: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, 124(3212), pp.119–120.
- Erling, C. & Norrby, I., 1966. The Relationship Virion between the Soluble Type Antigens and the of Adenovirus. , 617, pp.608–617.
- Everitt, E., Lutter, L. & Philipson, L., 1975. Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology*, 67(1), pp.197–208.
- Everitt, E. & Philipson, L., 1974. Structural proteins of adenoviruses. XI. Purification of three low molecular weight virion proteins of adenovirus type 2 and their synthesis during productive infection. *Virology*, 62(1), pp.253–269.
- Fabry, C.M.S. et al., 2005. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *The EMBO Journal*, 24(9), pp.1645–1654.
- Fawell, S. et al., 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), pp.664–668.
- Fender et al., 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nature Biotechnology*, 15(1), pp.52–56.
- Fender, P. et al., 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nature*

- Biotechnology*, 15(1), pp.52–56.
- Fender, P. et al., 2003. Adenovirus Dodecahedron Allows Large Multimeric Protein Transduction in Human. *Journal of Virology*, 77(8), pp.4960–4964.
- Fender, P. et al., 2008. Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle. *Virology*, 371(1), pp.155–64.
- Fender, P. et al., 2012. Impact of Human Adenovirus Type 3 Dodecahedron on Host Cells and Its Potential Role in Viral Infection. , pp.5380–5385.
- Fender, P. et al., 2005. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology*, 340(2), pp.167–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040074>.
- Flatt, J.W. et al., 2013. An Intrinsically Disordered Region of the Adenovirus Capsid Is Implicated in Neutralization by Human Alpha Defensin 5. *PLoS ONE*, 8(4).
- Fleischli, C. et al., 2007. Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *Journal of General Virology*, 88(11), pp.2925–2934.
- Fong, R.H. et al., 2014. Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy. *Journal of virology*, 88(24), pp.14364–79.
- Furcinitti, P.S., van Oostrum, J. & Burnett, R.M., 1989. Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *The EMBO journal*, 8(12), pp.3563–70.
- Fuschiotti, P. et al., 2006. Development of the dodecahedral penton particle from adenovirus 3 for therapeutic application. *The Journal of general virology*, 87(Pt 10), pp.2901–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963748>.
- Fuschiotti, P. et al., 2006. Structure of the Dodecahedral Penton Particle from Human Adenovirus Type 3. *Journal of Molecular Biology*, 356(2), pp.510–520. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228360501452X>.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. & Lieber, A., 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Medicine*, 9(11), pp.1408–1412.
- Galinier, R. et al., 2002. Adenovirus protein involved in virus internalization recruits ubiquitin-protein ligases. *Biochemistry*, 41(48), pp.14299–14305.
- Garber, K., 2006. China Approves World ' s First Oncolytic Virus Therapy for Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst*, 98(5), pp.298–300.
- Garcel, A. et al., 2006. Protein transduction into human cells by adenovirus dodecahedron using

- WW domains universal adaptors. *Journal of Gene Medicine*, 8(4), pp.524–531.
- Garnett, C.T. et al., 2002. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *Journal of virology*, 76(21), pp.10608–16.
- Giannakis, E. et al., 2002. Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *Journal of Immunology*, 168(9), pp.4585–4592.
- Ginn, S.L. et al., 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *Journal of Gene Medicine*, 15(2), pp.65–77.
- Ginsberg, H.S. et al., 1989. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), pp.3823–3827.
- Goodrum, F.D. & Ornelles, D. a, 1999. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *Journal of Virology*, 73(9), pp.7474–7488.
- Gordon, Y.J. et al., 1996. Isolation of human adenovirus type 5 variants resistant to the antiviral cidofovir. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 37(13), pp.2774–2778.
- Gout, E. et al., 2010. The Adenovirus Type 3 Dodecahedron 's RGD Loop Comprises an HSPG Binding Site That Influences Integrin Binding. , 2010.
- Greber, U.F. et al., 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75(3), pp.477–486.
- Greenstone, H.L. et al., 2002. Human herpesvirus 6 and measles virus employ distinct CD46 domains for receptor function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.39112–39118.
- Grutter, M. & Franklin, R.M., 1974. Studies on the molecular weight of the adenovirus type 2 hexon and its subunit. *J Mol Biol*, 89(1), pp.163–178.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E. & Blair, G.E., 2010. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochemical Journal*, 431(3), pp.321–336.
- Harvey, B.-G. et al., 2002. Safety of Local Delivery of Low- and Intermediate-Dose Adenovirus Gene Transfer Vectors to Individuals with a Spectrum of Morbid Conditions. *Human Gene Therapy*, 13(1), pp.15–63.
- Hay, R.T. et al., 1995. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Current topics in microbiology and immunology*, 199, pp.31–48.
- Heise, C. et al., 1997. ONYX-015, an E1b gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic

- agents. *Nature Medicine*, 3(6), pp.639–645.
- Hemminki, O. et al., 2012. Ad3-hTERT-E1A, a fully serotype 3 oncolytic adenovirus, in patients with chemotherapy refractory cancer. *Molecular Therapy*, 20(9), pp.1821–1830.
- Hilleman, M. & Werner, J., 1954. Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. *Experimental biology and medicine*, 85(1), pp.183–188.
- Hilleman, M.R. et al., 1957. Appraisal of occurrence of adenovirus-caused respiratory illness in military populations. *American Journal of Epidemiology*, 66(1), pp.29–41.
- Hong, S.S. et al., 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I $\alpha 2$ domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO Journal*, 16(9), pp.2294–2306.
- Hong, S.S. et al., 2003. Identification of Adenovirus (Ad) Penton Base Neutralizing Epitopes by Use of Sera from Patients Who Had Received Conditionally Replicative Ad (Add1520) for Treatment of Liver Tumors. *Journal of Virology*, 77(19), pp.10366–10375.
- Hong, S.S. et al., 2005. The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), pp.125–138.
- Huang, M.M. & Hearing, P., 1989. Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *Journal of virology*, 63(6), pp.2605–15.
- Hurst, G., 1957. Pharyngo-Conjunctival Fever School Outbreaks In England During The Summer Of 1955 Associated With Adenovirus Types 3, 7, And 14. *British Medical Journal*, 2(5037), p.160.
- Jia, H. & Kling, J., 2006. China offers alternative gateway for experimental drugs. *Nature Biotechnology*, 24(2), pp.117–118.
- Jiang, H. et al., 2011. Human adenovirus type 5 induces cell lysis through autophagy and autophagy-triggered caspase activity. *Journal of virology*, 85(10), pp.4720–9.
- Jörnvall, H., Ohlsson, H. & Philipson, L., 1974. An acetylated N-terminus of adenovirus type 2 hexon protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 56(2), pp.304–310.
- Juillard, V. et al., 1995. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *European Journal of Immunology*, 25(12), pp.3467–3473.
- Kafri, T. et al., 1998. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(19), pp.11377–11382.

- Kam, Y.-W. et al., 2012. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein: A protective linear B cell epitope in Chikungunya. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), pp.330–343.
- Kam, Y.W. et al., 2012. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), pp.330–343.
- Kam, Y.W. et al., 2014. Unique epitopes recognized by antibodies induced in chikungunya virus-infected non-human primates: Implications for the study of immunopathology and vaccine development. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1–11.
- Kanekiyo, M. et al., 2015. Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell*, 162(5), pp.1090–1100.
- Kanekiyo, M. et al., 2013. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, 499(7456), pp.102–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12202>.
- Kang, S. et al., 2017. Effects of gold nanoparticle-based vaccine size on lymph node delivery and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Journal of Controlled Release*, 256, pp.56–67.
- Kaufmann, J.R., Miller, R. & Cheyne, J., 2011. Vaccine supply chains need to be better funded and strengthened, or lives will be at risk. *Health Affairs (Project Hope)*, 30(6), pp.1113–1121.
- Kischkel, F.C. et al., 2001. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), pp.46639–46646.
- Kjellman, P. et al., 2015. Size-dependent lymphatic uptake of nanoscale-tailored particles as tumor mass increases. *Future Science OA*, 1(4), p.fso.15.60. Available at: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fso.15.60>.
- Klessner, J.L. et al., 2009. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), pp.328–337.
- Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P. & Horwitz, M.S., 2003. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in Medical Virology*, 13(3), pp.155–171.
- Lanzi, A. et al., 2011. Anti-adenovirus humoral responses influence on the efficacy of vaccines based on epitope display on adenovirus capsid. *Vaccine*, 29(7), pp.1463–1471.
- Lee, S.Y. et al., 2014. A novel adenovirus in chinstrap penguins (*Pygoscelis Antarctica*) in Antarctica. *Viruses*, 6(5), pp.2052–2061.

- Li, Q.G., Hambræus, J. & Wadell, G., 1991. Genetic relationship between thirteen genome types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Intervirology*, 32(6), pp.338–350.
- Liang, M., 2012. Clinical development of oncolytic viruses in China. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(9), pp.1852–1857.
- Lichtenstein, D.L. et al., 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *International Reviews of Immunology*, 23(1–2), pp.75–111.
- Lieber, A., He, C.Y. & Kay, M.A., 1997. Adenoviral preterminal protein stabilizes mini-adenoviral genomes in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, 15(13), pp.1383–1387.
- Liu, H. et al., 2010. Atomic structure of human adenovirus by Cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 329(5995), pp.1038–1043.
- Lonberg-Holm, K., Crowell, R.L. & Philipson, L., 1976. Unrelated animal viruses share receptors. *Nature*, 259(5545), pp.679–681.
- Louis, N. et al., 1994. Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *Journal of virology*, 68(6), pp.4104–6.
- Lu, Z.Z. et al., 2013. Penton-Dodecahedral Particles Trigger Opening of Intercellular Junctions and Facilitate Viral Spread during Adenovirus Serotype 3 Infection of Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, 9(10).
- Maier, O. et al., 2011. An N-terminal Domain of Adenovirus Protein VI Fragments Membranes By Inducing Positive Membrane Curvature. *Virology*, 402(1), pp.11–19.
- Martín, C.S., 2012. Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, 4(5), pp.847–877.
- McDonald, D. et al., 1999. Cocksackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Therapy*, 6(9), pp.1512–1519.
- Medina-Kauwe, L.K., Maguire, M., et al., 2001. Nonviral gene delivery to human breast cancer cells by targeted Ad5 penton proteins. *Gene Therapy*, 8(23), pp.1753–1761.
- Medina-Kauwe, L.K., Kasahara, N. & Kedes, L., 2001. 3PO, a novel nonviral gene delivery system using engineered Ad5 penton proteins. *Gene Therapy*, 8(10), pp.795–803.
- Meier, O. & Greber, U.F., 2003. Adenovirus endocytosis. *Journal of Gene Medicine*, 5(6), pp.451–462.
- Molinier-Frenkel, V. et al., 2002. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *Journal of Virology*, 76(1), pp.127–135.
- Molinier-Frenkel, V. et al., 2000. Immune response to recombinant adenovirus in humans:

- capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology*, 74(16), pp.7678–7682.
- Morin, J.E. et al., 1987. Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(13), pp.4626–4630.
- Murakami, S. et al., 2007. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Therapy*, 14(21), pp.1525–1533.
- Naniche, D. et al., 1993. Human Membrane Cofactor Protein (CD46) Acts as a Cellular Receptor for Measles Virus. *Journal of virology*, 67(10), pp.6025–6032.
- Naskalska, A. et al., 2009. Influenza recombinant vaccine: Matrix protein M1 on the platform of the adenovirus dodecahedron. *Vaccine*, 27(52), pp.7385–7393.
- Nemerow, G.R. & Stewart, P.L., 1999. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(3), pp.725–734.
- Neurath, A.R. & Rubin, B.A., 1968. Interaction of p-chloromercuribenzoate with adenoviruses. Inactivation of haemagglutinins and degradation of virions of types 3, 4 and 7. *The Journal of general virology*, 2(2), pp.215–229.
- NIH, 2002. Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Human Gene Therapy*, 13(1), pp.3–13.
- Norrby., E., 1968. Identification of Soluble Components of Adenovirus Type 11. *Journal of General Virology*, 2, pp.123–133.
- Norrby., E., 1966. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I. Morphological characteristics. *Virology.*, 28(2), p.236–48.
- Norrby., E.A., 1969. Biological characterization of structural components of Adenovirus type 12. *Journal of General Virology*, 5, pp.183–194.
- Norrby, E. et al., 1976. Adenoviridae. *Intervirology*, 7(3), pp.117–25.
- Norrby, E. et al., 1967. Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol*, 1(6), pp.1101–1108.
- Norrby, E. & Skaaret, P., 1968. Comparison between soluble components of adenovirus types 3 and 16 and of the intermediate strain 3-16 (the San Carlos Agent). *Virology*, 36(2), pp.201–211.
- Norrby, E. & Wadell, G., 1967. Soluble components of adenovirus type 4. *Virology*, 31(4), pp.592–600.

- O'Shea, C.C. et al., 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*, 6(6), pp.611–623.
- van Oostrum, J. & Burnett, R.M., 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *Journal of virology*, 56(2), pp.439–48.
- Parrott, R., 1955. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival viruses in common respiratory disease; pharyngo-conjunctival fever. *Clinical proceedings - Children's Hospital of the District of Columbia*, 11(7), pp.152–8.
- Pereira, H.G. & Wrigley, N.G., 1974. In vitro reconstitution, hexon bonding and handedness of incomplete adenovirus capsid. *Journal of Molecular Biology*, 85(4), pp.617–631.
- Pérez-Berná, A.J. et al., 2009. Structure and Uncoating of Immature Adenovirus. *Journal of Molecular Biology*, 392(2), pp.547–557.
- Perez, D. & White, E., 2000. TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Molecular cell*, 6, pp.53–63.
- Prevec, L. et al., 1990. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(1), pp.27–30.
- Van Raaij, M.J. et al., 1999. Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution. *Virology*, 262(2), pp.333–343.
- Rappuoli, R. et al., 2016. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(4), pp.469–81.
- Reddy, V.S. et al., 2010. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5995), pp.1071–5.
- Rekosh, D.M.K. et al., 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*, 11(2), pp.283–295.
- Roberts, M.M. et al., 1986. Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4754), pp.1148–51.
- Roelvink, P.W. et al., 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of virology*, 72(10), pp.7909–15.
- Rowe, W.P. et al., 1953. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine*, 84(3), pp.570–573.
- Russell, W.C., 2000. Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, 81(11), pp.2573–2604.
- Rux, J.J. & Burnett, R.M., 2004. Review: Adenovirus Structure. *Human Gene Therapy*,

- 1176(December), pp.1167–1176.
- Rux, J.J. & Burnett, R.M., 2000. Type-Specific Epitope Locations Revealed by X-Ray Crystallographic Study of Adenovirus Type 5 Hexon. *Molecular Therapy*, 1(1), pp.18–30.
- Saban, S.D. et al., 2005. CryoEM structure at 9Å resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells. *Journal of molecular biology*, 349(3), pp.526–37.
- Saban, S.D. et al., 2006. Visualization of α -Helices in a 6-Ångström Resolution Cryoelectron Microscopy Structure of Adenovirus Allows Refinement of Capsid Protein Assignments. *Journal of Virology*, 80(24), pp.12049–12059.
- Sakurai, F. et al., 2006. The short consensus repeats 1 and 2, not the cytoplasmic domain, of human CD46 are crucial for infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *Journal of Controlled Release*, 113(3), pp.271–278.
- Sandig, V. et al., 2000. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp.1002–7.
- Schneider, P. et al., 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity*, 7(6), pp.831–836.
- Schoehn, G. et al., 1996. Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *The EMBO journal*, 15(24), pp.6841–6.
- Seiradake, E. et al., 2006. Structural and mutational analysis of human Ad37 and canine adenovirus 2 fiber heads in complex with the D1 domain of coxsackie and adenovirus receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp.33704–33716.
- Short, J.J. et al., 2004. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology*, 322(2), pp.349–359.
- Siqueira-Silva, J. et al., 2012. Generation and biological properties of a recombinant dodecahedron containing the short fiber protein of the human adenovirus 41. *Intervirology*, 55(5), pp.349–355.
- Smaill, F. et al., 2013. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Science Translational Medicine*, 5(205).
- Smith, J.G. et al., 2010. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathogens*, 6(6).
- Soloff, A.C. et al., 2006. Protection of Mice and Poultry from Lethal H5N1 Avian Influenza Virus through Adenovirus-Based Immunization. *Journal of virology*, 80(4), pp.1959–1964.

- Song, J.M. et al., 2010. Protective immunity against H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. *Virology*, 405(1), pp.165–175.
- Stewart, P.L. et al., 1991. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, 67(1), pp.145–154.
- Sumida, S.M. et al., 2005. Neutralizing Antibodies to Adenovirus Serotype 5 Vaccine Vectors Are Directed Primarily against the Adenovirus Hexon Protein. *The Journal of Immunology*, 174(11), pp.7179–7185.
- Sundararajan, R. & White, E., 2001. E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Journal of virology*, 75(16), pp.7506–16.
- Syed, S.-H. et al., 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochemical Journal*, 362(2), pp.317–327. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj3620317>.
- Szolajska, E. et al., 2012. The structural basis for the integrity of adenovirus Ad3 dodecahedron. *PloS one*, 7(9), p.e46075. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3457955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Szurgot, I. et al., 2013. Self-adjuvanting influenza candidate vaccine presenting epitopes for cell-mediated immunity on a proteinaceous multivalent nanoplatform. *Vaccine*, 31(40), pp.4338–4346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.021>.
- Tarbouriech, N. et al., 2017. The vaccinia virus DNA polymerase structure provides insights into the mode of processivity factor binding. *Nature Communications*, 8(1), pp.1–12.
- Toogood, C.I.A., Crompton, J. & Hay, R.T., 1992. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *Journal of General Virology*, 73(6), pp.1429–1435.
- Trotman, L.C. et al., 2001. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nature Cell Biology*, 3(12), pp.1092–1100.
- Tuve, S. et al., 2006. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *Journal of virology*, 80(24), pp.12109–12120.
- Uhnnoo, I. et al., 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), pp.365–372.
- Vassal-stermann, E. et al., 2018. Mapping of Adenovirus of serotype 3 fibre interaction to desmoglein 2 revealed a novel ‘ non-classical ’ mechanism of viral receptor engagement. , (May), pp.1–10.
- Vigant, F. et al., 2008. Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver. *Molecular Therapy*, 16(8),

pp.1474–1480.

- Villegas-Mendez, A. et al., 2010. In Vivo delivery of antigens by adenovirus dodecahedron induces cellular and humoral immune responses to elicit antitumor immunity. *Molecular Therapy*, 18(5), pp.1046–1053.
- Villegas-Méndez, A. et al., 2012. Functional Characterisation of the WW Minimal Domain for Delivering Therapeutic Proteins by Adenovirus Dodecahedron. *PLoS ONE*, 7(9).
- Vivès, R.R. et al., 2004. Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology*, 321(2), pp.332–340.
- Vragliau, C. et al., 2017. Studies on the interaction of tumor-derived HD5 alpha defensins with adenoviruses and implications for oncolytic adenovirus therapy. *Journal of Virology*, 91(6), p.JVI.02030-16. Available at: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02030-16>.
- Waddington, S.N. et al., 2008. Adenovirus Serotype 5 Hexon Mediates Liver Gene Transfer. *Cell*, 132(3), pp.397–409.
- Wadell, G., Norrby, E. & Skaaret, P., 1969. The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosen's subgroup III - I. The rapidly sedimenting hemagglutinin. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 26(1–2), pp.33–52.
- Wang, H. et al., 2011. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11, and 14. *Nature medicine*, 17(1), pp.96–104.
- Wang, H. et al., 2015. Intracellular Signaling and Desmoglein 2 Shedding Triggered by Human Adenoviruses Ad3, Ad14, and Ad14P1. *Journal of Virology*, 89(21), pp.10841–10859.
- Wickham, T.J. et al., 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), pp.309–319.
- Wiethoff, C.M. et al., 2005. Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *Journal of Virology*, 79(4), pp.1992–2000.
- Wodrich, H. et al., 2003. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO Journal*, 22(23), pp.6245–6255.
- Wohlfart, C., 1988. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *Journal of virology*, 62(7), pp.2321–2328.
- Wold, WSM & Ison, M., 2013. No Title. In *Adenovirus*. pp. 1732–1767.
- Wold, W.S.M. & Toth, K., 2013. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Current gene therapy*, 13(6), pp.421–33.
- Yan, J. et al., 2016. Engineered adenovirus fiber shaft fusion homotrimer of soluble TRAIL with enhanced stability and antitumor activity. *Cell death & disease*, 7((6)), p.2274.

- Zubieta, C. et al., 2005. The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton. *Molecular Cell*, 17(1), pp.121–135.
- Zubieta, C., Blanchoin, L. & Cusack, S., 2006a. Structural and biochemical characterization of a human adenovirus 2/12 penton base chimera. *the FEBS Journal*.
- Zubieta, C., Blanchoin, L. & Cusack, S., 2006b. Structural and biochemical characterization of a human adenovirus 2 / 12 penton base chimera. , 273, pp.4336–4345.

ARTICLES

ARTICLE I

ARTICLE II



Studies on the Interaction of Tumor-Derived HD5 Alpha Defensins with Adenoviruses and Implications for Oncolytic Adenovirus Therapy

Charles Vragliau,^{a,d} Jens-Martin Hübner,^{a*} Peter Beidler,^a Sucheol Gil,^a Kamola Saydaminova,^a Zhuo-Zhuang Lu,^a Roma Yumul,^a Hongjie Wang,^a Maximilian Richter,^a Pavel Sova,^a Charles Drescher,^c Pascal Fender,^d André Lieber^{a,b}

Division of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, Washington, USA^a; Department of Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA^b; Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA^c; Institut de Biologie Structurale, CNRS/UGA/CEA, Grenoble, France^d

ABSTRACT Defensins are small antimicrobial peptides capable of neutralizing human adenovirus (HAdV) *in vitro* by binding capsid proteins and blocking endosomal escape of virus. In humans, the alpha defensin HD5 is produced by specialized epithelial cells of the gastrointestinal and genito-urinary tracts. Here, we demonstrate, using patient biopsy specimens, that HD5 is also expressed as an active, secreted peptide by epithelial ovarian and lung cancer cells *in situ*. This finding prompted us to study the role of HD5 in infection and spread of replication-competent, oncolytic HAdV type 3 (HAdV3). HAdV3 produces large amounts of penton-dodecahedra (PtDd), virus-like particles, during replication. We have previously shown that PtDd are involved in opening epithelial junctions, thus facilitating lateral spread of *de novo*-produced virions. Here, we describe a second function of PtDd, namely, the blocking of HD5. A central tool to prove that viral PtDd neutralize HD5 and support spread of progeny virus was an HAdV3 mutant virus in which formation of PtDd was disabled (mut-Ad3GFP, where GFP is green fluorescent protein). We demonstrated that viral spread of mut-Ad3GFP was blocked by synthetic HD5 whereas that of the wild-type (wt) form (wt-Ad3GFP) was only minimally impacted. In human colon cancer Caco-2 cells, induction of cellular HD5 expression by fibroblast growth factor 9 (FGF9) significantly inhibited viral spread and progeny virus production of mut-Ad3GFP but not of wt-Ad3GFP. Finally, the ectopic expression of HD5 in tumor cells diminished the *in vivo* oncolytic activity of mut-Ad3GFP but not of wt-Ad3GFP. These data suggest a new mechanism of HAdV3 to overcome innate antiviral host responses. Our study has implications for oncolytic adenovirus therapy.

IMPORTANCE Previously, it has been reported that human defensin HD5 inactivates specific human adenoviruses by binding to capsid proteins and blocking endosomal escape of virus. The central new findings described in our manuscript are the following: (i) the discovery of a new mechanism used by human adenovirus serotype 3 to overcome innate antiviral host responses that is based on the capacity of HAdV3 to produce subviral penton-dodecahedral particles that act as decoys for HD5, thus preventing the inactivation of virus progeny produced upon replication; (ii) the demonstration that ectopic HD5 expression in cancer cells decreases the oncolytic efficacy of a serotype 5-based adenovirus vector; and (iii) the demonstration that epithelial ovarian and lung cancers express HD5. The study improves our understanding of how adenoviruses establish infection in epithelial tissues and has implications for cancer therapy with oncolytic adenoviruses.

KEYWORDS adenovirus, cancer, defensins, innate immunity

Received 13 October 2016
Accepted 20 December 2016

Accepted manuscript posted online
11 January 2017

Citation Vragliau C, Hübner J-M, Beidler P, Gil S, Saydaminova K, Lu Z-Z, Yumul R, Wang H, Richter M, Sova P, Drescher C, Fender P, Lieber A. 2017. Studies on the interaction of tumor-derived HD5 alpha defensins with adenoviruses and implications for oncolytic adenovirus therapy. *J Virol* 91:e02030-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02030-16>.

Editor Lawrence Banks, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to André Lieber, lieber00@uw.edu.

* Present address: Jens-Martin Hübner, Division of Pediatric Neuro-oncology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. C.V. and J.-M.H. contributed equally to this article.

Defensins are small, cationic antimicrobial peptides that are characterized by several disulfide bonds and can, depending on the spatial distribution of the cysteine residues and connectivity of disulfide bonds, be divided into the subfamilies of alpha, beta, and theta defensins. So far, six alpha defensins that can be further distinguished as being of myeloid (human neutrophil peptide 1 [HNP-1], HNP-2, HNP-3, and HNP-4) or epithelial (human defensin 5 [HD-5] and HD-6) origin and 31 beta defensins have been found in humans (1).

Defensins show broad antiviral activity against both enveloped and nonenveloped viruses (2). For example, defensins can inhibit infection by cytomegalovirus (CMV), human immunodeficiency virus (HIV), human parainfluenza virus (HPIV), herpes simplex virus (HSV), influenza A virus (IAV), respiratory syncytial virus (RSV), vesicular stomatitis virus (VSV), vaccinia virus (VV), adeno-associated virus (AAV), human papillomavirus (HPV), and human adenovirus (HAdV) species A, B, C, and E (but not infection by species D and F) (3). HD5 binds to the capsids of sensitive HAdV serotypes and forms a bridge between extruding penton base loops and regions in the fiber, thus cementing the fiber into the capsid (3, 4). This capsid stabilization prevents the release of the endosomolytic protein VI and exposure of the internal core viral DNA, subsequently blocking endosome escape, nuclear localization, and ultimately replication of adenovirus (Ad) in infected cells.

HNP-1, -2, -3, and -4 are produced in neutrophils, granulocytes, and specific lymphocyte and monocyte subpopulations. Peptides HNP-1 to HNP-4 were found in lung cancer, oral squamous carcinoma, bladder cancer, renal cell carcinoma, colorectal cancer, breast cancer, cutaneous T-cell lymphoma, basal cell carcinoma, and invasive as well as head and neck cancer (for a review, see reference 5). It is thought that signals of HNP-1 to HNP-4 originate from tumor-infiltrating leukocytes. It was reported that HNP-1 to HNP-4 can support tumor growth through induction of the epithelial-to-mesenchymal transition, thus increasing tumor invasiveness (6, 7), as well as through attraction of tumor-associated macrophages that support tumor growth (8).

The association of the alpha defensin HD5 with cancer is less studied. HD5 is predominantly produced by and secreted from Paneth cells, specialized epithelial cells in the gastrointestinal (GI) tract (5). In Paneth cells, HD5 is primarily secreted as a precursor molecule and then undergoes proteolytic processing by Paneth cell-derived trypsin to generate mature forms with antimicrobial activity (9). The molecular masses for pro-HD5 forms are 8.1, 7.7, and 7.0 kDa (9). The molecular masses for mature HD5 forms are 4.3 and 3.6 kDa. HD5 expression has also been detected in epithelial cells of the urinary (10) and reproductive (11) tracts where HD5 is thought to contribute to the innate immune protection from pathogens. For HD5 produced in the genito-urinary tract, the key processing and activating enzymes are neutrophil-derived proteases (12). Although there are no reports of airway epithelial cells expressing HD5, the epithelial lining fluid of the lung contains 0.3 mM HD5, suggesting a potential function in blocking microbes in the airway tract (13). Two studies report that HD5 peptide is present in colon cancer and most likely produced by malignant Paneth cells (14, 15). HD5 expression was also documented in the colon cancer cell line Caco-2 where HD5 gene expression can be increased by recombinant fibroblast growth factor 9 (FGF9) (16). Because HD5 is found in other epithelial tissues, it is thought that it is produced by epithelial cancers other than colon cancer (5). We have corroborated this by our studies with human ovary, endometrium, and lung cancer samples. HD5 expression in tumors prompted our study on the effect of HD5 on oncolytic adenovirus therapy.

Oncolytic virotherapy focuses on engineering viruses in a way that they infect cancer cells and replicate and spread their progeny to neighboring tumor cells, eventually eliminating the tumor (17). Most clinically used oncolytic adenoviruses were based on species C serotype 5 (HAdV5). HAdV5 uses the coxsackie adenovirus receptor (CAR) as a primary attachment receptor. Because CAR expression on cancer cells is variable, HAdV serotypes with tropism other than CAR are being explored for oncolytic virus therapy. Among them are vectors derived from species B serotypes HAdV3 and -11 (18, 19). These serotypes use desmoglein 2 (DSG2) as a receptor.

During HAdV infection, the penton base and fiber proteins are produced in excess and assembled in the cytosol to form fiber-penton base hetero-oligomers called pentons (20, 21). In the cases of HAdV3, -11, and -14, 12 pentons self-assemble into dodecamers (penton-dodecahedra [PtDd]) with a diameter of 30 nm (22). During HAdV3 replication, PtDd are formed at an excess of 5.5×10^6 PtDd per infectious virus (22). Dodecamerization of pentons is required for high-affinity binding to DSG2. PtDd are released from Ad-infected cells before virus-triggered cytolysis and can be found in the paracellular space in epithelial cell cultures. We have recently shown that PtDd produced early during viral infection transiently open intercellular junctions between epithelial cells and thus facilitate the lateral spread of *de novo*-produced virions (23, 24). PtDd binding to DSG2 causes clustering of several DSG2 molecules, which in turn triggers intracellular signaling that culminates in junction opening. This mechanism involves the phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinases, triggering the activation of the matrix metalloproteinase ADAM17. ADAM17 in turn cleaves the extracellular domain of DSG2 that links epithelial cells together (25).

The central goal of this study was to demonstrate that PtDd are also capable of neutralizing defensin HD5, which represents a barrier to HAdV3 infection and dissemination. As a tool, we used a previously generated HAdV3 mutant (23). Based on the three-dimensional (3D) structure of Ad3 PtDd, we introduced a double mutation (D100R and R425E) into the penton base sequence of Ad3 that would break up the salt bridge between two neighboring pentons and prevent the assembly of PtDd. The penton base mutant (mut-Ad3GFP) is identical to its wild-type counterpart (wt-Ad3GFP) in the efficiency of progeny virus production; however, it is disabled in the production of PtDd.

RESULTS

HD5 is expressed in epithelial ovarian cancer. To provide therapeutic relevance for our studies on the interaction between HAdV and HD5, we investigated HD5 expression in normal and malignant ovarian tissues. Compared to normal tissue, HD5 mRNA expression was upregulated in endometrioid and serous ovarian cancer biopsy specimens (Fig. 1A). To exert its antiviral activity, HD5 has to be produced as an active protein. We used Western blot and immunohistochemistry (IHC) analyses to demonstrate this.

In our Western blot studies, recombinant mature HD5 ran at a molecular mass of 4 kDa. In the same range, we detected signals in three out of nine endometrioid cancer biopsy specimens and one out of seven serous ovarian cancer biopsy specimens (Fig. 1B, lanes 4, 5, 8, and 16). In the same samples, signals in the range of 6.6 to 8 kDa, which could represent pre-HD5 forms (9), were visible. In some biopsy specimens, processed forms with different molecular masses were detected (Fig. 1B, lanes 3, 6, and 8), while in other biopsy specimens only the 8-kDa pro-HD5 form was observed (Fig. 1B, lanes 9, 12, and 14). There was also immunoreactivity with proteins larger than 14 kDa, which, at this point, cannot be explained. Only one out of nine biopsy specimens of healthy ovarian tissue displayed signals that resembled HD5. In summary, the Western blot studies indicated that in ovarian cancer HD5 protein is expressed as its precursor form. In most endometrioid cancer biopsy specimens, HD5 is processed to mature peptides. Processing products can differ in individual tumors.

Furthermore, we performed IHC for HD5 on formalin-fixed paraffin and frozen tissue sections. The HD5 specificity of the monoclonal anti-HD5 antibody used was confirmed on sections of healthy colon, where signals were localized to Paneth cells (Fig. 2A). HD5 staining was found in sparse epithelial cells on sections of healthy or premalignant endometrial tissues (Fig. 2B and C, respectively). In contrast, sections of malignant endometrioid ovarian cancer tissue showed strong HD5 immunoreactivity (Fig. 2D to I). HD5 staining was found inside malignant cells (Fig. 2E, G, and I) and in the tumor stroma (Fig. 2F and H), which could represent secreted HD5. The intensity of HD5 reactivity varied between patients (Fig. 2D to F for patient 1, G for patient 2, and H and I for patient 3). To demonstrate that HD5 is produced by epithelial cancer cells, we

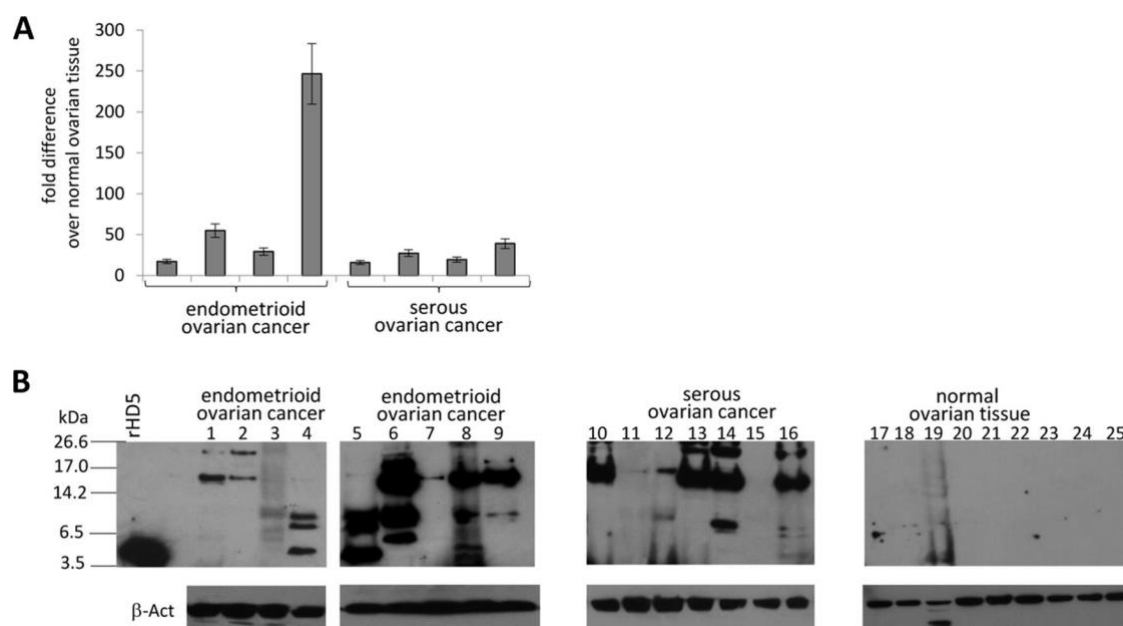


FIG 1 HD5 expression in ovarian cancer biopsy specimens from patients. (A) Fold increase of HD5 mRNA levels in endometrioid and serous ovarian cancer biopsy specimens compared to levels in healthy ovarian tissue pooled from five patients. HD5 mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized to the level of *b*-actin mRNA. Each column represents a biopsy specimen from an individual patient. The standard deviation is derived from technical repeats (n 3). (B) Western blot analysis for HD5 in tissue samples. Each lane represents an individual biopsy specimen. rHD5, 100 ng of recombinant HD5. After HD5 Western blotting, filters were stripped and incubated with antibodies against *b*-actin as a loading control.

costained frozen sections with antibodies against HD5 and DSG2, an epithelial junction protein (Fig. 3A). These results were confirmed by staining of consecutive paraffin sections with antibodies against HD5 and DSG2, respectively (Fig. 3B).

HD5 is expressed in small-cell lung cancer. Furthermore, we performed IHC for HD5 on paraffin sections from small-cell lung cancer tissues. In all three patients, we found strong HD5 signals (Fig. 4). HD5 appeared to be produced by malignant cells, and the secreted form accumulated in tumor stroma and necrotic areas.

Our findings that secreted HD5 is produced by ovary, endometrium, and lung cancers creates a basis to further study the implication of cancer-derived HD5 for oncolytic adenovirus therapy.

Effect of synthetic defensins on adenovirus infection and spread. In agreement with studies by Smith et al. (3), we demonstrated that synthetic HD5 defensin inhibited the transduction of a cancer cell line by HAdV5 and HAdV3 vectors (Fig. 5A). We used replication-competent vectors expressing green fluorescent protein (GFP) (wt-Ad5GFP and wt-Ad3GFP, respectively, where wt is wild type, and preincubated them with a synthetic HD5 peptide. The mixture was then added to lung cancer A549 cells, and GFP fluorescence was analyzed 48 h later. While transduction with wt-Ad5GFP was completely blocked by HD5, this effect was less pronounced for wt-Ad3GFP. We then compared viral spread of wt-Ad3GFP and the penton base mutant mut-Ad3GFP. The two viruses contain identical GFP expression cassettes to follow transduced cells (Fig. 5B). Infection of cells, viral replication, and production of penton base were comparable for both viruses (23). wt-Ad3GFP and mut-Ad3GFP viruses were used to infect confluent A549 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 PFU/cell. Culture medium was changed every day either without or with 15 mM HD5. Cell viability was assessed either by crystal violet staining (Fig. 5C) or MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay (Fig. 5D) at day 5 after infection. In the absence of HD5, both viruses efficiently killed the monolayer of A549 cells as a result of viral spread, whereby mut-Ad3GFP was slightly less potent (3% remaining viable cells for wt-Ad3GFP versus 9% viable cells for mut-Ad3GFP; P 0.05), most likely as a result of its reduced

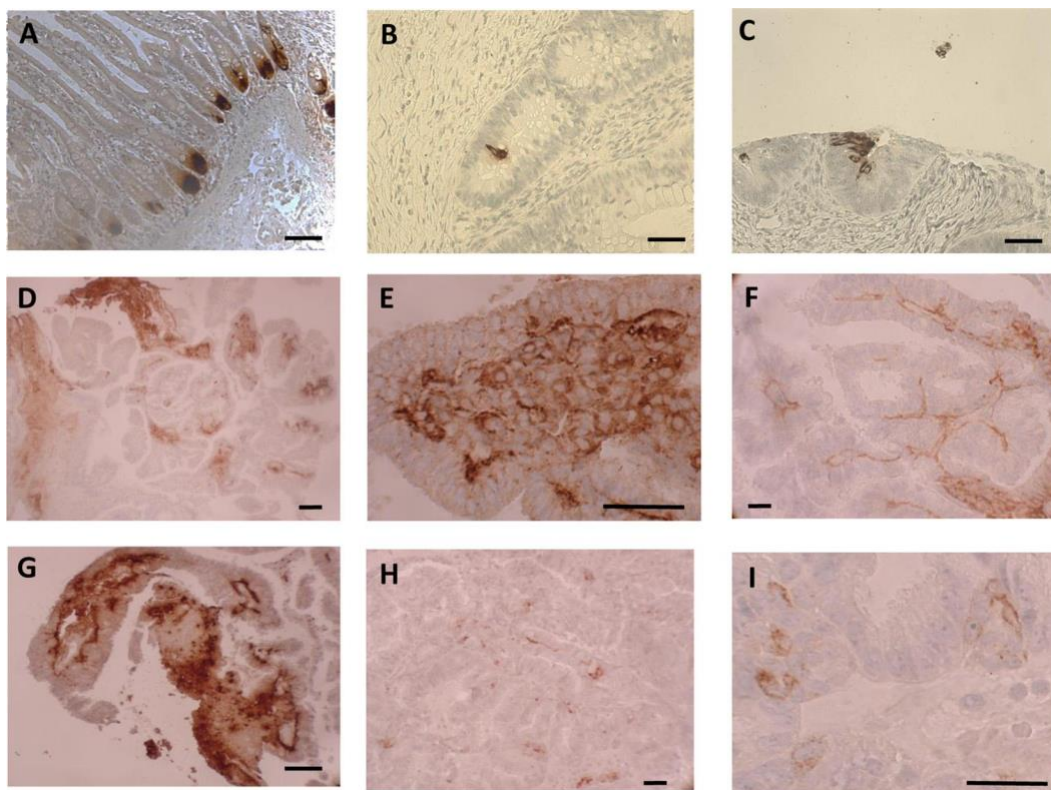


FIG 2 Immunohistochemistry for HD5 on formalin-fixed paraffin sections. HD5 staining appears in brown. (A) Normal colon tissue. (B) Healthy endometrial tissue. (C) Tissue showing complex atypical hyperplasia, which is a premalignant lesion of endometrial origin. (D to I) Tissues from patients with endometrioid ovarian cancer, as follows: patient 1, panels D to F; patient 2, panel G; patient 3, panels H and I. Scale bar, 50 μ m.

ability to open epithelial junctions that formed between A549 cells. Addition of HD5 slightly diminished the potency of wt-Ad3GFP (22% remaining viable cells), indicating that PtDd cannot completely inactivate HD5 at the concentration used. Importantly, the cytolytic activity of mut-Ad3GFP was nearly completely blocked in the presence of HD5 (P 0.001 for the difference between results for wt-Ad3GFP with HD5 and mut-Ad3GFP with HD5). The data support our hypothesis that PtDd released from primary infected cells act as a decoy for HD5 present in paracellular spaces and thus facilitate secondary infection and spread of *de novo*-produced wt-Ad3GFP.

Binding of HD5 to PtDd. The above hypothesis suggests that PtDd binds to HD5. In an attempt to demonstrate this, we first used a surface plasmon resonance (SPR) assay (Fig. 6A). HD5 was immobilized on sensor chips, and different concentrations of recombinant PtDd were injected. A dose-response effect was clearly observed, confirming PtDd interaction with immobilized HD5. However, affinity assessment was not possible, and nonphysiological avidity might be partly responsible for the slow dissociation phase. As a second method, we used a Western blot assay where we separated PtDd, HAdV3 fiber knob, and wt-Ad3GFP virus on an SDS-polyacrylamide gel, blotted the proteins, and incubated the filters with synthetic HD5 peptides as a probe (Fig. 6B). HD5 binding was detected using a rat polyclonal anti-HD5 antibody followed by an anti-rat IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Fig. 6B, Western panels). Before being loaded on the gel, samples were either boiled for 5 min in the presence of *b*-mercaptoethanol or left unboiled (Fig. 6B, B or UB, respectively). In the lanes representing boiled PtDd, the 62-kDa penton base monomer and the 27-kDa fiber monomer are visible. HD5 binds to both proteins, as well as a smaller (58-kDa) protein which is most likely a penton base derivative. HD5 binding to the penton base proteins is also detected in lanes in which complete wt-Ad3GFP virions were loaded. Here, binding to the fiber might be below the detection limit of the assay in the unboiled

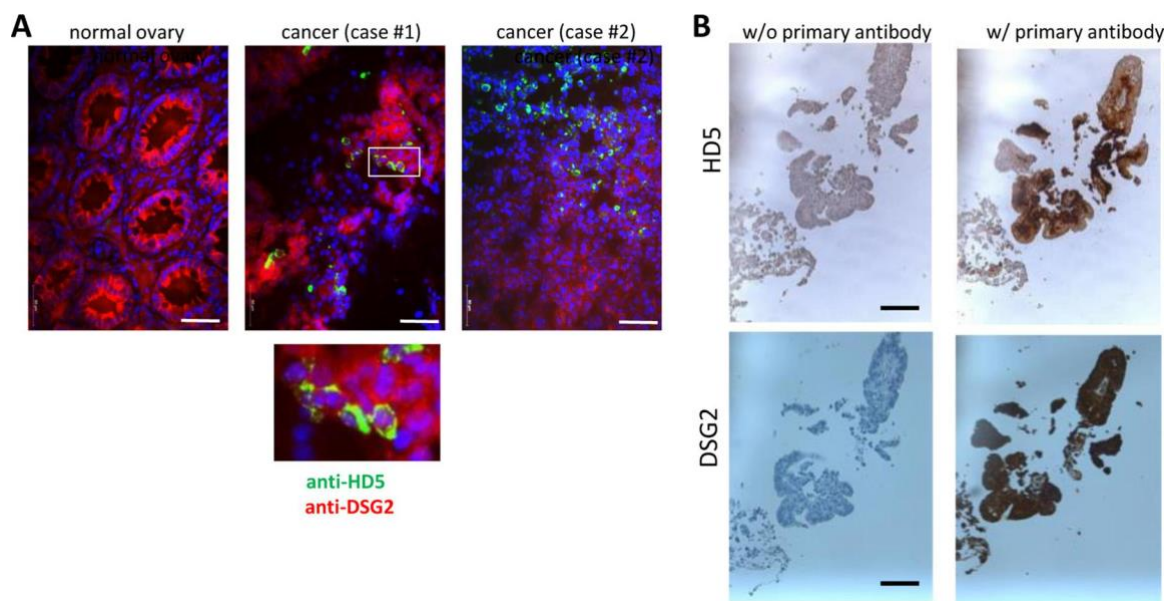


FIG 3 Colocalization of HD5 and DSG2 in ovarian cancer sections. (A) Immunofluorescence analysis for HD5 (green) and desmoglein 2 (DSG2) (red) on sections from biopsy specimens of normal ovarian tissues and two cases of endometrioid ovarian cancer. The small panel is a 5-fold-magnified image of the area boxed in white and shows that HD5 signals are present in DSG2-positive cancer cells. (B) Staining of consecutive paraffin sections with HD5- and DSG2-specific antibodies. (Left panels) As controls, sections were incubated without (w/o) the primary anti-HD5 or anti-DSG2 antibody and with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody only. (Right panels) Sections were stained with primary and secondary antibodies. Scale bar, 50 μ m.

sample (Fig. 6B, UB lane of Ad3 virus). No other virus capsid protein appeared to interact with HD5, including the most abundant capsid protein hexon (97 kDa). For both PtDd and wt-Ad3GFP virions, signals at 90 kDa or 150 kDa were visible in the lanes representing unboiled samples. These signals could represent multimeric penton base protein forms that were not completely dissociated into monomers. Smith et al. reported that HD5 binding involves the fiber shaft and the penton base (26). In our study, we found strong HD5 binding signals to a recombinant protein consisting of one Ad3 shaft motif and the Ad3 fiber knob (Fig. 6B, Ad3 knob).

Effect of endogenously induced HD5 gene expression on viral spread and the role of PtDd. So far, our studies involved synthetic HD5 peptide added to virus or cells. Next, we attempted to show that PtDd can neutralize endogenously expressed HD5 and thus increase viral spread. To do this, we capitalized on a report that recombinant FGF9 induced HD5 mRNA and protein expression in human colon cancer Caco-2 cells (16). FGF9 triggers signaling through FGF receptor 3 (FGFR-3), and the HD5 gene is a downstream target of FGFR-3. We measured HD5 mRNA levels by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) in three human cancer cell lines incubated with or without FGF9 for 4 days (Fig. 7A). In Caco-2 cells we found an 150-fold increase in HD5 mRNA levels upon FGF9 incubation. In another human colon cancer cell line, T84, FGF9 increased HD5 mRNA levels 9-fold. HD5 mRNA was not detectable in cervical carcinoma HeLa cells with or without FGF9 incubation. The levels of secreted HD5 protein in tissue culture supernatants of Caco-2 and T84 cells were induced 22-fold and 2.4-fold, respectively, by FGF9, as measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 7B). We then infected FGF9-treated and -untreated Caco-2, T84, and HeLa cells with wt-Ad3GFP or mut-Ad3GFP and measured the titers of *de novo*-produced virus in two assays. The first assay measured GFP-expressing units (infectious units [IU]) in culture supernatants after infection of 293 cells with 1:100 dilutions of cell supernatants (Fig. 7C). While the titers of *de novo*-produced Ads were comparable in cells without FGF9, they were significantly lower for mut-Ad3GFP generated in FGF9-treated Caco-2 and T84 cells ($P < 0.001$). The PtDd-producing wt-Ad3GFP, however, was not affected by FGF9-mediated HD5 expression. There was no effect of FGF9 on the titers

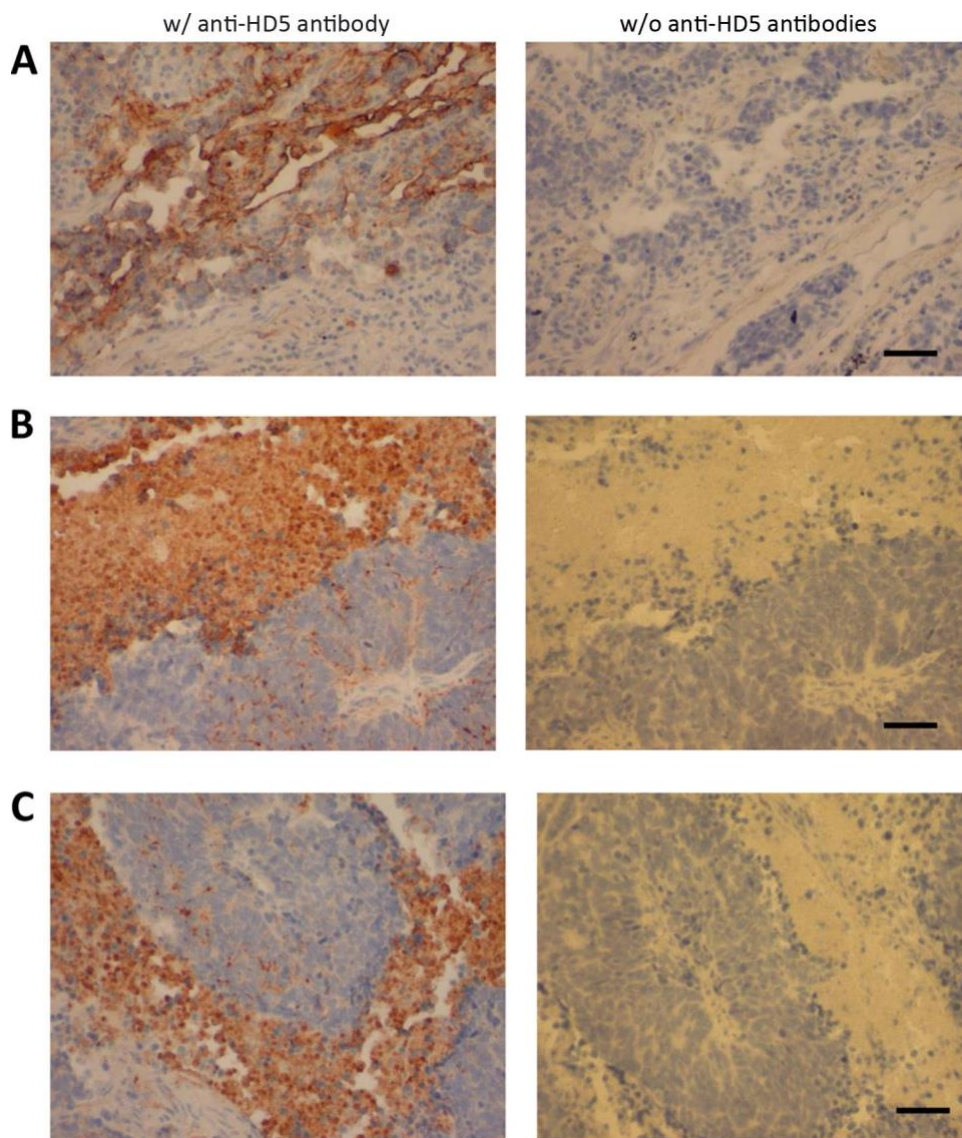


FIG 4 Immunohistochemistry for HD5 on formalin-fixed paraffin sections of small-cell lung cancer tissue. HD5 staining appears in brown. Images in panels A to C are from three different biopsy specimens/patients. In panels B and C accumulation of HD5 in tumor stroma can be seen. Scale bar, 50 μ m.

of either virus in HeLa cells, which do not produce HD5. To consolidate these data, viral genome titers were measured in Caco-2 cell lysates by quantitative PCR (qPCR) (Fig. 7D). As seen in the infectious-unit assay, titers of mut-Ad3GFP produced in FGF9-treated Caco-2 cells were significantly lower (P 0.05) although the differences in the cell lysates were not as substantial as seen in the infectious-unit assay of the supernatants. The outcome of these studies is summarized in Fig. 7E. wt-Ad3GFP produces PtDd, which block FGF9-induced HD5. For wt-Ad3GFP, there was no difference in transduction and spread in the presence or absence of FGF9. mut-Ad3GFP does not produce PtDd and is therefore not capable of blocking FGF9-induced defensins. Viral spread and progeny virus production were blocked for mut-Ad3GFP. Our data also suggest that Caco-2 cells can cleave pro-HD5 into active forms. This is in line with previous reports that colon cancers express proteases capable of cleaving HD5 (14, 15).

Effect of ectopically expressed HD5 on *in vivo* oncolytic efficacy of wt-Ad5GFP, wt-Ad3GFP, and mut-Ad3GFP. To further test our hypothesis and assess whether our findings are relevant for cancer therapy with oncolytic adenoviruses, we generated isogenic tumor cell lines with expression of an ectopic HD5 gene. We first screened

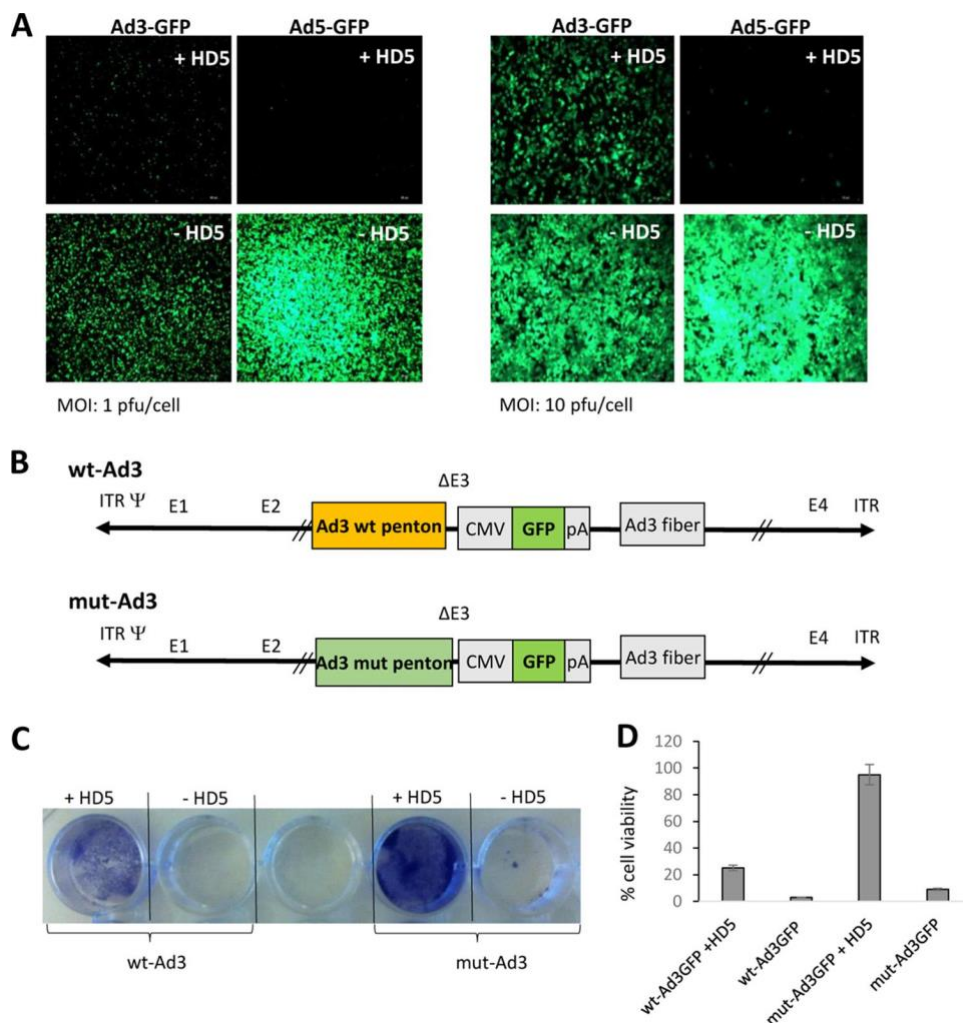


FIG 5 Inhibition of adenoviral infection and spread by synthetic HD5. (A) Inhibition of transduction. Replication-competent wt-Ad3GFP and wt-Ad5GFP were preincubated with 15 mM synthetic HD5 peptide or scrambled control peptide for 1 h at 4°C. The mixture was then added to A549 cells at an MOI of 1 or 10 PFU/cell in serum-free medium for 2 h at 37°C. Cells were washed, and fresh medium was added to cells. After 48 h, transduction was analyzed based on GFP fluorescence. Representative images are shown. Scale bar, 50 mm. (B) mut-Ad3GFP is identical to wt-Ad3GFP except for the two D100R and R425E amino acid substitutions in the penton base that disable the assembly of penton base and fiber into PtDd. This mutation does not decrease the level of penton base production or virus titers. ITR, inverted terminal repeat; pA, polyadenylation sequence. (C) Inhibition of mut-Ad3GFP spread. Confluent A549 cells in DMEM and 1% FBS were infected at an MOI of 0.5 PFU/cell for 2 days with wt-Ad3GFP or mut-Ad3GFP. At day 2, 15 mM synthetic HD5 peptide or scrambled control peptide was added daily for 5 days after medium change. Viable cells were stained with crystal violet at day 5. Representative images are shown. (D) Inhibition of mut-Ad3GFP spread. A549 cells were treated as described for panel C, and cell viability was measured 5 days after addition of HD5 by MTT assay. Cell viability of uninfected/untreated cells was taken as 100% (*n* 3).

human cancer cell lines for endogenous HD5 mRNA expression. These included the lung cancer cell line A549, the breast cancer cell line BT474, HEK 293 cells, the erythroleukemia cell line K562, and the lymphoma cell lines Raji and Farage. For comparison, we also included human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Fig. 8A). Overall, HD5 mRNA levels were relatively low, i.e., 0.01 to 0.3% of *b*-actin mRNA levels. Interestingly, HD5 mRNA levels were relatively high in both lymphoma cell lines. The lowest HD5 mRNA levels were found in BT474 and K562 cells. We therefore focused on these cell lines. The HD5 gene under the control of the strong ubiquitously active elongation factor alpha (EF1a) promoter was transferred into cells by a VSV-G-pseudotyped lentivirus vector (Fig. 8B, upper panel). Transduced cells were selected with G418 for 4 weeks. HD5 mRNA levels, measured by qRT-PCR,

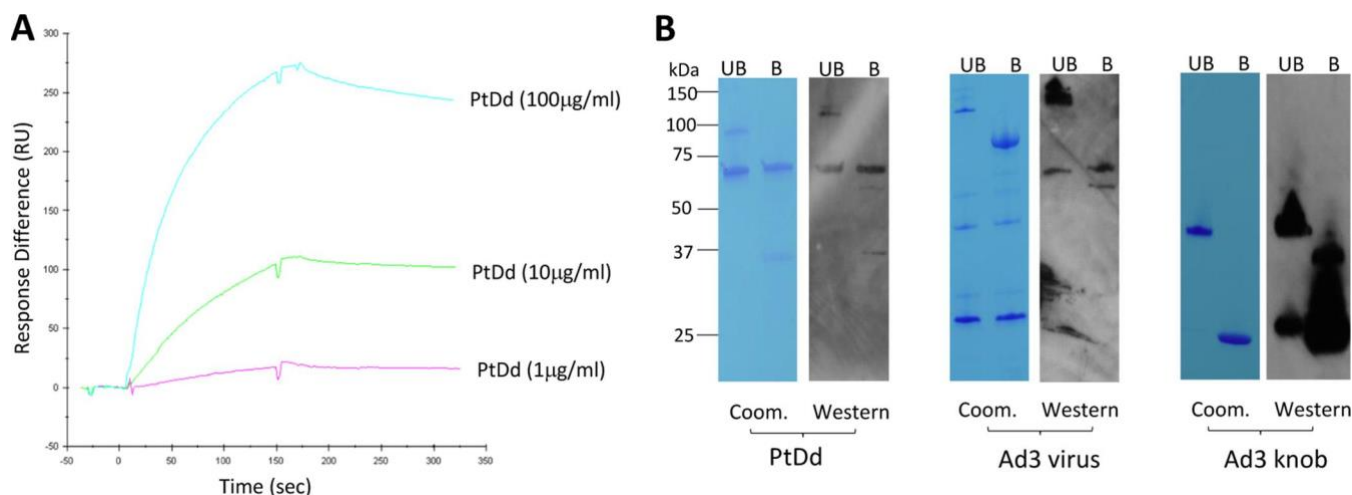


FIG 6 Binding of HD5 to PtDd. (A) Surface plasmon resonance analysis. HD5 was immobilized on sensor chips, different concentrations of recombinant PtDd (1, 10, and 100 µg/ml) were injected, and the response curves were recorded. (B) Binding of HD5 in Western blot assays. One microgram of recombinant PtDd, 1 mg of Ad3 fiber knob, or 10^9 PFU of wt-Ad3GFP virus in Laemmli buffer was either directly loaded or boiled for 5 min in the presence of 2-mercaptoethanol before being loaded on an SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were either stained with Coomassie blue (left panels) or blotted to a PVDF membrane which was then incubated with 0.1 mM synthetic HD5 peptide. HD5 binding was detected by a polyclonal anti-HD5 antibody (right panels). The theoretical molecular masses of Ad3 hexon, penton base, and fiber monomers are 97, 61.8, and 34.8 kDa, respectively. The molecular mass of the monomeric recombinant Ad3 fiber knob is 23 kDa. The fiber knob forms relatively stable trimers.

were 5- and 4-fold higher, respectively, in K562 and BT474 cells transduced with the HD5 lentivirus vector than in the parental cell line (Fig. 8B, lower panels). Growth of BT474 cells expressing HD5 slowed down greatly, which made it difficult to obtain the cell numbers required for *in vivo* studies. We therefore focused on the erythroleukemia cell lines K562 and K562 cells expressing HD5 (K562-HD5). The use of a nonepithelial cell line would also allow a focus on the HD5-neutralizing function of PtDd without interference by the junction-opening function of PtDd. Production of secreted HD5 protein in K562-HD5 cells was confirmed by ELISA (Fig. 8C). While immunoreactive HD5 was secreted from K562-HD5 cells into the supernatant, it was not processed into active forms, and spread of mut-Ad3GFP was not decreased by HD5 in confluent K562-HD5 cultures (data not shown).

To establish tumors, 2 million K562 or K562-HD5 cells in Matrigel were injected subcutaneously into immunodeficient mice. Immunohistochemistry of tumors showed infiltration of mouse leukocytes (Fig. 9A). When tumors reached a volume of 200 mm³, wt-Ad3GFP or mut-Ad3GFP was injected intratumorally, and tumor volumes were measured (Fig. 9B). Expression of HD5 in K562 cells had no effect on tumor growth. wt-Ad3GFP delayed the growth of K562 and K562-HD5 tumors to similar degrees. A comparable antitumor effect was observed for mut-Ad3GFP injected into K562 tumors. Notably, the erythroleukemia cell line K562 does not form epithelial junctions, and PtDd is therefore not necessarily required to overcome this barrier to viral spread. However, the expression of HD5 in K562-HD5 tumors significantly inhibited the oncolytic activity of mut-Ad3GFP ($P < 0.01$ at day 19). The inhibitory effect of HD5 expression on mut-Ad3GFP was abolished by intratumoral injection of recombinant PtDd (Fig. 9C). The study showed similar levels of antitumor efficacy between the K562-HD5 cells injected with mut-Ad3GFP and treated with PtDd and the K562 cells injected with mut-Ad3GFP. This indicates that HD5 expression negatively affects the oncolytic activity of Ads that do not produce PtDd. To further support this, we performed a study with the replication-competent wt-Ad5GFP vector as a prototype for an HAdV5-based oncolytic virus (Fig. 9D). wt-Ad5GFP was injected into K562 and K562-HD5 tumors as described for the Ad3 study, and tumor volumes were measured at day 19 after tumor cell implantation. Our data show that wt-Ad5GFP-injected K562 tumors were significantly smaller than wt-Ad5GFP-injected K562-HD5 tumors, suggesting that HD5 blocks the oncolytic activity of wt-Ad5GFP.

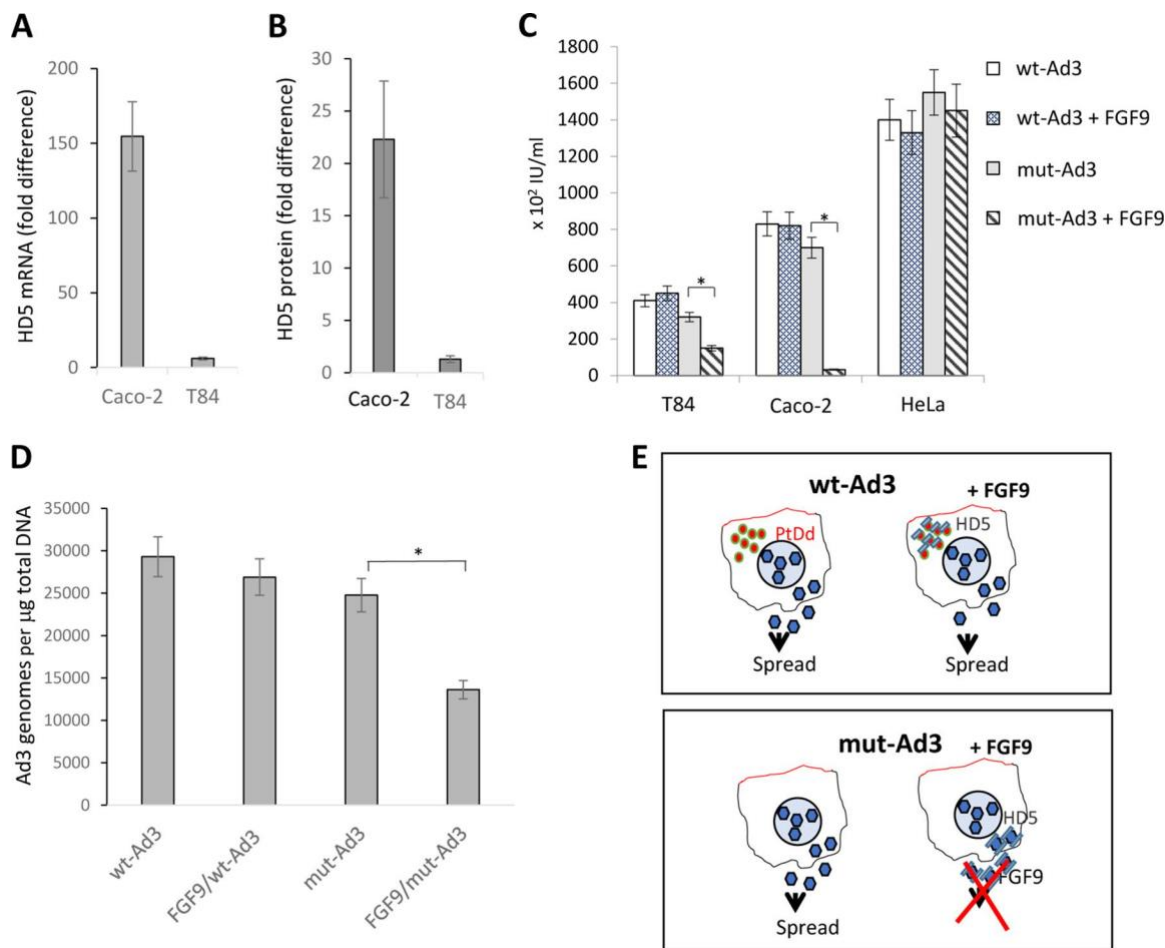


FIG 7 Role of PtDd in blocking HD5-mediated virus inactivation. (A) Induction of HD5 mRNA expression by FGF9. Colon cancer Caco-2 and T84 cells were incubated with FGF9 (50 ng/ml) for 3 days. Then, total RNA was purified, and HD5 mRNA was measured by qRT-PCR. Shown is the fold change in levels of HD5 mRNA compared to the level in untreated cells. HD5 mRNA levels in FGF9-treated and -untreated cells were normalized to *b-actin* mRNA levels ($n = 3$). (B) HD5 protein levels in culture supernatant after FGF9 induction measured by ELISA. Shown is the fold change of HD5 concentrations relative to those in untreated cells ($n = 3$). (C) Titration of progeny virus in cells in which HD5 expression was induced by FGF9. Confluent T84, Caco-2, or HeLa cells were used for these studies. One set of wells was treated daily (after medium change) with FGF9 (50 ng/ml). After 4 days of FGF9 treatment, wt-Ad3GFP and mut-Ad3GFP were added at an MOI of 0.5 PFU/cell for 2 h, followed by a medium change. Medium (with and without FGF9) was changed daily. Medium aliquots were collected at day 4 after infection and filtered to remove detached cells, and titers (infectious units [IU]) were determined on GFP-expressing 293 cells. Only differences between results for the wt-Ad3GFP FGF9-treated and -untreated groups were significant (*, $P = 0.001$; $n = 3$). (D) Quantification of viral genomic DNA in Caco-2 cell lysates. Cells were collected after 4 days of FGF9 treatment as described for panel C. Genomic DNA was isolated, and Ad3 genomes were measured by qPCR using hexon primers. Only differences between results for the mut-Ad3GFP FGF9-treated and -untreated groups were significant ($n = 3$; *, $P = 0.05$). (E) Diagram explaining the decreased spread of mut-Ad3GFP in FGF9-induced cells. wt-Ad3GFP produces PtDd which neutralize FGF9-induced HD5. Therefore, there was no significant difference in wt-Ad3GFP spread and progeny production in the presence or absence of FGF9. mut-Ad3GFP does not form PtDd and is therefore incapable of inactivating HD5 and protecting progeny virus. mut-Ad3GFP progeny virus production is therefore inhibited in FGF9-treated cells.

DISCUSSION

The expression of HD5 mRNA and protein in colon cancer has been reported previously (14, 15). In our study, we demonstrate the presence of processed HD5 peptides in epithelial ovarian cancer, predominantly in cases of endometrioid cancer. We speculate that HD5 processing is mediated by proteases derived from tumor-infiltrating neutrophils, which are usually a major component of nonmalignant cells in tumors (27). As noted above, neutrophil-derived proteases mediate HD5 processing in the genitourinary tract (12). On tissue sections, immunoreactive HD5 was found in specific subsets of malignant epithelial cells, the biology of which has to be further investigated. Furthermore, we demonstrated strong HD5 protein signals in sections of small-cell lung cancer tissue. Secreted HD5 appeared to accumulate in tumor stroma,

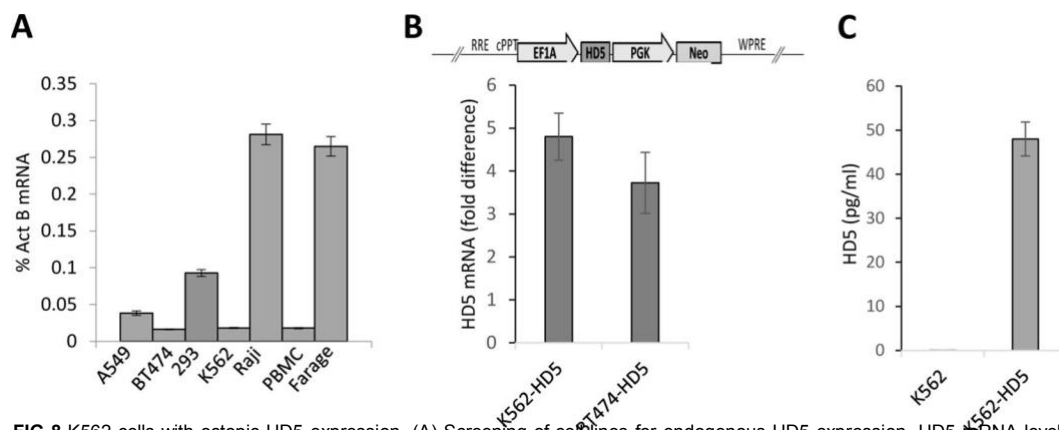


FIG 8 K562 cells with ectopic HD5 expression. (A) Screening of cell lines for endogenous HD5 expression. HD5 mRNA levels were measured in total cellular RNA by qRT-PCR and expressed as percentages of *b*-actin (Act B) mRNA levels. (B) HD5 mRNA expression in K562 and BT474 cells after gene transfer with an HD5-expressing lentivirus vector. The lentivirus vector contains the HD5 gene under the control of the elongation factor alpha (EF1a) promoter and the neomycin (Neo) resistance gene under the control of the phosphoglycerate kinase promoter (PGK). RRE, Rev-responsive element; cPPT, central polypurine tract; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Cells were transduced at an MOI of 1 PFU/cell and selected with G418 for 4 weeks. HD5 and *b*-actin mRNA levels were measured by qRT-PCR. HD5 mRNA levels were normalized to *b*-actin mRNA levels and expressed as fold increase compared to the levels in parental cells ($n = 3$). (C) HD5 protein levels in supernatants of K562 and K562-HD5 cells measured by ELISA ($n = 3$).

and in some ovarian cancer patients, elevated HD5 levels were found in the serum (Fig. 10). This indicates that HD5 can come into contact with and neutralize oncolytic HAdV and potentially inhibit the intratumoral dissemination of *de novo*-produced virus. To test this hypothesis, we performed studies with HAdV3. We recently demonstrated that HAdV3 PtDd are functionally relevant for virus spread in epithelial cells (23). Immunofluorescence studies indicate that PtDd are released from infected cells before virus-triggered cytolysis and mediate restructuring of epithelial junctions. This function requires multiple Ad3 fiber knobs in a specific spatial constellation, which is present in PtDd, implying that dodecamerization is functionally important (28). Here, we report on a second function of PtDd that allows better viral dissemination, i.e., the ability of PtDd to neutralize cellular HD5 defensins. Smith et al. showed that in Ad virions HD5 molecules simultaneously bind to fiber and penton base, which upon endocytosis prevents the release of fibers and endosomal escape of virions (3). Using equilibrium binding assays with labeled HAdV5 and synthetic HD5, the same authors also concluded that several thousand HD5 molecules are bound per virus (26). Here, we show that HD5 binds to recombinant PtDd. Our SPR studies indicated a dose-dependent binding of HD5 to PtDd, with a very low dissociation rate. This is in agreement with the reported function of this peptide which is known to stabilize the viral capsid and to prevent its controlled dismantling. Direct binding of synthetic HD5 to free fiber and penton base as well as to complexes of these two proteins with higher molecular weights was also observed in a Western blot assay.

The central tool to test our hypothesis that PtDd neutralize HD5 involves the pair of wt-Ad3GFP and mut-Ad3GFP viruses. We first showed that viral spread of mut-Ad3GFP is blocked by exogenous synthetic HD5 whereas that of wt-Ad3GFP is only minimally affected. This was then further consolidated in Caco-2 cells where expression of endogenous HD5 was induced by FGF9. Finally, the ectopic expression of HD5 in K562 cells diminished the oncolytic activity of mut-Ad3GFP *in vivo* but not that of wt-Ad3GFP.

As outlined above, both viruses produce the same levels of free penton base and fiber, with the difference that mut-Ad3GFP cannot assemble pentons into dodecahedra. Our Western blot data show that HD5 binds to fiber and penton base monomers. We speculate, however, that the PtDd structure is more efficient in neutralizing HD5 than

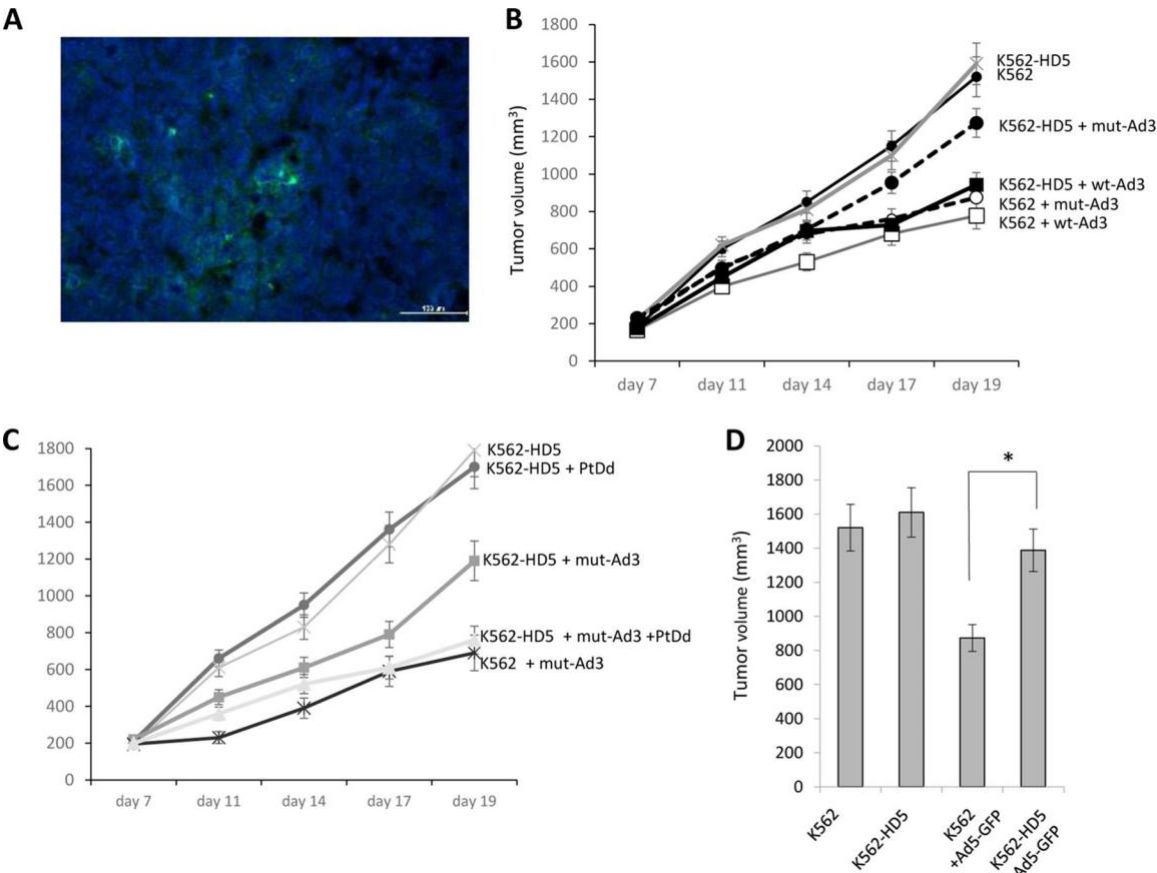


FIG 9 Effect of ectopic HD5 expression on oncolytic activity *in vivo*. (A) Mouse leukocyte infiltration of subcutaneous K562 tumors. Frozen tumor sections were stained with fluorescein isothiocyanate conjugated against the mouse pan-leukocyte marker CD45 (green). Scale bar, 100 μ m. (B) *In vivo* study with wt-Ad3GFP and mut-Ad3GFP. K562 and K562-HD5 cells were injected subcutaneously to establish tumors. When tumors reached a volume of 200 mm³, PBS, wt-Ad3GFP, or mut-Ad3GFP was injected intratumorally, and tumor volumes were measured at the indicated time points (*n* 7). The difference between values for mut-Ad3GFP-injected K562 and K562-HD5 cells at day 19 is significant (*P* 0.05). (C) The study described in panel A was repeated to test the effect of recombinant PtDd on the oncolytic activity of mut-Ad3GFP. Intratumoral PtDd injections (1 mg in 50 μ l of PBS) were started the day after mut-Ad3GFP injection and were then repeated every 4 days. (D) *In vivo* study with wt-Ad5GFP. K562 and K562-HD5 tumors were established, and virus was injected as described for panel B. Shown are the tumor volumes at day 19 (*n* 5). The difference between values for wt-Ad5GFP-injected K562 and K562-HD5 cells at day 19 is significant (*, *P* 0.05).

free pentons, penton base, or fiber because mut-Ad3GFP was more sensitive to HD5 than wt-Ad3GFP. Of note, PtDd are unusual virus-like particles formed by proteins that do not interact with each other in the viral capsid where penton bases are separated by hexons. The penton/penton interface can then be considered a novel putative binding site for other interactants, such as defensins, as has been already reported for

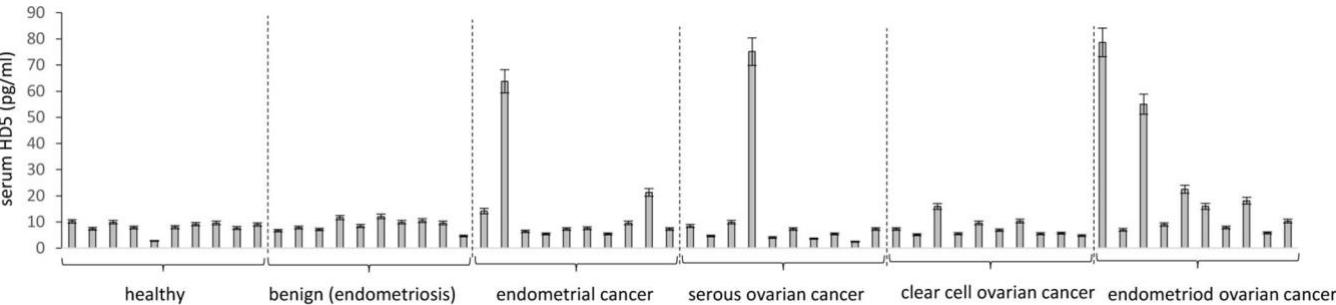


FIG 10 HD5 protein concentrations in human serum samples. Samples were diluted 1:10 in PBS and subjected to ELISA. The standard deviation is derived from technical repeats (*n* 3).

PtDd interaction with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (29). Our study suggests that HAdV serotypes that form PtDd (e.g., HAdV3, -11, and -14) could be more promising platforms for oncolytic Ad vectors.

In addition to production by colon, ovarian, endometrial, and lung cancers, it is possible that HD5 is produced by other cancers derived from epithelial cells in the airway, gastrointestinal, and genito-urinary tracts or epithelial ducts in the pancreas and liver. An indirect line of support for the association of HD5 and cancer comes from the fact that FGF9 signaling through FGFR-3 triggers HD5 expression (16). FGF9 is a target of the Wnt/*b*-catenin pathway. The Wnt pathway is deregulated in many types of human cancers, resulting in aberrant expression of FGF9 (30–32).

Our current findings that ovarian and lung cancers can produce HD5 and that this interferes with oncolytic activity of HAdVs are also relevant for oncolytic therapy with other viruses, including HSV, reovirus, and VSV, which are also sensitive to HD5 (13, 33). Furthermore, considering that HD5 is overexpressed in malignant endometrial cells and secreted, the peptide could theoretically serve as a cervical lavage biomarker for malignant changes in the female reproductive system.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Synthetic human alpha defensin HD5 peptide was from Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan). Recombinant FGF9 was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The HAdV3 and HAdV5 fiber knobs were produced in *Escherichia coli* with N-terminal 6-His tags using a pQE30 expression vector (Qiagen, Valencia, CA) and purified by Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose chromatography as described elsewhere (34). Recombinant Ad3 penton-dodecahedra (PtDd) were produced in insect cells and purified as described previously (35).

Adenoviruses. Propagation and purification of HAdVs were performed as described elsewhere (36). wt-Ad3GFP and wt-Ad5GFP are wild-type HAdV3- or HAdV5-based vectors containing a CMV GFP expression cassette inserted into the E3 region (23, 24). Both vectors have intact E1 genes. mut-Ad3GFP is based on wt-Ad3GFP but contains D100R and R425E mutations in the penton base gene that disable the virus's production of PtDd (23, 24). In mut-Ad3GFP, pentons (fiber plus penton base) assemble but do not form dodecameric structures.

Cell lines. Human colon cancer Caco-2 cells (ATCC HTB-37) were grown in ATCC-formulated Eagle's minimum essential medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Waltham, MA), 2 mM L-glutamine, antibiotics (100 IU of penicillin and 100 mg/ml streptomycin [P-S]). Human colon cancer T84 cells (ATCC CCL-284) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with F12 nutrient mix (DMEM/F12) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and P-S. Human HeLa, HEK 293, A549, and BT474 cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, glutamine, and P-S. K562 and Farage cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) with 10% FBS, glutamine, and P-S.

Cancer biopsy specimens. Ovarian cancer biopsy specimens were obtained through the Pacific Ovarian Cancer Research Consortium (POCRC). The tissue repository provided (i) fresh or frozen tissue samples for RNA and Western blot analysis, (ii) formalin-fixed paraffin sections, and (iii) serum samples. Work with patient-derived tumor material was approved by the Fred Hutchinson Cancer Research Center Institutional Review Board (protocol 6289).

HD5 immunofluorescence. Ovarian tissue and cancer sections were embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen on dry ice. OCT compound-embedded tissues were then stored at 80°C and equilibrated to 20°C for at least 1 h prior to sectioning. Tumor tissue was sliced (8 mm) using a Leica CM 1850 cryostat (Leica Microsystems) and then transferred onto Superfrost Plus microscope slides (Fisher Scientific, Hampton, NJ). Slides were fixed in 4% paraformaldehyde (Fisher Scientific) for 10 min at 4°C. After two rinses with phosphate-buffered saline (PBS), slides were blocked with 2% nonfat dry milk in PBS for 20 min at room temperature. Immunofluorescence analyses were performed with mouse anti-alpha defensin 5 monoclonal antibody (MAb) (MABF31; Millipore) (1:50) and goat anti-human DSG2 (AF947; R&D Systems) at 1:50. Primary antibody binding was detected with donkey anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 (AF488) or donkey anti-goat IgG-AF594 (1:200).

qRT-PCR for HD5 mRNA. A Quick-RNA MicroPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) was used to extract total RNA, which was then treated with a DNA-Free kit (Ambion, Austin, TX, USA) for DNA digestion. RNA (1 mg) was reverse transcribed into cDNA using a TaqMan MicroRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The qPCRs were performed using Power SYBR green master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA). The reaction was carried out on an ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 1 cycle of 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 58°C for 60 s and a dissociation stage to generate melting curves. The sequences of the HD5-specific primers were as follows: forward primer, 5'-GGCTACAACCC AGAAGCAGT; reverse primer, 5'-CGGCCACTGATTTACACAC. The *b*-actin gene (forward primer, 5'-CGT CTTCCCTCCATCG; reverse primer, 5'-CTCGTTAATGTACGCAC) was used as a reference gene to normalize HD5 mRNA expression. Relative expression levels were calculated using the 2^{-C_T} (where C_T is threshold cycle) method (14).

qPCR for adenoviral DNA genomes. Genomic DNA was extracted using a DNeasy kit from Qiagen (Valencia, CA). qPCR was performed as described previously (23). The sequences of the specific primers for the adenoviral hexon detection were as follows: forward primer, 5'-GCCCCAGTGGTCATACATGCAC ATC; reverse primer, 5'-CCACGGTGGGGTTTCTAACTT.

Inhibition of Ad transduction by synthetic HD5. wt-Ad3GFP or wt-Ad5GFP was incubated with or without synthetic HD5 at a concentration of 15 mM for 1 h at 4°C in 150 ml of DMEM serum-free medium. Confluent A549 cells were then exposed to 35 ml of the mixture (Ads with or without defensins) for 2 h at 37°C in serum-free medium. Cells were washed twice with serum-free medium and incubated with DMEM-FBS medium. After 48 h, transduction was analyzed based on GFP fluorescence by fluorescence microscopy.

Western blotting for HD5. Homogenized and sonicated tissues were incubated overnight at 4°C in 20% (wt/vol) acetic acid supplemented with protease inhibitors to extract cationic proteins. After centrifugation at 15,000 rpm in an Eppendorf centrifuge for 30 min at 4°C, supernatants were collected, and the pH was adjusted to neutral with 8 M NaOH. Ten microliters of lysate (2.5 mg of protein) was mixed with 10 ml of 2 Novex Tricine SDS sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), incubated at 85°C for 5 min, and run on a Novex 0 to 20% Tricine gel. Proteins were blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a semidry Invitrogen iBlot system. PVDF membranes were incubated in 0.2% glutaraldehyde-PBS for 10 min, followed by 5 min of incubation in 50 mM glycine-PBS. Membranes were blocked with Tween 20 -PBS-5% blocking-grade blocker (Bio-Rad, Hercules, CA) and incubated with polyclonal rabbit anti-HD5 antibodies (GTX 116079, clone N1C3; GeneTex, Irvine, CA) at a 1:1,000 dilution overnight at 4°C. Primary antibody binding was detected by anti-rabbit HRP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (1:2,000). After blots were stripped with Restore Western blot stripping buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA), they were incubated with mouse anti- β -actin (Sigma, St. Louis, MO) (1:5,000). Membranes were washed five times in PBS-Tween 20 between antibody incubations, and films were developed using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

HD5 ELISA. A human DEFA5 ELISA kit from Elabsciences (Wuhan, China) (E-EL-H1798) was used according to the manufacturer's directions.

Surface plasmon resonance. Binding assays were done on a BIAcore 3000 instrument. HBS-N (GE-Healthcare, Pittsburgh, PA) was used as running buffer in all experiments at a flow rate of 5 ml/min. Immobilization on a CM5 sensor chip was performed using HD5 (Peptide Institute, Inc.) at 20 mg/ml in 10 mM acetate buffer, pH 4.5, injected for 10 min on an ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS)-activated flow cell (570 response units [RU]). A control flow cell was activated by EDC/NHS, and both flow cells were inactivated by ethanolamine for 10 min. Different concentrations of recombinant PtDd protein were injected for a 3-min association time followed by a 2.5-min dissociation time, and the signal was automatically subtracted from the background of the ethanolamine-deactivated EDC/NHS flow cell. Kinetic and affinity constants were calculated from separated sensorgrams by the BIAeval software using a 1:1 Langmuir model.

Generation of BT474 and K562 cell lines with ectopic HD5 expression. Generation of BT474 and K562 cell lines with ectopic HD5 expression was accomplished using a VSV-G-pseudotyped lentivirus vector encoding the full-length HD5 gene under the control of the EF1 α promoter (kindly provided by Xiaobing Zhang, Loma Linda University). For transduction of K562 cells, a 6-cm dish was coated with RetroNectin (8 mg/cm²) for 4 h. Subsequently, the dish was blocked with 2% bovine serum albumin (BSA)-Hanks' balanced salt solution (HBSS) for 30 min at room temperature. Blocking solution was removed, and the plate was washed once with PBS. Next, the lentivirus (MOI of 10 infectious units/cell) was added to the plate for 45 min. Afterwards, K562 cells (1 $\times 10^6$) were added to the plate for 4 h for infection. For the transduction of BT474 cells, 1 $\times 10^6$ BT474 cells were incubated with Polybrene (4 mg/ml) and the lentivirus for 6 h. Transduced cells were incubated with 500 mg/ml of G418 for 4 weeks.

Animal studies. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* endorsed by the National Institutes of Health (37). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Washington, Seattle, WA (protocol 3108-01). Mice were housed in specific-pathogen-free facilities. Immunodeficient NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J (CB17) mice were obtained from the Jackson Laboratory. Mice were subcutaneously injected with either K562 or K562-HD5 cells (2 $\times 10^6$ cells; in Matrigel). Tumor sizes were measured every second day. After tumors reached a size of 200 mm³, wt-Ad5GFP, wt-Ad3GFP, or mut-Ad3GFP was injected intratumorally (2 $\times 10^9$ PFU/mouse).

Statistical analysis. All results are expressed as means standard deviations (SD). Two-way analysis of variance (ANOVA) for multiple testing was applied. Animal numbers and *P* values are indicated in the figure legends.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Lindsay Bergan and Sarah Hawley from the POCRC specimen repository for providing the biopsy samples. We thank Matthew Horton for help in histopathology. We thank Emilie Stermann for help with the Biacore graphics.

The work was supported by NIH grant R01 HLA078836 (A.L.), a grant from the Rivkin Center for Ovarian Cancer Research (A.L.), the Pacific Ovarian Cancer Research Consortium/Specialized Program of Research Excellence in Ovarian Cancer (grant P50 CA83636 to C.D.), and a grant from the Wings of Karen Foundation (A.L.).

REFERENCES

- Chen H, Xu Z, Peng L, Fang X, Yin X, Xu N, Cen P. 2006. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* 27: 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.08.018>.
- Wilson SS, Wiens ME, Holly MK, Smith JG. 2016. Defensins at the mucosal surface: latest insights into defensin-virus interactions. *J Virol* 90: 5216–5218. <https://doi.org/10.1128/JVI.00904-15>.
- Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL. 2010. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathog* 6:e1000959. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000959>.
- Flatt JW, Kim R, Smith JG, Nemerow GR, Stewart PL. 2013. An intrinsically disordered region of the adenovirus capsid is implicated in neutralization by human alpha defensin 5. *PLoS One* 8:e61571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061571>.
- Droin N, Hendra JB, Ducoroy P, Solary E. 2009. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J Proteomics* 72:918–927. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.002>.
- Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y. 2013. Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells. *Biochem Biophys Res Commun* 439:71–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.026>.
- Holterman DA, Diaz JI, Blackmore PF, Davis JW, Schellhammer PF, Corica A, Semmes OJ, Vlahou A. 2006. Overexpression of alpha-defensin is associated with bladder cancer invasiveness. *Urol Oncol* 24:97–108. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.07.010>.
- Jin G, Kawsar HI, Hirsch SA, Zeng C, Jia X, Feng Z, Ghosh SK, Zheng QY, Zhou A, McIntyre TM, Weinberg A. 2010. An antimicrobial peptide regulates tumor-associated macrophage trafficking via the chemokine receptor CCR2, a model for tumorigenesis. *PLoS One* 5:e10993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010993>.
- Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, Yadav SP, Crabb JW, Ganz T, Bevins CL. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3:583–590. <https://doi.org/10.1038/ni797>.
- Spencer JD, Hains DS, Porter E, Bevins CL, DiRosario J, Becknell B, Wang H, Schwaderer AL. 2012. Human alpha defensin 5 expression in the human kidney and urinary tract. *PLoS One* 7:e31712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031712>.
- Svinarich DM, Wolf NA, Gomez R, Gonik B, Romero R. 1997. Detection of human defensin 5 in reproductive tissues. *Am J Obstet Gynecol* 176: 470–475. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(97\)70517-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)70517-9).
- Porter E, Yang H, Yavagal S, Preza GC, Murillo O, Lima H, Greene S, Mahoozi L, Klein-Patel M, Diamond G, Gulati S, Ganz T, Rice PA, Quayle AJ. 2005. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chla-mydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil inter-actions. *Infect Immun* 73:4823–4833. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4823-4833.2005>.
- Wilson SS, Wiens ME, Smith JG. 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol* 425:4965–4980. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038>.
- Lisitsyn NA, Bukurova YA, Nikitina IG, Krasnov GS, Sykulev Y, Beresten SF. 2012. Enteric alpha defensins in norm and pathology. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11:1. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-1>.
- Bousserouel S, Lamy V, Gosse F, Lobstein A, Marescaux J, Raul F. 2011. Early modulation of gene expression used as a biomarker for chemo-prevention in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Pathol Int* 61:80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02621.x>.
- Brodrick B, Vidrich A, Porter E, Bradley L, Buzan JM, Cohn SM. 2011. Fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR-3) regulates expression of Paneth cell lineage-specific genes in intestinal epithelial cells through both TCF4/beta-catenin-dependent and -independent signaling path-ways. *J Biol Chem* 286:18515–18525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229252>.
- Russell SJ, Peng KW, Bell JC. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30:658–670. <https://doi.org/10.1038/nbt.2287>.
- Kuhn I, Harden P, Bazon M, Hermiston T. 2005. ColoAd1, a chimeric Ad11/Ad3 oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *Mol Ther* 11(Suppl 1):S124. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.06.322>.
- Hemminki O, Bauerschmitz G, Hemmi S, Kanerva A, Cerullo V, Pesonen S, Hemminki A. 2010. Preclinical and clinical data with a fully serotype 3 oncolytic adenovirus Ad3-hTERT-E1A in the treatment of advanced solid tumors. *Mol Ther* 18(Suppl 1):S74. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(16\)37634-1](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)37634-1).
- Trotman LC, Achermann DP, Keller S, Straub M, Greber UF. 2003. Non-classical export of an adenovirus structural protein. *Traffic* 4:390–402. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00094.x>.
- Greber UF. 1998. Virus assembly and disassembly: the adenovirus cys-teine protease as a trigger factor. *Rev Med Virol* 8:213–222.
- Fender P, Boussaid A, Mezin P, Chroboczek J. 2005. Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* 340:167–173. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.030>.
- Lu ZZ, Wang H, Zhang Y, Cao H, Li Z, Fender P, Lieber A. 2013. Penton-dodecahedral particles trigger opening of intercellular junctions and facilitate viral spread during adenovirus serotype 3 infection of epithelial cells. *PLoS Pathog* 9:e1003718. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003718>.
- Yumul R, Richter M, Lu ZZ, Saydaminova K, Wang H, Wang CH, Carter D, Lieber A. 2016. Epithelial junction opener improves oncolytic adenovirus therapy in mouse tumor models. *Hum Gene Ther* 27:325–337. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.022>.
- Wang H, Ducournau C, Saydaminova K, Richter M, Yumul R, Ho M, Carter D, Zubieta C, Fender P, Lieber A. 2015. Intracellular signaling and des-moglein 2 shedding triggered by human adenoviruses Ad3, Ad14, and Ad14P1. *J Virol* 89:10841–10859. <https://doi.org/10.1128/JVI.01425-15>.

26. Smith JG, Nemerow GR. 2008. Mechanism of adenovirus neutralization by Human alpha-defensins. *Cell Host Microbe* 3:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.001>.
27. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. 2013. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218:1402–1410. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003>.
28. Wang H, Li Z, Yumul R, Lara S, Hemminki A, Fender P, Lieber A. 2011. Multimerization of adenovirus serotype 3 fiber knob domains is required for efficient binding of virus to desmoglein 2 and subsequent opening of epithelial junctions. *J Virol* 85:6390 – 6402. <https://doi.org/10.1128/JVI.00514-11>.
29. Vives RR, Lortat-Jacob H, Chroboczek J, Fender P. 2004. Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* 321:332–340. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.01.015>.
30. Polakis P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.12.007>.
31. Hendrix ND, Wu R, Kuick R, Schwartz DR, Fearon ER, Cho KR. 2006. Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 66:1354 –1362. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3694>.
32. Todo T, Kondo T, Kirino T, Asai A, Adams EF, Nakamura S, Ikeda K, Kurokawa T. 1998. Expression and growth stimulatory effect of fibroblast growth factor 9 in human brain tumors. *Neurosurgery* 43:337–346. <https://doi.org/10.1097/00006123-199808000-00098>.
33. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. 21 July 2016. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol* <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>.
34. Wang H, Liaw YC, Stone D, Kalyuzhnyi O, Amiraslanov I, Tuve S, Verlinde CL, Shayakhmetov D, Stehle T, Roffler S, Lieber A. 2007. Identification of CD46 binding sites within the adenovirus serotype 35 fiber knob. *J Virol* 81:12785–12792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-07>.
35. Fender P, Ruigrok RW, Gout E, Buffet S, Chroboczek J. 1997. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 15:52–56. <https://doi.org/10.1038/nbt0197-52>.
36. Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, Shayakhmetov D, Li Z, Strauss R, Stone D, Lieber A. 2006. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol* 80:12109 –12120. <https://doi.org/10.1128/JVI.01370-06>.
37. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC.

ARTICLE III

(Draft)

Adenovirus dodecamer enables the rapid and tailored multiepitopic insertion in a robust non-infectious scaffold

Charles Vragliau ¹, Emilie Stermann¹, Frédéric Garzoni ², Céline Terrat³, Véronique Josserand,⁴ Bernard Verrier³, Laurence Chaperot⁵, Imre Berger² & Pascal Fender^{1#}

¹ *Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, 71 Avenue des Martyrs, 38042, Grenoble, France.*

² *School of Biochemistry and Bristol Research Centre for Synthetic Biology BrisSynBio, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK.*

³ *INSERM U823, Institute of Advanced Biosciences, 38706 Grenoble cedex, France*

⁴ *Colloidal Vectors and Tissue Transport, UMR5305, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université de Lyon, CNRS, Lyon, France.*

⁵ *UJF, INSERM U823, University Grenoble Alpes, EFS Rhone-Alpes, Grenoble, France.*

#corresponding authors

pascal.fender@ibs.fr

Abstract The penton base is an homopentameric protein involved in Adenovirus internalization. Remarkably, in some Human Adenovirus (HAd) serotypes such as HAd3, the penton base protein is able to self-assemble by twelve in a symmetric manner to give a non-infectious particle called adenovirus dodecahedron (Ad-Dd). Ad-Dd, composed of 60 identical monomers conserved the great internalization potential of HAd while being non-infectious. In this work, the HAd3 penton base gene has been engineered to enable a rapid insertion epitopes of interest without destroying the particle scaffold or its cell-entry properties. Remarkably, this particle can also enter both monocytes and dendritic cells *in vitro* and migrates to the lymph nodes upon *in vivo* injection. Insertion as long as 200 residues could be achieved in the thermostable particle which can be stored for weeks without the need of cold-chain. As a proof of concept, a neutralizing epitope from Chikungunya virus was inserted upon two different conformational configurations. *In vivo* validation, in mice showed that the way of displaying ChikV epitope on the scaffold is critical to trigger an efficient immune response.

Introduction

Some viruses and particularly human adenoviruses (HAd) can naturally induce a strong inflammatory and immune response. Recombinant Ad (rAd) used in vaccination purpose have shown their ability to trigger a strong and long lasting cellular Th1 and humoral responses against the antigenic transgene (Prevec et al. 1990; Juillard et al. 1995). The intense immune response induced by Ad itself is likely to be involved in this effect. The role played by the capsid components in cellular and humoral recognition of Ad has been reported (Kafri et al. 1998; Molinier-Frenkel et al. 2000). Interestingly, the potential of Ad capsid proteins such as hexon as vaccination adjuvants has already been demonstrated (Molinier-Frenkel et al. 2002). Beside the hexon, a non-covalent complex consisting of the penton base and the protruding fibers is located at each of the 12 vertices of the virion. This complex named 'penton' is involved in the virion attachment and cell entry. Interestingly, purified penton capsomers conserve their internalization properties making them a good vector for gene or protein delivery (Fender et al. 1997; Fender et al. 2003; Garcel et al. 2006; Medina-Kauwe, Kasahara, et al. 2001; Medina-Kauwe, Maguire, et al. 2001). In some adenovirus serotypes such as HAd3, the symmetric self-association of 12 penton bases with 12 protruding fibres penton-dodecahedron (Pt-Dd) can be produced during the virus replication cycle (Fender et al. 2012; Norrby. 1966; Fender et al. 1997). Those particles can also be recombinantly expressed in the baculovirus system while keeping their efficient internalization properties through interaction with desmoglein2, integrins or heparan-sulfate proteoglycans on the cell membrane (Wang et al. 2011; Vivès et al. 2004; Gout et al. 2010; Vassal-stermann et al. 2018). In a previous work, we have already reported the potential of Pt-Dd for protein transduction into cells using the structural WW domain adaptors to bind antigens to this scaffold (Villegas-Méndez et al. 2012; Garcel et al. 2006). The efficiency of this system has been reported in the immuno-oncology field. Indeed, *in vivo* studies have shown using the ovalbumin (OVA) model, that mice vaccinated with Pt-Dd in complex with WW-OVA were protected against B16-OVA melanoma cell thanks to a strong humoral and cellular response triggered by the complex (Villegas-Mendez et al. 2010). However, while this system was very efficient it could not reach the industrial requirements since it was a two-component system using two expression means and that the WW linker was from human origin.

In the present work, we report how we have re-engineered the adenovirus dodecahedron to display in a 'plug and play' manner the epitopes of interest in a single component devoid of any genetic material or human-derived protein sequences thus fulfilling regulatory and industrial requirements.

Results

Determination of exposed regions not involved in the dodecahedron architecture

Base-dodecahedron (Bs-Dd) is a symmetrical particle made of twelve adenovirus (Ad) penton bases which spontaneously assemble together. This non-infectious particle can be produced with high yield using baculovirus expression system. In a first step, monomers assemble by 5 to give the penton base protein. These building blocks then interact together by 12 thus forming Bs-Dd (Figure 1). Since the goal of this study was to engineer this particle in order to display peptides or epitopes of interest, a first step consisted in finding locations in which insertions could be done without destroying the scaffold while being well-exposed at the particle surface. According to HAd penton base sequence comparison and to the structure of Bs-Dd (Zubieta et al. 2005; Szolajska et al. 2012; Schoehn et al. 1996; P. Fuschiotti et al. 2006), two locations were found fulfilling these criteria: the variable loop (VL) and the loop encompassing the RGD motif (RGD-L). These loops are shown in Figure 1.

Engineering of the HAd3 penton base gene sequence for ‘plug and play’ insertion in the loops

The two identified loops are very variable in length and aminoacid composition. For instance, the HAd3 VL comprises 20 residues while HAd41 is only made of 9 amino-acids. The difference is even more pronounced for the RGD-L with 11 amino-acids for HAd12 while the HAd2 RGD-loop is 74 residues long. Despite this great diversity, the RGD motif involved in integrins recognition and then the Ad internalization is conserved in all HAd (except enteric adenoviruses HAd40 and HAd41). The choice has been made to conserve this tripeptide with flanking regions for keeping the high potential of internalization of Bs-Dd. Three insertion sites for foreign DNA sequences have then been designed by synthetic biology by adding three couple of unique restriction sites in the HAd3 penton base gene (Figure 2A). One couple enables the replacement of the VL sequence (EcoRI; RsrRII), another one can be used to insert sequence upstream the RGD motif in the RGD-L (BssHII; SalI) while the last one makes possible insertion downstream this RGD motif (SacI; XbaI). This ‘plug and play’ genetic platform has been renamed ‘ADDomer’ for Adenovirus Dodecamer. Since the addition of restriction sites slightly change the wild type HAd3 penton base primary sequence (Figure S1), particle production was checked. Production yield was comparable to the HAd3^{wt} penton base (about 80mg.L⁻¹) and the particle shape was unchanged as seen by electron microscopy (Figure 3A). The fate of this particle at different temperatures has then been investigated. At least a four-week storage at room temperature (RT= 22°C) can be performed without destroying the scaffold. Interestingly, if a frozen/thaw cycle tends to partially dissociate the dodecameric particle in their pentameric building blocks, this can be spontaneously reversed by storage at RT (Figure 3A). If long term incubation at 37°C did not change the particle assembly (not

shown), dissociation was observed at 45°C as predicted by the thermal shift assay experiment given a T_m of 54°C with increasing signal above 45°C (Figure 3B). Once again, particle incubated for 1h at this temperature can re-associate after storage at RT. Altogether, it can be concluded that ADDomer is a very thermostable particle with irreversible denaturation occurring only above 45°C.

Validation of the ADDomer platform by loop exchanges

In order to validate the structural and genetic design of ADDomer, the HAd3 RGD loop (RGD-L) comprises 40 amino-acids from residues 310 to 349 (Figure 1) was first replaced by the shortest HAd3 variable loop (V-L: residues 150 to 169). To do this the DNA sequence coding for the V-L amino-acid sequence was synthetically produced with BssHII and XbaI restriction sites at 5' and 3' extremities, respectively. This sequence was then cloned in the plasmid encoding ADDomer digested by the same enzymes beforehand to remove the RGD-L sequence (Figure 2A). After expression and purification, the integrity of this slightly lighter particle was checked by SDS-PAGE (Figure 2B) and transmission electron microscopy (TEM) validating that the VL(2X) particles were properly produced (not shown). To go further, a similar strategy was used to swap the two loops. The sequence coding the the RGD-L was flanked by EcoRI and RsrII sites to replace the first VL region in the ADDomer – VL(2X) plasmid (Figure 2A). Again, the expression of this ADDomer-Swapped particle (Figure 2B) resulted in good expression yield and well-formed particle (not shown). This result indicated that a sequence as long as 40 residues can be inserted in V-L which is normally made of only 20 residues. In order to investigate whether the RGD-L can also be extended, a large insertion of 200 aminoacid (**corresponding to HAd11+HAd3+HAd11 loops, Figure S2**) was then cloned in between the BssHII and Sall restriction sites of the ADDomer plasmid. Mass spectroscopy analysis confirmed that the monomer had the expected molecular weight of 81,1 kDa instead of 63,5 for ADDomer (Figure 2C). TEM imaging showed that despite this brutal insertion, the dodecameric scaffold was not affected and that the ADDomer-extended having a MW of more than 4,8 MDa instead of 3,8MDa for empty ADDomer was properly produced (Figure 3D)

Taken together, these results showed that both VL and RGD-L can be extended without affecting the yield of production or the quality of the scaffold

ADDomer internalization in epithelial, monocytes and dendritic cells

Before inserting epitopes of interest in the particles, the capacity of ADDomer to be internalized in different cell types was investigated in Human cell lines. To be the closest as possible to the HAd tropism, an epithelial-like cell line was used in a first attempt. As expected, a punctate signal was observed in the cytoplasm of HeLa cells, demonstrating that the engineering of ADDomer and more especially the addition of four restriction sites (resulting in the addition of 8 amino-acids) in the RGD-L was not detrimental to particle internalization (Figure 4A).

In order to investigate the behavior of ADDomer with white blood cells, monocytes were recovered from human blood patient. Incubation of Alexa488 labelled ADDomer with human monocytes was investigated by immunofluorescence. After a 1 hour contact time, a strong punctate signal was also observed in those cells (Figure 4B). Moreover, dendritic cell derived from monocytes (moDC) by GM-CSF and IL-4 treatment showed a rapid and efficient uptake of ADDomer by those cells (Figure 4C). Taken together these *in vitro* experiments performed with human patient immune cells suggest that ADDomer is a good candidate to induce an immune response.

Lymph nodes biodistribution of ADDomer

Based on the encouraging *in vitro* validation, an experiment was set up to investigate whether ADDomer can be found in mice draining lymph nodes (LNs). ADDomer was covalently labelled with Alexa680 and injected in the right leg of mice by either the subcutaneous (SC) or the intra-muscular (IM) route. The fluorescent content of different LNs and organs was then quantified on isolated tissues at 1H and 5H after injection and compared to the negative control group injected with PBS. A rapid draining of ADDomer to the right inguinal LN was observed whatever the injection mode (Figure 5A). Surprisingly, the time of residence in this LN was really different according to the injection mode (Figure 5B). Indeed, a slight decrease was observed in the inguinal LN of mice injected by the IM route while the fluorescent intensity almost went back to the background level in mice injected by the SC route 5H after injection (Figure 5B). No significant signal was seen in the opposite left Inguinal LN which can be considered as an internal control. In mesenteric LNs the results were more homogeneous with a rapid but non-lasting signal whatever the injection means. This behavior was also observed in the right Axillary LN. Regarding other LNs, the Alexa680 signal from ADDomer was too low to be significant. Taken together this data indicated that fluorescent-labelled ADDomer particles were mainly drained to the closest right Inguinal LN at early time after injection whatever the injection mode but that the time of residence was longer when the IM route was used.

Insertion of Chikungunya Virus (ChikV) neutralizing epitope in ADDomer

Knowing that ADDomer is a flexible platform enabling rapid insertion in the modified HAd3 penton base loops and that the resulting ADDomer scaffold is a good candidate to trigger an immune response, foreign (*i.e.* non-adenoviral) ‘epitope of interest’ (EOI) can be envisaged. Using such strategy, a single insertion of the EOI in the genetic platform will result in the display of 60 identical epitopes at the ADDomer surface. As a proof of concept, Chikungunya virus (ChikV) was chosen. It has been described that high level of antibodies against E2EP3 (Epitope 3 from the Chikungunya virus envelop protein E2) was found in patient during the acute phase (Kam et al. 2014; Y.-W. Kam et al. 2012). This linear 19 residues B-cell epitope (Figure S3) was then chosen for

insertion in the ADDomer variable loop (VL). However, in mature virion the E2 protein is processed by furin thus resulting in the exposition of this epitope with a floppy N-terminal. To take this point in consideration, a Tobacco Etche Virus (TEV) cleavage site was added upstream the E2EP3 sequence (Figure S3). Soluble ADDomer-Chik particles can be produced at high yield comparable to empty ADDomer ($>40\text{mg.L}^{-1}$) showing that the expression of E2EP3 in the particle VL was not affecting its expression. After purification, cleavage of ADDomer and ADDomer-Chik by the TEV protease was performed for 5 and 120 minutes and analyzed on SDS-PAGE (Figure 6A). As expected, non-treated sample showed a band at 66,3kDa whereas two bands at the expected size (47,4 and 18,9kDa) were found for ADDomer-Chik treated by TEV for 120 minutes thus showing that the TEV cleavage site was accessible to the protease at the particle surface. In order to determine whether this cleavage affect the dodecameric scaffold, electron microscopy was then performed for the TEV-cleaved ADDomer-Chik. Negative staining micrographs showed that particles were intact despite this drastic proteolytic treatment. Those particles thus carry 60 ChikV E2EP3 epitopes in a 'relaxed' form as found in mature ChikV.

Altogether, these results show that (i) foreign epitopes can be inserted in ADDomer without changing the scaffold neither the yield of production, the epitope being 'constrained' in the variable loops of each monomer, (ii) post expression treatment can be done with a protease to 'relax' the epitope from the N-terminus part in order to get closer to its natural conformation in the mature ChikV.

In vivo study with ADDomer-Chik particle displaying the epitope under two different configurations.

E2EP3 is known to be a major neutralizing epitope of ChikV. This B-cell epitope conserved amongst human and macaque could potentially trigger specific antibodies production in mice. To investigate this point, *in vivo* experiment was set up with three groups of eight mice. Group 1 were injected by 'Empty ADDomer' (no foreign epitope) while groups 2 and 3 were injected with ADDomer-Chik either treated or not treated by the TEV protease. Of note, no adjuvant was added to assess if the ADDomer scaffold could play an immune-stimulatory effect that would benefit to immune response against E2EP3. Three injections of ADDomer were performed subcutaneously, and blood was collected 2 weeks after each injection. The humoral response was assessed by ELISA against the E2EP3 peptide. As expected, no signal was observed in the group injected with empty ADDomer. More surprisingly, no response was seen in the group injected with the 'native' ADD-Chik even after 3 injections. By contrast, a significant response was observed when ADD-Chik was treated by TEV protease before injection (Figure 6C). This result clearly indicates that the way of displaying this epitope in the scaffold is critical to induce the humoral immune response. This response was observable since the second injection and raised after the third injection (Figure 6D). Taken together these result show that (i) an anti-E2EP3 humoral response can be trigger in absence of

adjuvant by the ADDomer scaffold (ii) the way of displaying this epitope at the surface of the immune-stimulatory platform is critical.

Discussion

The use of virus as vaccine vector encoding for an antigen of interest is very attractive. This strategy has been reported since the late 80's using different viruses including adenoviruses. For instance, transgenes encoding Hepatitis B, HIV or Rabies antigens have been inserted in HAd5 vector for vaccination purpose (Morin et al. 1987; DEWAR et al. 1989; Prevec et al. 1990). Another way to use viruses relies on their intrinsic immuno-stimulatory properties. In gene therapy trials using adenoviral vectors, it has been reported that antibodies against the main capsid proteins such as the hexon, the penton base and the fibre were found in patients (Hong et al. 2003; Molinier-Frenkel et al. 2000). Moreover, adenoviral capsid protein such as hexon could play the role of adjuvant for activation of the cellular response (Molinier-Frenkel et al. 2002). Rather than adding adenoviral capsid protein as adjuvant, direct insertion of epitope of interest in the HAd5 viral capsid has been reported. Both trimeric hexon and trimeric fibre were genetically engineered to display Ovalbumin epitopes (OVA) (Lanzi et al. 2011). In 2010, we have reported that OVA epitope can also be delivered by a particle derived from HAd3 devoid of genetic material called Dodecahedron (Dd) thanks to WW adaptor molecules (Fender et al. 1997; Garcel et al. 2006; Villegas-Mendez et al. 2010). This strategy was very efficient to mount both humoral and cellular response against the OVA epitope and to protect mice from melanoma B16-OVA cells. In the present work, our goal was to elaborate a strategy keeping the high immune-stimulatory properties of Dd while making epitope insertion easy and controlled. To do this, Dd structure has been finely investigated. Two regions in the HAd3 penton base (the building block of Dd) have been found to be well-exposed at the surface of the particle while being not involved in the scaffold assembly (Szolajska et al. 2012; Schoehn et al. 1996; P. Fuschiotti et al. 2006) (Figure 1). This region called variable loop (VL) and RGD loop (RGD-L) are not conserved amongst different adenovirus serotypes suggesting that modification can be done without disrupting the building block (Zubieta et al. 2006b; Zubieta et al. 2005). Since the HAd3 penton base monomer first pentamerizes, 5 copies of VL and RGD-L are found at the capsomer surface (Figure 1). In turn, the spontaneous assembly of HAd3 penton base by twelve subsequently results in a dodecahedral particle displaying 60 copies of each loop at its surface. Such feature is very interesting for vaccine purpose since it has been reported that multimerization of epitopes elicit more potent neutralizing antibodies (Kanekiyo et al. 2013; Kanekiyo et al. 2015).

In order to enable the rapid insertion of foreign peptides or epitopes at these locations, the HAd3 penton base gene has been engineered. A couple of restriction sites have been added at both extremities of the VL. The design of RGD-L has been thought in order to keep the RGD tripeptide required for the particle internalization (Wickham et

al. 1993; Gout et al. 2010). This has been made possible by adding two couple of restriction site upstream and downstream the region coding for the RGD sequence. This genetic platform derived from the HAd3 penton base nucleotides sequence has been renamed 'ADDomer' for Adenovirus Dodecamer (Figure 2A). To investigate whether the ADDomer platform was well designed to modify these loops without destroying the scaffold, we have first replaced the RGD-L by a shorter VL resulting in ADDomer having two identical variable loops (VL2X). Based on the successful expression of this construct, we went further by swapping the V-L and RGD-L with success thus showing that the natural V-L location (20 residues) can support longer insertion such as the 40 residues of RGD-L (Figure 2B). Finally, RGD-L extension was also tested by adding 200 residues encompassing the HAd2-HAd11 and HAd3 loops in tandem. Remarkably, this extended ADDomer (ADDomer-Ext) for which the monomer reach 81.7 kDa instead of 63.5 kDa was still able to form dodecameric particle (Figures 2C and 2D). Such particles of more than 4.9Mda carries 1.1Mda of extra material as compared to empty ADDomer.

The ADDomer thermo-stability study has shown that long-term storage can be done in a broad range of temperature below 45°C. This remarkable stability is clearly an asset to reach remote area where cold chain breakage often results in a loss of vaccine stock and/or weak protection efficiency(Kaufmann et al. 2011). Moreover, if frozen-thaw cycles or incubation at 45°C can partially dissociate the dodecameric scaffold in its building blocks, this process is reversible (Figures 3A and 3B). Again, this reversibility can be an advantage knowing that temperature in a fridge can go under 2°C resulting in irreversible damage of some vaccine stocks.

A hallmark of adenovirus dodecahedron is its high potential to enter epithelial cell through integrins engagement or HSPG recognition(Gout et al. 2010; Vivès et al. 2004). This property is kept by ADDomer (Figure 4A) and experiment performed with human monocytes and dendritic cells *ex vivo* clearly showed that this particle can also enter immune blood cells (Figures 4B and 4C). The mechanism by which the particle is internalized is not known but might be beneficial for epitopes presentation. Of note, in a previous work using adenovirus dodecahedron to deliver ovalbumin epitope using a two-component system in mice, a strong CTL response was reported beside the humoral one(Villegas-Mendez et al. 2010). Such results can be explained by the draining of the vaccine scaffold to lymph nodes as shown in Figure 5. Indeed, labelled ADDomer can be found after only 1H in the mesenteric and right inguinal lymph nodes next to the injection site whatever the mode of injection. ADDomer is a quasi-spherical 29nm in diameter particle and this range of size has been described to be optimal for lymph node draining(Kang et al. 2017; Kjellman et al. 2015).

Based on the ADDomer properties, insertion of epitope of interest has then be tried. An epitope from Chikungunya virus (ChikV) has been inserted in the VL region of ADDomer. This neutralizing epitope named E2EP3(E2 ChikV protein, epitope 3) composed of residues 2800-2818 is located at the N-terminus of E2 glycoprotein

proximal to the E2/E3 furin cleavage site. To mimic this configuration in ADDomer, a TEV (Tobacco Etch Virus) cleavage site was then added just upstream E2EP3 thus enabling to display this latter either under a constrained or under a relaxed configuration at the ADDomer surface. Remarkably, despite a full cleavage of monomers by the protease treatment (Figure 6A), the ADDomer scaffold was totally conserved as seen by electron microscopy (Figure 6B). Those particles might then display the 60 copies of E2EP3 in an exposition close to what is found in mature ChikV. Experiment performed in mice confirmed that E2EP3 must be cleaved by TEV to efficiently mount a humoral response against this epitope contrary to the uncleaved one (Figure 6C), thus showing that this epitope was not further processed *in vivo*. As expected, repeated injections of TEV-cleaved particle resulted in higher humoral response (Figure 6D). It is worth noting that injections were performed without adjuvant showing that the ADDomer scaffold played an immuno-stimulatory function to trigger E2EP3 humoral response.

Taken together, the results showed that (i) long peptide sequences can be added in two loops of the Ad3 penton base in a 'plug and play manner' resulting in a single component particle displaying them with a controlled stoichiometry, (ii) the scaffold is stable within a large range of temperature and can play immune-stimulatory function by priming the immune system and (iii) the epitope of interest can be processed post-production to facilitate its recognition if necessary. The development of such versatile 'ADDomer' platform opens the way to the development of new robust vaccine products scalable at the industrial scale. Since ADDomer is not infectious, it would be suitable for vaccination of immunocompromised people or pregnant women who cannot be vaccinated with attenuated virus during infectious outbreaks such as Zika virus a causing agent of microcephaly.

Material and Methods

Plasmid design and baculovirus construction

For baculovirus construction, the gene encoding the HAd3 penton base (Genbank/Z29487) with the additional unique restriction sites (shown in Figure 2) was synthesised by Genscript and cloned between BamHI and HindIII site of pACEBac1acceptor plasmid to give pACEBac1-ADDomer (Geneva Biotech). All the modification or insertion in the loop was done using the additional restriction sites in this plasmid by synthetic biology by Genscript. Once created, the acceptor plasmid was transformed in *E.coli* containing the DH10EMBacY bacmid. White colonies were picked and bacmids was recovered according to the procedure described by Geneva Biotech. Bacmids were then transfected in SF21 cell to produce the baculovirus stock. ADDomer particle expression were done by infecting High Five cells in suspension for 60H.

ADDomer purification

Pellets of infected High Five cells were lysed by hypotonic buffer (PBS 0,33X: 1mL per $2,5 \cdot 10^7$ cells) supplemented by EDTA-free protease inhibitors (Complete, Roche) and subjected to 3 freeze/thaw cycles. After centrifugation at 6.000g the supernatant was loaded on top of a 15-40% sucrose gradient as described previously (Fender 1997). The 30-40% fractions containing the dodecameric particle were pooled and dialysed against Hepes 10mM pH7,4 – 50mM NaCl. A second step of purification was performed on 5mL Hi-Q column (Bio-Rad) by a 30mL (50-500mM NaCl) linear gradient. Fractions eluted between 330 and 400mM were recovered.

For animal studies, ADDomer particles were further pass on “Detoxi-gel, endotoxin removing gel” (ThermoFischer) and dialysed against PBS.

Addomer stability studies

Addomer were store at 1mg.mL^{-1} in PBS at room temperature. Thermic shocks were either freezing at -20°C for one night and thawing or 1H incubation at 45°C . Thermal Shift Assay (TSA) was performed on thermofluor CRIMS interface of the High Throughput crystallography facilities of EMBL-Grenoble with an ADDomer sample at 3mg/mL^{-1} in PBS. Electron microscopy was performed by the standard mica-carbon flotation technic with uranyl acetate staining. Images were taken at 100-120kV on either JEOL or FEI Tecnai12 from the Grenoble PSB electron microscopy platform.

Cell culture and cell differentiation

HeLa Cell were culture in DMEM-10%SVF medium at 37°C under a 5%CO₂ atmosphere. Monocytes were purified from a patient blood sample by centrifugation on Ficoll (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at 800g and mononucleated cells were

subsequently pass through Easy-Sep (StemCell Technology) magnetic beads. Monocytes purity was verified by FACS by CD14 labelling. moDC were generated by cultivating monocytes in RPMI-10%SVF supplemented by GM-CSF 100ng.mL⁻¹ and IL-4 25 ng.mL⁻¹ for 6 days. moDC differentiation was checked by FACS using CD14/CD209 labelling.

Cell imaging

Hela cell were grown on glass coverslip and incubated for 1H at 37°C with unlabelled ADDomer at 20mg.mL⁻¹. After Methanol fixation ADDomer were labelled with rabbit serum against the HAd3 penton base diluted 1/1.000 in PBS and a subsequent Cy5 labelled Goat anti-rabbit antibody diluted at 1/500 (Jackson ImmunoResearch). Nuclei were counterstained by DAPI. Experiments with monocytes and moDC were performed with labelled ADDomer. ADDomer at 1mg.mL⁻¹ in PBS was labelled with Alexa488-TFP(Invitrogen) at 0,1mg. mL⁻¹ for 2H in the dark at 4°C. Free dye was removed by extensive dialysis against PBS. Monocytes and moDC (10⁵ cells) were incubated for 1H at 37°C with 10⁶g of Alexa488-ADDomer. Cell were loaded on glass coverslip and observed in an Olympus IX81 inverted microscope using DIC and green fluorescence channels.

Biodistribution studies

Véronique can you write something

In vivo vaccination

Bernard can you write something

Statement: *In vivo* experiments were carried out at the "Institute for Advanced Biosciences" (Grenoble) and the Institute of Biology and Chemistry of Proteins (Lyon), two laboratories certified by the Ministry of Research and Education Superior and regularly monitored by the Departmental Directorate for the Protection of Population (Approval number C 69 123 0303 and C38 516 10001). The animal experiments were carried out according to the rules in force and in the respect of the ethics of the animal experimentation.

Acknowledgments:

We are indebted to Mélanie Verneret for the biodistribution studies and to Wim Burmeister for its help with 3D structure analysis. This work used the platforms of the Grenoble Instruct center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support

from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). We are particularly grateful to Luca Signor for Mass Spec, Françoise Lacroix and Jean-Philippe Kleman for cell imaging, Daphna Fenel and Guy Schoehn TEM pictures. This work was supported by Labex GRAL valorization, the Finovi Fundation and the CNRS pre-maturation program.

Bibliography

1. Prevec L, Campbell JB, Christie BS, Belbeck L, Graham FL. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J. Infect. Dis.* 161(1), 27–30 (1990).
2. Juillard V, Villefroy P, Godfrin D, Pavirani A, Venet A, Guillet JG. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur. J. Immunol.* 25(12), 3467–3473 (1995).
3. Kafri T, Morgan D, Krah T, Sarvetnick N, Sherman L, Verma I. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(19), 11377–11382 (1998).
4. Molinier-Frenkel V, Gahery-Segard H, Mehtali M, *et al.* Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 74(16), 7678–7682 (2000).
5. Molinier-Frenkel V, Lengagne R, Gaden F, *et al.* Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J. Virol.* 76(1), 127–135 (2002).
6. Fender P, Ruigrok RW, Gout E, Buffet S, Chroboczek J. Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 15(1), 52–56 (1997).
7. Fender P, Schoehn G, Foucaud-Gamen J, *et al.* Adenovirus dodecahedron allows large multimeric protein transduction in human cells. *J. Virol.* 77(8), 4960–4964 (2003).
8. Garcel A, Gout E, Timmins J, Chroboczek J, Fender P. Protein transduction into human cells by adenovirus dodecahedron using WW domains as universal adaptors. *J Gene Med.* 8(4), 524–531 (2006).
9. Medina-Kauwe LK, Kasahara N, Kedes L. 3PO, a novel nonviral gene delivery system using engineered Ad5 penton proteins. *Gene Ther.* 8(10), 795–803 (2001).
10. Medina-Kauwe LK, Maguire M, Kasahara N, Kedes L. Nonviral gene delivery to human breast cancer cells by targeted Ad5 penton proteins. *Gene Ther.* 8(23), 1753–1761 (2001).
11. Fender P, Hall K, Schoehn G, Blair GE. Impact of human adenovirus type 3 dodecahedron on host cells and its potential role in viral infection. *J. Virol.* 86(9), 5380–5385 (2012).

12. Norrby E. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I. Morphological characteristics. *Virology*. 28(2), 236–248 (1966).
13. Wang H, Li Z-Y, Liu Y, *et al.* Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat. Med.* 17(1), 96–104 (2011).
14. Vivès RR, Lortat-Jacob H, Chroboczek J, Fender P. Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology*. 321(2), 332–340 (2004).
15. Gout E, Schoehn G, Fenel D, Lortat-Jacob H, Fender P. The adenovirus type 3 dodecahedron's RGD loop comprises an HSPG binding site that influences integrin binding. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 541939 (2010).
16. Vassal-Stermann E, Mottet M, Ducournau C, *et al.* Mapping of Adenovirus of serotype 3 fibre interaction to desmoglein 2 revealed a novel 'non-classical' mechanism of viral receptor engagement. *Scientific Reports* [Internet]. 8(1) (2018). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26871-x>.
17. Villegas-Méndez A, Fender P, Garin MI, *et al.* Functional characterisation of the WW minimal domain for delivering therapeutic proteins by adenovirus dodecahedron. *PLoS ONE*. 7(9), e45416 (2012).
18. Villegas-Mendez A, Garin MI, Pineda-Molina E, *et al.* In vivo delivery of antigens by adenovirus dodecahedron induces cellular and humoral immune responses to elicit antitumor immunity. *Mol. Ther.* 18(5), 1046–1053 (2010).
19. Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. The Structure of the Human Adenovirus 2 Penton. *Molecular Cell*. 17(2), 319–320 (2005).
20. Szolajska E, Burmeister WP, Zochowska M, *et al.* The structural basis for the integrity of adenovirus Ad3 dodecahedron. *PLoS ONE*. 7(9), e46075 (2012).
21. Schoehn G, Fender P, Chroboczek J, Hewat EA. Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *EMBO J.* 15(24), 6841–6846 (1996).
22. Fuschiotti P, Schoehn G, Fender P, *et al.* Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J. Mol. Biol.* 356(2), 510–520 (2006).
23. Kam Y-W, Lee WWL, Simarmata D, *et al.* Unique epitopes recognized by antibodies induced in Chikungunya virus-infected non-human primates: implications for the study of immunopathology and vaccine development. *PLoS ONE*. 9(4), e95647 (2014).
24. Kam Y-W, Lum F-M, Teo T-H, *et al.* Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein: A protective linear B cell epitope in Chikungunya. *EMBO Molecular Medicine*. 4(4), 330–343 (2012).
25. Morin JE, Lubeck MD, Barton JE, Conley AJ, Davis AR, Hung PP. Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 84(13), 4626–4630 (1987).

26. DEWAR RL, VASUDEVACHARI MB, NATARAJAN V, SALZMAN NP. Biosynthesis and Processing of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins: Effects of Monensin on Glycosylation and Transport. *J. VIROL*. 63, 5 (1989).
27. Hong SS, Habib NA, Franqueville L, Jensen S, Boulanger PA. Identification of Adenovirus (Ad) Penton Base Neutralizing Epitopes by Use of Sera from Patients Who Had Received Conditionally Replicative Ad (Add1520) for Treatment of Liver Tumors. *Journal of Virology*. 77(19), 10366–10375 (2003).
28. Lanzi A, Ben Youssef G, Perricaudet M, Benihoud K. Anti-adenovirus humoral responses influence on the efficacy of vaccines based on epitope display on adenovirus capsid. *Vaccine*. 29(7), 1463–1471 (2011).
29. Zubieta C, Blanchoin L, Cusack S. Structural and biochemical characterization of a human adenovirus 2/12 penton base chimera. *FEBS J*. 273(18), 4336–4345 (2006).
30. Kanekiyo M, Wei C-J, Yassine HM, *et al*. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*. 499(7456), 102–106 (2013).
31. Kanekiyo M, Bu W, Joyce MG, *et al*. Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell*. 162(5), 1090–1100 (2015).
32. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 73(2), 309–319 (1993).
33. Kaufmann JR, Miller R, Cheyne J. Vaccine supply chains need to be better funded and strengthened, or lives will be at risk. *Health Aff (Millwood)*. 30(6), 1113–1121 (2011).
34. Kang S, Ahn S, Lee J, *et al*. Effects of gold nanoparticle-based vaccine size on lymph node delivery and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Journal of Controlled Release*. 256, 56–67 (2017).
35. Kjellman P, Fredriksson S, Kjellman C, Strand S-E, Zandt R in ‘t. Size-dependent lymphatic uptake of nanoscale-tailored particles as tumor mass increases. *Future Science OA* [Internet]. 1(4) (2015). Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fso.15.60>.

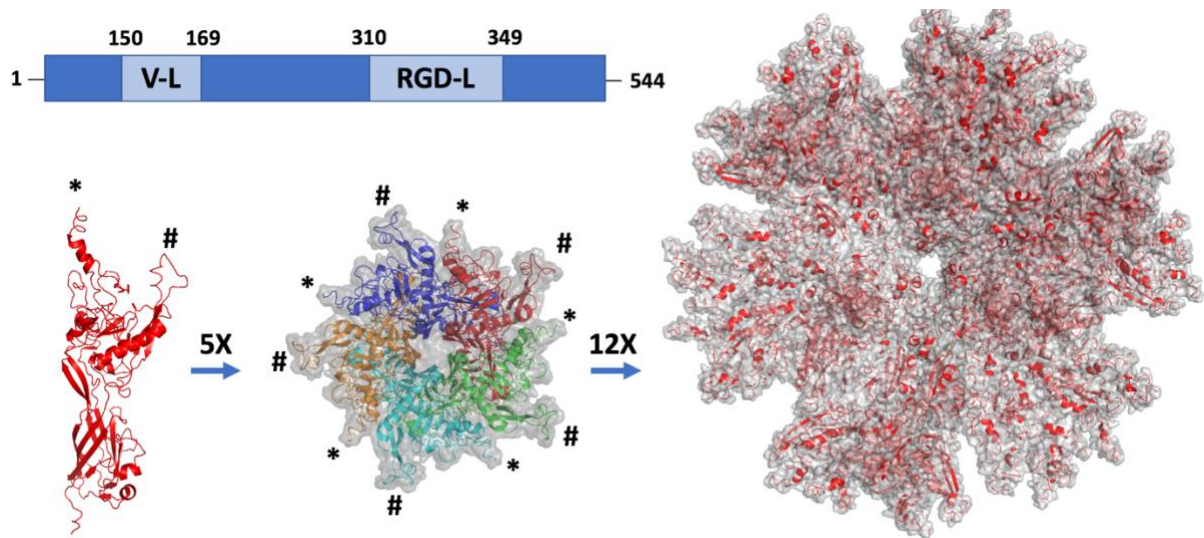


Figure 1: Exposed loops at the surface of HAd3 base- dodecahedron. Upper panel: Schematic representation of the HAd3 penton base monomer in dark blue with the position of the two loops highlighted in light blue (V-L: variable loop; RGD-L: RGD loop). Lower panel: Structural description of Bs-Dd assembly. A HAd3 monomer (red cartoon) is shown from a side view with V-L depicted by (#) and RGD-L by (*). This monomer assembles by five to give the penton base protein (Top view with each monomer colored differently and surrounded by a grey surface density. Penton base dodecamerisation leads to a symmetric particle made of 60 monomers (red cartoon) surrounded by grey surface.

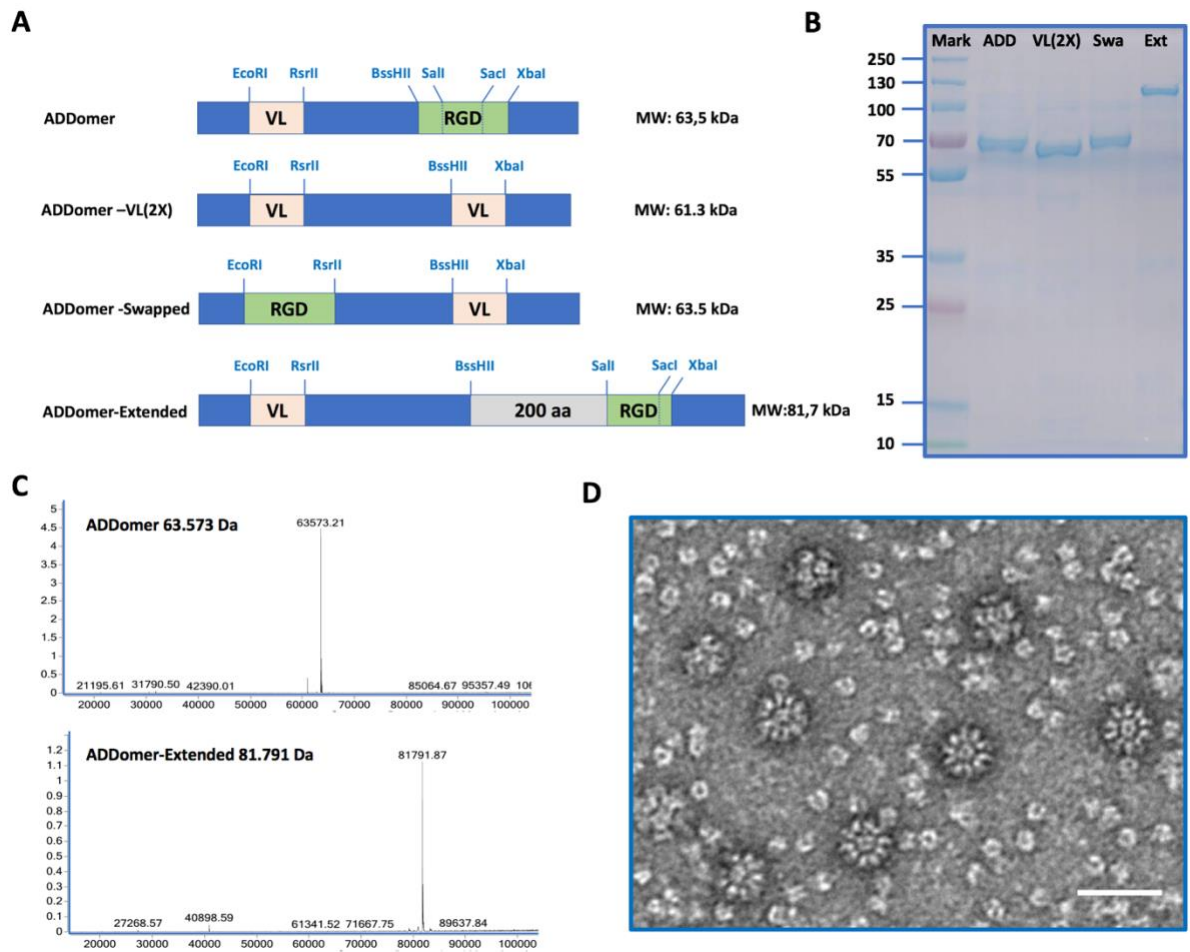


Figure 2: Design of ADDomer genetic platform and loop modifications. (A) Schematic representation of the ADDomer platform and the different loop exchanges or modifications. (B) SDS-PAGE showing the migration the different ADDomer according to their modifications. (C) Mass spec analysis of non-modified and extended ADDomers. (D) negative staining of ADDomer-Extended (Bar: 50 nm).

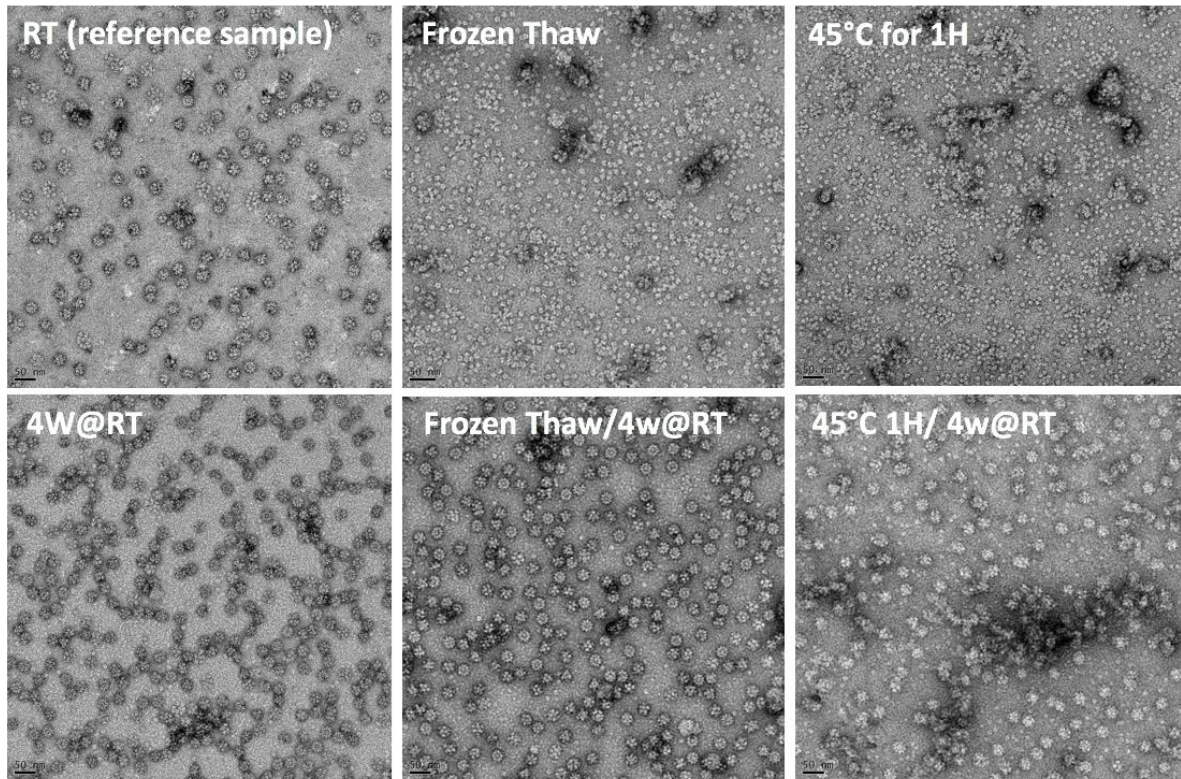
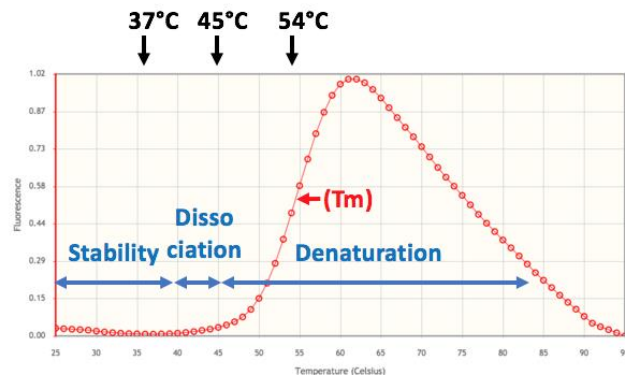
A**B**

Figure 3: Thermostability study of ADDomer. (A) Upper panel: negative staining of ADDomer after purification (reference sample), frozen/thaw or incubated for 1H at 45°C. Bottom panel: same sample after storage for 4 weeks at room temperature (RT). (B) Thermal shift assay showing a T_m of 54°C preceded by a stability phase up to 40°C and an intermediate phase (40-45°C) where dodecamer dissociated in pentameric building blocks.

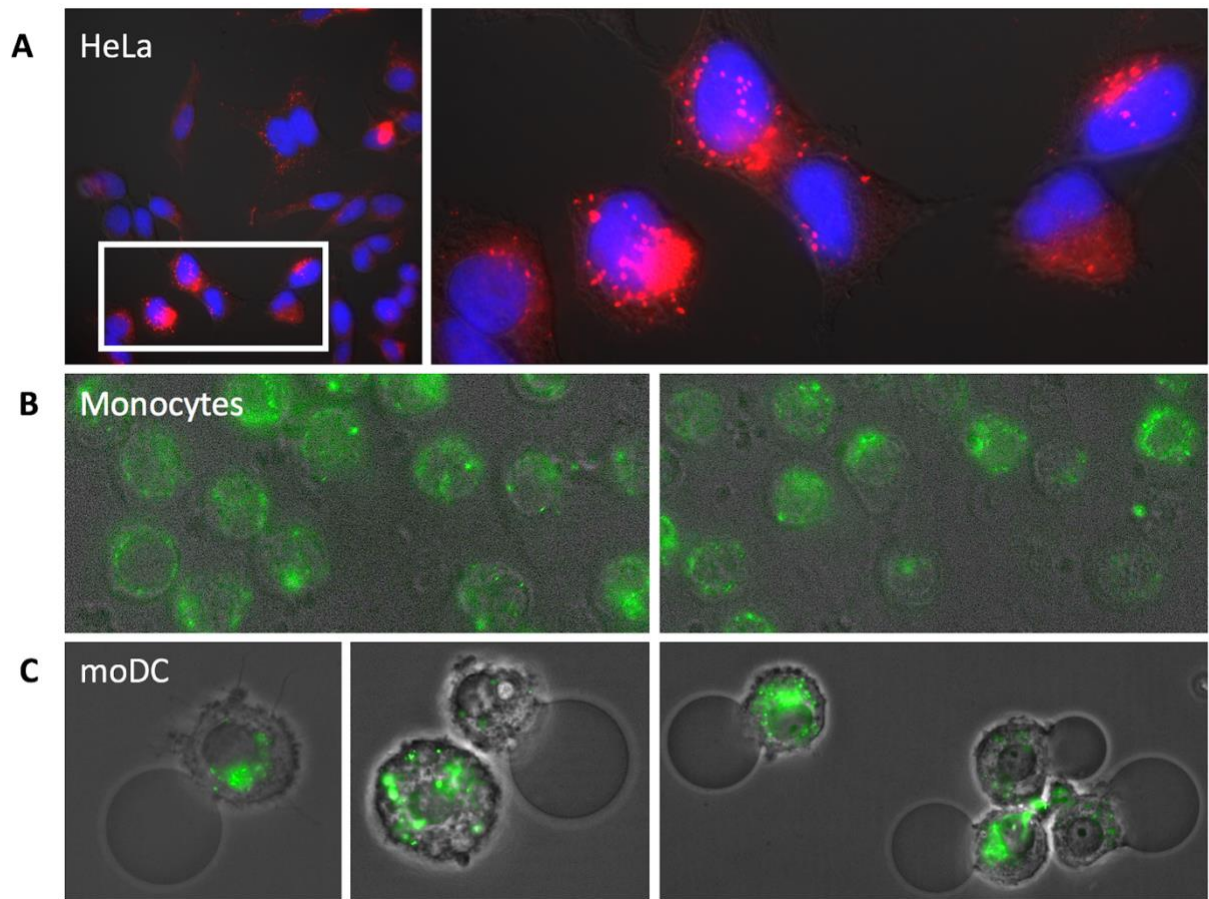


Figure 4: Internalisation of ADDomer in different human cell lines. (A) HeLa cell incubated for 1H with ADDomer detected in red, nucleus is stained in blue with DAPI. (B) Human monocytes incubated for 1H with ADDomer detected in green. (C) Same experiment with monocyte derived dendritic cells.

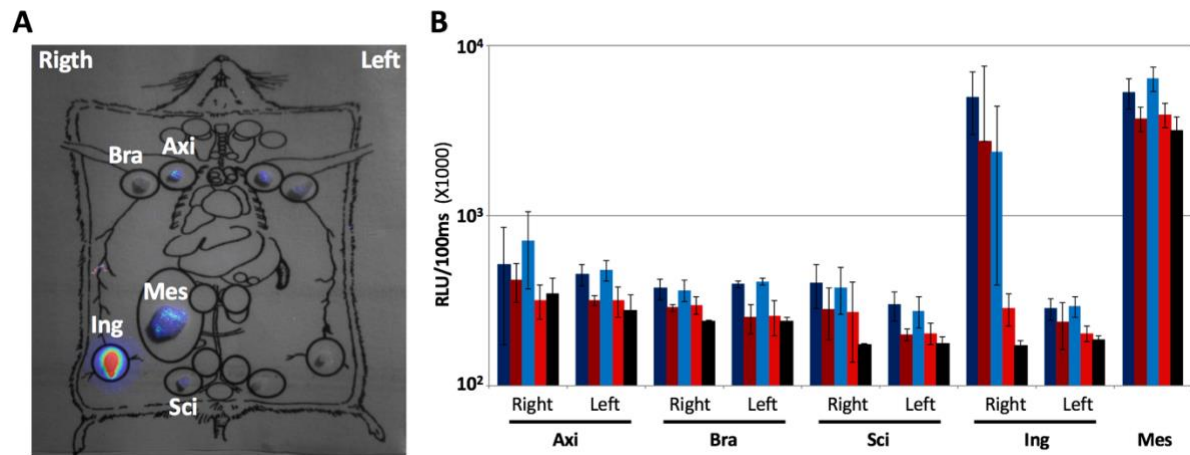


Figure 5: Lymph nodes biodistribution of ADDomer labelled with alexa 647. (A) Ex vivo imaging of the main different lymph nodes from one representative mouse 5H after injection in the right leg. (B) Quantification for 100ms of isolated LNs at 1 and 5H hours after IM or SC injection. Dark blue: IM for 1H; brown: (IM for 5H; light blue: SC for 1H; red: SC for 5H, black: non-injected mice (n=5). Axi (Axillary); Bra (Brachial); Sci (Sciatic); Ing (Inguinal); Mes (Mesenteric).

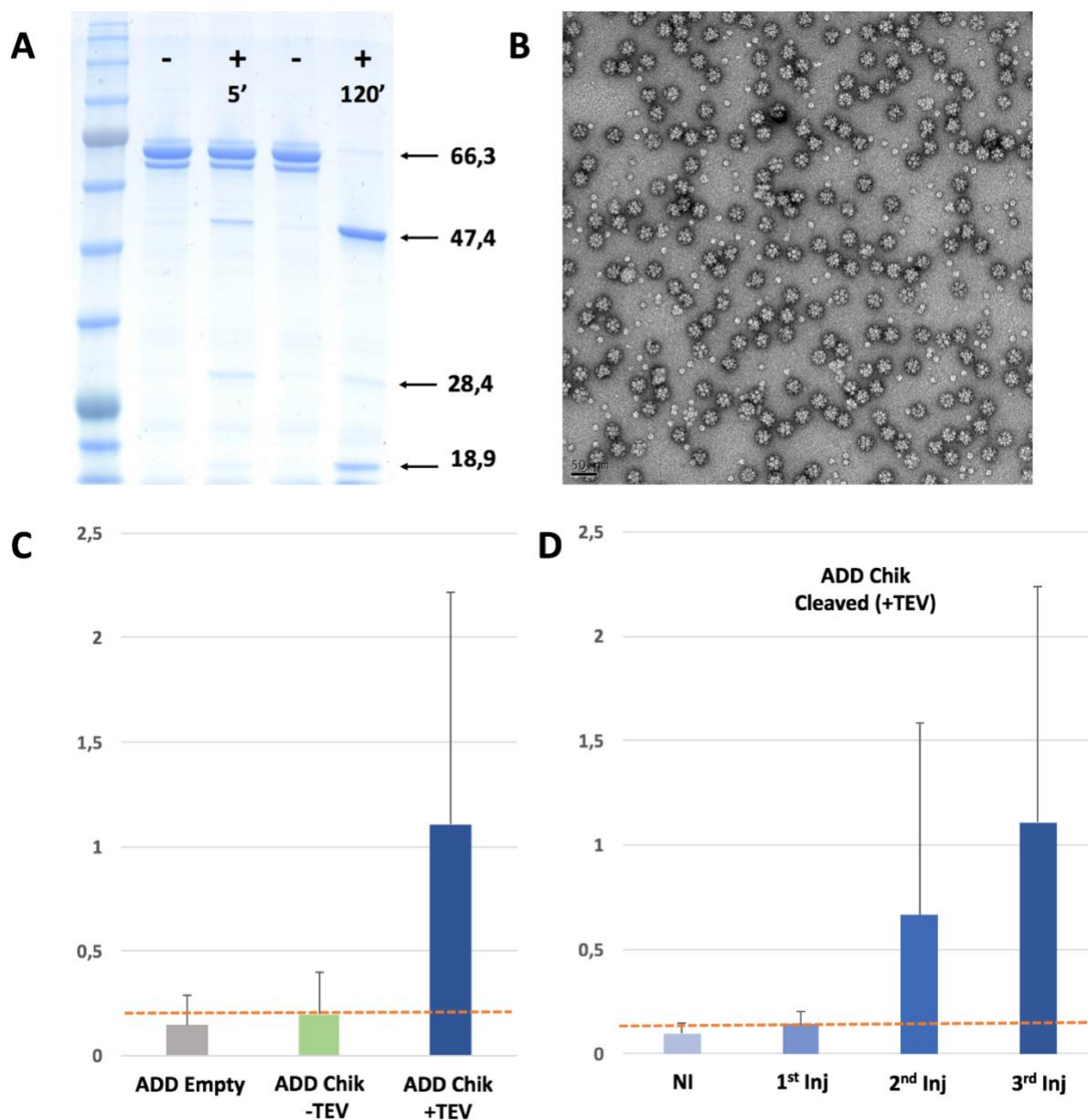


Figure 6: *In vivo* humoral characterization of ADDomer-Chik with E2EP3 displayed under two configurations. (A) SDS-PAGE analysis of ADDomer-Chik uncleaved or cleaved by TEV for 5 or 120 minutes. (B) Negative staining analysis of ADDomer-Chik cleaved by TEV for 120 minutes. (C) Assessment of the humoral response against E2EP3 peptide by ELISA for mice injected 3 times with empty ADDomer, ADDomer-Chik uncleaved and ADDomer-Chik cleaved by TEV (n=8). (D) E2EP3 humoral response induces by ADDomer-Chik cleaved by TEV according to the number of injection (n=8).

Supplementary Informations

Adenovirus dodecamer enables the rapid and tailored multiepitopic insertion in a robust non-infectious scaffold

Charles Vragliau ¹, Emilie Stermann¹, Frédéric Garzoni ², Céline Terrat³, Véronique Josserand,⁴ Bernard Verrier³, Laurence Chaperot⁵, Imre Berger² & Pascal Fender^{1#}

Base du penton HAd3	1	MRRRAVLGGAVVYPEGPPPSYESVMQQQAAMIQPPLEAPFVPPRYLAPTEGRNSIRYSEL
Base du penton ADDomer	1	MRRRAVLGGAVVYPEGPPPSYESVMQQQAAMIQPPLEAPFVPPRYLAPTEGRNSIRYSEL *****
Base du penton HAd3	61	SPLYDTTKLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLT TVVQNNDFTPEASTQTINFDERSRWG
Base du penton ADDomer	61	SPLYDTTKLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLT TVVQNNDFTPEASTQTINFDERSRWG *****
Base du penton HAd3	121	GQLKTIMHTNMPNVNEYMF SNKFKARVMVSRKAPEG--VTVND-----TYDHKEDILKYE
Base du penton ADDomer	121	GQLKTIMHTNMPNVNEYMF SNKFKARVMVSRKAPEGEFVTVNDGPVNDTYDHKEDILKYE *****
Base du penton HAd3	174	WFEFILPEGNFSATMTIDL MNNAIIDNYLEIGRQNGVLES DIGVKFDTRNFR LGWD PETK
Base du penton ADDomer	181	WFEFILPEGNFSATMTIDL MNNAIIDNYLEIGRQNGVLES DIGVKFDTRNFR LGWD PETK *****
Base du penton HAd3	234	LIMPGVYTYEAFHPDIVLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKRHPFQEGFKIMYEDLEGGNIP
Base du penton ADDomer	241	LIMPGVYTYEAFHPDIVLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKRHPFQEGFKIMYEDLEGGNIP *****
Base du penton HAd3	294	ALLDVTAYEESKDDTTT--ETTTLAVAEETSED--DDITRGDTYITE--KQKREAAAAEV
Base du penton ADDomer	301	ALLDVTAYEESKDDTTTARETTTLAVAEETSEDVDDITRGDTYITELEKQKREAAAAEV *****
Base du penton HAd3	348	--KKELKIQPLEKDSKRSYNVLEDKINTAYRSWYLSYNYGNPEKGIRSWTLLTSDVTC
Base du penton ADDomer	361	SRKKELKIQPLEKDSKRSYNVLEDKINTAYRSWYLSYNYGNPEKGIRSWTLLTSDVTC *****
Base du penton HAd3	406	GAEQVYWSLPDMMQDPVTFRSTRQVNNYPVVGAE LMPVFSKSFYNEQAVYSQQLRQATSL
Base du penton ADDomer	421	GAEQVYWSLPDMMQDPVTFRSTRQVNNYPVVGAE LMPVFSKSFYNEQAVYSQQLRQATSL *****
Base du penton HAd3	466	THVFNRFPENQILIRPPAPTITTVSENVPALTDHGTLPLRSSIRGVQRVTVDARRRTCP
Base du penton ADDomer	481	THVFNRFPENQILIRPPAPTITTVSENVPALTDHGTLPLRSSIRGVQRVTVDARRRTCP *****
Base du penton HAd3	526	YVYKALGIVAPRVLSSRTF
Base du penton ADDomer	541	YVYKALGIVAPRVLSSRTF *****

Supplementary Figure S1: Sequence alignment of HAd3 penton and ADDomer. The extra residues induced by restriction sites additions on VL and RGD-L are boxed in red. The critical RGD sequence is boxed in orange.

GSGG**ENLYFQS**EQGGG**GAGGGNNSGSGAEENSNA**AAAAAMQPVEDMNDHAI
RGDTFATRAEEKRAEAEAAAEAAAPAAQPEVEKPQGGSGGGSGG**AKIEAATA**
AAEAKANIVASDSTRVANAGEVRGDNFAPTPVPTAESLLADVSEGTDGGSGG
SGG**TETTTLAVAEETSEDDDITRGDTYITEKQKREAAAAEVKK**GGSG

Supplementary Figure S2: Sequence inserted in the ADDomer-Extended. This sequence is derived from **HAd2+HAd11+HAd3** RGD loops flanked and separated by linker sequences. A TEV site is highlighted in yellow

GSGG**ENLYFQ****STKDNFNVYKATRPYLAH**GGSG

Supplementary Figure S3: Sequence of E2EP3 with Tev Cleavage site. This sequence was inserted in the VL of ADDomer to give ADDomer-Chik. The TEV cleavage site is highlighted in yellow and E2EP3 in red. TEV addition results in cleavage between Q and S.

ANNEXES

ANNEXES I :
SEQUENCE PRIMAIRE DES EPITOPES
INSERES DANS L'ADDOMER

1. Extended Loop

GSGGENLYFQSEQGGGGAGGGNNSGSGAEENSNAAAAAMQPVEDMNDHAI
RGDTFATRAEEKRAEAEAAAEAAAPAAQPEVEKPPQGGSGSGGAKIEAATAA
AEAKANIVASDSTRVANAGEVRGDNFAPTPVPTAESLLADVSEGTDGGSGGS
GGTETTTLAVAEETSEDDDDITRGDTYITEKQKREAAAAEVKKGGSG

2. Long Ova

GSGGENLYFQSEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEE
KYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVV
GSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVGGSG

3. Ova MHC-I

GSGGENLYFQSIINFEKLTEWTSSGGSG

4. Ova MHC-II

GSGGISQAVHAAHAEINEAGRENLYFQGGSGGG

5. E9i3

TLVGVVVSTNRLEEEINNQLLLQKYPPPRYITVHCEPRLPNLISEIAIFD

6. E9i3 helix

GSGGTNRLEEEINNQLLLQKYGSGG

7. Esp3

NGKYFSKVGSAGLKQLTNKLDINECATVDELVDEINKSGTVKRKIKNQSAFDL
SRECLGYPEADFITLVNNMRFKIENCKVVNFNIENTNCLNNPSIETIYRNFNQF
VSIFNVVTDVKKRLFENLYFQG

8. Esp3 helix

GSGGGSJETIYRNFNQFVSIFNVVTDVKKRLFENLYFQG

9. TevChik

GSGGENLYFQSTKDNFNVYKATRPYLAHGGSG

10. L52-L67

GSGGENLYFQGLQIGIKTDDSHDWTCLGSGG

11. L52-L83

GSGGENLYFQGLQIGIKTDDSHDWTCLRYMDNHMPADAERAGLGSGG

12. Nanobody

GSGGENLYFQSMAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGAMGWFRQ
APGKEREFVAGIGGAGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDT
AVYYCAAGGAYDYWGQGTQVTVGGSGGGSGS

13. DARPin/off7

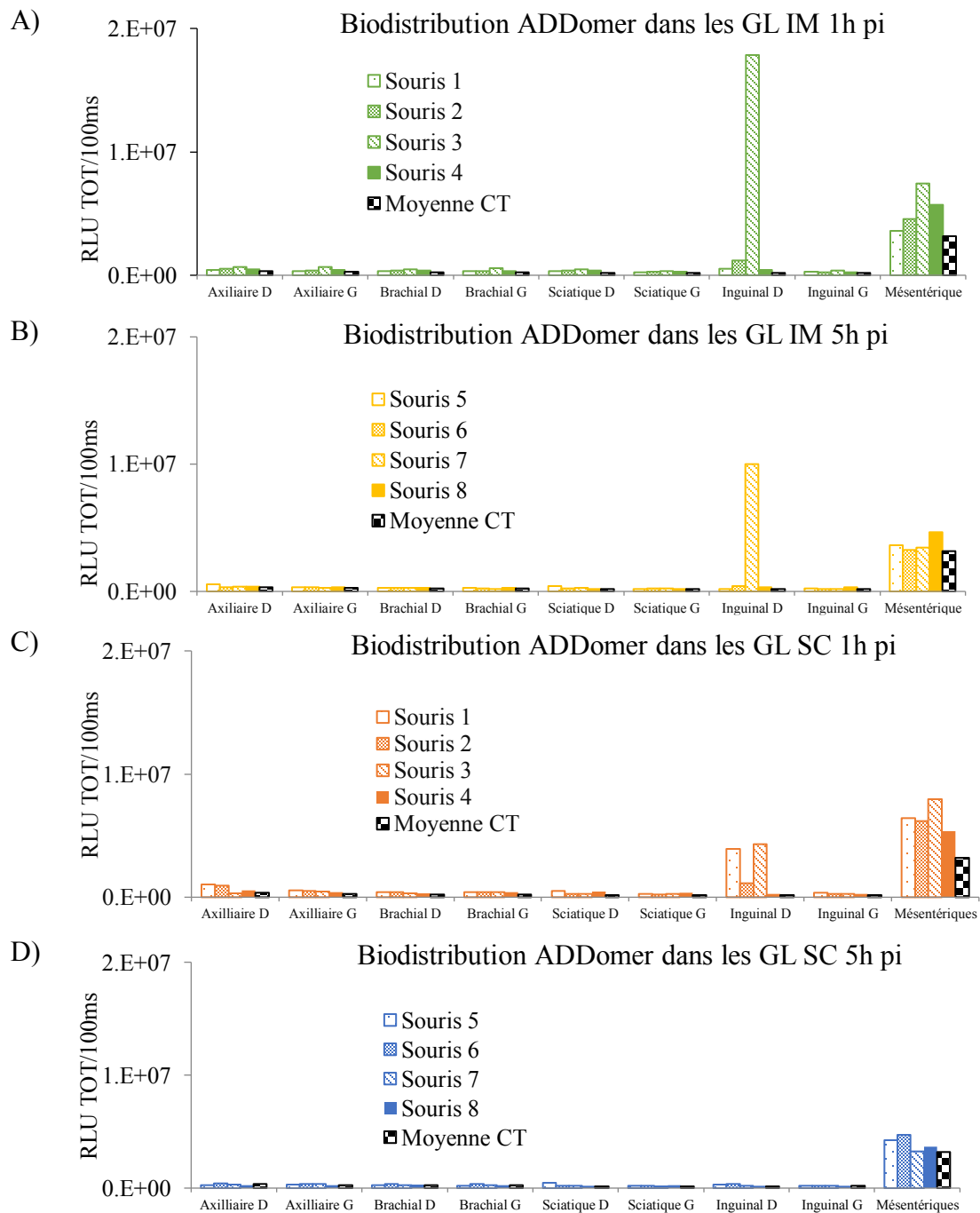
➤ Construction #1 (179 aa)

GSGGGSGGGSDLGRKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAADNTGTTPLHL
AAYSGHLEIVEVLLKHGADVVDASDVFGYTPLHLAAYWGHLEIVEVLLKNGA
DVNAMDSGMTPLHLAAKWGYLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISID
NGNEDLAEILQKLNENLYFQSGGSGS

➤ Construction#2 (108 aa)

GSGGDNTGTTPLHLAAYSGHLEIVEVLLKHGADVVDASDVFGYTPLHLAAYW
GHLEIVEVLLKNGADVNDSDGMTPLHLAAKWGYLEIVEVLLKHGADVNA
ENLYFH

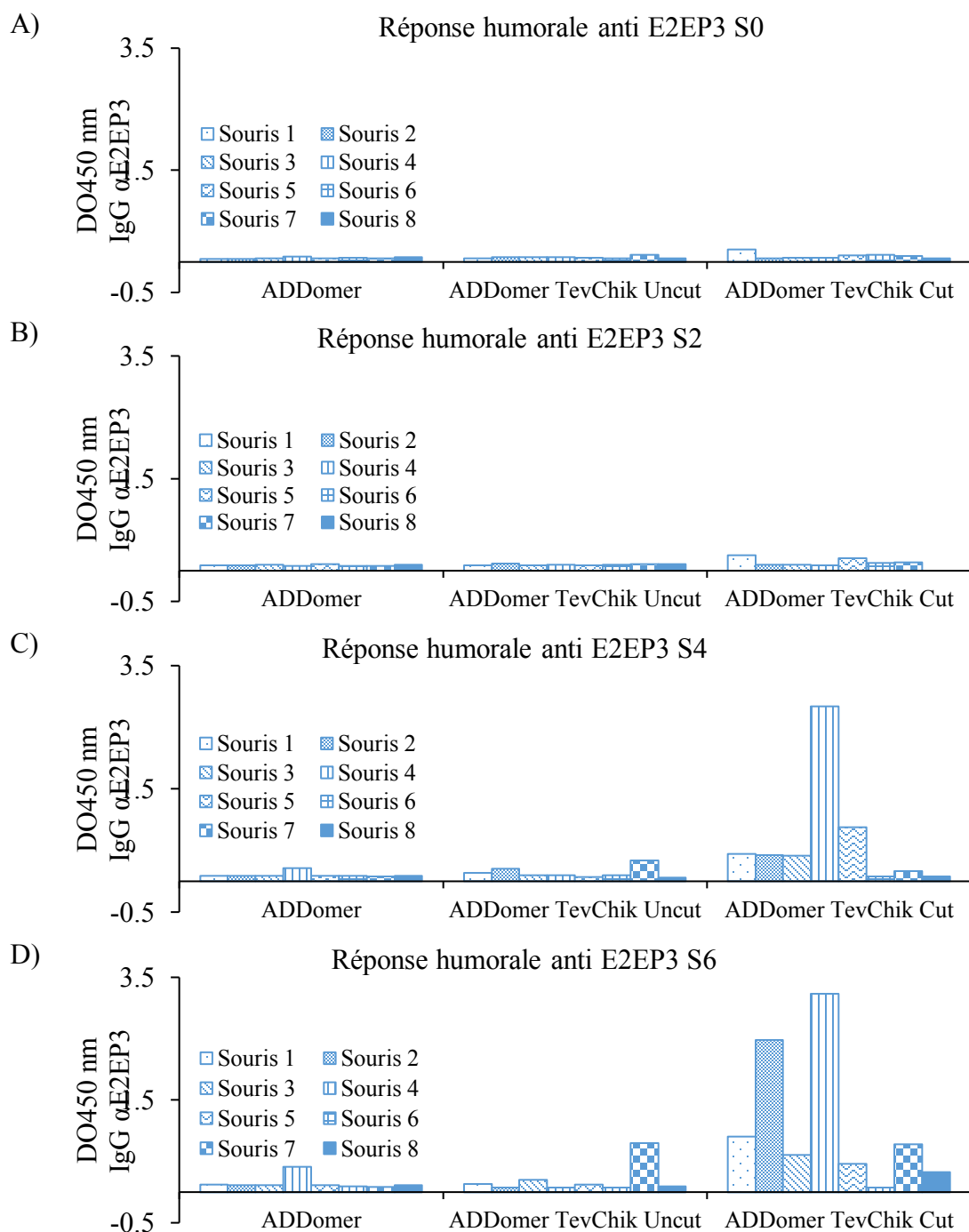
ANNEXES II :
DONNEES SUR LA BIODISTRIBUTION
DE L'ADDOMER CHEZ LA SOURIS



Biodistribution de l'ADDomer dans les GL par souris :

A et B) Injection en IM de l'ADDomer chez la souris : L'ADDomer n'est drainé dans le ganglion inguinal droit que chez 1 souris sur 4. C et D) Injection en SC de l'ADDomer chez la souris : Seules 2 souris sur 4 ont drainé l'ADDomer jusqu'au GL à T1h. A T5h, le signal est retombé au niveau du bruit de fond.

ANNEXES III :
DONNEES SUR LA REPONSE ANTI
EPITOPIQUE CHEZ LA SOURIS



Réponse anti-épitopique par souris

A, B, C et D) Détection des IgG anti E2EP3 dans le sérum dilué au 1/100^{ème} des souris injectées avec les différents ADDomers respectivement à S0, S2, S4 et S6.