



HAL
open science

Modification du tropisme de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire : ciblage de récepteurs d'intérêt

Isoline Duquénois

► To cite this version:

Isoline Duquénois. Modification du tropisme de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire : ciblage de récepteurs d'intérêt. Virologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UP-ASL098 . tel-04907839

HAL Id: tel-04907839

<https://theses.hal.science/tel-04907839v1>

Submitted on 23 Jan 2025

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.

Modification du tropisme de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire : ciblage de récepteurs d'intérêt

*Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein tropism modification: targeting receptors
of interest.*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 :
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School : Sciences de la vie et santé
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'Institut for Integrative Biology of the Cell (I2BC-UMR9198)
(Université Paris-Saclay, CEA, CNRS), sous la direction de **Yves GAUDIN**, directeur de
recherche, et la co-direction de **Aurélié ALBERTINI**, Directrice de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 4 Décembre 2024, par

Isoline DUQUÉNOIS

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Stéphanie BURY-MONE Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Présidente
Pascal FENDER Directeur de recherche, Université Grenoble-Alpes	Rapporteur & Examineur
Jean-François FONTENEAU Chargé de recherche, HDR, Université de Nantes, CRCI2NA	Rapporteur & Examineur
Pascale BOUILLE Directrice générale, Ariana Pharma	Examinatrice

Titre : Modification du tropisme de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire : ciblage de récepteurs d'intérêt

Mots clés : Glycoprotéine, virus de la stomatite vésiculaire, cellules tumorales, ciblage, nanobody

Résumé : Le transfert d'un cargo, contenu dans une vésicule, vers des cellules d'intérêt reste un défi pour les thérapies ciblées. Les glycoprotéines virales, se liant à un récepteur cellulaire et induisant la fusion membranaire, constituent des outils prometteurs pour ce type d'approche. La glycoprotéine G du VSV est la glycoprotéine virale la plus utilisée pour pseudotyper des lentivirus en thérapie génique. Néanmoins, il y a des limites à l'utilisation de G : les récepteurs de G (membres de la famille du LDLR) sont ubiquitaires et présents à la surface de cellules non cibles.

Les travaux de l'équipe sur la structure du complexe VSVG/LDLR avaient identifié des mutants de G ne liant plus le LDLR mais conservant leur activité de fusion. Ce découplage entre reconnaissance du récepteur et fusion ouvrait la possibilité de recibler spécifiquement la glycoprotéine vers des récepteurs d'intérêt.

Nous avons construit une glycoprotéine chimérique en fusion avec un nanobody dirigé contre la mCherry en position amino-terminale de G.

L'insertion de ce nanobody dans G est délétère. Par évolution expérimentale, nous avons identifié deux mutations dans G améliorant le repliement de la chimère. Ces mutations favorisent le repliement des G chimériques, quel que soit le nanobody inséré en position amino-terminale. Les virus pseudotypés (VSV et lentivirus) avec ces G chimériques ont un titre 10 fois plus élevé lorsque les mutations d'optimisations sont présentes.

Nous avons ensuite construit des glycoprotéines chimériques avec plusieurs nanobodies ciblant le récepteur HER2. Dans ces glycoprotéines, nous avons introduit les mutations abolissant la reconnaissance des récepteurs naturels de G. Les virus pseudotypés par ces glycoprotéines n'infectent plus que des cellules exprimant le récepteur HER2.

Nous avons donc identifié des mutations de G permettant de conférer un nouveau tropisme à G par insertion amino-terminale de nanobodies. Ceci ouvre la voie à des thérapies ciblées personnalisées.

Title : Vesicular stomatitis virus glycoprotein tropism modification: targeting receptors of interest

Keywords : Glycoprotein, vesicular stomatitis virus, tumor cells, targeting, nanobody

Abstract : The transfer of vesicles containing cargos toward cells of interest remains a challenge for targeted therapy. Viral fusion glycoproteins having the property of receptor recognition and fusion activity constitute promising tools for this kind of approach. VSV glycoprotein (G) is the most used viral glycoprotein to pseudotype lentiviruses in gene therapy. However, we encounter limits to the use of G: G cellular receptors (from LDLR family) are ubiquitous and expressed at the surface of non-target cells.

The work of the team on VSVG/LDLR structure enabled us to identify G mutants that no longer bind the LDLR without affecting its fusion activity. This uncoupling between the recognition of the receptor and the fusion capacity opened up the possibility of retargeting G towards receptors of interest.

A chimeric glycoprotein fused with a nanobody directed against the mCherry protein, in N-terminal, of G has been constructed.

The insertion of a nanobody in G is deleterious for its activity. Using experimental evolution, we identified two mutations on G enhancing the chimera folding. Remarkably, these mutations improve the folding of chimeric Gs, regardless of the sequence of the nanobody inserted in amino-terminal. Pseudotyped viruses (both VSV and lentiviruses) with these chimeric Gs at their surface show 10 times higher titers with these mutations of optimisation.

We then constructed chimeric Gs with several nanobodies targeting the receptor HER2. We introduced the mutations abolishing LDLR recognition in these Gs. Viruses pseudotyped with these glycoproteins only infected cells expressing HER2.

We therefore identified G mutations conferring a new tropism of G thanks to the N-terminal insertion of a nanobody. All this work opens the way to personalised targeted therapies.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Pascal Fender, Jean-François Fonteneau, Pascale Bouillé et Stéphanie Bury-Moné d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse Agathe Urvoas, Matteo Negroni et Didier Poncet pour leur implication et leur aide au cours de ma thèse.

J'aimerais dire un grand merci à toute l'équipe Rhabdovirus, une sacrée bande d'enragés !

Je remercie infiniment mes directeurs de thèse Yves Gaudin et Aurélie Albertini pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour m'avoir fait confiance.

Je te remercie sincèrement Yves pour tous tes conseils et nos discussions scientifiques. Merci pour tout le temps que tu as passé à relire et corriger ma thèse. Merci pour ton aide lors des nombreuses répétitions pour diverses présentations. Merci pour ton empathie dans les moments difficiles. J'ai pu apprendre énormément à tes côtés durant ces quatre années.

Aurélie, merci énormément pour ta disponibilité à chaque instant de ma thèse et pour ta patience. Merci pour tous tes conseils et ton soutien dans les moments de stress. Merci pour tout ce que tu m'as transmis au cours de ces quatre années. Merci pour la relecture et la correction de ma thèse.

Merci pour votre encadrement à tous les deux.

Merci à Cécile Lagaudrière-Gesbert pour ta gentillesse, ta bienveillance et pour tes conseils tout au long de ma thèse. Merci d'être le rayon de soleil du labo.

Merci à Nathalie Scrima pour ton aide et conseils pour les manip. Merci pour ton écoute et ta disponibilité.

Je te remercie Malika Ouldali pour ta gentillesse, nos échanges et pour tes magnifiques images de microscopie.

Je remercie les copains du bureau (ou les Totally labs), Sarah Johari, Damien Glon et Benjamin Léonardon pour les fous-rires, les voll-herpès, les pauses eau, les sorties sushis et la super ambiance (avec beaucoup de n'importe quoi).

Merci ma petite Sarah pour avoir toujours été là pour m'écouter (radoter surtout) et me soutenir, pour nos discussions (pas toujours très scientifiques haha), que ce soit au bureau, à la cafèt' ou dans le labo. Merci pour ton aide au labo. Merci d'être cette personne si chaleureuse et toujours de bonne humeur.

Merci Damien de m'avoir bien fait rire (même si ce n'est pas toujours intentionnel), pour ton aide précieuse avec power point ou graph pad, d'avoir toujours répondu à mes (petites) questions, pour avoir contribué à la magnifique décoration de mon bureau et pour toutes nos discussions.

Merci Benj pour nous avoir bien fait rire avec tes excuses absurdes et tes expressions. Merci pour nos discussions. Bon courage pour la dernière ligne droite !

Je remercie les post-docs présents et passés Quentin Nervers, Stéphanie Thébault, Julien Sourimant et Frédéric Rivière avec lesquels j'ai eu la chance de pouvoir échanger. Merci pour tous vos conseils. Merci à Stéphanie pour ton aide pour les manips et pour ta bonne humeur. Un merci particulier à Quentin pour ton écoute, nos discussions, nos trajets (parfois chaotiques) en RER B (vive la voiture) et pour nous avoir tellement fait rire au café.

Merci à Marie Minoves pour tous nos échanges et nos discussions plus personnelles. Merci de m'avoir écouté râler et pour le temps qu'on a passé sous psm avec nos tests de fusion. On aura commencé ensemble et presque terminé ensemble.

Je remercie Ariane Guillemot pour nos discussions et pour tes super plans astronomie (et pour les grenouilles). Je te souhaite bon courage pour ta dernière année.

Merci à notre petit Boris Pinto. On aura bien ri. Je te souhaite plein de courage pour la suite et de toujours trouver chaussette à ton pied.

Merci à Tracy Bellande pour toutes nos discussions et rires matinaux et pour ton aide précieuse dans le labo.

Je suis reconnaissante pour ces années passées dans cette équipe pluridisciplinaire dans laquelle j'ai beaucoup appris et grandi scientifiquement. Encore merci à cette drôle de famille.

Je tiens également à remercier tous les membres du département de Virologie pour les divers échanges lors des séminaires de département.

Je remercie mes amis pour leur soutien et pour nos sorties qui m'ont fait penser à autre chose.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue et qui a toujours été là pour moi. Enfin, merci à Serghei pour ton soutien indéfectible et pour m'avoir encouragée dans les moments de stress et de doute.

A mes trois belles étoiles.

Table des matières

Remerciements.....	V
Table des matières	VII
Liste des abréviations	XI
Table des illustrations	XIII
Partie 1 : Introduction	1
I. Apport de la biologie moléculaire dans le développement de nouvelles thérapies.....	3
I.1. Généralités.....	3
I.1.1. Histoire de la pharmacologie.....	3
I.1.2. L'avènement des protéines recombinantes.....	4
I.1.3. Changement de paradigme : les thérapies basées sur la modification du génome	5
I.2. La thérapie génique	6
I.2.1. Généralités	6
I.2.2. Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.....	8
I.2.2.1. Les vecteurs rétroviraux.....	8
I.2.2.2. Les vecteurs viraux adéno-associés	12
I.2.3. Exemples d'applications en thérapie génique.....	13
I.2.3.1. Les récepteurs antigéniques chimériques	13
I.2.3.2. Thérapie génique ciblant les cellules souches hématopoïétiques.....	16
I.2.4. Délivrance de molécules thérapeutiques via des vésicules	17
I.2.4.1. Les liposomes.....	17
I.2.4.2. Les Vésicules extracellulaires	19
I.3. Onco-virothérapie	20
I.4. Thérapies <i>in vivo</i> : la difficulté de cibler les cellules d'intérêt.....	22
II. Les <i>Rhabdoviridae</i>	25
II.1. Le genre <i>Vesiculovirus</i>	25
II.2. Pathologie	27
II.3. La stomatite vésiculaire	27
II.4. Morphologie des <i>Rhabdoviridae</i> /Virus de la stomatite vésiculaire	27
II.5. Organisation génomique.....	28
II.6. Le cycle viral du VSV.....	29
II.6.1. Entrée virale du VSV	29
II.6.2. La transcription virale	32
II.6.3. La traduction des ARNm viraux	33
II.6.4. La réplication virale	34
II.6.5. Les usines virales	34
II.6.6. Assemblage et bourgeonnement des virions	34
II.7. Rôle des protéines virales	35
II.7.1. Les protéines de la RNP.....	35

II.7.1.1. La nucléoprotéine N	35
II.7.1.2. L'ARN polymérase ARN-dépendante L	36
II.7.1.3. La phosphoprotéine P.....	38
II.7.2. Les protéines d'enveloppe.....	40
II.7.2.1. La protéine de Matrice M.....	40
II.7.2.2. La glycoprotéine G.....	42
III. La glycoprotéine G.....	46
III.1. Généralités.....	46
III.2. Structure de la G.....	47
III.3. Les récepteurs du VSV	48
III.3.1. Les facteurs d'attachement	48
III.3.2. Le LDLR.....	49
III.3.2.1. Rôle du LDLR.....	49
III.3.2.2. Structure du LDLR.....	50
III.3.2.3. Interaction avec les récepteurs LDLR.....	51
III.3.3. Autre récepteur proposé.....	55
III.3.3.1. Induction des anticorps neutralisants.....	55
IV. VSV et sa glycoprotéine en biotechnologie.....	57
IV.1. VSV en tant que vecteur vaccinal.....	57
IV.2. VSV en tant que virus oncolytique	58
IV.3. Utilisation de la G en biotechnologie.....	60
V. Reciblage de VSV G	62
V.1. Identification de récepteurs d'intérêt.....	62
V.2. Les ligands de ciblage.....	63
V.2.1. Les ligands de ciblage dérivés d'anticorps.....	64
V.2.2. Les protéines artificielles comme ligands de ciblage.....	65
V.3. Modification du tropisme	65
V.4. Une cible d'intérêt en thérapie : le récepteur HER2.....	68
V.4.1. Découverte du récepteur HER2.....	68
V.4.2. La famille ErbB.....	69
V.4.3. Rôle du récepteur HER2.....	70
V.4.4. Oncogénicité du récepteur HER2.....	71
V.4.5. Les cancers HER2+	71
V.4.6. Traitement des cancers HER2+	72
VI. Objectifs de la thèse	74
Partie 2 : Résultats.....	4
I. Informations générales	79
I.1. Contribution à l'article.....	79
I.2. Synopsis de l'article	79
II. Article (en cours de soumission)	82
III. Résultats complémentaires	116

III.1. Sensibilité de l'infection de VSVΔG-GFP pseudotypés par différentes G chimériques à l'incubation avec le domaine CR2 ou une forme de HER2 soluble. ..	116
III.2. Les lentivirus pseudotypés avec G _{H2-opt-K47Q} et G _{H2-opt-R354Q} sont reciblés vers HER2 dans des cellules HAP-1 HER2+.....	119
IV. Matériel et méthodes	121
<i>Partie 3 : Discussion et perspectives</i>	<i>125</i>
I. Optimisation de glycoprotéines chimériques	127
II. Modification du tropisme de G.....	129
III. Choix de la cible HER2.....	131
IV. Autres possibilités de reciblage de G.....	133
<i>Bibliographie.....</i>	<i>135</i>

Liste des abréviations

A

AAV : Vecteurs viraux adéno-associés
ADNccc : ADN circulaire clos de façon covalente
ApoER2 : Récepteur de l'apolipoprotéine E
ASA : Arylsulfatase A

B

BMP : Bis(monoacylglycérol)phosphate

C

Cap : Domaine de coiffage
CAR-B : Cellules B à récepteur d'antigène chimérique
CAR-T : Cellules T à récepteur d'antigène chimérique
CCHFV : Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo
CD : Domaine de connexion
CMH-1 : complexe majeur d'histocompatibilité 1
CR : Domaine riche en cystéine
CSH : Cellules souche hématopoïétiques

D

DI : Particules défectueuses interférentes
DICS : Déficience immunitaire combinée sévère

E

EBOV : Virus Ebola
ECP : Effet cytopathogène
EGF : Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur au facteur de croissance épidermique
ESCRT : *Endosomal sorting complex required for transport*

F

Fab : Fragment de liaison à l'antigène

FD : Domaine de fusion
FDA : *Food and drug administration*

G

G : Glycoprotéine

H

HAdV-5 : Adénovirus de type 5
HcAbs : anticorps uniquement constitués de chaînes lourdes
HER2 : Récepteur au facteur de croissance épidermique humain
HSV-1 : Virus herpès simplex de type 1

I

IgG : Immunoglobuline G
IFN- γ / β : Interféron gamma/bêta

L

IL-2 : Interleukine 2
ILV : Vésicule intraluminale
L : ARN polymérase ARN-dépendant
LBPA : Acide lysobisphosphatidique
L-domain : *Late budding domain*
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLR : Récepteur aux lipoprotéines de basse densité
LGR4 : *Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 4*
LLC : Leucémie lymphocytaire chronique
LRP1/LRP1b/LRP4 : *LDLR related protein 1/1b/4*
LTR : *Long terminal repeat*

M

M : Protéine de matrice
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MLV : Virus de la leucémie murine

MT : Domaine de méthylation

MVB : Corps multivésiculaires

N

N : Nucléoprotéine

Nedd4 : *Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4*

NIS : Symporteur sodium iodure

NK : Cellules natural killer

O

OV : Virus oncolytique

P

P : Phosphoprotéine

PAM : *Protospacer adjacent motif*

PBMCs : Cellules mononucléaires périphériques

PBS : *Primer binding site*

PHD : Domaine d'homologie à la pleckstrine

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PS : Phosphatidylsérine

R

RABV : *Rabies virus* / Virus de la rage

RID : Région intrinsèquement désordonnée

RNP : Ribonucléoprotéine

RRE : Élément de réponse à Rev

RTK : Récepteur tyrosine kinase

S

SARS-CoV-1/2 : Virus du syndrome respiratoire aigu sévère 1/2

ScFv : Fragment variable à simple chaîne

siRNA : Petits ARN interférents

shRNA : Petits ARN en épingle à cheveux

SORLA : *Sortilin-related receptor with A-type repeats*

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

SU : protéine de surface

T

TALEN : Nucléase effectrice de type activateur de transcription

TCR : Récepteur de cellule T

TM : protéine transmembranaire

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TrD : Domaine de trimérisation

Tsg101 : *Tumor susceptibility gene 101*

T-VEC : Talimogene Laherparevneq

V

VEGFR2 : Récepteur de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2

v-erbB : Avian erythroblastosis virus

VHB : Virus de l'hépatite B

VHH : Domaine variable de chaîne lourde

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine 1

VLDLR : Récepteur aux lipoprotéines de très basse densité

VSIV : Virus de la stomatite vésiculaire sérotype Indiana

VSJNV : Virus de la stomatite vésiculaire sérotype New-Jersey

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

VRS : Virus respiratoire syncytial

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1: Système CRISPR-CAS9. ARN cr : ARN CRISPR. ARN tr : ARN transactivateur	7
Figure 2: Organisation génomique des Retroviridae.....	8
Figure 3: Cycle viral du VIH-1	10
Figure 4: Schéma des différentes générations de vecteurs rétroviraux développés à partir du MLV.....	10
Figure 5: Schéma des différentes générations de vecteurs lentiviraux.....	11
Figure 6: Structure des cellules CAR-T.....	13
Figure 7: Les cinq générations de cellules CAR-T	14
Figure 8: Position des vésiculovirus dans l'arbre phylogénétique des Rhabdoviridae. ...	26
Figure 9 : Organisation génomique du virus de la stomatite vésiculaire	28
Figure 10: Organisation de la particule virale du virus de la stomatite vésiculaire	29
Figure 11: Schéma de l'entrée du virus de la stomatite vésiculaire dans les cellules. Schéma réalisé à l'aide de BioRender.	29
Figure 12: Voies d'endocytoses classique et alternative du VSV.	31
Figure 13: Schéma du génome viral montrant les signaux d'initiation et de terminaison de la transcription.	32
Figure 14: Schéma du cycle viral du VSV.....	33
Figure 15: Organisation de la Nucléoprotéine N.....	36
Figure 16: Organisation de l'ARN polymérase ARN dépendante L.....	37
Figure 17: Organisation de la phosphoprotéine P.....	38
Figure 18: Organisation de la protéine de matrice M.....	40
Figure 19: Diagramme longitudinal schématique du VSV.....	41
Figure 20: Schéma expérimental de la reconstitution d'un VSV recombinant par génétique inverse	44
Figure 21: Organisation génomique de la glycoprotéine du VSV	46
Figure 22: Structure des conformations pré et post-fusion des protomères et trimères de G.....	47
Figure 23: Cycle du LDLR.	50
Figure 24: Structure du LDLR.....	51
Figure 25: Interaction en G et les domaines CR2 et CR3.....	52
Figure 26: Caractérisation des G mutées en H8, K47, Y209 et R354.....	54
Figure 27: Localisation des sites antigéniques A1, A2 et B sur l'ectodomaine d'un protomère de G au stade pré-fusion	56
Figure 28: Exemple de production de virus VSV pseudotypés avec la glycoprotéine du virus Ebola (EBOV GP).....	58
Figure 29: Structures des IgG classiques, scFv, IgG de camélidés et Nanobodies	64
Figure 30: Organisation du récepteur HER2.....	69
Figure 31: Voies de signalisation activées par le récepteur HER2	70
Figure 32: Représentation schématique de G (G _{WT}) et de la G chimérique G _{C11}	74
Figure 33: Production de VSV pseudotypés.....	80

Figure 34: Production de lentivirus pseudotypés par G _{nano} et évaluation de leur infectiosité.....	81
Figure 35: Tests de l'infectiosité préférentielle dirigée vers le récepteur HER2 avec pour exemple le G _{H2-opt-K47Q}	81
Figure 36: Tests de compétition avec les protéines solubles.....	116
Figure 37: Infectiosité des VSV pseudotypés avec les G _{H2-opt} , G _{H2-opt-K47Q} et G _{H2-opt-R354Q} après incubation avec CR2-GST dans des cellules HEK293T	118
Figure 38: Infectiosité des VSV pseudotypés avec les G _{H2-opt} , G _{H2-opt-K47Q} et G _{H2-opt-R354Q} après incubation avec l'ectodomaine de HER2 dans des cellules HEK293T.....	118
Figure 39: Recyclage des lentivirus pseudotypés avec G _{H2-opt-K47Q} et G _{H2-opt-R354Q} vers les cellules HAP-1 ^{HER2+}	120
Figure 40: Positions d'insertion identifiées dans G.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1: Cibles les plus décrites en thérapies anti-cancéreuses.	63
---	----

Partie 1 :

Introduction

I. Apport de la biologie moléculaire dans le développement de nouvelles thérapies

I.1. Généralités

I.1.1. Histoire de la pharmacologie

Depuis toujours, l'Homme n'a eu de cesse de chercher des traitements afin de contrecarrer les différentes maladies auxquelles il pouvait faire face. Les premiers traitements développés ont eu recours à la pharmacologie. La pharmacologie provient du grec et signifie « étude des drogues ». Celle-ci regroupe l'utilisation de médicaments, de substances endogènes, ainsi que de substances biologiquement actives. Les premières évidences de l'utilisation de la pharmacologie remontent donc à l'antiquité où des plantes médicinales étaient utilisées pour soigner. Ainsi, Hippocrate au Vème siècle avant JC et Théophraste au IVème siècle avant JC ont contribué à la connaissance de ces plantes médicinales et, au premier siècle de notre ère, Dioscoride a rédigé « *De Materia Medica* », un texte décrivant des centaines de plantes médicinales, ainsi que leurs usages.

Plus tard, au moyen-âge, des ouvrages de médecins, tel que le « Canon de médecine » d'Avicenne ont permis de regrouper les connaissances médicales et pharmacologiques de l'époque.

A compter de la fin du XIXème siècle, les développements en chimie et en biologie, combinés à l'avancement des techniques de recherche vont mener à l'essor de la pharmacologie permettant des découvertes importantes, notamment celle de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming, ou encore le développement des chimiothérapies grâce aux travaux de Paul Ehrlich qui, en 1909, met au point le premier médicament de synthèse à avoir une véritable efficacité dans le traitement de la syphilis.

Dans les années 1950-60, les avancées en pharmacologie mènent au développement de l'industrie pharmaceutique et à la production à grande échelle de médicaments. Ces développements s'appuient beaucoup sur la chimie.

I.1.2.L'avènement des protéines recombinantes

A partir des années 1970, le développement de la biologie moléculaire et la capacité de production de protéines d'intérêt va contribuer à l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques. En 1975, des techniques de production d'anticorps monoclonaux ont pu être mises en place. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits naturellement par une même lignée de lymphocytes B. Ils reconnaissent donc le même épitope d'un antigène (Köhler and Milstein, 1975). En 1986, un premier anticorps monoclonal a obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il s'agit du Muromonab, un anticorps dirigé contre le récepteur CD3 présent à la surface des cellules T. Il servira à réduire le rejet aigu chez les personnes ayant subi une transplantation d'organe (Starzl and Fung, 1986; Fung, Demetris and Porter, 1987; Markus *et al.*, 1987).

Les anticorps monoclonaux sont également utilisés dans des thérapies antivirales. En 1998, le palivizumab, une immunoglobuline G (IgG) humanisée, a été approuvé en tant que traitement pour les patients infectés par le virus respiratoire syncytial (VRS) (Subramanian *et al.*, 1998). Actuellement, des anticorps monoclonaux sont utilisés pour traiter diverses maladies telles que des cancers, des maladies infectieuses ou encore des maladies auto-immunes.

Ces anticorps ciblant un antigène tumoral sont parfois couplés à une drogue et utilisés pour traiter des cancers, comme les leucémies myéloïdes multiples (Lancman *et al.*, 2023).

Au-delà des anticorps monoclonaux, le développement des systèmes de productions de protéines recombinantes ont permis de nombreuses avancées. On peut citer l'insuline, utilisée dans le traitement du diabète de type I. Initialement, l'insuline était purifiée à partir de pancréas bovins et porcins, et son injection provoquait des réactions allergiques et une réponse immunitaire (Wiles *et al.*, 1983). L'utilisation d'insuline recombinante humaine produite en *Escherichia coli* a changé la donne, puisque celle-ci est identique à l'insuline humaine.

I.1.3. Changement de paradigme : les thérapies basées sur la modification du génome

La seconde révolution, toujours en cours aujourd'hui, est l'émergence de nouvelles thérapies, parmi lesquelles la thérapie génique qui s'appuie sur les nouvelles technologies permettant la modification du génome.

Pour un certain nombre de maladies, elles permettent d'envisager un traitement curatif tandis que la pharmacologie ne permettait qu'un traitement des symptômes ou un ralentissement de l'évolution de la maladie. Ces nouvelles thérapies ont donc conféré un nouvel espoir de guérison pour des maladies considérées auparavant comme incurables.

Les premiers essais de correction de gènes défectueux ont été réalisés chez des modèles animaux. En 1989, des essais sur des souris atteintes de déficience immunitaire combinée sévère (DICS), résultant d'une mutation dans le gène de l'adénosine désaminase, ont été menés en modifiant les cellules hématopoïétiques chez des souris (Lim *et al.*, 1989).

Au départ, ce type de thérapie avait pour unique but de traiter les maladies monogéniques, c'est-à-dire des maladies causées par la mutation d'un seul gène, telles que la drépanocytose. A ce jour, elles ont pour ambition de traiter des cancers (Amara *et al.*, 2016; Cesur-Ergün and Demir-Dora, 2023), des maladies neurodégénératives (Tuszynski *et al.*, 2015; Katsouri *et al.*, 2016; Griciuc *et al.*, 2020) et des maladies infectieuses (Leibman and Riley, 2015; Scholler *et al.*, 2015).

L'un des plus grands enjeux de ces nouvelles thérapies est le développement de thérapies personnalisées délivrées *in situ* (directement chez le patient) et ciblant exclusivement les cellules qu'on souhaite éliminer ou dont on souhaite modifier le génome. Parmi les différentes thérapies ciblées, on retrouve la thérapie génique, certaines immunothérapies, mais aussi des thérapies anticancéreuses permettant la délivrance ciblée de molécules antitumorales ainsi que l'oncovirothérapie.

Dans le cadre de ces thérapies ciblées, on cherche à libérer un cargo (un gène, un acide nucléique, un peptide, une petite molécule, etc.) spécifiquement dans la cellule d'intérêt. Ce cargo peut être véhiculé par des vecteurs viraux, des liposomes (vésicules artificielles) ou encore des exosomes (vésicules naturelles) produits par des cellules modifiées.

I.2. La thérapie génique

I.2.1. Généralités

La thérapie génique permet de traiter, voire de guérir, des maladies qui ne peuvent être traitées par des approches de pharmacologie traditionnelles. Cette approche thérapeutique a été utilisée avec succès pour traiter diverses pathologies, telles que certains cancers (Wirth, Parker and Ylä-Herttuala, 2013), les maladies génétiques, certaines maladies infectieuses, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (Sudhakar and Richardson, 2018). La thérapie génique consiste à délivrer, modifier, inhiber ou supprimer des gènes dans une cellule ou un tissu donné afin de soigner les patients. A ce jour, les cancers sont les maladies les plus traitées par thérapie génique (Wirth, Parker and Ylä-Herttuala, 2013). Notamment, via les thérapies par cellules CAR-T, qui seront présentées par la suite.

L'inhibition de l'expression d'un gène se fait par diverses approches utilisant des petits ARN interférents (siRNA)(Yu *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2024; Yamamoto *et al.*, 2024) et petits ARN en épingle à cheveux (shRNA)(Lengrand *et al.*, 2023).

La modification de gènes a recours à des nucléases, telles que les nucléases à doigt de zinc, ou encore des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN). Actuellement, la technologie la plus prometteuse est la technologie CRISPR-CAS9 dérivée d'un mécanisme de défense bactérien contre les bactériophages (Jinek *et al.*, 2012). Surnommé les ciseaux moléculaires, ce système permet de modifier les gènes. Il implique deux composants essentiels : un ARN guide correspondant à un gène cible et une endonucléase (CAS9) qui coupe l'ADN double brin, permettant ainsi la modification du génome. CAS9 reconnaît une séquence spécifique de 3 à 5 nucléotides, appelée PAM (en Anglais : *protospacer adjacent motif*), sur l'ADN double brin et située après la séquence cible de l'ARN guide. Elle se lie à la séquence cible et clive ensuite l'ADN double brin au niveau de cette séquence. La réparation du gène se fait par recombinaison homologue grâce à cet ARN guide servant de matrice de réparation (Figure 1).

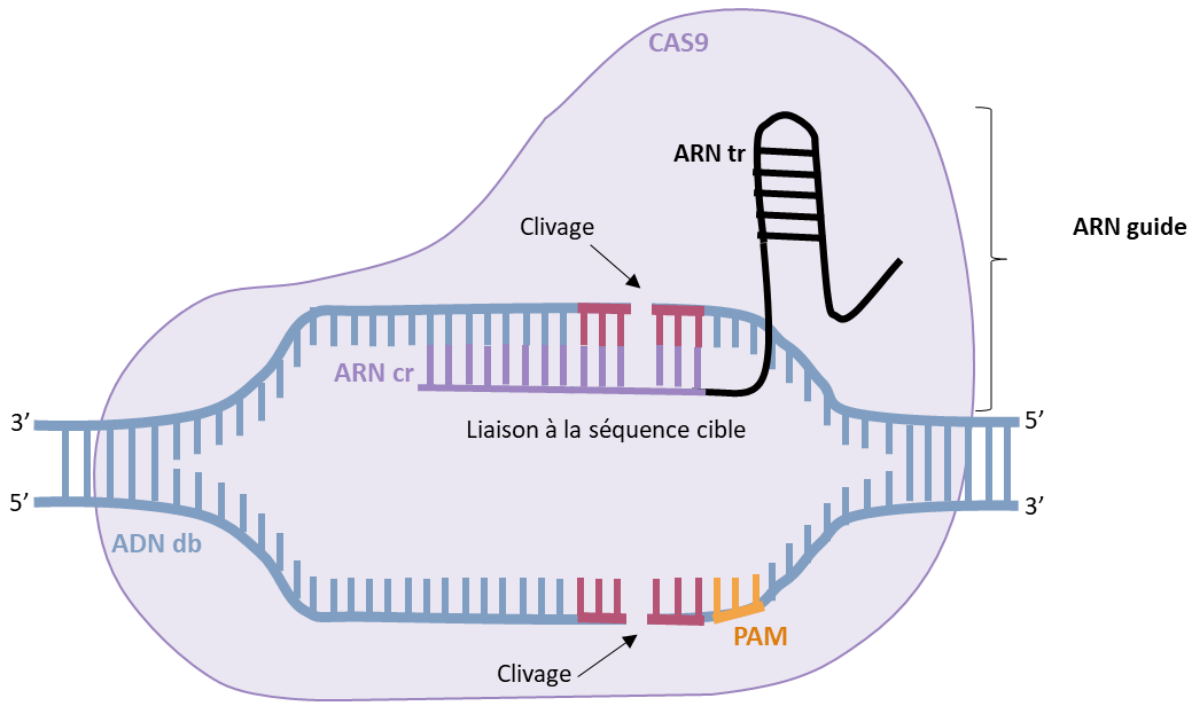


Figure 1: Système CRISPR-CAS9. ARN cr : ARN CRISPR. ARN tr : ARN transactivateur. L'ARN guide est divisé en un ARN cr et un ARN tr. Il existe également des ARN guides uniques constitués d'une seule séquence.

La délivrance de gènes, peut se faire via des vecteurs viraux, à savoir des virus pseudotypés (lentivirus ou rétrovirus), des adénovirus, des vecteurs viraux adéno-associés (AAV), mais aussi via des plasmides ou des vésicules (Wirth, Parker and Ylä-Herttuala, 2013). Les différentes stratégies utilisées peuvent avoir recours à des approches *in vivo* ou *ex vivo*. Les approches *in vivo* consistent à injecter directement le vecteur viral dans l'organisme du patient. Dans le cas des thérapies *ex vivo*, on procède au prélèvement de cellules du patient, qui seront modifiées, la plupart du temps en utilisant un vecteur lentiviral, avant d'être réinjectées chez le patient.

Actuellement, la grande majorité des thérapies géniques sont des thérapies *ex vivo*. Le principal avantage de ce type de thérapie par rapport à une thérapie *in vivo* est qu'elle permet de contrôler les étapes du traitement, notamment d'éviter la dispersion des vecteurs viraux dans des organes non cibles. L'un des défis dans ce domaine est de développer des approches *in vivo* qui ciblent exclusivement les cellules à modifier.

I.2.2. Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

I.2.2.1. Les vecteurs rétroviraux

La famille des *Retroviridae* regroupe des virus enveloppés dont le génome est diploïde, constitué de deux ARN simple brin de polarité positive. Après sa transcription inverse en ADN, ce génome va s'intégrer dans le génome d'une cellule hôte par l'intégrase virale. Les virions ont une forme sphérique et mesurent entre 80 et 200nm de diamètre (Yeager *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2018). Au sein des *Retroviridae*, on distingue différents genres parmi lesquels les gamma-rétrovirus, dont le prototype est le virus de la leucémie murine de Moloney (MLV) et les lentivirus, dont le prototype est le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), deux genres particulièrement utilisés en thérapie génique, en tant que vecteurs. L'avantage majeur de l'utilisation de vecteur rétroviraux est leur capacité d'intégration, ce qui va permettre de modifier durablement le génome de l'hôte.

Les *Retroviridae* possèdent trois gènes communs à toutes les espèces, appelés Gag, Pol et Env, ainsi que deux régions de séquences terminales longues répétées (LTR ; en Anglais : *Long terminal repeat*) situées aux extrémités 5' et 3' du génome (Figure 2). La séquence LTR en 5' est composée d'une séquence R et d'une région U5. Elle est suivie d'un site PBS (en Anglais : *Primer binding site*) et d'une séquence d'encapsidation du génome (ψ). La région 3' LTR contient également une séquence R mais aussi une région U3. Le gène Gag code pour la protéine de capsid, la protéine de matrice et la nucléoprotéine. Pol code pour la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Env quant à lui code pour la glycoprotéine d'enveloppe, qui sera clivée en une protéine de surface (SU) (gp120 pour le VIH) et une protéine transmembranaire (TM) (gp41 chez le VIH-1) (Willey *et al.*, 1988).

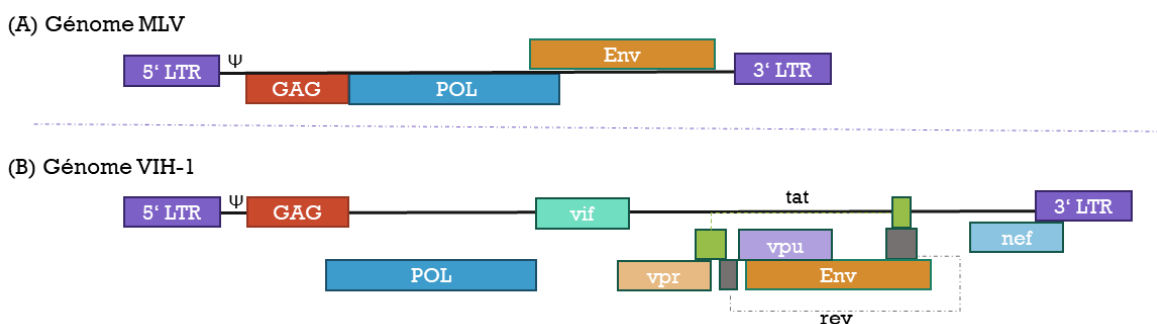


Figure 2: Organisation génomique des *Retroviridae*. Exemples du MLV (A) et du VIH-1 (B). LTR : répétition terminale longue. RRE : Élément de réponse à Rev.

Le génome du VIH-1 possède d'autres cadres de lecture (Figure 2B)(Ratner *et al.*, 1985; Wain-Hobson *et al.*, 1985) codant pour des protéines accessoires, nef, vif, vpu, vpr (Sodroski *et al.*, 1986; E A Cohen *et al.*, 1988), et pour des protéines régulatrices Tat et Rev (Arya *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1985). Tat et Rev sont impliquées respectivement dans l'activation de la transcription et dans la régulation de l'épissage et du transport de l'ARN (Rosen, Sodroski and Haseltine, 1985; M H Malim 1 , J Hauber, R Fenrick, 1988). Le génome du VIH-1 possède également un élément de réponse à Rev (RRE), permettant son export nucléaire (Malim *et al.*, 1989; Cochrane, Chen and Rosen, 1990).

La première étape du cycle viral des *Retroviridae* est la liaison de la protéine SU au récepteur (Figure 3). La seconde protéine TM catalyse ensuite la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule. Ce qui permet le relargage de la capsid dans le cytoplasme. Il est suggéré que la transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin, via la transcriptase inverse, est initiée dans la capsid, alors que celle-ci est encore dans le cytoplasme. La majeure partie de la transcription inverse a lieu, après la translocation de la capsid, dans le noyau. Le complexe nucléoprotéique comprenant l'ADN double brin, appelé complexe de pré-intégration, sera ensuite désenrobé pour permettre son intégration dans le chromosome de l'hôte, par l'intégrase (Bukrinsky *et al.*, 1992; Burdick *et al.*, 2020). La séquence virale ainsi intégrée dans le génome de la cellule hôte est appelée provirus. La transcription du provirus en génome viral et ARNm est effectuée par l'ARN polymérase II cellulaire avec l'aide des protéines régulatrices (Tat pour le VIH-1). Les ARN épissés et non épissés sont ensuite exportés du noyau vers le cytoplasme où les ARN non épissés seront traduits en protéines virales. Les ARN viraux, compétents pour l'encapsidation (possédant la séquence ψ) et pour leur dimérisation, favorisent l'assemblage de la capsid (Sarni *et al.*, 2020). En effet, la protéine Gag se lie à ces ARN, permettant la localisation des complexes Gag-ARN à la membrane plasmique où les ARN se dimériseront (Chen *et al.*, 2016). Les particules virales bourgeonnent à la membrane et sont ensuite libérées sous forme immature. Au sein de la particule virale, les différents éléments de Gag et Pol sont ensuite clivés par la protéase virale. Ceci induit un réarrangement structurel permettant la maturation des virions et donc la production de virus infectieux (Katoh *et al.*, 1985; Kohl *et al.*, 1988).

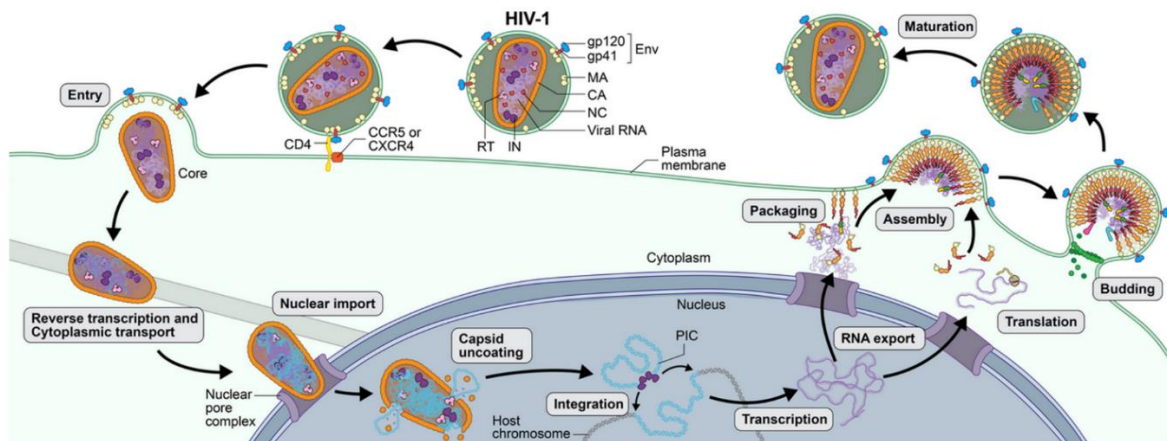


Figure 3: Cycle viral du VIH-1. D'après Science of hiv.org.

Les premiers vecteurs rétroviraux ont été développés, dans les années 1980, à partir d'un γ -rétrovirus, le MLV (Mann, Mulligan and Baltimore, 1983). Par la suite, ceux-ci ont permis de délivrer le gène de l'adénosine désaminase dans des cellules souches hématopoïétiques et d'induire son expression durable (Rivière, Brose and Mulligan, 1995).

Dans ces premiers systèmes, le vecteur était séparé en deux plasmides codant pour différentes protéines du virus de la leucémie murine : un plasmide de transduction comprenant les séquences d'encapsulation du transgène (Ψ) et d'intégration (LTR), et un plasmide auxiliaire d'encapsulation, comprenant les gènes codant pour Gag, Pol et Env (Figure 4A)(Naviaux *et al.*, 1996; Blesch, 2004). Ainsi, ont été obtenus des virus incapables de se répliquer et exprimant un gène d'intérêt.

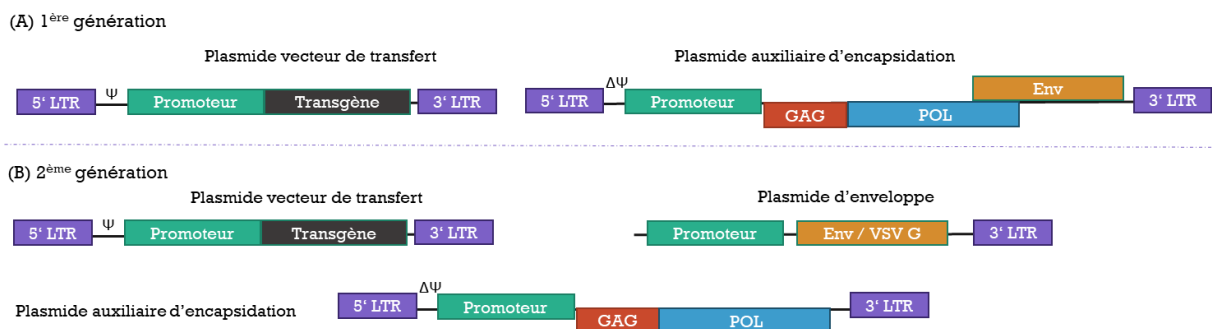


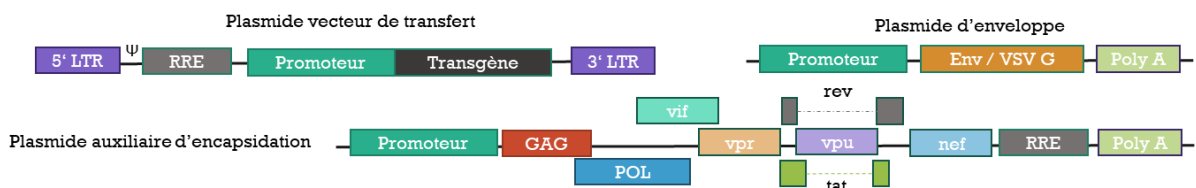
Figure 4: Schéma des différentes générations de vecteurs rétroviraux développés à partir du MLV. A. Première génération de vecteurs rétroviraux. B. Deuxième génération de vecteurs rétroviraux. LTR : répétition terminale longue. $\Delta\Psi$: région délétée de la séquence psi.

Ces vecteurs pouvaient se révéler dangereux en cas de recombinaison et relocalisation de l'élément Ψ , en menant à la formation de rétrovirus répliquatifs. Un second système de

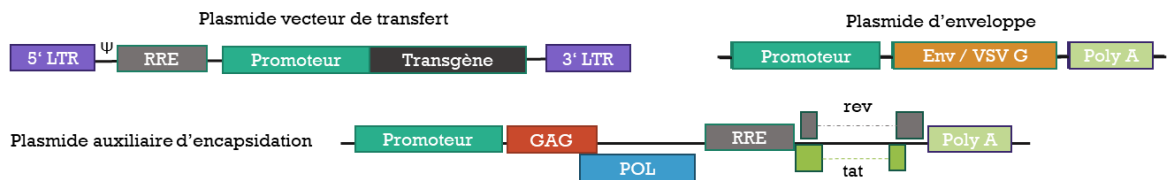
vecteurs rétroviraux a donc été développé, dans lequel le plasmide auxiliaire est divisé en deux plasmides, ce qui permet de séparer les gènes Gag et Pol du gène Env (Figure 4B)(Soneoka *et al.*, 1995). Comme deux recombinaisons seraient nécessaires pour regrouper les gènes Ψ , Gag, Pol et Env, ce système réduit les risques de formation de rétrovirus capables de se répliquer.

Il s'avère néanmoins que les systèmes de vecteurs lentiviraux développés à partir du MLV sont peu efficaces en termes de transfert de gènes dans des cellules humaines (Miller, Adam and Miller, 1990). Des systèmes de vecteurs lentiviraux, dérivés du VIH-1 ont donc été développés (Figures 2B, 5A). Ceux-ci présentent l'avantage de posséder deux gènes supplémentaires codant pour Tat et Rev, et d'infecter des cellules en division ou non (Miller, Adam and Miller, 1990; Fouchier *et al.*, 1997). (Arya *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1985).

(A) 1^{ère} génération



(B) 2^{ème} génération



(C) 3^{ème} génération

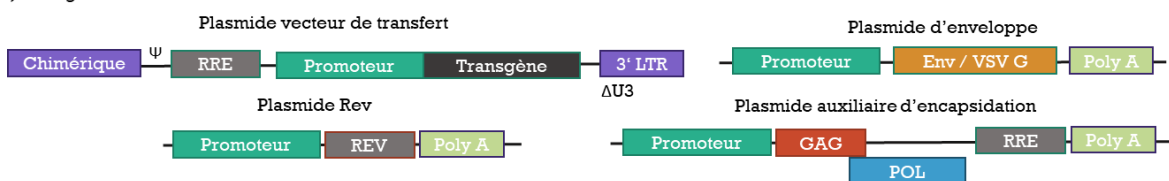


Figure 5: Schéma des différentes générations de vecteurs lentiviraux. A. Première génération de vecteurs lentiviraux. B. Deuxième génération de vecteurs lentiviraux. C. Troisième génération de vecteurs lentiviraux. LTR : répétition terminale longue. RRE : Élément de réponse à Rev. $\Delta U3$: séquence LTR déléetée de sa partie U3.

Un système de première génération dérivé du VIH-1 et incluant cette fois-ci Tat et Rev, ainsi que des gènes accessoires a d'abord été mis au point en utilisant des plasmides similaires à ceux utilisés dans le système dérivé du MLV (Figure 5A)(Naldini *et al.*, 1996).

Pour les mêmes raisons de sécurité que pour le MLV, une seconde génération de vecteurs lentiviraux a été développée excluant les protéines accessoires du HIV-1 mais conservant Tat et Rev (Figure 5B)(Zufferey *et al.*, 1997).

Le système de troisième génération utilise quatre plasmides (Figure 5C)(Dull *et al.*, 1998). Le plasmide contenant le transgène a été modifié par une LTR 5' chimérique. Celle-ci contient un promoteur chimérique, ce qui permet de se dispenser du gène Tat. Le gène Rev est codé par un plasmide différent de celui codant Gag et Pol. De plus, la séquence U3 de la région 3'LTR comporte une délétion inactivant l'activité du promoteur et empêchant ainsi la production de nouvelles molécules d'ARN génomique.

Actuellement, le système de seconde génération est le plus utilisé en recherche. Bien que moins utilisés que les vecteurs lentiviraux, les vecteurs dérivés du MLV sont utilisés pour certaines applications de thérapie génique impliquant les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou pour modifier des lymphocytes T.

Enfin, les vecteurs lentiviraux ont la possibilité d'être pseudotypés par une protéine d'enveloppe exogène, ce qui permet de modifier le tropisme du vecteur et/ou d'en augmenter la stabilité.

I.2.2.2. Les vecteurs viraux adéno-associés

La famille des *Parvoviridae* regroupe des virus non enveloppés à ADN simple brin classés dans deux sous-familles : Les *Densovirinae* et les *Parvovirinae* (ICTV Août 2024). Ceux-ci ont été découverts dans les années 1960. Parmi les différents genres de la sous-famille des *Parvovirinae*, on retrouve le genre *Dependovirus*, auquel appartiennent les virus adéno-associés (Pipe *et al.*, 2019). À ce jour, 13 sérotypes d'AAV ont pu être isolés : AAV1 à AAV13. Ils sont classés en fonction de leur antigène de surface.

Les AAV sont incapables de se répliquer sans l'aide d'un adénovirus ou d'un herpès virus (Carter, 2004) et sont non pathogènes pour l'homme. En absence de fonctions auxiliaires provenant d'un adénovirus ou herpès virus, les AAV vont s'intégrer dans le génome de l'hôte. Les AAV pourront se répliquer grâce au simple ajout d'un virus auxiliaire. Ils peuvent ainsi être utilisés en tant que système inductible (Tratschin *et al.*, 1984).

A l'heure actuelle, trois types de thérapies géniques à base d'AAV ont été approuvés. En 2012, un premier protocole, basé sur l'utilisation d'AAV et permettant de traiter des déficiences en lipoprotéines lipases induisant une accumulation de triglycérides dans le plasma, a été développé (Salmon, Grosios and Petry, 2014; Pupo *et al.*, 2022). Le coût élevé de ce traitement a engendré un arrêt de sa commercialisation. D'autres traitements développés à partir d'AAV sont cependant toujours commercialisés. Ainsi, un médicament (Luxturna) dérivé d'un vecteur AAV2 permet de traiter certains types de cécités, liée à la mutation bi allélique du gène RPE65 (Russell *et al.*, 2017; Ford *et al.*, 2024).

Les AAV sont donc des vecteurs prometteurs pour la thérapie génique. Ils présentent l'avantage de ne provoquer qu'une faible réponse du système immunitaire et d'engendrer une expression durable des gènes.

I.2.3.Exemples d'applications en thérapie génique

I.2.3.1. Les récepteurs antigéniques chimériques

La thérapie par cellules T à récepteur d'antigène chimérique (CAR-T) consiste en un traitement utilisant des cellules allogéniques. Dans le cas des cellules CAR-T, il s'agit de recibler des lymphocytes T prélevés chez des patients, vers des cellules cancéreuses exprimant un antigène spécifique, afin de les éliminer. Cette stratégie en plein essor a montré des réponses efficaces et durables chez des patients souffrant de leucémies aiguës lymphoblastique et de lymphomes diffus à grandes cellules B.

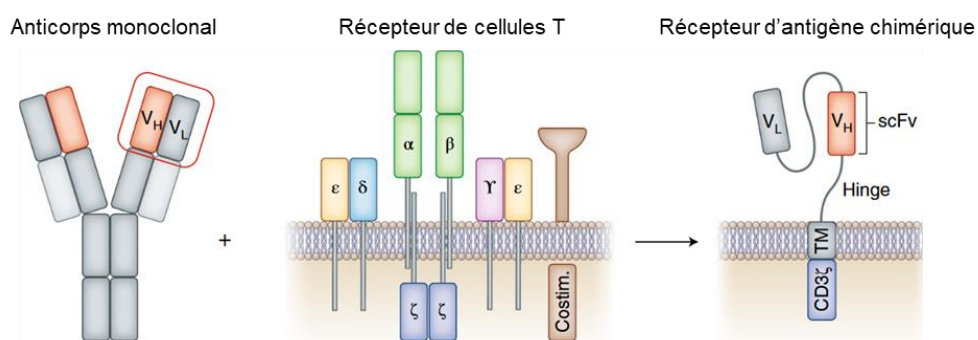


Figure 6: Structure des cellules CAR-T. V_H : chaîne lourde. V_L : chaîne légère. TM: domaine transmembranaire. Costim. : domaine de co-stimulation. Adapté (Majzner and Mackall, 2019); Debbie Maizels/Springer Nature

Actuellement, il existe cinq générations de cellules CAR-T. La structure des CAR de première génération est constituée d'un fragment variable à chaîne unique d'un anticorps monoclonal fusionné avec un domaine transmembranaire et un domaine de signalisation

intracellulaire, celui du récepteur des cellules T CD3- ζ capable de déclencher une réponse des lymphocytes T (Figure 6). Dans les générations suivantes, le domaine transmembranaire est relié au récepteur CD3- ζ via une (seconde génération) ou deux (troisième génération) molécules de co-stimulation (Figure 7)(Pulè *et al.*, 2005; Kowolik *et al.*, 2006; June *et al.*, 2018). Les CAR de quatrième génération quant à eux possèdent un domaine inductible permettant l'expression de chimiokines (notamment l'interleukine 12), ainsi qu'un domaine de co-stimulation. Ceux de cinquième génération contiennent un autre domaine de co-stimulation permettant l'activation de voies de signalisation spécifiques, telles que celles des transducteurs de signal et activateurs de la transcription (STATs)(Kagoya *et al.*, 2018; Mehrabadi *et al.*, 2022). Dans l'exemple donné, ce domaine correspond à un domaine cytoplasmique de la chaîne β du récepteur de l'interleukine (IL)-2 (IL-2R β), qui associé à un motif Tyrosine-X-X-glutamine liant STAT3 (YXXQ) permet l'activation de STAT3.

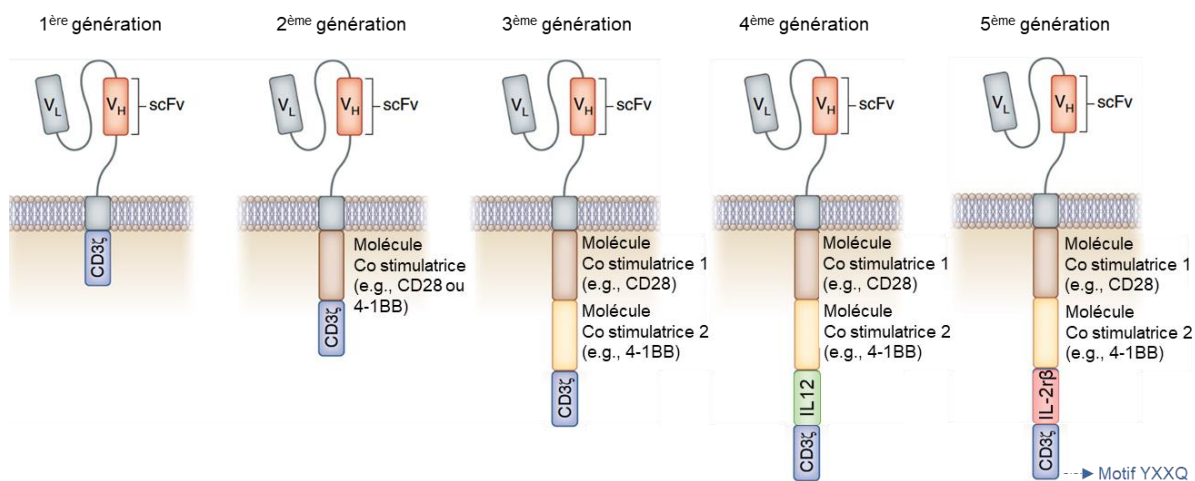


Figure 7: Les cinq générations de cellules CAR-T. Adapté de Majzner and Mackall, 2019, illustrations Debbie Maizels.

La première étape de production de cellules CAR-T consiste à prélever des lymphocytes T sur un patient par aphérèse. Les lymphocytes T sont ensuite activés par des anticorps, puis modifiés par exposition à un vecteur viral ou à un autre codant pour la molécule CAR. Le gène ainsi introduit permettra de produire et d'exposer les CAR à la surface des lymphocytes T. Les cellules CAR-T ainsi modifiées seront triées et multipliées avant administration au patient.

Les thérapies par cellules CAR-T dirigées contre la molécule de surface CD19 des lymphocytes B ont montré des résultats probants chez des patients atteints de leucémies lymphocytaires chroniques (LLC) et de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B

(LLA)(Porter *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). Ce traitement induit une aplasie des lymphocytes B.

De façon générale, les thérapies géniques utilisant des cellules CAR-T sont complexes à mettre en place et très coûteuses.

Une manière de simplifier le protocole serait d'utiliser une approche *in vivo* pour produire directement les cellules CAR-T chez les patients. Ainsi, des lentivirus pseudotypés avec la glycoprotéine (G) du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV), portant un transgène anti-CD19, ont été transfusés chez des souris. Les lymphocytes T ont donc été transduits et modifiés *in vivo* pour produire des cellules CAR-T dirigés contre CD19 et ainsi induire une aplasie de la population de lymphocytes B (Rive *et al.*, 2022). Ceci a permis une initiation de la transduction, une expansion et une activité antitumorale des cellules CAR-T *in vivo*. Il serait donc possible de réaliser une transduction directement chez les patients dans le cadre de certaines thérapies anti-cancéreuses, tel que pour des lymphomes non hodgkiniens.

L'utilisation de vecteurs pour des thérapies *in vivo* pose la question de leur dangerosité pour les patients en cas de transduction de cellules non cibles. En effet, dans le cas de thérapies *in vivo* l'environnement n'est pas contrôlé et, à la différence des thérapies *ex vivo*, il n'est pas possible de sélectionner les cellules qui ont été modifiées. Il serait utile de modifier le tropisme des vecteurs lentiviraux pour cibler exclusivement les lymphocytes T.

Les limites des thérapies par cellules CAR-T

Les thérapies par cellules CAR-T ont des limites, notamment concernant leur efficacité dans le traitement de tumeurs solides. En effet, l'infiltration des cellules CAR-T au sein des tumeurs solides est limitée par le micro-environnement tumoral immunosuppresseur (Sternern and Sternern, 2021). Cela pourrait être contrecarré par une administration locale des cellules CAR-T, comme le montre une étude pré-clinique sur l'efficacité d'injection de cellules CAR-T ciblant le récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2)(Priceman *et al.*, 2018). Par ailleurs, certains antigènes tumoraux ciblés par les CAR-T sont également exprimés dans les tissus sains, ce qui peut induire la destruction de cellules ou d'organes sains. Enfin, on recense aussi l'apparition de tumeurs résistantes aux CAR-T, liées à l'échappement des antigènes, ainsi qu'une certaine toxicité du

traitement chez certains patients qui ont une production accrue en cytokines (Teachey *et al.*, 2013; Frey and Porter, 2016).

Développement de thérapies utilisant d'autres cellules du système immunitaire

Suite aux résultats obtenus grâce aux thérapies par cellules CAR-T, d'autres cellules immunitaires, telles que les Natural killers (NK), les macrophages et les cellules dendritiques ont également été modifiées pour traiter différentes maladies.

Récemment, il a été mentionné le développement d'une approche utilisant des cellules NK. Celles-ci ont été modifiées afin d'exposer un CAR, constitué d'un domaine extracellulaire d'ACE2, d'un domaine CD28 et d'un domaine CD3 ζ , à leur surface. Le domaine ACE2 permet le ciblage de la spike (protéine de surface) du virus SARS-CoV2. Le but était de donc de développer un traitement contre le SARS-CoV2. Des tests de liaison ont montré que ce CAR exposé à la surface des cellules CAR-NK formait un complexe avec une spike recombinante. Ces résultats ont également été confirmés en incubant les cellules CAR-NK avec un VSV chimérique exprimant la spike. Par ailleurs, en se liant à des cellules exprimant la spike du SARS-CoV-2, les cellules CAR-NK augmentent leur production du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et d'interféron γ (IFN- γ). Ceci induit une cytotoxicité envers les cellules exprimant la spike (Lu *et al.*, 2022).

Enfin, des souris déplétées de leurs cellules immunitaires endogènes avant que des cellules CAR-NK ne leur soient administrées et infectées avec le SARS-CoV-2 ont survécu, contrairement aux souris témoin dont le taux de mortalité était de 100%.

Dernièrement, une thèse sur le développement de cellules B à récepteur d'antigène chimérique (CAR-B) a été publiée. Cette thèse avait pour but d'utiliser des cellules CAR-B pour le traitement de cancers ovariens, mais aucun résultat ou article n'est actuellement publié (Wan Zeqi, Developing of CAR-B cell immunotherapy to target mesothelin in ovarian cancer, Université Johns Hopkins).

I.2.3.2. Thérapie génique ciblant les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules multipotentes et indifférenciées à l'origine de toutes les cellules de la lignée hématopoïétique. Elles sont localisées dans la moelle osseuse. Les cellules hématopoïétiques matures ayant une durée

de vie courte, les CSH vont permettre le renouvellement de celles-ci au cours du temps (Orkin and Zon, 2008; Monga, Kaur and Dhanda, 2022).

Différentes cellules sanguines peuvent être à l'origine de maladies, telles que des déficiences immunitaires primaires, des maladies métaboliques ou encore d'hémoglobinopathies (Morgan *et al.*, 2017). Toutefois, ces différentes maladies pourront être traitées en transplantant des CSH allogéniques modifiées. Les CSH sont soit prélevées directement dans la moelle osseuse des patients, soit sous forme de cellules souches du sang périphérique. Celles-ci seront ensuite modifiées génétiquement, la plupart du temps en utilisant un vecteur lentiviral, pour être ensuite réadministrées aux patients.

Les CSH ont pu être utilisées en tant que traitement de déficit immunitaire combiné sévère en adénosine désaminase (ADA-SCID), une hydrolase catalysant la désamination de l'adénosine en inosine et désoxyadénosine en désoxyinosine (Cristalli *et al.*, 2001). Des cellules hématopoïétiques CD34+ ont été prélevées chez des patients atteints d'un déficit immunitaire sévère, modifiées via un vecteur rétroviral (codant pour l'ADNc de l'adénosine désaminase), puis réinjectées chez les patients (Bordignon *et al.*, 1995; Cassani *et al.*, 2009). Ceci a permis le développement du premier médicament de thérapie génique *ex vivo* (Strimvelis)(Schimmer and Breazzano, 2016).

L'avantage de l'utilisation de CSH corrigées par thérapie génique est la persistance de la correction génétique au sein des différentes cellules de la lignée hématopoïétique.

I.2.4. Délivrance de molécules thérapeutiques via des vésicules

I.2.4.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques de taille variable, allant de 20 à plus de 1000nm. Ils sont composés d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux. Ils permettent de délivrer des molécules hydrophobes, qui seront présentes au sein de la bicouche lipidique, ou hydrophiles, qui dans ce cas seront localisées dans les compartiments aqueux. Les liposomes sont classés selon leur taille et le nombre de bicouches de leur membrane. Ces caractéristiques auront une importance quant à leur efficacité d'encapsulation et leur temps de circulation (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Large *et al.*, 2021) . On distingue les vésicules multi-lamellaires (5 bicouches ou plus), les uni-lamellaires, et les vésicules oligo-lamellaires (2 à 5 bicouches).

Les composants moléculaires des liposomes dérivent de lipides, polysaccharides, stéroïdes et tensioactifs naturels ou synthétiques (Large *et al.*, 2021). Différentes méthodes peuvent être utilisées pour leur préparation, telles que la méthode d'hydratation du film lipidique (Bangham, Hill and Miller, 1974), l'évaporation en phase inverse (Szoka and Papahadjopoulos, 1978), la méthode par injection (Has and Sunthar, 2020), l'élimination des détergents, la déshydratation-réhydratation (Shew and Deamer, 1985), etc...

L'idée d'utiliser les liposomes comme vecteurs pour la délivrance de molécules thérapeutiques a été proposée dès les années 1970.

Aujourd'hui, combinés à des molécules thérapeutiques, ils sont actuellement utilisés pour différents traitements, notamment anti-cancéreux mais aussi dans le cas de maladies parasitaires et infectieuses. Concernant le traitement de cancer, il est possible de faire usage de liposomes sensibles au pH qui vont cibler des tumeurs et régions d'inflammation. Leur sensibilité au pH permet de délivrer leur cargo, après leur endocytose, dans l'environnement acide de l'endosome, puisque cet environnement va engendrer une perturbation de la structure de la bicouche et *in fine* une rupture membranaire (Simões *et al.*, 2001).

Plusieurs formulations de liposomes ont déjà été développées. L'irinotécan liposomal pegylé a déjà été approuvé pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas et, l'Aroplatin fait actuellement l'objet d'études cliniques pour le traitement de cancers colorectaux métastatiques. Enfin, différentes formulations de liposomes sont utilisées à des fins vaccinales, notamment contre la grippe saisonnière, l'hépatite A (Large *et al.*, 2021) ainsi que dans les vaccins à ARNm contre la Covid 19 (Baden *et al.*, 2021).

Les liposomes possèdent plusieurs avantages : leur biocompatibilité, leur capacité à être dégradés et leur non-immunogénicité. L'absence d'induction de l'immunité constitue un atout dans le cas de combinaison des liposomes avec des virus oncolytiques notamment.

Toutefois, les liposomes sont peu stables *in vivo* et la dégradation des phospholipides par oxydation ou hydrolyse sont des inconvénients importants. Par ailleurs, leur spécificité est limitée et le risque de fuite des molécules encapsulées demeure problématique (Maja, Željko and Mateja, 2020).

I.2.4.2. Les Vésicules extracellulaires

Parmi les différentes vésicules utilisées pour la délivrance de molécules, on retrouve également les vésicules extracellulaires. On distingue trois classes principales de vésicules extracellulaires : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques. Ces vésicules sont dérivées de membranes de cellules et sont donc entourées d'une bicouche lipidique. Elles mesurent de 30 nm à 2µm de diamètre (El Andaloussi *et al.*, 2013). Les microvésicules sont générées par bourgeonnement de la membrane plasmique. La source majeure des exosomes est quant à elle constituée par les vésicules intraluminales contenues dans les endosomes multivésiculaires qui subissent une fusion exocyttaire avec la membrane plasmique.

Les vésicules extracellulaires sont importantes pour la signalisation cellulaire, notamment pour le transfert de protéines, de lipides et d'acides nucléiques (Lee, El Andaloussi and Wood, 2012). En fonction du type cellulaire dont elles dérivent, elles peuvent avoir un rôle dans la maintenance physiologique, comme la régénération des tissus (El Andaloussi *et al.*, 2013) ou encore la maintenance des cellules souches.

Celles-ci ont donc des rôles biologiques variés mais peuvent être à l'origine de dissémination de pathogènes, tels que des virus (HIV-1). Elles sont également impliquées dans la tumorigénèse (Camussi *et al.*, 2010), la dissémination des peptides β -amyloïdes et de l' α -synucléine (Emmanouilidou *et al.*, 2010) dans les cas des maladies Alzheimer et de Parkinson, respectivement, mais aussi dans la dissémination de la protéine prions PrPc (Vella *et al.*, 2007).

Les vésicules extracellulaires naturelles présentent divers avantages à savoir, leur biocompatibilité, leur capacité à franchir les barrières cellulaires mais aussi leur non immunogénicité. Ainsi, à l'instar des liposomes, elles constituent des vecteurs prometteurs pour la délivrance de molécules thérapeutiques.

De manière générale, les vésicules extracellulaires utilisées dans le cadre de thérapies sont conjuguées avec des peptides de ciblage ou des anticorps via une surexpression de ceux-ci dans des cellules produisant des vésicules extracellulaires. Ceci permet un ciblage précis pour la délivrance de médicaments ou d'autres molécules actives.

I.3. Onco-virothérapie

A l'heure actuelle, les cancers constituent toujours une des causes majeures de mortalité chez l'Homme. Leur grande diversité ainsi que leur caractère unique rendent ces pathologies difficiles à traiter. Par ailleurs, le micro-environnement tumoral engendre une faible accessibilité des traitements et une résistance des tumeurs aux cellules du système immunitaire. Une des stratégies envisagées pour faire face à ces défis thérapeutiques est l'oncovirothérapie.

L'oncovirothérapie exploite la capacité oncolytique de certains virus. Les virus oncolytiques (OV) infectent et se répliquent préférentiellement dans les cellules cancéreuses, et grâce à leur activité lytique, entraînent la destruction de ces cellules cancéreuses. Les OV tirent profit du fait que les cellules tumorales ne répondent pas à l'interféron et n'en produisent pas. Cela altère les mécanismes de l'immunité innée et entraîne une défense antivirale amoindrie au sein de ces cellules. D'autres phénomènes peuvent aussi expliquer la sensibilité accrue des cellules tumorales à l'infection : celles-ci peuvent présenter une expression exacerbée de récepteurs viraux ou une altération de leur métabolisme cellulaire favorisant ainsi l'infection virale (Stojdl *et al.*, 2000; Ammayappan, Peng and Russell, 2013).

Les virus oncolytiques sont aussi capables de « réchauffer » la tumeur. En effet, la lyse des cellules cancéreuses infectées induit le relargage d'antigènes tumoraux, entraînent une réponse immunitaire anti-tumorale. Cela éduque le système immunitaire à reconnaître ces antigènes tumoraux, qui peut engendrer une activité anti-tumorale sur le long terme (Fend *et al.*, 2017; Lemos de Matos, Franco and McFadden, 2020). Cette réponse immunitaire sera par ailleurs active contre d'éventuelles métastases.

Enfin, les virus oncolytiques peuvent être modifiés par génie génétique. Par exemple, il est possible de limiter leur pathogénicité ou de leur faire exprimer une cytokine afin de stimuler la réponse immunitaire. Ces modifications font des virus oncolytiques des candidats de choix pour une thérapie anti-cancéreuse.

La première description d'un virus oncolytique remonte à 1904, lorsqu'une patiente atteinte d'une leucémie est entrée en rémission suite à une infection par le virus Influenza A (Dock, 1904). Depuis, de nombreux virus ont été décrits comme oncolytiques, tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1)

(Menotti *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2019), l'adénovirus de type 5 (HAdV-5)(Sato-Dahlman and Yamamoto, 2017; Shinoda *et al.*, 2023), le virus Sindbis, le virus de la rougeole, le virus influenza A ou encore le virus Zika (Garcia *et al.*, 2023; Grunwald *et al.*, 2023). Chacun de ces virus ont fait l'objet d'études visant à développer des thérapies anticancéreuses.

Par exemple, un essai clinique a été réalisé chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire résistant aux chimiothérapies (Galanis *et al.*, 2015). Une souche vaccinale du virus de la rougeole recombinant exprimant le symport sodium/iodure (MV-NIS). Le taux de survie médian des patientes traitées par le MV-NIH était de 26,6 mois contre 12 mois dans le cas d'un traitement classique avec des anticorps monoclonaux humanisés.

Un second essai clinique a été réalisé avec un virus de la rougeole modifié sur des patients atteints de glioblastome (Galanis *et al.*, 2024). De manière générale, le pronostic des patients est très mauvais, avec une évolution rapide de la maladie ; un patient sur quatre est encore en vie deux ans après le diagnostic (Stupp *et al.*, 2005; Ostrom *et al.*, 2017). Les traitements classiques, n'impliquant pas de virus oncolytiques, permettent une survie médiane comprise entre 14 et 18 mois à partir du diagnostic, et de 6 à 8 mois en cas de rechute (Chinot *et al.*, 2014). Dans l'étude de Galanis *et al.* (2024), bien que les patients aient montré une bonne tolérance au traitement, le taux de survie à un an était seulement de 45,5%, ce qui est inférieure à celui observé avec un traitement classique.

HSV-1 a également été génétiquement modifié (Talimogene Laherparepvec : T-VEC) pour traiter des patients atteints d'un mélanome avancé. Le virus a été atténué par suppression de ses gènes de neurovirulence (Andtbacka *et al.*, 2015; Bommarreddy *et al.*, 2017). Son immunogénicité a été renforcée par la suppression du gène ICP47 (*Infected cell protein 47*), impliqué dans l'échappement à la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. Ce traitement représente la première thérapie virale oncolytique approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) américaine (Andtbacka *et al.*, 2015).

Par la suite, un second HSV-1 modifié, le G47 Δ a été approuvé au Japon pour le traitement de glioblastomes. Un essai clinique de phase II chez 19 patients a montré un taux de survie à 1 an de 84,2% et trois des patients étaient encore en vie 3 ans après la dernière injection de G47 Δ (Todo *et al.*, 2022).

Une thérapie virale oncolytique impliquant un adénovirus de sérotype 5 (Ad5), le CG0070, a également été approuvée récemment par la FDA pour le traitement de cancers de la vessie non-musculo invasifs et résistants aux immunothérapies par Bacille de Calmette-Guérin (BCG). L'essai clinique de phase II, combinant le CG0070 et le pembrolizumab (un anticorps monoclonal humanisé) mené chez 35 patients a montré une réponse complète après 3 mois chez 29 patients (Li *et al.*, 2024).

Néanmoins, les virothérapies oncolytiques présentent certaines limites. Tout d'abord, l'administration de virus oncolytique peut entraîner une réponse immunitaire forte, ce qui provoque la production d'anticorps neutralisant contre le virus utilisé. Pour contourner ce problème, l'approche envisagée consiste à avoir recours à l'encapsulation. L'encapsulation des virus oncolytiques peut être réalisée à l'aide de polymères bioactifs, des liposomes ou des nanohydrogels. Ces agents peu immunogènes servent de barrières protectrices, augmentant la furtivité du virus. Une seconde solution pour échapper aux anticorps neutralisants est l'administration de virus oncolytique en intratumoral. Cette méthode a été utilisée pour administrer le T-VEC lors des essais cliniques (Andtbacka *et al.*, 2015).

Une autre limitation en oncovirothérapie est le manque de spécificité des virus envers les tumeurs. Les virus utilisés possèdent leur propre tropisme et peuvent toujours infecter des cellules non tumorales, bien qu'ils s'y répliquent moins efficacement. Un des grands défis, qui fait l'objet de cette thèse, est le reciblage de ces virus exclusivement vers les cellules tumorales. Idéalement, on souhaiterait que ces virus reconnaissent des récepteurs exclusivement présents à la surface des cellules tumorales.

1.4. Thérapies *in vivo* : la difficulté de cibler les cellules d'intérêt

Actuellement, le principal défi en thérapie ciblée est l'identification d'antigènes d'intérêt et de ligands ciblant spécifiquement ces antigènes.

Le développement des vecteurs lentiviraux a ouvert de nouvelles perspectives, notamment en ce qui concerne l'évolution vers des thérapies *in vivo*. Nous l'avons vu, une des limites majeures pour le développement de ces thérapies *in vivo* est le manque de spécificité lors du ciblage de cellules ou tissus d'intérêt, ce qui peut entraîner des effets indésirables.

Une manière de contourner cette limite est l'utilisation de virus pseudotypés, qui permettent de moduler le tropisme viral, améliorant ainsi la spécificité et l'efficacité des thérapies.

Le pseudotypage

Le pseudotypage se définit comme une production de virus ou de vecteur viral, naturellement défectueux, qui nécessitent donc d'utiliser une protéine exogène. A l'heure actuelle, cela concerne principalement des virus enveloppés qui exposent à leur surface une protéine d'enveloppe (glycoprotéine) d'un autre virus. Ces glycoprotéines d'enveloppe ont deux fonctions essentielles dans l'entrée virale : elles permettent la reconnaissance d'un récepteur spécifique et catalysent la fusion de la membrane virale avec une membrane cellulaire, conduisant à la libération du génome viral dans la cellule infectée. L'utilisation d'une glycoprotéine exogène confère au virus un tropisme différent. Par ailleurs, ces glycoprotéines exogènes sont souvent plus résistantes à la dénaturation et vont conférer une meilleure stabilité au virus pseudotypé. Enfin, le génome des virus pseudotypés ne code pas pour cette glycoprotéine, ce qui signifie que ces virus ne permettent qu'un seul cycle de réplication. Ceci constitue un avantage majeur dans le cadre d'une thérapie, car permet d'éviter la propagation dans d'autres cellules ou tissus.

Le pseudotypage a été décrit pour la première fois en 1964 chez le virus du sarcome de Rous, un rétrovirus à l'origine de sarcomes chez le poulet. Ce virus possède un défaut de réplication et nécessite un virus auxiliaire pour se répliquer (Hanafusa, Hanafusa and Rubin, 1963). Deux virus auxiliaires, RAV1 et RAV2, permettant la réplication du virus du sarcome de Rous, ont été isolés. Lors d'une co-infection par un virus auxiliaire et le virus du sarcome de Rous, le virus ainsi produit expose à sa surface l'enveloppe du virus auxiliaire.

Par la suite, le développement du pseudotypage s'est étendu à des virus infectant l'homme et autres mammifères. Ainsi, VSV est l'un des premiers virus pseudotypés, tout d'abord avec la glycoprotéine de deux rétrovirus, celui de la leucémie murine et celui du virus de la myéloblastose aviaire (Závada, 1972). Le VSV pseudotypé avec l'une de ces deux glycoprotéines est neutralisé par les anticorps se liant spécifiquement aux enveloppes de ces rétrovirus, ce qui interfère avec l'entrée du rétrovirus correspondant.

En 1990, les premiers pseudotypages de vecteur lentiviraux HIV-1 avec la glycoprotéine du MLV ont également été décrits (Page, Landau and Littman, 1990).

Aujourd'hui, le pseudotypage est utilisé pour de nombreux lentivirus. Les glycoprotéines utilisées pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux peuvent être celles du VSV, du MLV, la glycoprotéine E2 du virus Sindbis (Ahani *et al.*, 2016), la glycoprotéine du virus de la Rage (Hislop *et al.*, 2014), dans le cas de ciblage de neurones, celles de Paramyxovirus, tels que le virus Nipah et le virus Hendra (Khetawat and Broder, 2010), ou encore les glycoprotéines E1, E2 et E3 du virus du chikungunya, afin de cibler des cellules du système nerveux central (Eleftheriadou *et al.*, 2017). La glycoprotéine du VSV est certainement la plus utilisée pour de nombreuses raisons qui seront détaillées par la suite.

II. Les *Rhabdoviridae*

La famille des *Rhabdoviridae* appartient à l'ordre des *Mononegavirales* qui possèdent un génome d'ARN simple brin de polarité négative (i.e. complémentaire des ARN messagers).

Les différents membres de la famille des *Rhabdoviridae* sont classés selon la proximité des séquences de leur ARN polymérase (L). On distingue ainsi 56 genres et 434 espèces, répartis-en 4 sous-familles : les *Alpharhabdovirinae* (32 genres), les *Betarhabdovirinae* (6 genres), les *Deltarhabdovirinae* et les *Gammarhabdovirinae* (Novirhabdovirus), ainsi qu'un autre genre non associé à une de ces sous-familles (Figure 5) (Base de données ICTV Août 2024). De plus, il existe au moins 300 espèces supplémentaires de *Rhabdoviridae*, qui ne sont pas encore classés (i.e. qui n'appartiennent pas aux genres identifiés). Les *Rhabdoviridae* ont été isolés chez un certain nombre de vertébrés, de plantes et d'arthropodes (Dietzgen *et al.*, 2017). Certains arthropodes sont des hôtes uniques, tandis que d'autres peuvent être vecteurs de transmission vers les animaux et plantes. Parmi les *Alpharhabdovirinae*, on distingue deux virus modèle : le virus de la rage appartenant au genre des *Lyssavirus* et le virus de la stomatite vésiculaire appartenant au genre des *Vesiculovirus* (Dietzgen *et al.*, 2017). Les virus du genre *Lyssavirus* infectent les mammifères et engendrent des encéphalites mortelles. Les virus du genre *Vesiculovirus* sont généralement transmis aux vertébrés (mammifères, oiseaux et reptiles) par des arthropodes mais la contagion peut parfois se faire par contact directs entre vertébrés. Les arthropodes impliqués sont majoritairement des insectes suceurs de sang, tels que les Phlébotomes, les mouches noires ou encore des moucherons piqueurs.

II.1. Le genre *Vesiculovirus*

Le genre *Vesiculovirus* regroupe 21 espèces identifiées parmi lesquelles l'espèce la plus étudiée est le Virus de la stomatite Vésiculaire sérotype Indiana (VSIV), suivie du sérotype New-Jersey (VSNJV) et du virus Chandipura (Figure 8).

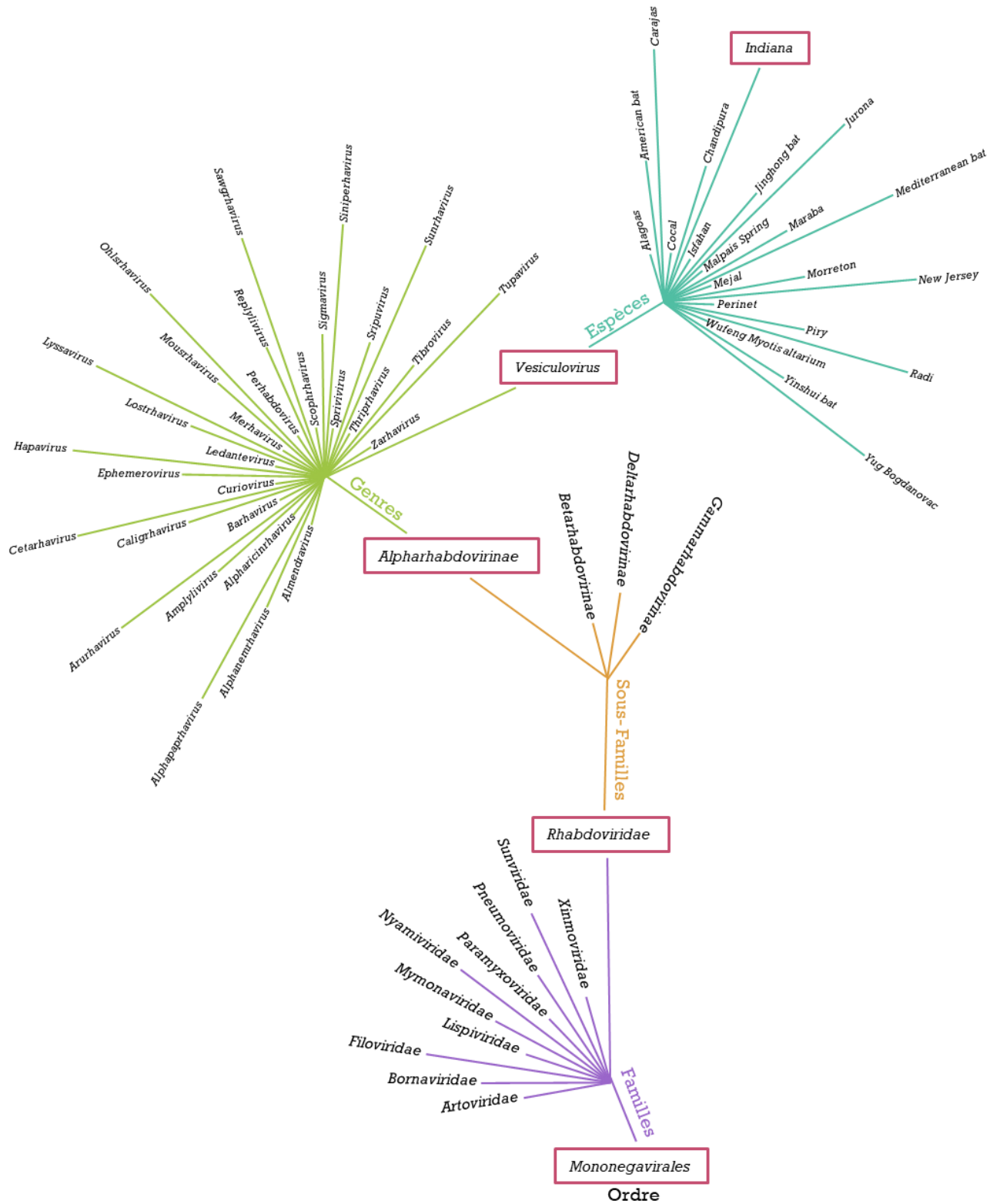


Figure 8: Position des vésiculovirus dans l'arbre phylogénétique des Rhabdoviridae. D'après la base de données de l'ICTV (juillet 2024).

II.2. Pathologie

Une infection par VSV induit divers symptômes chez les animaux d'élevage tels que les bovins, porcs, et les chevaux. Trois à cinq jours après l'infection, les animaux développent une fièvre ainsi que des lésions (vésicules, ulcères) au niveau de la bouche, de la langue, des sabots et des mamelles. Ces symptômes étant similaires de ceux associés à une infection par le virus de la fièvre aphteuse, celui-ci ne peut être différencié qu'en réalisant des tests en laboratoire (Hanson, 1952).

Chez l'Homme, la contamination par VSV est accidentelle et se manifeste la plupart du temps par un syndrome pseudo-grippal. Néanmoins, des cas d'encéphalites ont été rapportés en Amérique du sud. La circulation de VSV au sein des élevages est endémique au nord de l'Amérique du sud, Amérique centrale et Mexique. On dénombre également de nombreuses épidémies aux Etats-Unis (Pelzel-McCluskey, 2023).

II.3. La stomatite vésiculaire

La maladie de la stomatite vésiculaire a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis en 1916. Cependant, il semblerait que celle-ci était déjà présente auparavant et aurait été importée aux Etats-Unis depuis l'Afrique. En effet, durant la guerre civile de 1862, plus de 4000 chevaux ont subi une maladie décrite comme violente et destructrice (Hanson, 1952). Ces animaux présentaient des symptômes de stomatite vésiculaire avec la présence de lésions au niveau des sabots et de la langue. Une épidémie similaire avait été aussi décrite en 1904 chez des bovins. Depuis lors, de nombreuses épidémies ont eu lieu aux Etats-Unis, mais également en Europe et Afrique du Sud, touchant des chevaux provenant des Etats-Unis. Outre les épidémies recensées, le virus de la stomatite vésiculaire est désormais endémique en Amérique centrale, sud du Mexique et au Brésil (Letchworth *et al.*, 1999).

II.4. Morphologie des *Rhabdoviridae*/Virus de la stomatite vésiculaire

Les *Rhabdoviridae* ont une forme caractéristique en balle de fusil ou bacilliforme, avec une extrémité plate et une extrémité arrondie. Les virions mesurent entre 100 et 430 nm de longueur (190 nm pour VSV) et entre 45 et 100 nm de diamètre (85 nm pour VSV) (Hummeler, Koprowski and Wiktor, 1967; Walker *et al.*, 2022). Ils possèdent une

nucléocapside hélicoïdale, entourée d'une couche de protéines de matrice et d'une enveloppe lipidique.

II.5. Organisation génomique

La taille des génomes des différents *Rhabdoviridae* varie entre 10,8 et 16,1 kb (Walker *et al.*, 2015). Celui du VSV est de 11,2 kb. Leur génome possède jusqu'à 12 gènes dont 5 codant les protéines structurales, communs à presque tous les *Rhabdoviridae*. Leur transcription en ARNm se fait de manière séquentielle (Abraham and Banerjee, 1976; Flamand and Delagneau, 1978). Les autres gènes codent pour des protéines accessoires mais celles-ci sont peu caractérisées.

Le génome du VSV encode donc les 5 protéines structurales présentes chez tous les *Rhabdoviridae* : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L) (Figure 9).

Il code en plus deux petites protéines, C et C', exprimées à partir d'un cadre de lecture alternatif dans le gène de P, dont le rôle reste incertain (Peluso *et al.*, 1996).

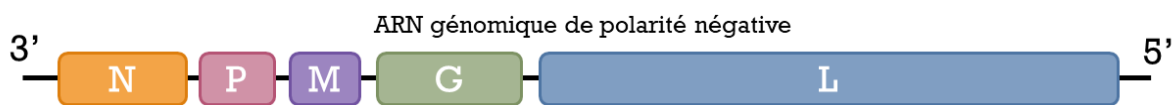


Figure 9 : Organisation génomique du virus de la stomatite vésiculaire

N est étroitement associée en manchon autour de l'ARN viral pour former la nucléocapside. Cette nucléocapside, associée à L et P, constitue la ribonucléoprotéine (RNP). La RNP, en complexe avec l'ARNg, s'enroule en une structure en dôme, puis s'élargit progressivement pour former un tronc hélicoïdal compact au sein du virion. Cette structure est déterminante pour l'assemblage en forme de balle de fusil du VSV (Desfosses *et al.*, 2013; Jenni *et al.*, 2022). La RNP est reliée à la membrane *via* la protéine de matrice M. G est quant à elle enchâssée dans la membrane (Figure 10).

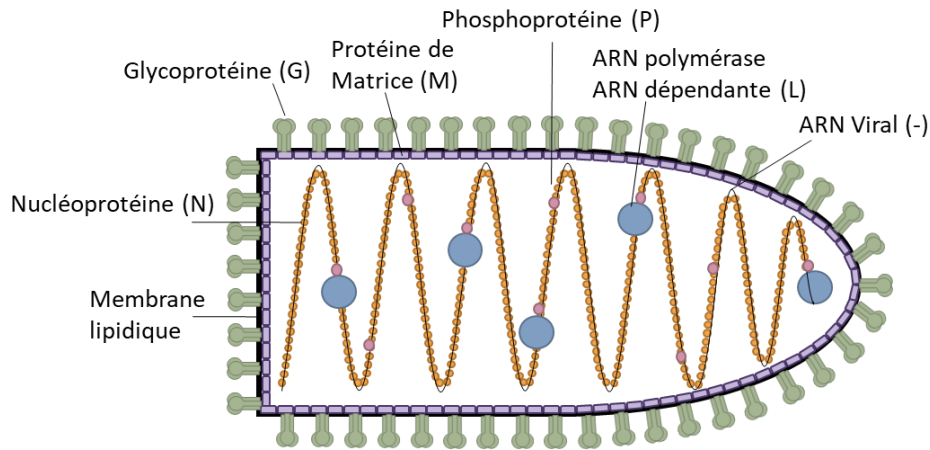


Figure 10: Organisation de la particule virale du virus de la stomatite vésiculaire

II.6. Le cycle viral du VSV

II.6.1. Entrée virale du VSV

Le cycle viral du VSV est entièrement cytoplasmique. Le récepteur principal du VSV est le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLR), qui sera décrit dans la troisième partie de l'introduction. Après la reconnaissance et la liaison au récepteur par la glycoprotéine, les virions sont endocytés, la plupart du temps, *via* une voie dépendant de la clathrine (Cureton *et al.*, 2009). L'environnement acide au sein de l'endosome induit un changement conformationnel de G et mène à la fusion de l'enveloppe virale avec celle de la vésicule. Cette étape de fusion permet la libération de la RNP dans le cytoplasme (Figure 11).

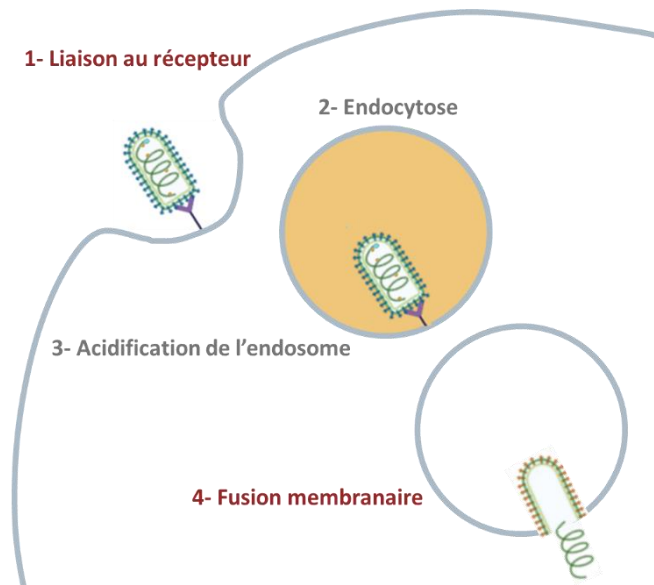


Figure 11: Schéma de l'entrée du virus de la stomatite vésiculaire dans les cellules. Schéma réalisé à l'aide de BioRender.

L'endocytose du VSV dans la cellule est très rapide, puisqu'elle se fait avec un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de 2,5 à 3 minutes (Johannsdottir *et al.*, 2009). Cette endocytose est médiée par la clathrine et dépend d'autres protéines cellulaires, parmi lesquelles la dynamine-2 et l'actine.

Contrairement à certains virus entrant *via* des puits préformés et recouverts de clathrine, tels que le virus de la dengue (Acosta, Castilla and Damonte, 2008; Suksanpaisan, Susantad and Smith, 2009), le VSV est endocyté par de nouveaux puits formés à proximité des particules virales (Cureton *et al.*, 2009). La dynamine-2 est alors recrutée au niveau des puits recouverts de clathrine et va catalyser la scission entre ces puits et la membrane plasmique (Johannsdottir *et al.*, 2009). Le virion se retrouve ainsi au sein d'un endosome (Damke *et al.*, 1994).

Les virions ont une longueur (~90x200nm) plus grande que celle des vésicules d'endocytose classiques. Par conséquent, les vésicules transportant les virus sont plus allongées que les vésicules d'endocytose vides. En fait, la taille des particules virales empêche la fermeture des vésicules par la clathrine, et VSV entre donc dans les cellules *via* des vésicules recouvertes seulement partiellement de clathrine. Par conséquent, la fermeture et l'internalisation des vésicules nécessite un assemblage de filaments d'actine (Cureton *et al.*, 2009). Cet assemblage est réellement la conséquence de la taille du VSV puisque dans le cas de particules défectueuses interférentes (DI), plus courtes (75nm) que le virus, la polymérisation de l'actine n'est pas nécessaire pour qu'elles soient endocytées et les DIs entrent donc dans la cellule par une endocytose classique (Figure 12)(Cureton *et al.*, 2010).

Il a été montré que la fusion se produit rapidement après l'endocytose, dans un délai de 1 à 2 minutes après l'internalisation (Johannsdottir *et al.*, 2009). Étant donné la rapidité du processus comparée à celle du trafic intracellulaire des vésicules, la fusion se déroule très probablement dans les endosomes précoces.

Ceci est en accord avec des expériences montrant qu'une forme dominante négative de RAB 5, qui bloque la maturation des vésicules d'endocytose en endosomes précoces, inhibe l'infection par le VSV alors qu'une forme dominante négative de RAB 7 (qui bloque le trafic de l'endosome précoce vers l'endosome tardif) ou de RAB 11 (qui bloque le

transport des cargos endocytés vers les endosomes de recyclage) est sans effet sur l'infection par le VSV (Sieczkarski and Whittaker, 2003; Mire, White and Whitt, 2010).

Il convient de souligner qu'un petit nombre d'autres études ont proposé que la fusion du VSV et le relargage de la RNP dans le cytosol se fassent en deux étapes. Selon ce modèle, la fusion virale n'aurait plus lieu dans l'endosome précoce, mais plus tardivement au niveau des corps multivésiculaires (MVBs). La membrane des particules virales fusionnerait avec celle de vésicules intraluminales (ILV) au sein des MVBs, induisant le relargage du génome dans celles-ci. La libération du génome dans le cytoplasme se ferait ensuite par une étape dite de « back-fusion » entre la membrane des ILVs et la membrane des MVBs (Figure 12).

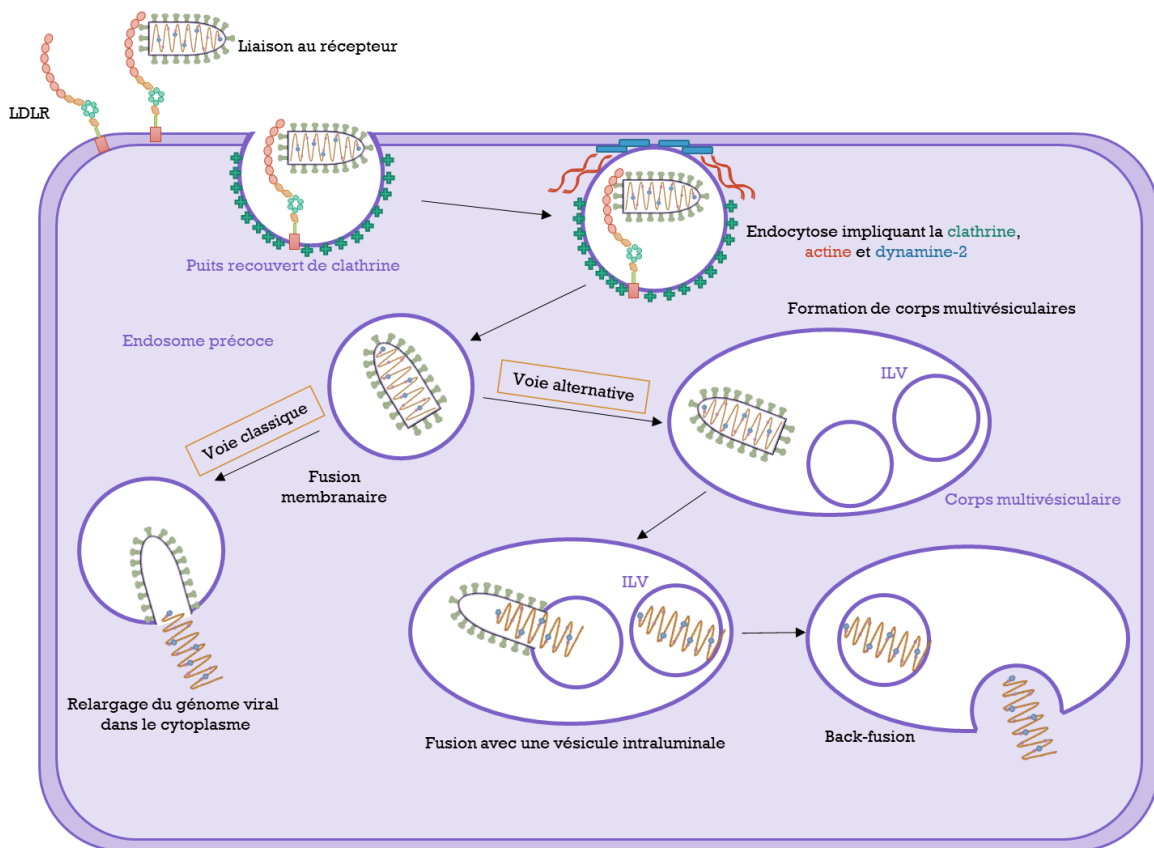


Figure 12: Voies d'endocytoses classique et alternative du VSV.

En accord avec cette hypothèse, l'inhibition de l'expression de plusieurs protéines ALIX, HRS, Vps22, TSG101 et Vsp24 de la machinerie ESCRT, impliquée dans la formation des ILVs, induit une diminution de l'infectiosité du VSV (Le Blanc *et al.*, 2005; Pasqual *et al.*, 2011). De plus, un traitement au nocodazole, induisant la dépolymérisation des microtubules, n'a pas d'effet sur la fusion, mais a un effet inhibiteur sur le relargage des

RNP (Le Blanc *et al.*, 2005). Enfin, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-acide lysobisphosphatidique (LBPA) et anti-bis(monoacylglycérol) phosphate (BMP), des phospholipides marqueurs des endosomes tardifs, engendre une inhibition de l'infection par VSV (Le Blanc *et al.*, 2005;).

Il n'est cependant pas exclu que certaines des approches expérimentales utilisées dans ces travaux aient un effet pléiotrope et agiraient indirectement sur l'entrée virale. Néanmoins, il est possible que VSV puisse utiliser ces deux voies d'entrée en fonction du type cellulaire infecté, voire de l'état physiologique de la cellule.

II.6.2. La transcription virale

Une fois que la RNP a été libérée dans le cytoplasme, le génome qu'elle contient va servir de matrice pour la transcription par le complexe L-P. Il n'existe qu'un seul site d'entrée pour la polymérase au niveau de la séquence *leader* en 3' du génome (Abraham and Banerjee, 1976; Emerson, 1982), et la transcription suit un modèle dit « stop-start »(Chanda, Kang and Banerjee, 1980).

La polymérase va donc d'abord synthétiser l'ARN *leader* non codant, qui n'est ni coiffé ni polyadénylé (N Tordo *et al.*, 1986; Conzelmann, 1998). Elle va ensuite synthétiser les ARNm correspondant au 5 gènes viraux (Figure 13). Ces ARNm sont coiffés et polyadénylés.

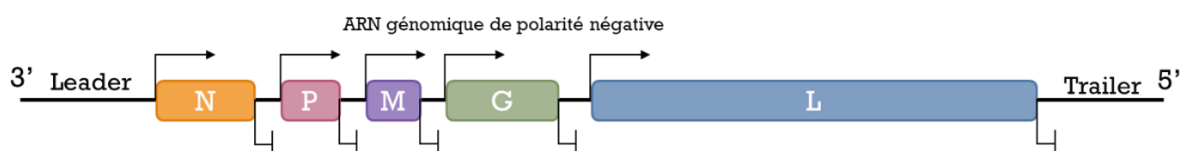


Figure 13: Schéma du génome viral montrant les signaux d'initiation et de terminaison de la transcription.

A l'extrémité 3' de chaque gène se trouve une région codant pour un signal d'initiation de la transcription. Une seconde région se trouve après chacun des gènes en 5' et code pour un signal de terminaison de la transcription et de polyadénylation (N. Tordo *et al.*, 1986; Hinzman, Barr and Wertz, 2008)(Figure 13). La séquence permettant la polyadénylation du transcrit est une séquence polyU, le signal U₇, constituée de 7 uraciles, sur laquelle la polymérase va bégayer (Barr, Whelan and Wertz, 1997; Hwang, Englund and Pattnaik, 1998). Finalement, à l'extrémité 5' du génome est encodée une seconde

région régulatrice dite *trailer*. Les deux séquences *leader* et *trailer* sont partiellement complémentaires. Les fonctions des ARN *leader* et *trailer* sont encore inconnues.

Lorsque la transcription s'arrête à la fin d'un gène, sa réinitiation n'est pas systématique (Iverson and Rose, 1981; Finke, Cox and Conzelmann, 2000). Cela induit une décroissance de la transcription et les ARNm ne sont pas synthétisés en quantités équimolaires (Figure 14). Leur abondance décroît selon l'ordre des gènes N>P>M>G>L (Iverson and Rose, 1981). Ainsi, N et P sont les protéines synthétisées en plus grande quantité.

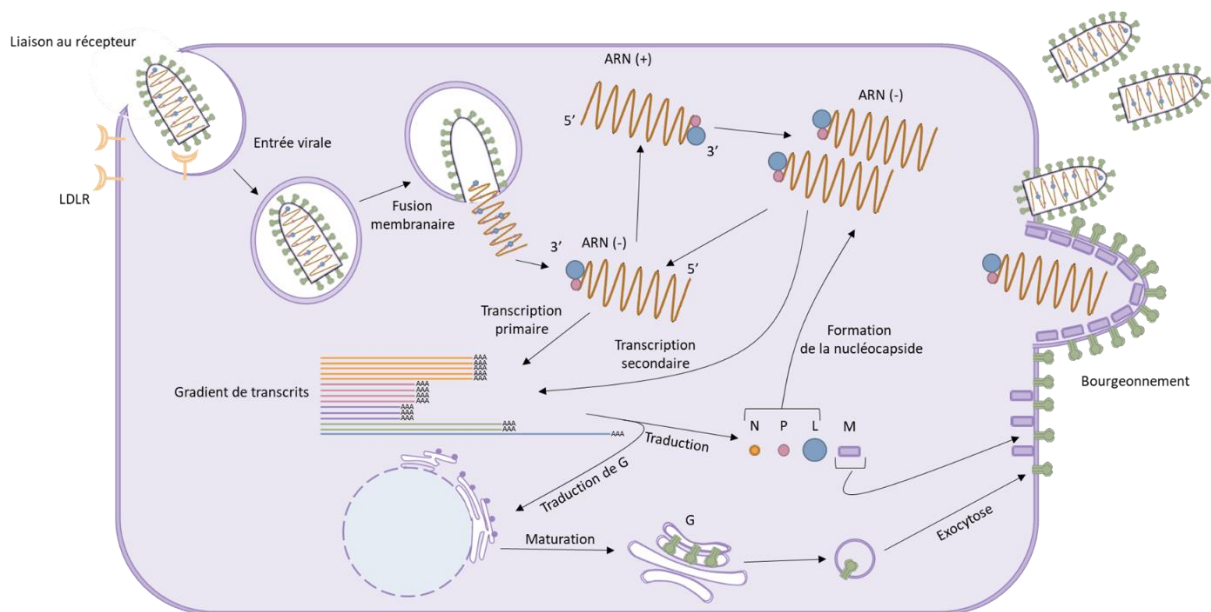


Figure 14: Schéma du cycle viral du VSV.

II.6.3. La traduction des ARNm viraux

L'étape de traduction des ARNm, coiffés et polyadénylés, se fait en utilisant la machinerie de traduction de la cellule hôte. Ce détournement de la machinerie de traduction induit donc une diminution de la traduction des ARNm de l'hôte. Ceux-ci sont de toute façon moins abondants que dans une cellule non infectée, puisque le virus est capable de bloquer l'export des ARNm cellulaires depuis le noyau vers le cytoplasme.

Une infection par VSV induit la déphosphorylation du répresseur de la traduction 4E-BP1. 4E-BP1 séquestre ensuite eIF4e, le facteur d'initiation de la traduction, ce qui induit l'inhibition de la traduction des ARNm de l'hôte (Connor and Lyles, 2002). La traduction des protéines du VSV est quant à elle maintenue.

La sous-unité ribosomale 60S rpL40, bien que non nécessaire pour la traduction des ARNm cellulaires, est indispensable pour l'assemblage du ribosome 80S sur les ARNm du VSV et pour leur traduction. Elle est également requise pour d'autres Mononegavirales, notamment le virus de la rage et le virus de la rougeole (Lee, Burdeinick-Kerr and Whelan, 2013).

Le peptide signal en amont du gène de la glycoprotéine G contribue à sa translocation co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique. G est ainsi synthétisée sur des ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique.

II.6.4. La réplication virale

Dès lors qu'un nombre suffisant de nucléoprotéines a été synthétisé, permettant l'encapsidation des antigénomes et des génomes, L bascule d'une activité transcriptase vers une activité réplicase.

La L, associée à P, va d'abord synthétiser des ARN anti-génomiques de polarité positive à partir du génome de polarité négative. Ces antigénomes vont ensuite servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes.

Au fur et à mesure de leur synthèse, les génomes et les antigénomes sont encapsidés par N. Les génomes viraux seront soit incorporés dans de nouvelles particules virales, soit utilisés en tant que matrice pour la transcription dite secondaire ou pour de nouveaux cycles de réplication.

II.6.5. Les usines virales

De manière générale, les *Mononegavirales* effectuent la synthèse de leurs ARN viraux (messagers, antigénomiques et génomiques) au sein d'organites dépourvus de membrane, appelés usines virales. Ainsi, dans le cas du VSV, 4 heures après l'infection, on observe la formation de condensats dans le cytoplasme. Ces structures concentrent les protéines N, P et L (Heinrich *et al.*, 2018). Comme pour le virus de la rage (Nikolic *et al.*, 2017), il a été montré que ces usines virales ont des propriétés liquides et se forment probablement par séparation de phase.

II.6.6. Assemblage et bourgeonnement des virions

L'assemblage de la RNP se fait au sein des usines virales. Les RNP seront ensuite transportées au niveau du site d'assemblage des virions et de bourgeonnement.

G, quant à elle, sera exportée jusque la membrane cellulaire à travers l'appareil de Golgi depuis le réticulum endoplasmique dans lequel elle a été synthétisée, (Sevier *et al.*, 2000).

La membrane virale possède une composition en lipide très proche de celle de la membrane de la cellule infectée. Elle est composée à 50% de protéines et 50% de lipides avec un enrichissement en cholestérol. En effet, le site de bourgeonnement des virions est situé au niveau des radeaux lipidiques (Brown and Lyles, 2003), qui sont eux-mêmes enrichis en cholestérol et en sphingolipides.

Les protéines de matrice M et les glycoprotéines G, présentes à la membrane, vont permettre l'assemblage des nouveaux virions au niveau du site de bourgeonnement (Brown and Lyles, 2003). L'étape finale du bourgeonnement est celle de la fission membranaire. Elle mènera au relargage des virions dans le milieu, qui pourront ainsi infecter d'autres cellules.

De nombreux virus détournent la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) pour cette étape de fission, c'est le cas pour VSV (Chen and Lamb, 2008). La machinerie ESCRT est requise pour la formation des corps multivésiculaires, qui sont formés dans l'endosome tardif et transportent des cargos qui seront dégradés par les lysosomes. Elle est recrutée à la membrane de l'endosome pour séquestrer des protéines et conduire à la formation des vésicules intraluminales dans l'endosome. Le bourgeonnement des vésicules intraluminales médié par la machinerie ESCRT est topologiquement équivalent au bourgeonnement viral. Les virus vont donc repositionner cette machinerie au niveau de leur site de bourgeonnement.

II.7. Rôle des protéines virales

II.7.1. Les protéines de la RNP

Le complexe RNP comprend la nucléoprotéine N, l'ARN polymérase ARN dépendante L, ainsi que la phosphoprotéine P. Ce complexe est impliqué dans les étapes de transcription et de réplication du génome viral.

II.7.1.1. La nucléoprotéine N

La nucléoprotéine N est la protéine virale du VSV la plus abondamment synthétisée dans la cellule infectée. Elle est constituée de 422 acides aminés (Figure 15).

N est composée de deux lobes, l'un N-terminal (résidus 27 à 225) et l'autre C-terminal (résidus 225 à 422), ainsi que d'un bras N-terminal (résidus 4 à 19) et d'une boucle étendue en position C-terminale (résidus 342 à 357) (Jenni *et al.*, 2022).

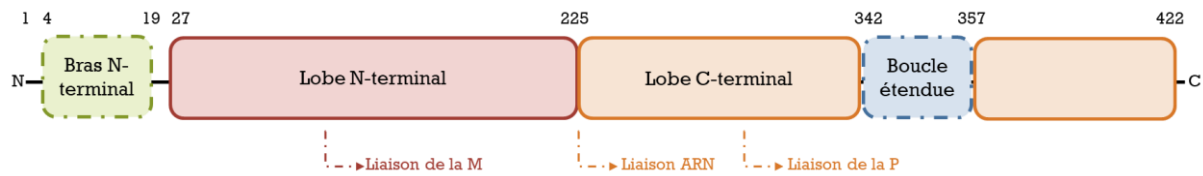


Figure 15: Organisation de la Nucléoprotéine N.

N permet l'encapsulation du génome viral et donc de le protéger des éventuelles dégradations dues aux nucléases cellulaires mais aussi d'empêcher sa reconnaissance par les senseurs de la réponse immunitaire innée.

Les deux lobes N et C-terminaux forment une structure en mâchoire dans laquelle viennent s'insérer les ARN génomique et anti-génomique. Chaque nucléoprotéine interagit avec 9 nucléotides (Albertini *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2006). Au sein de la nucléocapside, les nucléoprotéines, interagissent via leur lobes C-terminaux. Par ailleurs, pour chaque sous-unité, le bras flexible N-terminal interagit avec le lobe C-terminal de la sous-unité suivante (située en 5' le long de l'ARN encapsidé), et la boucle étendue du lobe C-terminal entre en contact avec le lobe C-terminal de la sous-unité située en 3', le long de l'ARN encapsidé (Green *et al.*, 2011). C'est l'ensemble de ces contacts qui permettent la stabilisation de la nucléocapside. En dehors de la nucléocapside, N existe aussi sous une forme soluble, appelée N⁰. N⁰ correspond à N sans ARN. Sous cette forme, N est associée à P qui occupe la place de l'ARN pour former le complexe N⁰P (Masters and Banerjee, 1988). Ce complexe constitue une réserve de protéines N qui vont être libérées pour venir encapsider spécifiquement les anti-génomes et génomes naissant.

II.7.1.2. L'ARN polymérase ARN-dépendante L

La protéine L (pour « large », en raison de sa taille), est une ARN-polymérase dépendant de l'ARN (RdRp) qui joue un rôle essentiel dans la transcription et la répllication du génome viral. Elle est constituée de 2109 acides aminés (240 kDa).

Sa séquence est très conservée parmi les différentes espèces de *Rhabdoviridae* mais aussi au sein de l'ordre des Mononegavirales. Ainsi, six régions conservées (CRI à CRVI) ont été

identifiées suite à l'analyse des séquences des protéines L des membres de l'ordre des *Mononegavirales* (Poch *et al.*, 1990).

L est une enzyme multifonctionnelle impliquée dans les étapes de transcription et de réplication du génome viral. Elle est constituée de trois domaines fonctionnels : le domaine RdRp, le domaine de coiffage (Cap) et le domaine de méthylation (MT). A ceux-ci viennent s'ajouter deux autres domaines structuraux : le domaine de connexion (CD) et domaine C-terminal (CTD) (Figure 16) (Liang *et al.*, 2015). L est organisée en une structure annulaire de 10nm de diamètre (Hodges *et al.*, 2013).

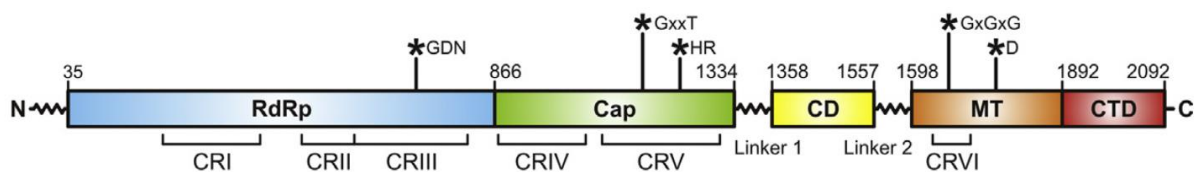


Figure 16: Organisation de l'ARN polymérase ARN dépendante L. RdRp : domaine ARN polymérase ARN dépendante. Cap : domaine de coiffage. CD : domaine connecteur. MT : domaine méthyltransférase. CTD : domaine C terminal. CRI à CRVI : régions conservées de protéines L chez les *Mononegavirales*. Les résidus des sites actifs sont indiqués par les astérisques. D'après (Liang *et al.*, 2015).

Le site catalytique lié à la synthèse d'ARN est situé dans la région CRIII. Pour une synthèse efficace, L doit être associée à son cofacteur P (Ogino *et al.*, 2018) et l'ARN servant de matrice doit être encapsidé par la nucléoprotéine N.

La liaison entre la L et la P se fait dans la région N-terminale de la phosphoprotéine (Jenni *et al.*, 2020) et dans la région C-terminale de la L (Gould *et al.*, 2020).

Comme toutes les polymérases des virus à ARN, la L n'est pas très fidèle. Il n'y a ni activité de relecture, ni activité de correction qui lui sont associées. Le taux d'erreur est de l'ordre de un pour 10^3 à 10^4 nt synthétisés, soit environ une erreur introduite pour chaque génome copié (Holland *et al.*, 1989; Steinhauer, de la Torre and Holland, 1989; Furió, Moya and Sanjuán, 2005). Ce taux de mutation important et la production d'un grand nombre de virions en peu de temps conduit à l'apparition d'une quasi-espèce virale, c'est à dire d'une population de variants en équilibre dynamique. Comme nous le verrons, ceci permet d'utiliser ces polymérases pour faire de l'évolution expérimentale et générer dans notre cas, des glycoprotéines ayant des propriétés d'intérêt.

L possède également deux domaines ayant une activité de coiffage et de méthylation des ARN messagers (Emerson and Yu, 1975; Hercyk, Horikami and Moyer, 1988; Li, Wang

and Whelan, 2006). Les ARNm viraux ainsi synthétisés ont donc toutes les caractéristiques des ARNm cellulaires, ce qui leur permet d'être pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire.

II.7.1.3. La phosphoprotéine P

La phosphoprotéine est constituée de 265 acides aminés et est la protéine possédant la plus grande variabilité de séquence chez les *Rhabdovirus*. Elle est néanmoins un composant essentiel de la machinerie de réplication, présent chez tous les virus à ARN négatif non segmenté. En effet, elle agit comme co-facteur non catalytique de la L, nécessaire à l'incorporation de la polymérase dans les virions mais aussi important pour la régulation de la réplication et de la transcription (Emerson and Yu, 1975).

P est aussi une protéine modulaire. Elle est composée de deux domaines intrinsèquement désordonnés et de trois domaines structurés (Gerard *et al.*, 2007). Elle possède une région N-terminale potentiellement structurée en hélice alpha (résidus 6 à 34) suivie d'une longue région intrinsèquement désordonnée (RID NT) (35 à 107) (Ribeiro *et al.*, 2008; Leyrat *et al.*, 2012). On trouve ensuite deux domaines structurés dont un domaine central de dimérisation (résidus 109 à 170) et un domaine C-terminal (résidus 193 à 265). Ces deux domaines sont séparés par une seconde région intrinsèquement désordonnée (RID CT), d'une vingtaine acides aminés (Figure 17) (Ribeiro *et al.*, 2008).

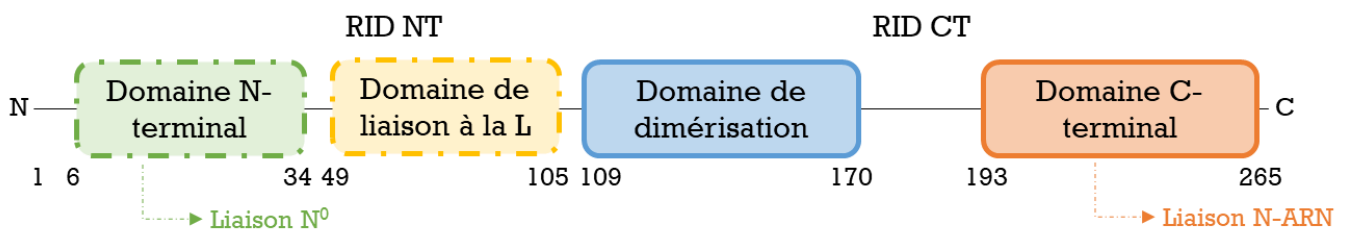


Figure 17: Organisation de la phosphoprotéine P. Les domaines RID NT et RID CT correspondent respectivement aux domaines intrinsèquement désordonnés N-terminal et C-terminal

Le domaine N-terminal contient le site de liaison à N⁰ (Chen, Ogino and Banerjee, 2007). Ce domaine va se lier à N⁰ entre les deux lobes de N, c'est à dire à la place qu'occupe l'ARN. Dans le complexe N⁰-P, l'extrémité N-terminale de P adopte une structure en hélice alpha. Comme mentionné plus haut, cette interaction permet de garder un pool de N sans ARN

qui seront disponibles pour venir encapsider spécifiquement les anti-génomés et génomes naissants.

La liaison avec L implique la région RID NT de P (Jenni *et al.*, 2020). Cette interaction permet la régulation positive de la synthèse de l'ARN viral (Gould *et al.*, 2020).

Dans cette région RID NT, P possède des sites de phosphorylation. Lorsqu'elle est phosphorylée, P est sous sa forme transcriptionnellement active (Y Gao and Lenard, 1995; Yuan Gao and Lenard, 1995).

Le domaine C-terminal de P est quant à lui impliqué dans la liaison avec le complexe N-ARN. Il se lie au niveau du domaine C-terminal d'un protomère de N. En liant le complexe N-ARN lors de la réplication virale, P va ponter la L à la matrice N-ARN (Mavrakis *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006).

La présence du RID CT, entre les domaines de dimérisation et C-terminal suggère que deux domaines C-terminaux de P appartenant au même oligomère peuvent bouger indépendamment l'un de l'autre (Leyrat *et al.*, 2012).

Lors de la traduction des ARNm codant la phosphoprotéine, un mécanisme de « leaky-scanning » est responsable de la synthèse de deux protéines secondaires appelées C et C'. Elles sont traduites dans un second cadre de lecture, différent de celui de la P. Leur rôle est encore inconnu. *In vitro*, l'absence de ces protéines n'a aucun impact sur la réplication du virus (Kretzschmar *et al.*, 1996). Certaines expériences suggèrent toutefois que la protéine C' serait impliquée dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la polymérase (Peluso *et al.*, 1996).

II.7.2. Les protéines d'enveloppe

II.7.2.1. La protéine de Matrice M

La protéine de matrice M (229 aas) est une protéine structurale, associée à la monocouche interne de la membrane virale. Elle est donc située à proximité de la nucléocapside et de la glycoprotéine. On dénombre 1800 copies de M par virion.

M est composée d'un segment N-terminal (résidus 1 à 43), d'un motif d'auto-assemblage (résidus 44 à 52) et d'un domaine globulaire C-terminal (résidus 58 à 229) (Graham *et al.*, 2008; Jenni *et al.*, 2022). Elle possède également divers motifs lui permettant de recruter des partenaires cellulaires (Figure 18).

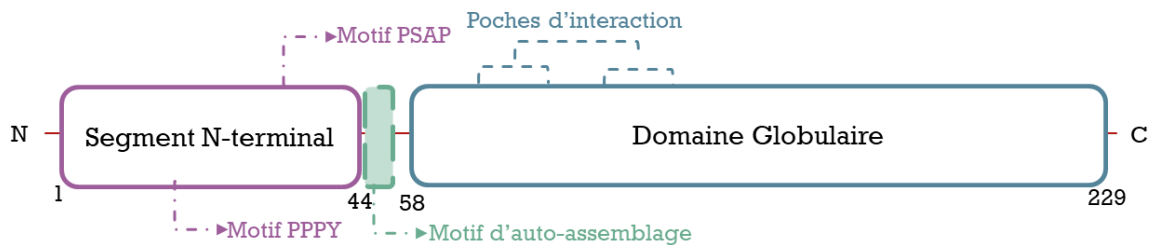


Figure 18: Organisation de la protéine de matrice M.

Au sein de la particule virale, on distingue deux couches de protéines M. Dans la couche la plus interne (couche M1), chaque M est associée à une protéine N et à une protéine M de la couche la plus externe (couche M2) (Figure 19) (Jenni *et al.*, 2022). La couche la plus externe est au contact de la membrane virale. Les virions contiennent donc deux structures hélicoïdales imbriquées : l'une externe constituée des deux couches de protéines M et une interne formée par la nucléocapside (Ge *et al.*, 2010).

La région N-terminale de M est enrichie en lysines et chargée positivement est impliquée dans l'interaction avec la face interne de la membrane (chargée négativement), ainsi que dans l'interaction avec la nucléoprotéine (Lenard and Vanderoef, 1990; Dancho *et al.*, 2009).

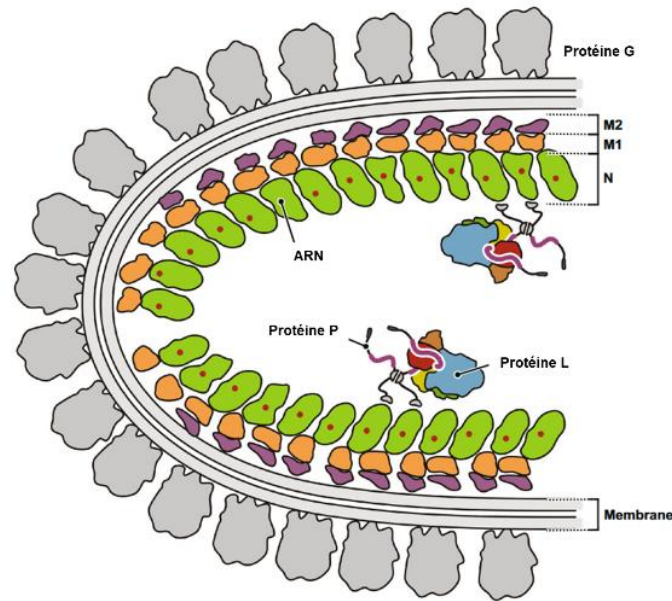


Figure 19: Diagramme longitudinal schématique du VSV. D'après (Jenni *et al.*, 2022).

La capacité d'auto assemblage de M permet la compaction de la RNP (Gaudin *et al.*, 1995, 1997; Desfosses *et al.*, 2013). L'interaction avec la RNP est également nécessaire pour l'assemblage des virions. En effet, la M, via son domaine N-terminal interagit avec le domaine d'homologie à la pleckstrine de la dynamine. Cette interaction induit une perturbation de l'endocytose médiée par la clathrine. Elle est également importante pour la localisation de G et de la N lors de l'étape d'assemblage (Raux *et al.*, 2010).

Aussi, l'interaction entre la M et la RNP est importante pour l'inhibition et le contrôle de la transcription virale (Clinton *et al.*, 1978). En effet, on observe que des mutants thermosensibles du VSV contenant une mutation dans M voient leur transcription augmenter de 2 à 5 fois à température non permissive. La protéine de matrice agit donc en tant qu'inhibiteur direct de la transcription (Clinton *et al.*, 1978).

M interagit avec divers partenaires cellulaires via des motifs présents dans sa séquence en acides aminés. Elle contient en particulier des motifs L-domain (en Anglais : *late budding domain*), permettant l'interaction avec des protéines cellulaires impliquées dans la formation des MVB. On retrouve deux L-domain chez la M. Ils correspondent à des motifs riches en proline. Le premier PPPY est situé en N-terminal de M. Ce motif PPPY permet l'interaction avec un motif WW de l'E3 ubiquitine ligase Nedd4 (en Anglais : *Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4*) (Harty *et al.*, 1999). Le second motif PSAP, également situé en N-terminal de M, permet le recrutement d'une

seconde E3 ubiquitine ligase appelée Tsg101 (en Anglais : *Tumor susceptibility gene 101*). Les ubiquitines ligases sont des composants de la machinerie ESCRT. Ainsi VSV utilise cette interaction pour détourner le système ESCRT pour son bourgeonnement à la membrane (Harty *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2012; Obiang *et al.*, 2012).

M est également responsable d'effets cytopathogènes (ECP) se traduisant par un arrondissement des cellules infectées par VSV (Raux *et al.*, 2010). M est en effet capable d'inhiber des voies de signalisation de la cellule hôte. Elle cible notamment le facteur d'export de l'ARNm Rae1 en complexe avec la nucléoporeine Nup98 (Rajani *et al.*, 2012). Ainsi, elle empêche l'export des ARNm de l'hôte, ce qui se traduit par l'inhibition de l'expression des gènes de l'hôte. Par ailleurs, M lie la tubuline (Melki *et al.* 1994) et perturbe le cytosquelette.

D'autres partenaires de M ont été identifiés, comme la sous-unité catalytique LMP2 du protéasome (Beilstein *et al.*, 2015). La M interagit via son domaine globulaire avec LMP2, ce qui pourrait interférer avec l'assemblage de l'immunoprotéasome, qui promeut la synthèse de peptides compatibles avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-1). Ainsi, cette interaction permettrait l'échappement de la détection et de l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire.

Enfin, il a été montré que le gène de M code également pour deux autres protéines dans le même cadre de lecture que celui de M. Il en résulte une protéine sans les 32 premiers acides aminés et une seconde sans les 50 premiers. Ces deux protéines, dont le mécanisme de synthèse est mal connu, semblent jouer un rôle important quant à l'induction de ECP (Jayakar and Whitt, 2002).

II.7.2.2. La glycoprotéine G

La glycoprotéine G est exposée sur toute la surface des virions. Elle joue un rôle clé lors de l'entrée. Tout d'abord, elle est capable de reconnaître et de lier les récepteurs viraux. Ensuite, elle va catalyser la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome

Cette glycoprotéine G sera plus amplement décrite dans la partie suivante, puis dans la dernière partie dans laquelle nous présenterons le but de nos travaux, c'est-à-dire à son recyclage.

II.8. Génétique inverse du VSV

II.8.1. Développement de la génétique inverse des *Mononegavirales*

La génétique inverse des virus à ARN de polarité positive (ARN+) a été mise au point au début des années 1980. En effet, elle nécessite uniquement l'utilisation d'un plasmide codant pour l'ADNc de ce virus. Après transfection de cellules par ce plasmide, la transcription de cet ADNc en ARNm initie directement un cycle infectieux. C'est ainsi que le premier virus reconstitué par génétique inverse a été un poliovirus. (Racaniello and Baltimore, 1981).

En revanche, la génétique inverse des Mononegavirales qui est plus complexe restait un défi au début des années 1990. Le premier virus à ARN de polarité négative qui a été reconstitué par génétique inverse a été le virus de la rage (Conzelmann and Schnell, 1994). Pour produire ce virus, des cellules ont été infectées avec un virus de la vaccine recombinant, apportant l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les cellules ont ensuite été transfectées avec des plasmides codant pour les protéines P, N et L et un plasmide contenant l'ADN complémentaire de l'ARN génomique du RABV (Figure 20). Chacun de ces plasmides était sous le contrôle du promoteur de la polymérase T7, ce qui permettait une transcription cytoplasmique des gènes viraux et de l'antigénome, comme c'est le cas lors d'une infection par le virus de la rage et la plupart des *Mononegavirales*. Le plasmide contenait également la séquence du ribozyme du virus de l'hépatite delta, permettant le clivage correct de l'ARN antigénomique. Le coiffage et la polyadénylation des ARNm de P, N et L était permis par la machinerie du virus de la vaccine.

Le protocole original utilisé pour le virus de la rage a ensuite été utilisé avec quelques variations pour les autres *Mononegavirales* et en particulier VSV (Lawson et al., 1995).

En particulier, des lignées stables de cellules exprimant la polymérase du bactériophage T7 ont été générées. Elles ont permis de ne plus avoir recours au virus de la vaccine. Ces cellules sont toujours transfectées par les différents plasmides codant P, N et L, mais au début du gène d'intérêt, il a été inséré une séquence correspondant un site d'entrée interne du ribosome (IRES ; en Anglais : *Internal ribosome entry site*), permettant la fixation des sous-unités ribosomales de l'hôte et donc la traduction de l'ARNm (Wirblich et al., 2008; Nikolic et al., 2017).

II.8.2. Développement de la génétique inverse du VSV

Le protocole permettant la reconstitution du VSV par génétique inverse est très semblable à celui développé pour le RABV. Il utilise le virus de la vaccine, les plasmides codant pour N, P, L et l'ADNc du VSV (Lawson et al., 1995) (Figure 20).

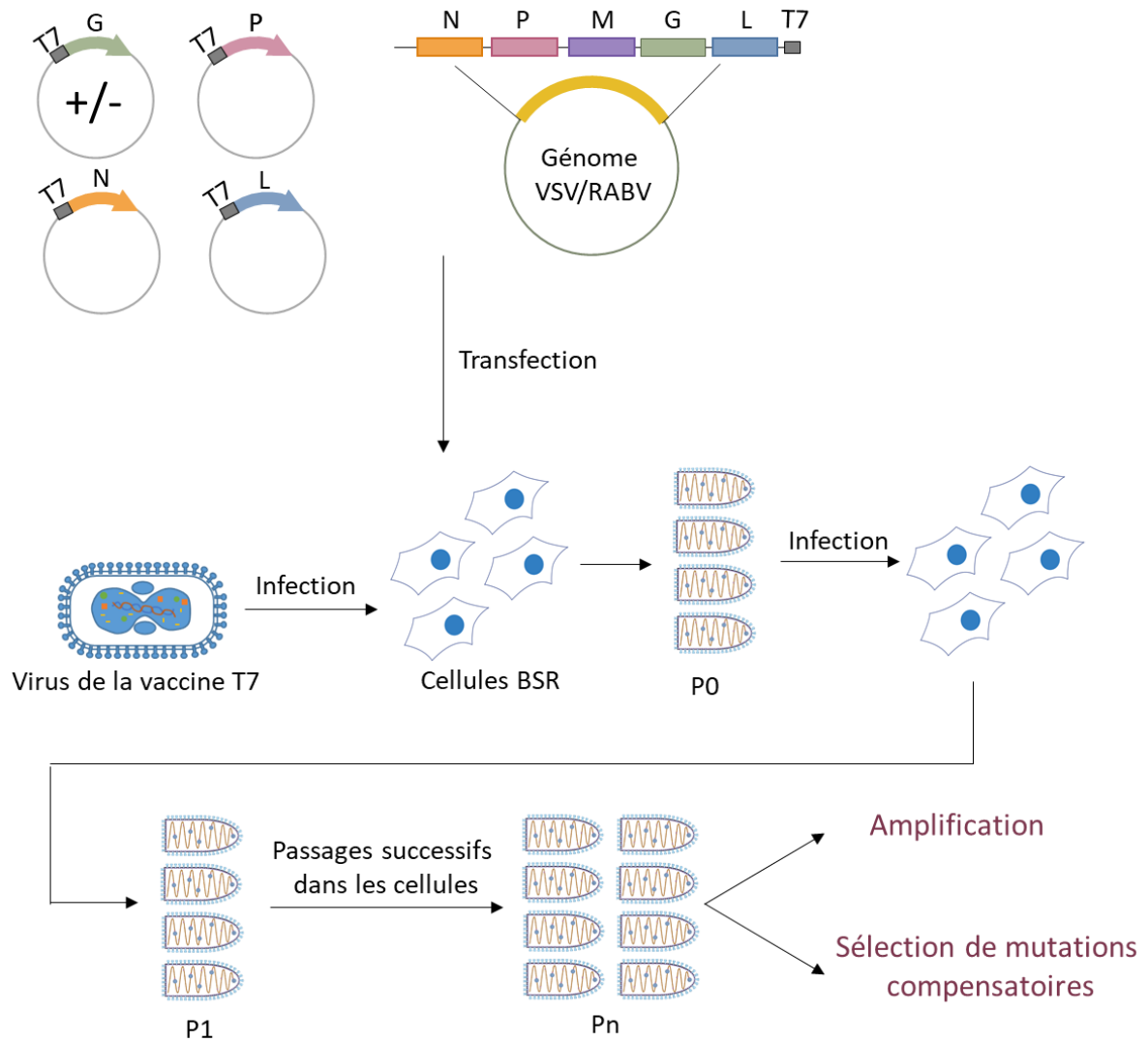


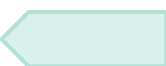
Figure 20: Schéma expérimental de la reconstitution d'un VSV recombinant par génétique inverse. +/- : transfection ou non du plasmide codant pour G. P : Plasmide codant pour P. N : plasmide codant pour N. L : plasmide codant pour L. Génome VSV/RABV : plasmide codant pour l'ADN complémentaire à l'ARN génomique de VSV ou RABV. P0, P1 et Pn : nombre de passages dans les cellules.

Cette méthode permet également de produire des virus recombinants mutés dans un gène viral (dont on va caractériser le phénotype) (Raux *et al.*, 2010), ou exprimant des gènes étrangers (tels que des gènes rapporteurs ou codant pour une cytokine dans le cas

de thérapie oncolytique)(Matsuura *et al.*, 2001; Stojdl *et al.*, 2003), ou codant une G modifiée (fusionnée à un scFv) (Gao, 2023).

Par ailleurs, l'obtention d'un virus recombinant codant pour une glycoprotéine mutée ou chimérique peut être assistée par la transfection d'un plasmide *helper* codant pour la glycoprotéine sauvage qui va permettre la réalisation d'un premier cycle viral.

Dans l'article (cf. Partie 2.II.), nous aborderons la reconstitution d'un VSV recombinant, par cette méthode, exprimant une G chimérique. Les virus recombinants produits peuvent être passés dans des cellules afin d'augmenter le titre viral de ce virus par sélection de mutations compensatoires dans le cas où la modification est délétère pour ce virus (Ferlin *et al.*, 2014; Beilstein *et al.*, 2020).



III. La glycoprotéine G

III.1. Généralités

La glycoprotéine G est une protéine transmembranaire de type 1. Suite au clivage de son peptide signal amino-terminal constitué de 16 acides aminés, on obtient une protéine mature de 495 acides aminés qui forme des trimères à la surface de la particule virale (Dubovi and Wagner, 1977; Kreis and Lodish, 1986; Doms *et al.*, 1987; Lyles, Varela and Parce, 1990). On compte environ 400 trimères de G exposés à la surface d'un virion (Sun *et al.*, 2010).

G est ancrée dans la membrane par une hélice α transmembranaire. L'ectodomaine amino-terminal de G (résidus 1-446) est localisé à l'extérieur de la membrane virale et représente la majeure partie de la glycoprotéine. Cet ectodomaine possède deux sites de N-glycosylation sur les asparagines 163 et 320 (Figure 20), qui sont importants pour le repliement correct de G (Hammond and Helenius, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; Gaudin, 1997). Un site de palmytoylation est localisé après le domaine transmembranaire (Rose, Adams and Gallione, 1984), ce qui est également le cas du virus de la rage (Gaudin *et al.*, 1991).

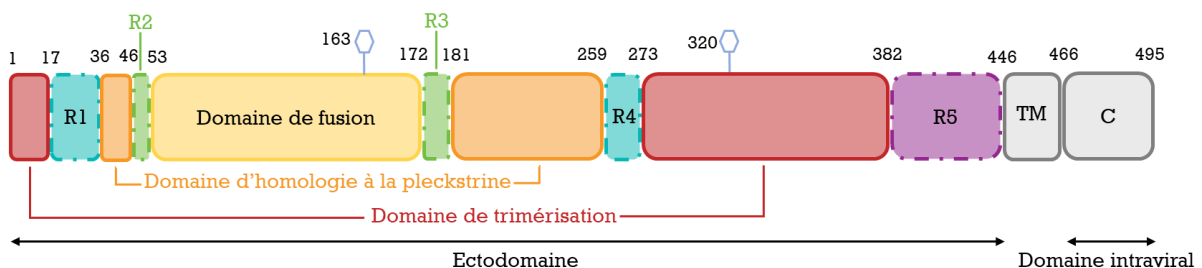


Figure 21: Organisation génomique de la glycoprotéine du VSV.

G est impliquée dans les premières étapes du cycle viral du VSV. Dans un premier temps, G permet la reconnaissance du récepteur. Après endocytose des virions, l'environnement acide de l'endosome induit un important changement conformationnel de G. Durant cette transition structurale, G va exposer des boucles hydrophobes (boucles de fusion) qui vont lui permettre d'interagir avec la membrane cible et de la déstabiliser, ce qui permet à G de catalyser la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome (Roche *et al.*, 2006, 2007; Baquero *et al.*, 2015).

III.2. Structure de la G

G possède deux états conformationnels majeurs : un état pré-fusion à pH 7,5 (dans lequel G reconnaît les récepteurs viraux) et un état post-fusion, majoritairement présent à la surface des particules virales en dessous de pH 6 (Figure 21)(Roche *et al.*, 2006, 2007). Le passage de l'état pré-fusion à celui post-fusion est déclenché par l'abaissement du pH. Ce changement conformationnel est réversible et il existe un équilibre dépendant du pH entre les diverses conformations de G (Lyles, Varela and Parce, 1990; Albertini *et al.*, 2012; Baquero *et al.*, 2017). Cette propriété n'est pas spécifique à VSV G mais est partagée par l'ensemble des glycoprotéines G des Rhabdovirus (Roche and Gaudin, 2002; Libersou *et al.*, 2010; Baquero *et al.*, 2013).

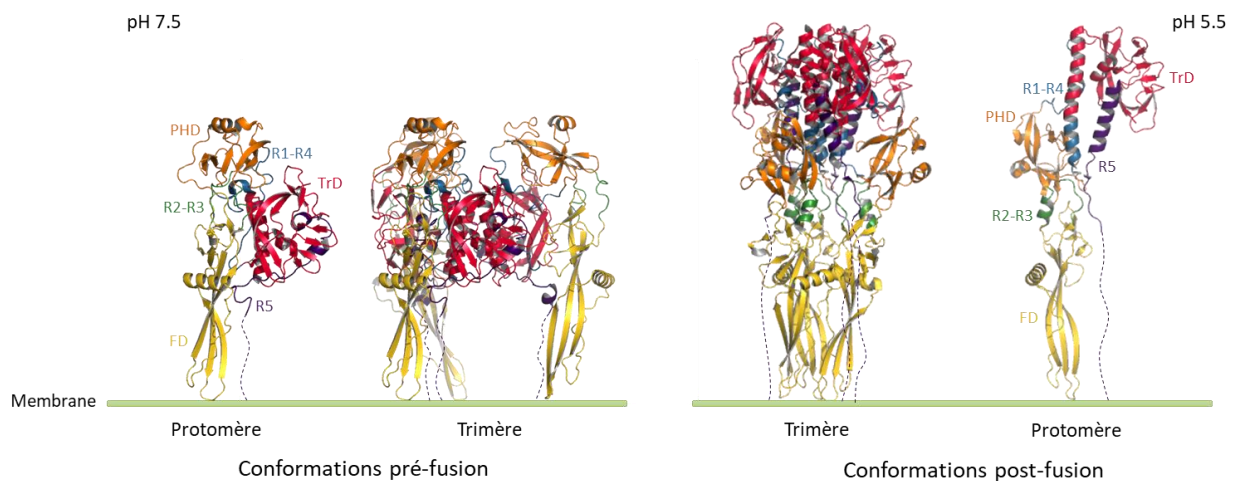


Figure 22: Structure des conformations pré et post-fusion des protomères et trimères de G. PDB : 5i2s, 5i2m. D'après (Roche *et al.*, 2006, 2007)

La détermination de la structure cristallographique de G a montré que G avait le même repliement que la glycoprotéine gB des Herpesvirus (Backovic, Longnecker and Jardetzky, 2009; Burke and Heldwein, 2015; Chandramouli *et al.*, 2015) et gp64 du Baculovirus (Kadlec *et al.*, 2008). Ce repliement est propre à la famille des glycoprotéines de fusion de classe III dont G est le prototype (Roche *et al.*, 2006, 2007). Au sein du trimère, chaque protomère de G est constitué d'un domaine de fusion (FD), situé dans une boucle d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD), lui-même situé dans une boucle d'un domaine de trimérisation (TrD) (Figure 20 et 21). Le domaine de fusion est constitué d'une structure en feuillet bêta. A son extrémité se situent deux boucles de fusion hydrophobes ; celles-ci constituent le motif qui va permettre l'interaction de

l'ectodomaine de G avec la membrane cible au début du processus de fusion (Roche *et al.*, 2006, 2007; Baquero *et al.*, 2015).

Chacun des domaines de l'ectodomaine est connecté à un autre domaine par une région charnière (R1 à R4). Les régions R1 et R4 permettent de connecter le domaine de fusion et le domaine de trimérisation. Le PHD et le FD sont connectés via les régions R2 et R3. Une dernière région, R5, permet de connecter le TrD au domaine transmembranaire (Baquero *et al.*, 2015).

Ces trois domaines (FD, PHD, TrD) conservent leur structure tertiaire lors de leur transition structurale et subissent un réarrangement de leur orientation relative qui est dû à un changement de conformation des régions charnières entre les domaines. En particulier, le réarrangement des régions R1 et R4 entre le TrD et le PHD induit un allongement de l'hélice centrale du TrD (Baquero *et al.*, 2013).

La détermination de la structure de conformations intermédiaires de la glycoprotéine du virus Chandipura (un autre vésiculovirus) a permis de proposer un chemin pour la transition structurale (Baquero *et al.*, 2015).

III.3. Les récepteurs du VSV

III.3.1. Les facteurs d'attachement

Comme pour le virus de la rage, un grand nombre de molécules ont été proposées pour jouer le rôle de récepteur du VSV. Ainsi, les premières investigations concernant le site de liaison du VSV, ont identifié la phosphatidylsérine (PS) comme potentiel récepteur (Schlegel *et al.*, 1983). Cette molécule a été décrite comme se liant directement à VSV et comme étant capable d'induire l'inhibition de l'attachement et de l'infectiosité du VSV. Toutefois, bien que la PS soit un lipide membranaire ubiquitaire, son exposition à la surface membranaire externe est limitée. En effet, l'exposition de la PS à la surface de la cellule est une signature de l'entrée en apoptose de celle-ci et va permettre l'élimination des corps apoptotiques par les macrophages (Williamson and Schlegel, 2002). Ceci faisait donc de la PS un très mauvais récepteur. Un examen plus précis de l'interaction entre VSV et la PS a finalement montré que la PS n'était pas un récepteur du VSV (Coil and Miller, 2004). D'autres travaux ont également proposé que d'autres composants membranaires,

tels que le phosphatidylinositol ou encore le ganglioside GM3 eux aussi chargés négativement, pouvaient jouer un rôle dans l'entrée virale (Mastromarino *et al.*, 1987).

Les données actuelles suggèrent que ces molécules chargées négativement et présentes à la surface de nombreuses cellules, sont au mieux des facteurs d'attachement capables de concentrer les virions à la surface de la cellule, mais ne constituent pas des récepteurs qui eux ont un rôle actif dans l'entrée du virus en déclenchant l'endocytose de la particule virale.

III.3.2. Le LDLR

Plus récemment, il a été montré que les récepteurs du VSV appartiennent à la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basses densités (LDLR pour *Low density lipoprotein receptor*), dont le LDLR qui est son récepteur principal (Finkelshtein *et al.*, 2013). La découverte de ces récepteurs de VSV, présents à la surface de nombreux types cellulaires permet d'expliquer le large tropisme du VSV. Cette famille regroupe 7 récepteurs chez l'Homme : le LDLR, le récepteur aux lipoprotéines de très basses densités (VLDLR pour *Very low density lipoprotein receptor*), le récepteur de l'apolipoprotéine E (ApoER2 ou LRP8), le LRP4 (*low density lipoprotein receptor-related protein 4*), LRP1 (*LDLR-related protein 1*), LRP1b (*LDLR-related protein 1b*) et la mégaline aussi appelée LRP2. D'autres récepteurs plus distants sont considérés comme faisant partie de la famille des LDLR. Il s'agit de LRP5, LRP6 et SORLA (*sortilin-related receptor with A-type repeats*) (Dieckmann, Dietrich and Herz, 2010). Ces récepteurs ont des structures apparentées et sont impliqués dans différentes fonctions biologiques, telles que l'homéostasie du cholestérol (Brown and Goldstein, 1986).

III.3.2.1. Rôle du LDLR

Le LDLR a été découvert lors de l'étude de la maladie génétique d'hypercholestérolémie. Chez les patients, cette maladie se caractérise par une concentration élevée en lipoprotéine de basse densité (LDL, en anglais *low density lipoprotein*) et en cholestérol. Le LDLR a donc été identifié comme étant le récepteur de ces LDL (Brown and Goldstein, 1986). Les LDL permettent le transport du cholestérol, qui est un composant essentiel des membranes cellulaires. Il sert aussi de précurseur des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et des vitamines lipophiles. Il joue également un rôle dans le maintien des fonctions physiologiques du cerveau (Gliozzi *et al.*, 2021).

Le LDLR a donc un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol. Les LDLs circulants interagissent avec le LDLR exposé à la surface des cellules. Cette interaction va engendrer l'endocytose, médiée par la clathrine, du récepteur et de son ligand. Dans l'endosome, l'environnement acide engendre un changement de conformation du LDLR qui passe dans une conformation dite fermée permettant la libération des lipoprotéines. Le récepteur est ensuite recyclé à la surface de la cellule où il retrouve sa conformation ouverte. Le LDL est lui dirigé vers le lysosome où il sera dégradé en cholestérol et acides aminés (Figure 22) (Rudenko *et al.*, 2002; Beglova and Blacklow, 2005).

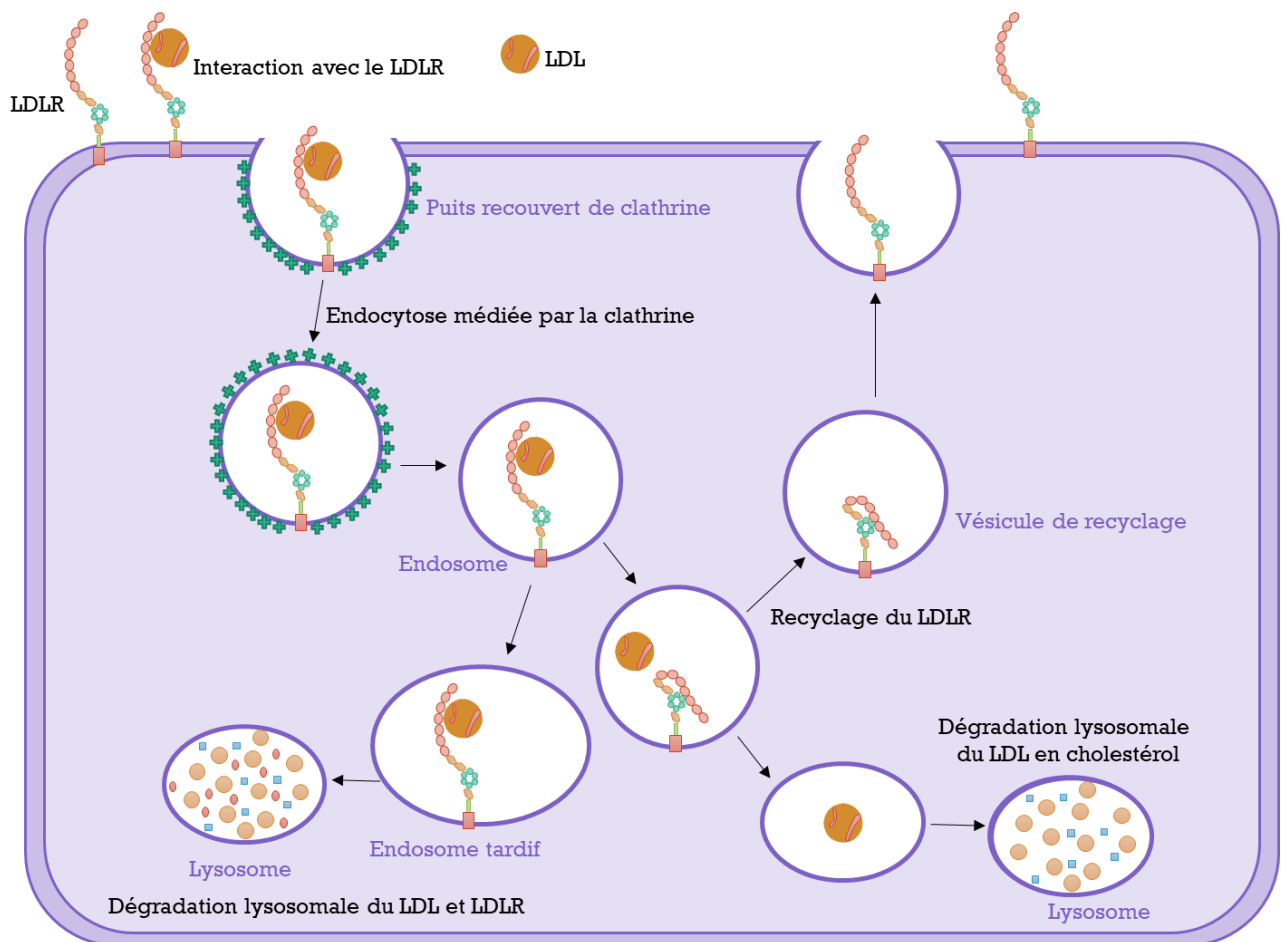


Figure 23: Cycle du LDLR.

III.3.2.2. Structure du LDLR

Le LDLR est une protéine transmembranaire de type I, qui est composée d'un signal peptide, d'un ectodomaine, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. L'ectodomaine est constitué de 7 domaines riches en cystéine, de 3 répétitions de domaines d'homologie du précurseur du facteur de croissance épidermique (EGF) entre lesquelles on retrouve un domaine β -propeller, suivi d'un

domaine C-terminal contenant des oligosaccharides O-glycosylés (Figure 23)(Russell *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1984; Rudenko *et al.*, 2002). Les domaines riches en cystéine sont nommés CR1 à CR7 et constituent son domaine de liaison. Chaque domaine CR est composé d'environ 40 acides aminés, dont 6 résidus cystéine formant 3 ponts disulfures stabilisant sa structure (Rudenko *et al.*, 2002). Les domaines EGF sont des domaines protéiques conservés, de 30 à 40 acides aminés, ayant été décrits pour la première fois chez le récepteur au facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*).

Les domaines β -propeller sont constitués d'une structure tertiaire composée d'un arrangement de 4 à 8 feuillets β en forme de lame (6 chez le LDLR). Le LDLR possède deux conformations pH dépendantes : une forme extracellulaire à pH neutre, permettant la liaison à un ligand et une forme endosomale, en conformation fermée, à pH acide (Rudenko *et al.*, 2002). La région cytoplasmique contient des signaux permettant l'internalisation des récepteurs (Figure 23).

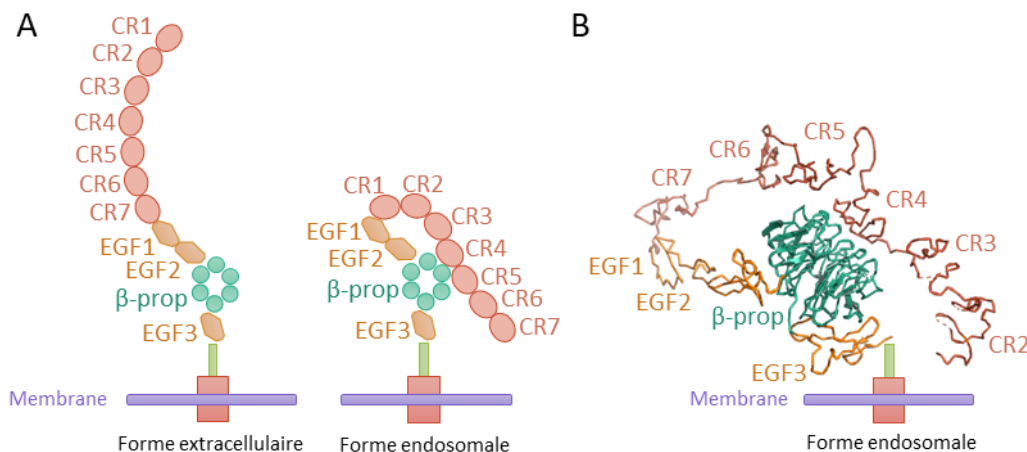


Figure 24: Structure du LDLR. A. Schéma de structure la forme extracellulaire et endosomale du LDLR. B. Structure cristallisée de la forme endosomale du LDLR. β -prop : β -propeller. PDB : 1N7D.

III.3.2.3. Interaction avec les récepteurs LDLR

La découverte des récepteurs du VSV a initié l'étude des résidus impliqués dans l'interaction entre VSV et ces récepteurs. Dans un premier temps, l'étude ayant décrit l'interaction entre VSV et les récepteurs de la famille des LDLR, a montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine CR3, inhibait en majeure partie l'effet cytopathique du VSV dans des cellules amniotiques (Finkelshtein *et al.*, 2013).

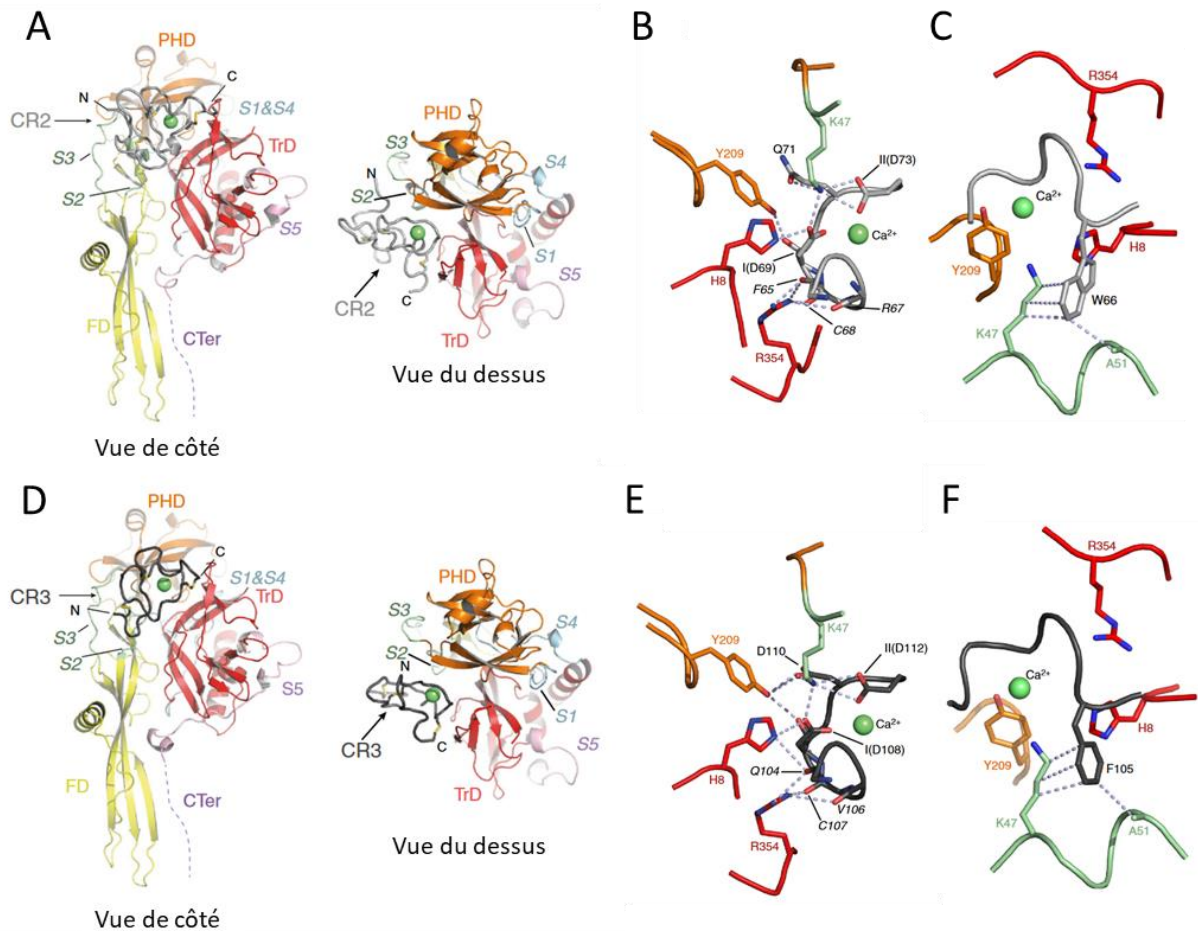


Figure 25: Interaction en G et les domaines CR2 et CR3. A. Structures cristallographiques de l'interaction entre G et CR2 représentées en ruban. Les domaines de la G sont représentés en couleur et le domaines CR en gris. B. Vue rapprochée de l'interaction entre G et CR2. Les résidus acides impliqués dans la liaison de l'ion Ca^{2+} sont indiqués par I, II, III et IV. C. Vue rapprochée de l'interaction entre G et CR2 montrant l'interaction hydrophobe avec le résidu aromatique W66 du CR2. D. Structures cristallographiques de l'interaction entre G et CR3. Les domaines de la G sont représentés en couleur et le domaines CR en gris. E. Vue rapprochée de l'interaction entre G et CR3. F. Vue rapprochée de l'interaction entre G et CR3 montrant l'interaction hydrophobe avec le résidu aromatique F105 du CR3. D'après (Nikolic *et al.*, 2018).

Par la suite, l'interaction entre G et les sept domaines CR du LDLR a été testée. Ainsi, les résultats ont montré que l'interaction entre G et le LDLR se fait via les domaines CR2 et CR3 (Nikolic *et al.*, 2018). L'analyse de la structure cristallographique des complexes G-CR2 et G-CR3 a permis de caractériser la zone d'interaction et de montrer que ces deux domaines se liaient au même endroit sur G. Ceci a aussi permis d'identifier quatre résidus dans G impliqués dans l'interaction avec ces deux domaines CR : l'histidine 8 (située au niveau du TrD), la lysine 47 (située au niveau du PHD), la tyrosine 209 (située au niveau du PHD), et l'arginine 354 (située au niveau du TrD) (Figure 24). Les résidus H8 et K47, deux résidus basiques, pointent vers deux résidus acides, faisant partie de la cage de

calcium des domaines CR, c'est-à-dire vers les résidus aspartates 69 et 73 du domaine CR2 et aspartates 108 et 112 du domaine CR3. Également, la chaîne latérale du résidu K47 établit une liaison hydrogène avec le groupe amide de la glutamine 71 du domaine CR2 et un pont salin avec le groupe acide du glutamate 100 du domaine CR3 (Figure 24 B et D). Le résidu Y209 établit une liaison hydrogène avec le groupe carboxyle du résidu D69 du CR2 et avec ceux des résidus D108 et D100 du CR3 (Figure 24 C et F). Le résidu 354 établit des contacts avec la chaîne principale des domaines CR2 et CR3. Deux résidus aromatiques, le tryptophane 66 chez CR2 et la phénylalanine 105 chez CR3 permettent la stabilisation de l'interaction via la formation d'une liaison hydrophobe avec les résidus K47 et A51 de G.

Afin de déterminer l'importance de ces résidus de G dans l'interaction avec les domaines CR2 et CR3, ceux-ci ont été mutés soit en alanine soit en glutamine. La fonctionnalité des G mutantes a été caractérisée (Figure 25). Tout d'abord, il a été montré que les G pour lesquelles les résidus K47 et R354 étaient mutés ne sont plus capables d'interagir avec les domaines CR2 et CR3 et donc avec leur récepteur (Nikolic *et al.*, 2018). (Figure 25 A). Ces glycoprotéines mutées restent toutefois capables d'induire la fusion entre cellules (Figure 25 B). Finalement, des expériences de pseudotypages du VSV avec les G mutées ont été menées. Ceci a permis de montrer une diminution de l'infectiosité des virus pseudotypés avec les G mutées en K47 et R354 dans différents types cellulaires (HEK293T, BSR, CHO et S2) (Figure 25 C).

En définitive, ces G mutées au niveau des résidus K47 et R354 ne sont plus capable de reconnaître leur récepteur mais conservent leur capacité de fusion. Ces résultats démontrent qu'il est possible de découpler l'activité de fusion de G de sa capacité à interagir avec le LDLR.

Ces travaux suggéraient qu'il était possible de recibler la G, à façon, vers des récepteurs d'intérêt. La dernière partie de cette introduction se focalisera donc sur le reciblage de la G et sur le récepteur d'intérêt choisi.

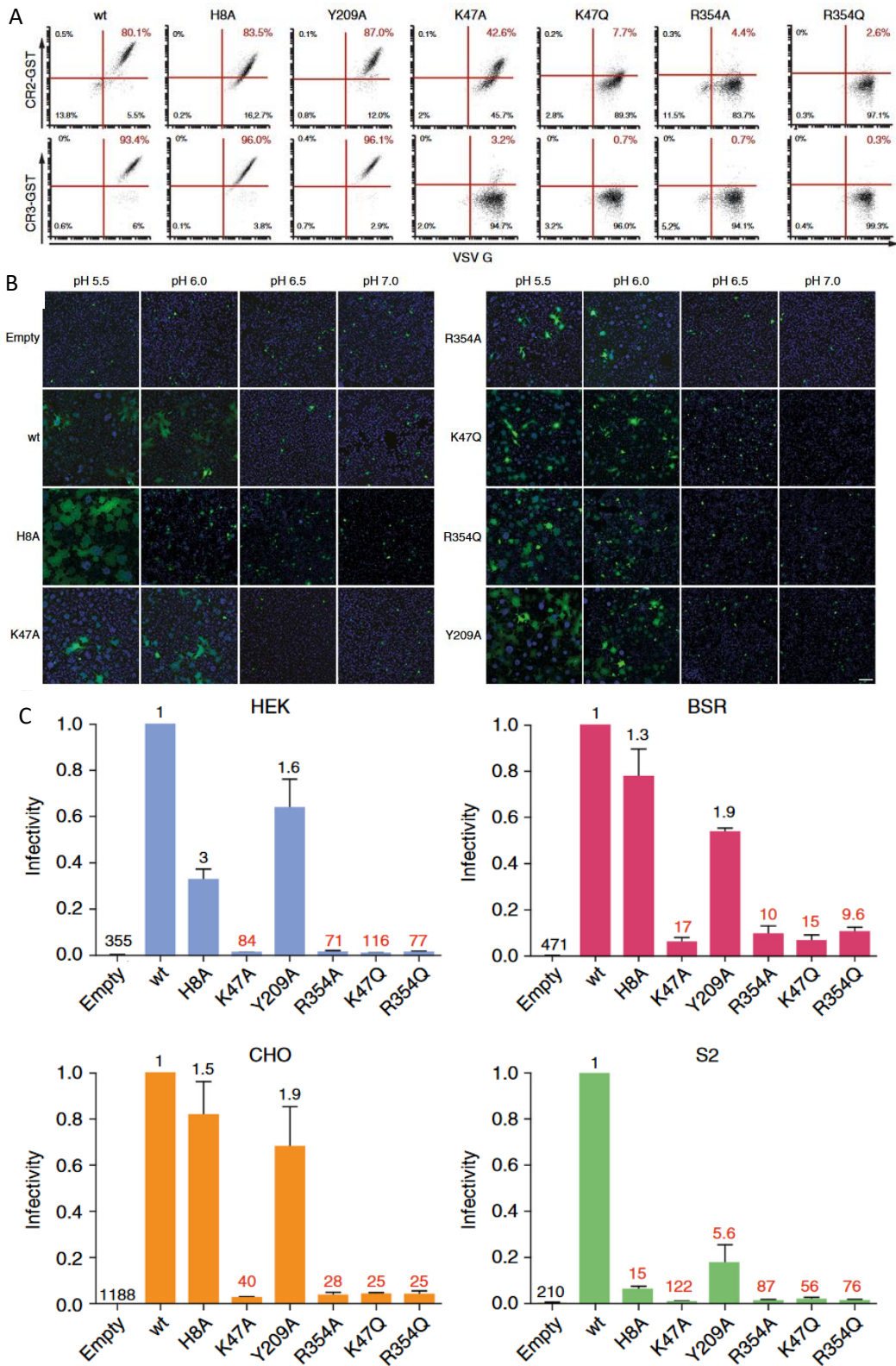


Figure 26: Caractérisation des G mutées en H8, K47, Y209 et R354. A. Analyse par cytométrie en flux de l'expression des glycoprotéines WT et mutantes à la surface des cellules HEK293T et de la liaison avec la GST-CR2 (en haut) et la GST-CR3 (en bas) fluorescentes. B. Tests de fusion cellule-cellule des glycoprotéines WT et mutantes. D. Tests d'infectiosité du VSVΔG-GFP pseudotypé avec des glycoprotéines WT et mutantes dans des cellules HEK293T, BSR, CHO et S2 (Nikolic et al., 2018).

III.3.3. Autre récepteur proposé

En 2017, il a été montré que le récepteur LGR4 (en Anglais : *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4*) interagissait aussi avec VSV G, facilitant l'entrée du VSV dans des cellules exprimant ce récepteur (Zhang *et al.*, 2017). En effet, une diminution de l'infectiosité du VSV a été observée dans des macrophages, dans lesquels l'expression de LGR4 était invalidée. Inversement, une surexpression de LGR4 conduisait à une augmentation de l'infectiosité du VSV dans ces mêmes cellules. LGR4 est présent à la surface de divers types cellulaires, tels que des cellules pancréatiques, mammaires, des cellules germinales ainsi que dans des cellules de cancer colorectal (Yi *et al.*, 2013).

Toutefois, les macrophages ne sont pas des hôtes naturels du VSV. Par ailleurs, dans les expériences validant les interactions entre G et LGR4, les deux protéines étaient coexprimées sans leur peptide signal. Il est donc tout à fait possible que ces protéines aient été mal repliées et se soient agrégées, puisqu'elles n'ont pas été transloquées dans le réticulum endoplasmique. Enfin, la concentration en ectodomaine de LGR4 nécessaire à la neutralisation du VSV était de 200µg/ml, soit largement supérieure à celle requise pour la neutralisation de VSV par le LDLR (55ng/ml) (Finkelshtein *et al.*, 2013; Rubinstein, 2018). Ces observations remettent en cause le fait que LGR4 soit un récepteur du VSV.

III.3.3.1. Induction des anticorps neutralisants

L'infection par VSV déclenche une réponse immunitaire adaptative. Certains lymphocytes B vont être capables de reconnaître les antigènes présents à la surface des virions, ce qui induira la réponse immunitaire à médiation humorale. Elle permettra la production d'anticorps neutralisants dirigés contre ces antigènes. La région variable de l'anticorps reconnaissant l'antigène est appelée paratope, tandis que la région reconnue par l'anticorps est désignée comme épitope. Lorsque qu'un grand nombre d'anticorps ciblent des épitopes proches, l'ensemble de ces épitopes forment un site antigénique.

G est la seule protéine exposée à la surface des virions de VSV. Elle est donc la cible des anticorps neutralisants. Trois sites antigéniques dans G ont été identifiés chez VSV Indiana Mudd Summer. Il s'agit des sites nommés A1 (résidus 241-255), A2 (résidus 37-39)(Lefrancois and Lyles, 1982, 1983; Vandepol, Lefrancois and Holland, 1986) et B (résidus 341-351)(Vandepol, Lefrancois and Holland, 1986). Les sites A1 et A2 sont situés

au niveau du domaine d'homologie à la pleckstrine. Le site antigénique B est localisé dans le domaine de trimérisation (Figure 26). Un autre site a été identifié, impliquant les résidus 453 et 455. Toutefois, les anticorps reconnaissant ce site ne sont pas neutralisants, probablement en raison de leur proximité avec le domaine transmembranaire, ce qui pourrait limiter leur accessibilité dans le contexte d'une particule virale.

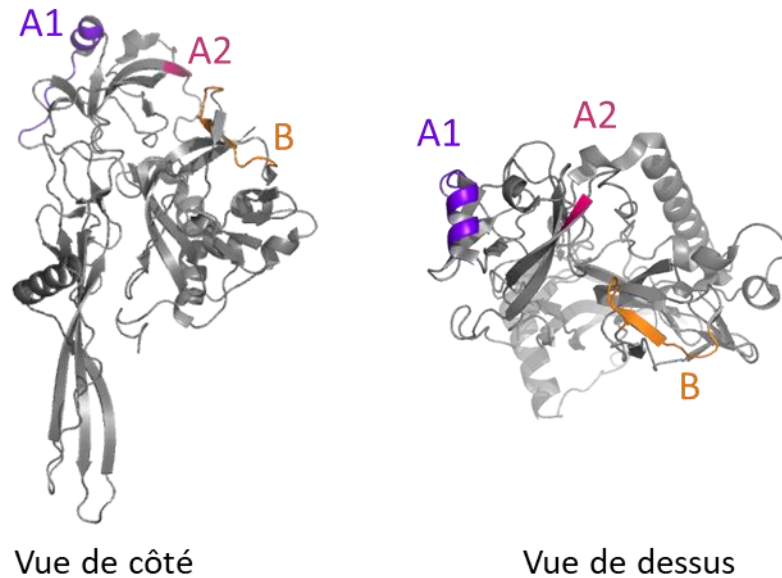


Figure 27: Localisation des sites antigéniques A1, A2 et B sur l'ectodomaine d'un protomère de G au stade pré-fusion. PDB : 5i2s.

IV. VSV et sa glycoprotéine en biotechnologie

IV.1. VSV en tant que vecteur vaccinal

VSV a la capacité de former spontanément des pseudotypes lors d'une co-infection avec un autre virus, tel que le MLV. Cette capacité est attribuée à son mécanisme de bourgeonnement (Jayakar, Jeetendra and Whitt, 2004), qui ne nécessite pas la présence de G (Schnell *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 1997). Ainsi, on obtient une production de particules nues non infectieuses en absence de G (Robison and Whitt, 2000). Toutes ces caractéristiques ont conduit au développement de virus recombinants, dans lesquels le gène de la G a été remplacé par celui d'une autre glycoprotéine d'enveloppe, ainsi que de virus pseudotypés, où le gène de la G a été remplacé par celui d'une protéine fluorescente (comme la GFP ou la RFP) ou de la luciférase.

Les vaccins basés sur des VSV recombinants

La bonne tolérance du VSV à l'insertion d'autres glycoprotéines dans sa membrane a été exploitée pour le développement de vaccins basés sur l'utilisation de VSV recombinants et capables de se répliquer.

Ainsi, un vaccin recombinant contre le virus Ebola a été conçu en remplaçant le gène de VSV G par celui de la glycoprotéine du virus Ebola (VSV-EBOV GP). Avec un taux de survie de 100% des souris vaccinées par VSV-EBOV et ensuite infectées par le virus Ebola, ce vaccin s'est révélé efficace (Garbutt *et al.*, 2004). Ce vaccin a été administré à des patients lors d'essais cliniques de phase III et s'est montré efficace contre le virus Ebola (Suder *et al.*, 2018).

De même, un vaccin contre le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) a été développé, via la production d'un VSV recombinant exprimant le précurseur de la glycoprotéine du CCHFV (Rodriguez *et al.*, 2019). Une production d'IgG neutralisantes dirigées contre la glycoprotéine du CCHFV, a été observée chez les souris vaccinées. Les résultats ont là aussi montré une protection complète des souris ayant reçu une ou deux doses de vaccin.

D'autres vaccins, développés à partir de VSV recombinants, ont conféré une protection contre le virus Nipah chez des primates non humains (Foster *et al.*, 2022) ou contre le virus de Hantaan chez des souris (Zhang *et al.*, 2024).

Les vaccins basés sur des VSV pseudotypés

Les vaccins basés sur des virus recombinants infectieux présentent des risques. C'est pourquoi des vaccins utilisant des VSV pseudotypés par d'autres glycoprotéines virales comme celle du virus Ebola (EBOV GP) ont été développés (Figure 27) (Lennemann *et al.*, 2017). Ainsi, des virus ne codant plus pour le gène de la G (VSVΔG) et portant à leur surface des glycoprotéines d'Ebola ont été produits (VSVΔG/EBOV GP). Des souris vaccinées avec VSVΔG / EBOV GP ont été efficacement protégées contre une infection par le virus.

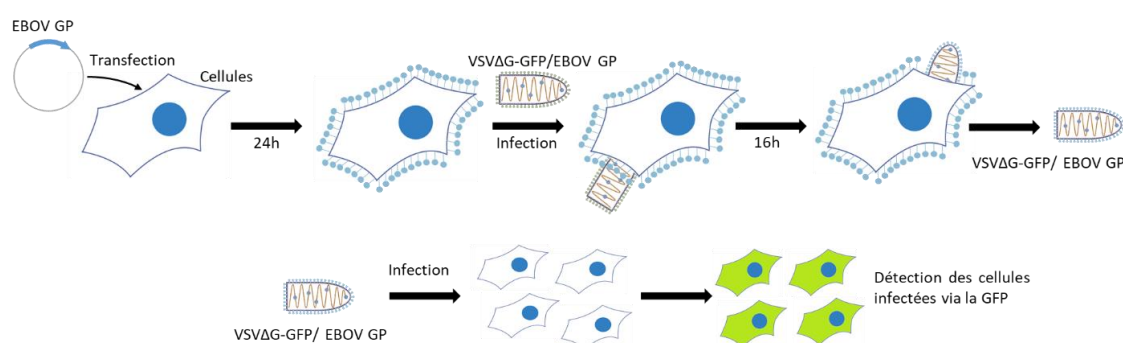


Figure 28: Exemple de production de virus VSV pseudotypés avec la glycoprotéine du virus Ebola (EBOV GP). VSVΔG-GFP : VSV dont le gène de la G a été remplacé par celui de la GFP.

Une autre étude a exploré la possibilité de développer un vaccin multivalent contre les virus Ebola, Nipah et Hendra (Ithinji *et al.*, 2022). Une production d'anticorps neutralisants envers chacun des virus a été détectée chez des hamsters vaccinés avec les VSV pseudotypés multivalents. Ces vaccins ont permis une protection de 100% des hamsters infectés par ces virus.

En recherche fondamentale, ces VSV pseudotypés sont aussi utilisés pour identifier des récepteurs et caractériser les voies d'entrée de virus nécessitant un environnement de niveau P3 ou P4, comme le virus Ebola (Takada *et al.*, 1997), le virus Marburg (Zhang, Liu and Wang, 2023), le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-1) et le SARS-CoV-2 (Hoffmann *et al.*, 2020). En effet, les pseudotypes de VSV peuvent être manipulés dans un laboratoire P2.

IV.2. VSV en tant que virus oncolytique

Le VSV est un OV prometteur. Lors d'essais pré-cliniques, il s'est révélé être efficace contre divers types de tumeurs : cancer du côlon (Stojdl *et al.*, 2003), carcinome hépatocellulaire (Shinozaki, Ebert and Woo, 2005), métastases du cancer du sein (Ebert

et al., 2003) ou cancer du pancréas (Goad, Nesmelova, Yohe and Grdzlishvili, 2023). De plus, Il a fait l'objet de plusieurs essais cliniques de phase I.

Une version dérivée de VSV, exprimant l'IFN- β (VSV-IFN- β) et associée à la protéine symport sodium iodure (NIS) a été administrée chez des patients atteints d'hémopathie maligne récidivante (Cook *et al.*, 2022). La protéine NIS est une protéine membranaire à l'origine d'accumulation d'iode dans la thyroïde. Son expression dans les cellules tumorales infectées permet une imagerie à l'aide de traceurs radio-spécifiques du NIS et donc de suivre la bio-distribution et la réplication du virus au fil du temps. Parmi les 7 patients traités dans cette étude, trois ont montré une réponse au traitement, dont un avec une réponse complète. Chez ce patient, une réplication virale élevée a été observée, ainsi qu'un taux important d'anticorps neutralisant contre VSV, et surtout une augmentation de l'activation des lymphocytes T envers la tumeur (Cook *et al.*, 2022).

L'onco-virothérapie utilisant VSV peut être combinée à d'autres thérapies. Une étude a porté sur l'utilisation du VSV en combinaison avec des cellules CAR-T, portant des scFv (Fragments variables à simple chaîne) dirigés contre le récepteur EGFR (Evgin *et al.*, 2022). Des tests *in vivo* réalisés chez des souris porteuses de mélanomes sous-cutanés et de gliomes intracrâniens exprimant EGFR ont montré que cette combinaison favorise l'expansion *in vivo* des cellules CAR-T et la réactivation des cellules T. Cette thérapie combinée a permis de prolonger la survie des souris.

Le VSV a un tropisme large. Il infecte donc des cellules non tumorales de l'hôte Ce qui contribue à la toxicité du traitement. Plusieurs VSV atténués ont donc été développés pour contrebalancer cette toxicité. En particulier, on a introduit des mutations dans le gène de la protéine M inhibant sa capacité à bloquer l'export nucléaire des ARNm cellulaires. Deux mutations sont couramment utilisées : la délétion de la méthionine 51 de M (VSV Δ M51) ou une substitution de celle-ci en arginine (Coulon *et al.*, 1990; Stojdl *et al.*, 2003; Publicover *et al.*, 2006), notamment lors d'essais pré-cliniques (Stojdl *et al.*, 2003; Goad, Nesmelova, Yohe, Grdzlishvili, *et al.*, 2023). Ces virus recombinants ne sont plus capable d'inhiber l'expression des gènes de l'hôte, dont celui de l'Interféron β , ce qui augmente sa sensibilité à l'interféron de type I (Stojdl *et al.*, 2003; Lichty *et al.*, 2014; Lemos de Matos, Franco and McFadden, 2020). Ceci permet une réplication préférentielle du virus dans les tumeurs qui sont résistantes à l'interféron .

IV.3. Utilisation de la G en biotechnologie

VSV G est la glycoprotéine la plus couramment utilisée pour pseudotyper d'autres virus (Naldini *et al.*, 1996; Mátrai, Chuah and Vandendriessche, 2010). Son large tropisme, sa capacité de fusion élevée et sa robustesse la rendent adaptée aux étapes du processus de production, purification et concentration virale. G est ainsi fréquemment utilisée pour pseudotyper des vecteur lentiviraux. Les débuts du pseudotypage de vecteurs rétroviraux avec VSV G ont été décrits en 1993 (Burns *et al.*, 1993). Ceci a permis de surmonter les limitations des vecteurs rétroviraux antérieurs, qui n'infectaient qu'un nombre restreint de types cellulaires et présentaient des titres viraux bas.

Toutefois, le large tropisme de VSV G pose problème dans le cadre de thérapies ciblées *in vivo*, car il rend difficile le ciblage spécifique des organes ou cellules d'intérêt. Par conséquent, VSV G est principalement utilisée dans le développement de thérapies *ex vivo*.

Utilisation de la G en thérapie ex vivo

G permet de transduire différents types cellulaires, tels que les lymphocytes T, les cellules NK (Natural Killer) et les cellules progénitrices neurales, utilisés en thérapie *ex vivo*. G a été très utilisée dans des études de thérapie pour pseudotyper des lentivirus. Par exemple, dans le cas d'une leucodystrophie métachromatique, une maladie autosomale récessive provoquée par une mutation du gène codant pour l'arylsulfatase A (ASA) et se traduisant par des atteintes neurologiques dues à l'accumulation de lipides dans le cerveau, des cellules progénitrices neurales ont été modifiées *via* des lentivirus afin de restaurer l'expression d'ASA chez des souris (Kawabata *et al.*, 2006). G est également utilisée pour la modification *ex vivo* de cellules T, afin d'exprimer des CAR à leur surface (cf. partie IV.1.3.).

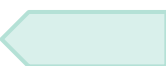
Utilisation de la G à la surface de vésicules extracellulaires

Des études ont montré que VSV G peut aussi être utilisée à la surface des vésicules extracellulaires à des fins de ciblage (Zeng *et al.*, 2024).

Par exemple, des vésicules extracellulaires présentant G à leur surface ont été chargées avec la protéine CAS9 afin d'éliminer l'ADN circulaire clos de façon covalente (ADNccc en Anglais *Covalently Closed Circular DNA*) du virus de l'hépatite B (VHB), ainsi que son

intégration dans les cellules infectées (Zeng *et al.*, 2024). Ceci a permis une réduction du niveau d'ADNccc dans des cellules infectées.

Par ailleurs, G exprimée à la surface de vésicules extracellulaires, a aussi été utilisée comme antigène viral pour le développement d'immunothérapies. Les cellules cancéreuses échappent souvent au système immunitaire, ce qui empêche la production de lymphocytes T spécifiques des tumeurs et limite l'efficacité des immunothérapies actuelles. Pour contrecarrer cela, des exosomes fusogènes, exposant G à leur surface, ont été développés. L'objectif était d'induire la fusion membranaire entre les exosomes et les cellules cancéreuses, permettant l'introduction d'antigènes viraux à la surface des cellules tumorales. Cette approche a facilité la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Les résultats de l'étude ont montré une inhibition de la croissance tumorale chez la souris (Kim *et al.*, 2020).



V. Reciblage de VSV G

Comme nous l'avons vu, VSV et sa glycoprotéine G sont largement utilisés dans diverses approches en biomédecine. Toutefois, il existe un certain nombre de limites à l'utilisation du VSV comme virus oncolytique ou de la G pour pseudotyper des vecteurs rétroviraux. En effet, G confère au VSV ou aux vecteurs rétroviraux qu'elle pseudotype un tropisme large dû à la présence du LDLR à la surface de nombreux types cellulaires. Il va donc y avoir infection ou transduction de cellules non cibles. Par ailleurs, ce récepteur est peu exposé à la surface de cellules d'intérêt, telles que celles de la lignée hématopoïétique qui sont la cible de nombreux traitements utilisant la thérapie génique. Il est donc important de développer des approches permettant de cibler spécifiquement G vers des récepteurs d'intérêt thérapeutique.

V.1. Identification de récepteurs d'intérêt

Une des difficultés majeures dans le développement de thérapies spécifiques est le définir des récepteurs adéquats.

Il est donc essentiel de caractériser la cible selon plusieurs critères : son niveau d'expression dans la cellule d'intérêt, son accessibilité la surface cellulaire, sa capacité à être internalisé, sa spécificité au niveau des cellules cancéreuses, ainsi que la voie de signalisation dans laquelle elle intervient.

En ce qui concerne les thérapies anti-cancéreuses, plusieurs protéines de surface ont déjà été identifiées, telles que le récepteur HER2, le récepteur EGFR et certaines intégrines. Ces molécules sont impliquées dans le développement de divers types de cancers et sont fréquemment surexprimées à la surface des cellules tumorales. Elles constituent donc des cibles privilégiées pour les traitements ou des modèles d'étude pour le développement de thérapies (Tableau 1).

D'autres molécules, spécifiques du type cellulaire à l'origine du cancer, peuvent aussi constituer des cibles thérapeutiques prometteuses. C'est le cas de CD19, un antigène retrouvé à la surface des lymphocytes B, qui peut être ciblé pour traiter certaines formes de leucémies (Tableau 1).

Cible	Cancer cible	Rôle dans le développement tumoral
HER2	Cancer du sein, cancer ovarien, poumon, gastrique, glandes salivaires.	Sa surexpression promeut la transformation des cellules et la croissance tumorale.
PD-1/PD-L1	Cancer du poumon, gastrique, du sein, colorectal, carcinome à cellules rénales...	Promeut l'évasion du système immunitaire et la croissance tumorale.
CD19	Leucémies aiguës lymphoblastiques, leucémie lymphoïde chronique.	Impliqué dans la croissance tumorale en stabilisant la concentration de l'oncogène myc.
Intégrines ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\beta 4$...)	Glioblastomes multiformes, cancer du sein.	Stimule l'angiogenèse en contrôlant la localisation et l'activité de protéases qui dégradent la matrice.
Muc1	Cancer du sein, prostate.	Promeut l'invasion tumorale, l'angiogenèse et les métastases.
BCMA	Myélome multiple.	Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse et dissémination des métastases.
EGFR	Cancer du poumon, du sein, des ovaires, cervical, de la vessie...	Contribue à la prolifération des cellules tumorales, à l'évasion de l'apoptose et aux métastases.
VEGFR	Mélanome, gliome.	Progression tumorale et dissémination des métastases.

Tableau 1: Cibles les plus décrites en thérapies anti-cancéreuses. (Scheuermann and Racila, 1995; Dong et al., 2002; Boudreau and Varner, 2004; Rapisarda and Melillo, 2012; Kwilas et al., 2015; Tai et al., 2016; Sritama Nath and Pinku Mukherjee, 2017; Wang, 2017; Shah et al., 2020; Malekan et al., 2024)

Nous nous sommes focalisés sur le récepteur HER2, qui est une cible largement décrite et d'intérêt puisque ce récepteur est surexprimé dans 15 à 20% des cancers du sein. Le récepteur HER2 sera décrit dans la partie suivante (cf. V.4.).

V.2. Les ligands de ciblage

Dans les années 1970, le tamoxifène a été l'un des premiers traitements en thérapie ciblée. Il s'agit d'un anti-œstrogène utilisé dans le traitement de cancers du sein, agissant par inhibiteur compétitif de l'estradiol. Par la suite, la découverte des anticorps monoclonaux contre CD3 (Muromonab) a mené à d'autres traitements en thérapie ciblée.

On mentionnera le traitement de cancers du sein HER2 positifs en ciblant ces récepteurs grâce au trastuzumab.

Actuellement, les thérapies ciblées évoluent vers le développement de thérapies personnalisées. En effet, chaque cancer présente des caractéristiques uniques d'un patient à un autre, ce qui nécessiterait une thérapie à façon. Les approches basées sur cellules CAR-T illustrent bien cette personnalisation.

V.2.1. Les ligands de ciblage dérivés d'anticorps

De nombreux ligands de ciblage sont dérivés d'anticorps. Il peut s'agir des fragments de liaison à l'antigène (Fab), de scFv ou de nanobodies issus de camélidés (Figure 28).

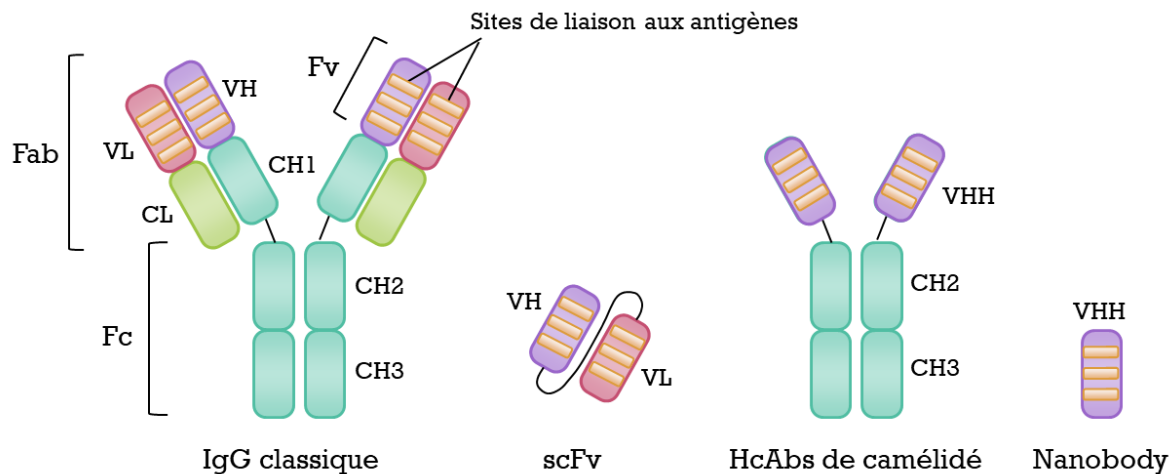


Figure 29: Structures des IgG classiques, scFv, IgG de camélidés et Nanobodies. HcAbs : anticorps uniquement constitués de chaînes lourdes. Fc: Fragment constant. Fab: Domaine de liaison à l'antigène. Fv: Fragment variable. CH : région constante de la chaîne lourde. CL: région constante de la chaîne légère. VH: région variable de la chaîne lourde. VL: région variable de la chaîne légère. En bleu et violet : domaines de la chaîne lourde. En vert et rose : domaines de la chaîne légère.

Les scFv sont constitués des domaines variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps. Ces domaines sont reliés entre eux par un lien peptidique flexible. Comme mentionné précédemment, ils sont utilisés pour des applications thérapeutiques de reciblage des cellules CAR-T.

Les nanobodies, quant à eux, sont de petits anticorps de camélidés, constitués d'un seul domaine variable de chaîne lourde (VHH)(Muyldermans, 2013). Ils diffèrent des autres anticorps de camélidés qui sont constitués uniquement d'un dimère de chaînes lourdes (HcAbs). En effet, dans cette famille de mammifères, à cause d'un épissage alternatif, la chaîne lourde ne possède pas de domaine CH1 (Khong Nguyen *et al.*, 1999). Les

nanobodies présentent de nombreux avantages. Ils ont une affinité très élevée pour leur cible (Kd de l'ordre du nanomolaire, voire picomolaire)(Wesolowski *et al.*, 2009; Kolkman and Law, 2010). Leur petite taille leur permet de reconnaître des structures non accessibles aux anticorps classiques. Ils ont aussi une grande stabilité thermique et sont résistants aux pressions élevées, aux détergents, aux pH acides, etc... Enfin, il est possible de les multimériser, ce qui augmente leur avidité pour leur cible (Coppieters *et al.*, 2006). Ils sont donc utilisés pour diverses applications thérapeutiques, que ce soit en thérapie ciblée ou contre différents virus pathogènes (Ahani *et al.*, 2016). Ils sont également employés pour des diagnostics, notamment pour le virus de la vaccine et le virus Marburg (Vanlandschoot *et al.*, 2011).

V.2.2. Les protéines artificielles comme ligands de ciblage

D'autres protéines peuvent également être utilisées en thérapie ciblée, telles que des affibodies, des DARPins ou encore des α Rep. Tout comme les nanobodies, elles présentent les avantages d'avoir une spécificité élevée et une forte affinité pour leur cible, ainsi qu'une petite taille. Les affibodies et DARPins fonctionnent de manière similaire aux nanobodies. Les affibodies sont composées de trois hélices alpha et ont une masse molaire d'environ 6 kDa. Les DARPins sont constituées de répétitions de motifs ankyrine. Les α Rep sont des protéines artificielles composées de répétitions alpha-hélicoïdales de types HEAT (deux hélices alpha)(Urvoas *et al.*, 2010).

Il existe des banques de gènes codant pour ces différentes protéines artificielles. Elles peuvent être sélectionnées par phage display dans le cas des nanobodies, ou par ribosome display pour certaines DARPins.

V.3. Modification du tropisme

Les ligands mentionnés dans la partie précédente peuvent être utilisés pour modifier le tropisme d'une vésicule ou d'un vecteur viral. Deux types d'approches sont possibles. Les approches dites monopartite qui vont impliquer la fusion de ce ligand à une glycoprotéine virale par construction d'un gène chimérique. Cela permet de combiner en une seule protéine la capacité de fusion et la capacité de reconnaissance de la cible. Dans le cadre d'une approche bipartite, deux protéines seront exposées à la surface d'une vésicule ou du vecteur viral : une protéine d'origine virale, impliquée dans la fusion avec la membrane cible et une seconde protéine permettant la reconnaissance d'une cible.

Idéalement, pour assurer un reciblage spécifique vers un nouveau récepteur, il est essentiel d'éliminer la capacité de la glycoprotéine virale à reconnaître son récepteur naturel.

Approches en monopartite

Le système monopartite a été utilisé pour concevoir un VSV recombinant ciblant le récepteur HER2. Ce virus code pour une G mutée sur les résidus K47Q et R354Q, abolissant la reconnaissance du LDLR et dont l'extrémité amino-terminale est fusionnée avec un scFv dirigé contre le récepteur HER2 (Gao, 2023). Le virus ainsi obtenu est moins infectieux dans des cellules n'exprimant pas HER2 que dans des cellules SKBR3 et D2F2/E2, exprimant fortement HER2. Ce virus améliore la survie des souris portant des tumeurs péritonéales, lorsque son injection a lieu avant le septième jour suivant l'implantation des tumeurs.

De même, la glycoprotéine E du virus Sindbis, (constituée de deux protomères : E1 portant l'activité de fusion et E2 qui lie le récepteur) a pu être reciblée après que la sous-unité E2 ait été fusionnée à un nanobody dirigé contre le récepteur de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2 (VEGFR2). Des lentivirus pseudotypés avec cette glycoprotéine chimérique ont ensuite été produits, et il a été mis en évidence leur potentiel de ciblage des tumeurs vascularisées (Ahani *et al.*, 2016).

Le reciblage par l'approche monopartite a été utilisé dans d'autres contextes, notamment en modifiant des protéines membranaires présentes à la surface d'exosomes. Ainsi, un peptide, dérivé de la glycoprotéine du virus de la Rage et spécifique des cellules neuronales, a été fusionné à une protéine membranaire d'exosome, Lamp2b. La construction obtenue a été exprimée à la surface de cellules dendritiques, chargées avec un siRNA ciblant le gène de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Le reciblage des cellules dendritiques a permis de délivrer le siARN dans le cerveau de souris, entraînant une inhibition de l'expression du gène de la GAPDH (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

Approches en bipartite

L'approche bipartite consiste à insérer la G mutée ne reconnaissant pas le LDLR et d'autre part une seconde protéine transmembranaire capable de lier un antigène d'intérêt.

Une première étude a montré l'intérêt de cette approche en immunothérapie. Des lentivirus ont été pseudotypés avec des complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH), et avec la G mutée pour la reconnaissance du LDLR (K47Q dans cette étude) (Guo and Elledge, 2022). Les CMH ont été chargés avec des peptides ciblant des récepteurs de cellules T (TCR) CD4+ ou CD8+. Les résultats ont montré une infection spécifique des lymphocytes T CD8+ ou CD4+ exprimant des TCR correspondant au peptide chargé sur le CMH. Cette approche pu être utilisée pour supprimer l'expression de PD-1 grâce à la délivrance spécifique d'ARNsh, dans les lymphocytes T CD8+.

Une autre étude a permis de montrer que des lentivirus pseudotypés par la G mutée pour la reconnaissance du LDLR et un scFv anti-CD19 transmembranaire permettait le ciblage de cellules B, engendrant l'activation de cellules B primaires. Cette technologie offre la possibilité de délivrer des gènes suicides dans des cellules cibles. Par exemple, des lentivirus dirigés contre HER2 ont permis de délivrer des gènes suicides dans des lymphocytes B exposant le récepteur HER2 (Yu *et al.*, 2022).

Le ciblage spécifique permis par la combinaison de la G mutée et d'une seconde protéine transmembranaire reconnaissant un récepteur d'intérêt a également été confirmé sur des échantillons sanguins de donneurs. Ces prélèvements sont constitués d'un mélange complexe de cellules mononucléaires périphériques (PBMCs) : des lymphocytes T, lymphocytes B, NK, monocytes, dendritiques et basophiles. Des anticorps, ciblant des marqueurs de surface spécifiques (notamment CD3 et CD19) d'un type cellulaire présent dans le mélange, ont donc été utilisés en combinaison avec une G mutée pour pseudotyper des lentivirus. Les cellules T ont ainsi été ciblées avec un anticorps anti-CD3 et les cellules B avec un anticorps anti-CD19 démontrant une transduction efficace (Strebinger *et al.*, 2023).

Il a été également développé des lentivirus exposant à la surface la G mutée pour la reconnaissance du LDLR et un scFv dirigé contre l'antigène de surface CD19. Ces lentivirus

encapsident la protéine Cas9 et codent également un transgène CAR. L'objectif de cette étude était de modifier le génome des cellules T primaires *in vivo* (Hamilton *et al.*, 2023).

Ce type d'approche qui cible finement les cellules d'intérêt, ouvre des perspectives d'administration directe de vecteurs lentiviraux chez le patient, afin par exemple de transduire des cellules CAR-T *in vivo* (Rive *et al.*, 2022).

V.4. Une cible d'intérêt en thérapie : le récepteur HER2

Le récepteur au facteur de croissance épidermique humain, HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-2*), également connu sous le nom de Neu ou p185neu (Sefton, 1988), est un marqueur cellulaire de différents types de cancers, notamment cancers du sein, dits HER2 positifs. Identifié comme oncogène, il présente donc un grand intérêt pour la thérapie ciblée.

V.4.1. Découverte du récepteur HER2

HER2 a été décrit pour la première fois en 1981 en tant qu'oncogène dans un modèle de tumeur cérébrale chez le rat (Shih *et al.*, 1981). Il s'est avéré que le gène de HER2 (*ErbB2*) était un homologue d'un oncogène de rétrovirus v-erbB (avian erythroblastosis virus) et du récepteur EGFR (Schechter *et al.*, 1984, 1985). En 1985, HER2 a été identifié et amplifié à partir d'une lignée provenant d'un carcinome mammaire (King, Kraus and Aaronson, 2013). A l'heure actuelle le terme *ErbB2* est utilisé pour désigner le gène aussi bien chez l'Homme que chez les rongeurs. HER2 fait référence au récepteur humain, tandis que Neu correspond à l'homologue chez les rongeurs.

Le récepteur HER2 est codé par le proto-oncogène *ErbB2*, localisé sur le chromosome 17. Ce gène produit différentes isoformes du récepteur HER2, provenant d'épissages alternatifs (Chervo *et al.*, 2020; Madera *et al.*, 2023). Le récepteur HER2 a un poids moléculaire de 185kDa (1255 acides aminés). C'est une protéine transmembranaire qui possède donc un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire.

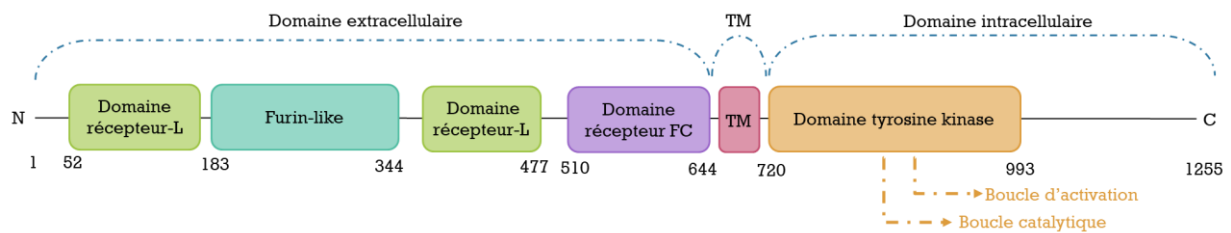


Figure 30: Organisation du récepteur HER2. Furin-like : région riche en cystéine et homologue de la furine. Domaine récepteur FC : domaine IV récepteur de facteur de croissance. TM : domaine transmembranaire.

L'organisation de HER2 est modulaire. Il comprend deux domaines récepteur-L (site de liaison d'un ligand), un domaine ayant une région riche en cystéine (Furin-like), un domaine récepteur de facteurs de croissance (FC), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire tyrosine kinase comprenant une boucle catalytique et une boucle d'activation (Figure 29)(Burguin *et al.*, 2020).

V.4.2. La famille ErbB

Le récepteur HER2 appartient à la famille des récepteurs ErbB, qui regroupe HER1 (ErbB1), plus connu sous le nom EGFR et lui-même impliqué dans plusieurs types de cancers, HER2, HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Parmi ces récepteurs EGFR reste le plus étudié. Ceux-ci appartiennent à la catégorie des récepteurs tyrosines kinases (*Receptor tyrosine kinase, RTK*) et sont des récepteurs de facteurs de croissance. Les récepteurs de la famille ErbB sont actifs après s'être homodimérisés ou hétérodimérisés.

A la différence des autres membres de la famille ErbB, qui lient des ligands de la famille des EGF, le récepteur HER2 ne possède pas de ligand direct (Sliwkowski, 2003). Il possède une conformation constitutivement active, contrairement aux autres membres de la famille (Burgess *et al.*, 2003). HER2 peut former des dimères, mais dans cette conformation, l'encombrement stérique ne laisse pas de place pour interagir avec un ligand. En revanche, les autres membres de la famille ErbB sont capables de s'hétérodimériser avec HER2 (Tzahar *et al.*, 1996), le rendant ainsi fonctionnel. Il semble que l'hétérodimère HER2-HER3 soit le complexe de signalisation le plus actif. Ce complexe, associé à son ligand la neuréguline-1, est en particulier essentiel pour le développement du système nerveux sympathique (Britsch *et al.*, 1998).

V.4.3. Rôle du récepteur HER2

Les récepteurs de la famille ErbB sont impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Suite à son hétérodimérisation, HER2 peut activer 3 voies de signalisations : la voie phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)(Knuefermann *et al.*, 2003), les voies des MAP kinases (en Anglais : *Mitogen-activated protein kinases* ; MAPK)(O'Hagan and Hassell, 1998) et celle de la phospholipase C- γ (Peles *et al.*, 1991).

L'activation de la voie PI3K est spécifiquement induite par l'hétérodimère HER2/HER3. Cependant, n'importe quel partenaire d'hétérodimérisation de HER2, parmi HER1, HER3 et HER4, permet l'activation des voies MAPK (Figure 30) (Tai, Mahato and Cheng, 2010).

HER2 est donc important dans la signalisation cellulaire, puisque les voies PI3K et MAPK sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la prévention de l'apoptose.

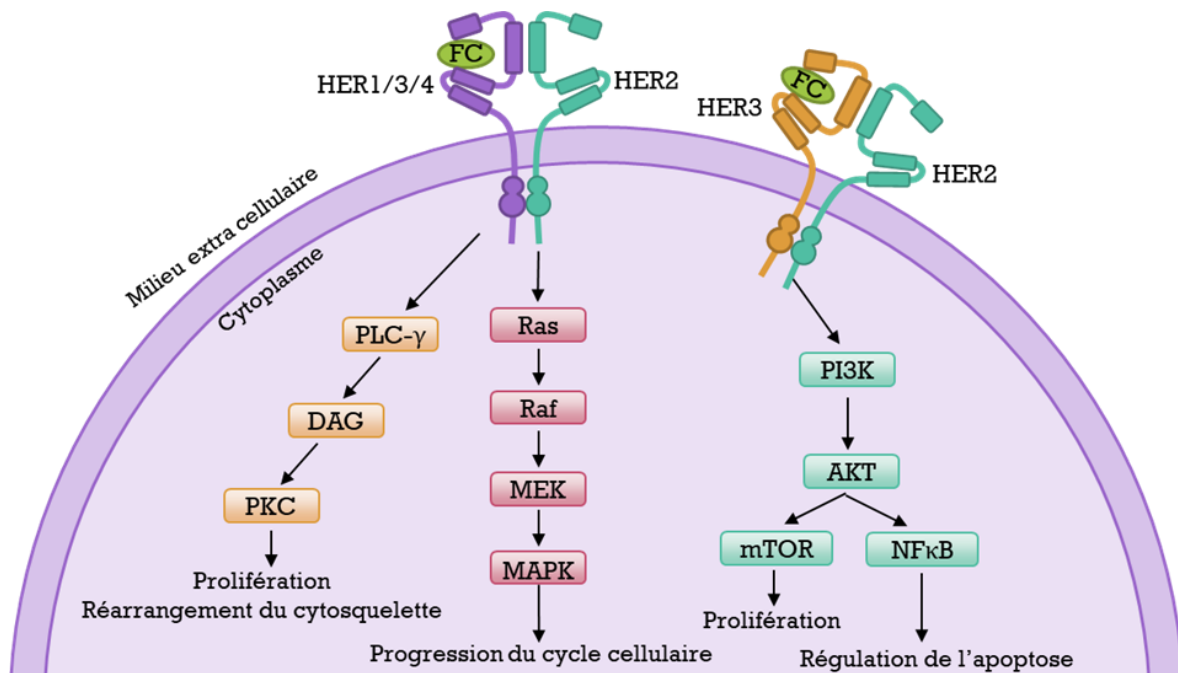


Figure 31: Voies de signalisation activées par le récepteur HER2.

HER2 est par ailleurs capable de se transloquer dans le noyau : soit sous sa forme entière, soit sous une forme issue d'un épissage alternatif ou associée à un ligand. Au niveau du noyau, HER2 joue alors un possible rôle de facteur de transcription de gènes, tels que ceux de la Cycline D, du gène p53 ou encore Cox 2. La localisation nucléaire de HER2 serait médiée par une interaction avec le récepteur de transport importine β 1 et la protéine de pore nucléaire Nup358 (Giri *et al.*, 2005).

V.4.4. Oncogénicité du récepteur HER2

La raison pour laquelle le récepteur HER2 est surexprimé lors des cancers reste inconnue. En effet, aucune mutation de HER2 n'est nécessaire pour sa surexpression. Il a été montré que cette surexpression de HER2 dans différents types cellulaires induit une transformation des cellules et favorise leur croissance tumorale. Ainsi, la surexpression de HER2 dans des cellules humaines du sein MCF-7, provenant d'un adénocarcinome, entraîne une augmentation de leur invasivité, de leur activité kinase et de leur tumorigénicité (Benz *et al.*, 1992).

Cette capacité tumorigénique de HER2 est probablement la conséquence de son implication dans les voies de signalisation de croissance et de différenciation cellulaire décrites précédemment. La voie de signalisation PI3K possède notamment des propriétés oncogènes dans une variété de tumeurs malignes. La mutation PIK3CA, du gène PI3K, connue pour augmenter la signalisation, a été détectée dans différents cas de tumeurs solides, incluant des cancers du sein (Samuels *et al.*, 2004). La voie de signalisation MAPK est également connue pour être impliquée dans la prolifération cellulaire et la tumorigénèse.

Enfin, les récepteurs HER2 nucléaires peuvent activer le promoteur du gène Cox2, augmentant son expression dans les cellules tumorales. L'augmentation de l'expression de Cox2 est un facteur aggravant, car il participe à l'augmentation du potentiel anti-apoptotique, pro-angiogène et métastatique des cellules cancéreuses (Turini and DuBois, 2002).

Il convient aussi de noter que si HER2 possède un potentiel tumorigène chez l'homme, cela n'est pas le cas du gène neu, chez les rongeurs, qui nécessite des mutations pour avoir un tel effet.

V.4.5. Les cancers HER2+

De manière générale, peu de récepteurs HER2 sont présents à la surface des cellules. Ainsi, seulement quelques hétérodimères sont formés, permettant un contrôle précis des signaux de croissance. Toutefois, lors d'une surexpression du récepteur HER2 de nombreux hétérodimères sont formés. Cela entraîne une augmentation significative de la réponse associée aux facteurs de croissance favorisant la croissance de tumeurs malignes.

Le récepteur HER2 est surexprimé chez 15 à 20% des patientes atteintes de cancer du sein (Loibl and Gianni, 2017) et 20 à 25% en incluant les cancers ovariens (Wang *et al.*, 2017). L'expression de ce récepteur est associée à un mauvais pronostic ce qui justifie une recherche systématique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Le récepteur HER2 est également sur-exprimé dans des carcinomes gastriques (Yonemura *et al.*, 1991), des cancers des glandes salivaires (Press *et al.*, 1994) ou des cancers du poumon non à petites cellules (Liu *et al.*, 2018).

V.4.6. Traitement des cancers HER2+

Le récepteur HER2 est donc une cible privilégiée dans le traitement des cancers du sein et des ovaires, de par sa surexpression et son exposition à la surface des cellules. Les cancers HER2+ font notamment partie des premiers cancers pour lesquels une thérapie ciblée a été développée. En 1998, le trastuzumab a été approuvé par la FDA. Il s'agit d'un anticorps monoclonal murin humanisé et appartenant à la classe des IgG1. Il se lie à la région extracellulaire de HER2, ce qui induit son internalisation du récepteur. Cela permet l'inhibition de la croissance et le ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses HER2+. Le trastuzumab peut également induire une cytotoxicité dépendante des anticorps.

De manière générale, le trastuzumab est recommandé pour le traitement des cancers du sein HER2+ à un stade précoce soit post chirurgie, soit en chimiothérapie néo- ou adjuvante et radiothérapie, soit en association avec une chimiothérapie.

Le traitement par trastuzumab associé à une chimiothérapie améliore la survie globale et sans progression chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2+ (SLAMON *et al.*, 2001; Marty *et al.*, 2005).

Cependant, la plupart des cancers à des stades avancés finissent par évoluer. Il est possible d'utiliser un second anticorps en combinaison avec le trastuzumab, tel que le pertuzumab (Baselga *et al.*, 2012). Le pertuzumab est également un anticorps monoclonal humanisé ayant un mécanisme d'action complémentaire à celui du trastuzumab. Le pertuzumab se fixe au récepteur HER2 sur un épitope différent et empêche la dimérisation de HER2. Un essai clinique de phase 3 combinant les deux anticorps et un agent chimio thérapeutique, le docetaxel, a montré une augmentation de la survie à 56,6

mois chez les patientes traitées comparée à celle des non traitées (40,8 mois)(Swain *et al.*, 2015).

Certains patients développent une résistance au traitement, liée au déclenchement de différents mécanismes. Notamment, le récepteur de la famille des tyrosines kinases AXL est impliqué dans cette résistance, lorsqu'il est surexprimé. En effet, AXL se dimérise avec HER2 et engendre l'activation des voies PI3K et MAPK. Une étude a montré que l'inhibition d'AXL, associé au trastuzumab permet la régression des tumeurs résistantes chez des souris (Adam-artigues *et al.*, 2022).

L'utilisation de ces anticorps dirigés contre HER2 n'est pas toujours possible. En effet, chez certains patients le récepteur HER2 n'est pas surexprimé. Ces cancers sont appelés HER2 négatifs ou HER2 faibles, et ne peuvent être traités avec les anticorps ciblant HER2. Récemment, des essais cliniques ont montré une réponse à un anticorps couplé à une drogue, appelé ARX788, et ciblant HER2 dans des cancers HER2 faibles. ARX788 a permis une inhibition de la croissance tumorale dans des souris (Skidmore *et al.*, 2020; Khalil *et al.*, 2024).

D'autres traitements sont indiqués pour soigner les patients atteints de cancers HER2+, notamment l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosines kinases, tels que le lapatinib, le neratinib, le tucatinib et le pyrotinib (Schlam and Swain, 2021). Ces traitements peuvent être utilisés en combinaison avec les autres traitements cités précédemment (chimiothérapie, anticorps monoclonaux)(MacPherson *et al.*, 2019; Murthy *et al.*, 2020).

En résumé, de nombreux traitements ont été développés pour le traitement des cancers HER2+, que ce soit en immunothérapie ou en chimiothérapie. Les thérapies ciblées via des virus oncolytiques ou vecteurs viraux pourraient néanmoins être combinés avec les traitement actuels ou constituer une alternative lorsque ceux-ci ont échoué. Également, ce type de traitements pourrait permettre des options de traitements moins lourds et moins invasifs que la chimiothérapie.

Le récepteur HER2 est l'un des marqueurs tumoraux les plus étudiés, ce qui permet le développement de nouvelles approches. Ces approches pourront ensuite être appliquées à d'autres antigènes tumoraux.

VI. Objectifs de la thèse

La caractérisation de la structure de VSV G en complexe avec les domaines CR2 ou CR3, menée au sein de l'équipe, a permis d'identifier des résidus critiques pour l'interaction entre la glycoprotéine du VSV et le LDLR. La mutation de deux de ces résidus, à savoir la lysine 47 et l'arginine 354, abolit la reconnaissance du récepteur, tout en permettant de conserver l'activité de fusion de G. Cela a démontré qu'il est possible de découpler la capacité de G à reconnaître le récepteur et sa capacité de fusion. Ceci ouvre la possibilité de cibler spécifiquement G vers des récepteurs d'intérêt (cf. III.3.2.3.).

L'objectif de ma thèse était de démontrer qu'il est possible de cibler G en fusionnant G avec des nanobodies dirigés contre un antigène d'intérêt qui va constituer le nouveau récepteur. En parallèle, les mutations K47Q ou R354Q seront introduites pour abolir la reconnaissance du LDLR (cf. V.5.1. et V.3.).

Avant mon arrivée, l'équipe avait montré que la fusion d'un nanobody (nanobody C11 reconnaissant la protéine fluorescente mCherry) à l'extrémité amino-terminale de la glycoprotéine mature était délétère pour l'activité de G (Figure 31). Le gène codant cette glycoprotéine chimérique (G_{C11}) avait été inséré dans le génome d'un VSV recombinant (rVSV- G_{C11}) à la place du gène de G sauvage. Grâce à l'évolution expérimentale, deux mutations dans la séquence de G améliorant la fonctionnalité de la chimère ont été sélectionnées.

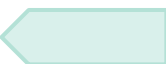


Figure 32: Représentation schématique de G (G_{WT}) et de la G chimérique G_{C11} . SP : peptide signal. TM : domaine transmembranaire. IV : Domaine intraviral. QF et GGGGS : linker.

Mon travail a d'abord consisté à caractériser l'impact fonctionnel de ces mutations (transport de G, capacité de pseudotyper un virus VSVΔG-GFP dans lequel le gène de G a été remplacé par la GFP). J'ai montré que ces mutations améliorant la fonctionnalité de la chimère G_{C11} amélioreraient aussi la fonctionnalité d'autres chimères de G contenant d'autres nanobodies.

Nous avons ensuite voulu voir s'il était possible de cibler spécifiquement G vers un récepteur d'intérêt en utilisant ce châssis optimisé de G, tout en introduisant les mutations K47Q ou R354Q abolissant la reconnaissance du LDLR. Nous avons choisi de cibler le récepteur HER2, un récepteur présentant un intérêt thérapeutique (cf. V.4.) et pour lequel de nombreux nanobodies sont disponibles.

L'objectif global de mes travaux était donc de développer un outil thérapeutique adaptable, permettant la mise en place de thérapies personnalisées *in vivo*.



Partie 2 : Résultats

I. Informations générales

I.1. Contribution à l'article

Comme mentionné dans les objectifs de ma thèse, le travail avait été initié avant mon arrivée au sein de l'équipe. Durant ma thèse, j'ai réalisé la construction de toutes les chimères contenant les nanobodies dirigés contre le récepteur HER2 (H1 à H6) et j'ai invalidé le gène *ErbB2* dans les cellules HEK293T.

Les données présentées dans les figures de l'article ont été obtenues par moi, à l'exception de celles présentées en figure 1f et 1g (obtenues avant mon arrivée), 1h (micrographies réalisées par Malika Ouldali), 1i (expérience réalisée par Aurélie Albertini) et l'immunoblot présenté en figure 4b (réalisé par Stéphanie Thébault).

I.2. Synopsis de l'article

La première étape du reciblage de G a consisté à fusionner un nanobody (C11), dirigé contre la protéine fluorescente mCherry, à l'extrémité amino-terminale de G pour obtenir la G chimérique G_{C11} . Les premiers résultats ont révélé que l'insertion du nanobody perturbait le repliement de G_{C11} , compromettant par conséquent son transport à la membrane. En conséquence, cette chimère G_{C11} ne pseudotypait pas efficacement VSV Δ G-GFP.

Afin d'optimiser cette construction G_{C11} , un VSV recombinant (rVSV- G_{C11}) a été généré par génétique inverse, en remplaçant le gène de la G par celui de G_{C11} . Le virus produit a ensuite été soumis à de l'évolution expérimentale, avec plusieurs passages dans des cellules BSR. Après un certain nombre de passages, une augmentation du nombre de foyers infectieux a été observée, ainsi qu'une propagation de l'infection aux cellules voisines. Le séquençage du virus a montré l'apparition de deux mutations dans G : H22N et S422I. Ces mutations, dites d'optimisation, ont permis de créer une nouvelle version améliorée de la chimère, baptisée $G_{C11-opt}$.

L'analyse structurale de l'impact de la mutation S422I a suggéré que la présence d'un acide aminé hydrophobe à cette position était cruciale. L'isoleucine avait été sélectionnée car c'était la seule substitution possible pour obtenir un résidu hydrophobe *via* une simple substitution nucléotidique. J'ai ensuite testé l'impact d'autres hydrophobes à cette

position et montré qu'il y avait une amélioration semblable de la fonctionnalité avec un résidu phénylalanine, leucine, méthionine et valine à cet endroit.

En parallèle, dès mon arrivée au laboratoire, j'ai réalisé les premiers tests de l'infectiosité du VSVΔG-GFP pseudotypés (Figure 32) avec différentes versions de G chimériques fusionnées à 11 nanobodies différents, dans un contexte optimisé ou non.

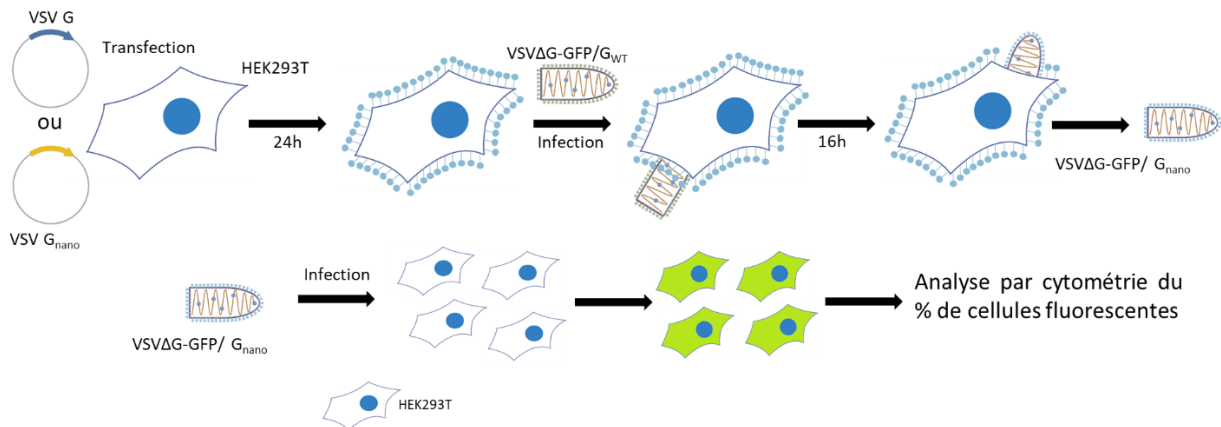


Figure 33: Production de VSV pseudotypés. Des cellules HEK293T sont transfectées avec les G_{nano}. Après 24h, les G_{nano} sont exposées à la surface des cellules. Les cellules sont infectées avec un VSVΔG-GFP/G, dont le gène de la G a été remplacé par celui de la GFP et à la surface duquel est ajoutée une G sauvage. La G sauvage permet aux virus d'infecter les cellules exposant les G_{nano}. Après leurs cycles les virus bourgeonnent en emportant les G_{nano}. On obtient ainsi des VSV pseudotypés avec les G_{nano}. On peut ensuite infecter des cellules et détecter le pourcentage de cellules infectées par cytométrie, grâce à l'expression de la GFP. Le titre viral est calculé à partir du pourcentage de cellules fluorescentes.

Les différents tests de pseudotypage réalisés ont montré, dans 9 cas sur 11, une augmentation significative de l'infectiosité des virus pseudotypés avec des G chimériques optimisées, par rapport à ceux pseudotypés avec des G chimériques non optimisées. La moyenne géométrique de l'optimisation était d'environ 10.

Ensuite, nous avons introduit les mutations K47Q ou R354Q dans les chimères optimisées fusionnées à 4 nanobodies (H1 à H4) dirigés contre le récepteur HER2 créant ainsi les chimères G_{Hn-opt}. Ces G chimériques ont été utilisées pour pseudotyper soit VSVΔG-GFP, soit des lentivirus (Figures 32 et 33). La capacité d'infection des pseudotypes ainsi obtenus a été testée sur des cellules exprimant HER2 (cellules HEK293T et SKBR3) ou n'exprimant pas le récepteur HER2 (HEK293T-HER2^{KO}). Ces expériences ont permis d'établir la preuve de concept qu'il est possible de cibler G vers un récepteur d'intérêt, ici HER2, ouvrant ainsi des perspectives pour le reciblage vers d'autres récepteurs spécifiques.

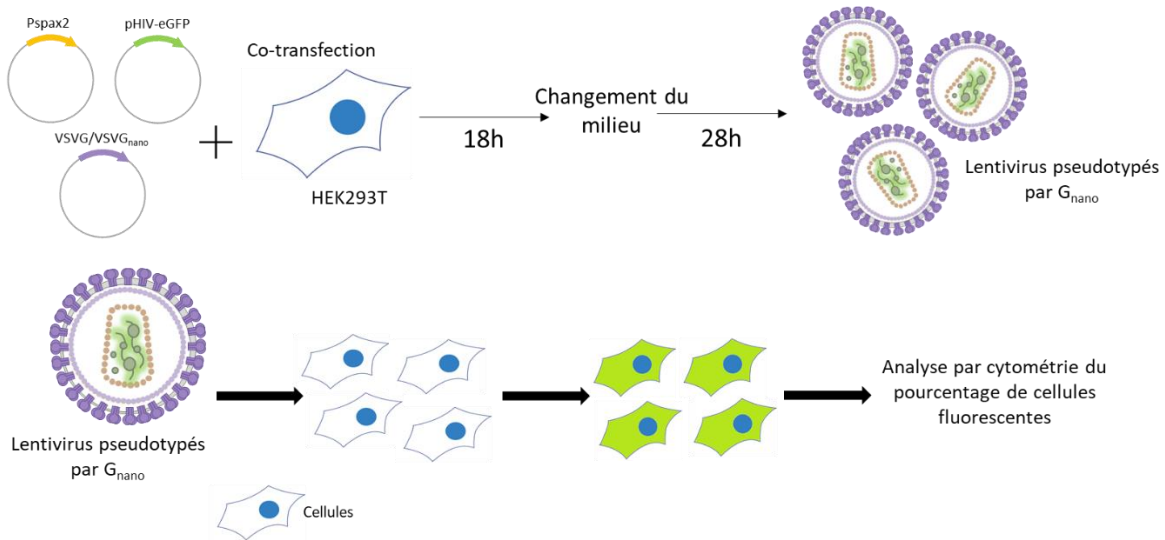


Figure 34: Production de lentivirus pseudotypés par G_{nano} et évaluation de leur infectiosité. Les cellules HEK293T sont co-transfectées par Pspax2, pHIV-eGFP et G_{nano} . Après 18h, le milieu des cellules est renouvelé. Après 28h de production, les lentivirus pseudotypés avec les G_{nano} sont récoltés. Les lentivirus sont ensuite utilisés pour infecter des cellules, et le pourcentage de cellules infectées est détecté par cytométrie, grâce à l'expression de la GFP. Le titre viral est calculé à partir du pourcentage de cellules fluorescentes.

Nous avons également évalué l'infectiosité des VSV Δ G-GFP pseudotypés avec les chimères $G_{Hn-opt-K47Q}$ et $G_{Hn-opt-R354Q}$ dans un mélange constitué à 50% de HEK293T et 50% de HEK293T-HER2^{KO} (Figure 34). Dans ce contexte, nous avons observé une infection très préférentielle des cellules HEK293T exprimant le récepteur HER2, confirmant ainsi la spécificité du recâblage des virus pseudotypes vers ce récepteur d'intérêt.

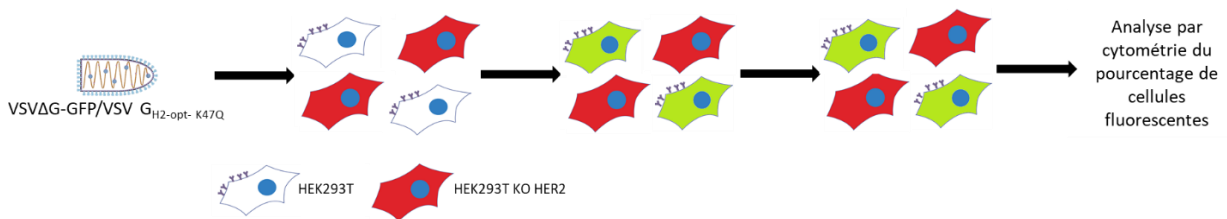


Figure 35: Tests de l'infectiosité préférentielle dirigée vers le récepteur HER2 avec pour exemple le $G_{H2-opt-K47Q}$. Un mélange de cellules à 50% HER2+ et 50% HER2- est infectée par des VSV pseudotypés avec les $G_{H2-opt-K47Q}$. Les cellules HER2- fluorescent en rouge, ce qui nous permet de distinguer les cellules KO pour HER2 des cellules infectées en vert. Le pourcentage de cellules fluorescentes est analysé par cytométrie.

II. Article (en cours de soumission)

**Optimization of the VSV G backbone for amino terminal fusion with nanobodies
allowing its retargeting to receptors of therapeutic interest.**

Isoline Duquénois¹, Stéphanie Thébault¹, Sarah Johari¹, Hélène Raux¹, Malika Ouldali¹,
Cécile Lagaudrière-Gesbert¹, Franck Perez², Aurélie A. Albertini^{1*}, Yves Gaudin^{1*}

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay,
Gif-sur-Yvette, France

² Dynamics of Intracellular Organization Laboratory, Institut Curie, PSL Research University,
Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 144, 75005, Paris,
France.

*Co-corresponding authors:

yves.gaudin@i2bc.paris-saclay.fr

aurelie.albertini@i2bc.paris-saclay.fr

Summary

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a promising oncolytic virus. Additionally, its glycoprotein G is the most commonly used envelope glycoprotein to pseudotype lentiviral vectors for gene therapy. However, G receptors (LDLR family members) are ubiquitous and expressed at the surface of non-target cells, precluding *in vivo* gene therapy. Recently, we identified G mutants that no longer bind to LDLR but retain their fusion activity. This opened the possibility of specifically retargeting the glycoprotein to receptors of interest. Here, we constructed chimeric glycoproteins fused with a nanobody at the amino-terminus of G. By experimental evolution, we identified two mutations in G improving the folding and functionality of chimeric Gs, regardless of the nanobody inserted at the amino-terminus. We then constructed chimeric glycoproteins using several nanobodies targeting HER2 receptor and, into these chimeras, we introduced mutations that abolish the recognition of LDL receptors. VSV and lentiviruses pseudotyped with these glycoproteins specifically infect cells expressing HER2. We have therefore identified G mutations that optimize the G scaffold to tolerate amino-terminal insertion of a nanobody and establish proof of concept that this approach can be used to confer a new tropism on G. This paves the way for targeted *in vivo* therapies.

Introduction

Vesicular stomatitis virus (VSV) is a promising oncolytic virus particularly for the treatment of refractory solid tumors (1–6). Indeed, it replicates preferentially in tumor cells due to their interferon (IFN) pathway defects and the subsequent lysis of infected cells induces the release of tumor antigens, which then stimulate the anti-tumor immune response (2,7). Its glycoprotein G (VSV-G) is also the most commonly used envelope glycoprotein to pseudotype lentiviral vectors for gene therapy approaches (8,9). In both cases, the lack of specificity of VSV G limits the spectrum of its use. Indeed, G binds to VSV receptors which are members of the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) family (10) and present on the surface of almost all cell types with the notable exception of cells of the hematopoietic lineage. In virotherapy, this can lead to off-target toxicity, especially neurotoxicity (11–13). This lack of specificity also precludes *in vivo* gene therapy (*i.e.* by administering the lentiviral vector to a specific organ or area in the body). There is therefore a strong need to develop glycoproteins derived from VSV G specifically targeting cells of interest for therapeutic purposes.

VSV G has two functions essential for viral entry into the host cell (14). First, it initiates infection by binding to a cellular receptor (the LDL-R or a member of its family) which triggers endocytosis of the virion (15,16). Then, the acidic environment of the endosome induces a huge conformational change of G from its pre-fusion state toward its post-fusion state which catalyzes the fusion of the viral envelope with the endosomal membrane. This results in the release of the viral ribonucleoprotein in the cytoplasm for subsequent stages of infection.

VSV G is a type I glycoprotein, synthesized on endoplasmic reticulum-bound ribosomes. After cleavage of its amino terminal signal peptide, the mature glycoprotein is 495 aa long. It is anchored in the membrane by a single α -helical transmembrane (TM) segment (Figure 1A). Most of the mass of G (residues 1-446) is located outside the viral membrane and

constitutes its amino-terminal ectodomain. The structures of pre- and post-fusion trimers of VSV G were determined revealing the details of the conformational change (17–19). More recently, crystal structures of the prefusion conformation of G ectodomain in complex with two cysteine-rich domains (CR2 and CR3) of the LDL-R of G have also been determined (20). The binding site of the CR domains on G was the same in both crystals and allows the identification of two basic residues (K47 and R354) which are essential for the interaction between G and its receptor. Mutant glycoproteins in which those two residues are replaced by either an alanine or a glutamine are unable to bind LDL-R CR domains and cannot pseudotype a recombinant VSV (VSV Δ G-GFP) in which the G gene has been replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene (20). Nevertheless, these mutant glycoproteins retain their ability to induce syncytia formation at low pH when expressed in cells by plasmid transfection (20). Therefore, the fusion activity and receptor binding activity of VSV G can be decoupled which paves the way for the development of G-derived glycoproteins with modified tropism.

A possible strategy to retarget the VSV glycoprotein toward a receptor of interest expressed at the cell surface consists of fusing it to a protein domain specifically binding this receptor. Nanobodies (also known as VHH or single domain antibodies) are an interesting class of specific binders (21,22). They are stable, rather small, and several libraries are available for screening of high affinity bindings against a specific target (23,24). Thus, we decided to construct chimeric glycoproteins with a nanobody inserted between the signal peptide (SP) and the ectodomain of G. However, we observed that such a fusion of a nanobody (directed against mCherry) at the N-terminus of G affected the properties of the glycoprotein. We thus decided to carry out experimental evolution to optimize the backbone of G so that it tolerates this insertion. Our hypothesis was that selecting mutations that optimize the G backbone for insertion of a given nanobody should also optimize it for the insertion of any nanobody due to their common 3D structure. For this, we constructed a recombinant VSV in which the gene

encoding G was replaced by a gene encoding the chimeric glycoprotein. The recombinant virus had a very low titer and after a few passages, two mutations were selected in the G backbone that were shown to optimize several chimeras involving distinct nanobodies (as assessed in VSV Δ G-GFP pseudotyping experiments). We then constructed several chimeras in which this optimized G backbone was fused to distinct nanobodies directed against the receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (HER2, overexpressed at the surface of malignant cells (25) and used for targeted drug delivery (26)) and introduced the mutations K47Q or R354Q abolishing the recognition of LDL-R by G (20). We demonstrated that these chimeras efficiently pseudotype both VSV Δ G-GFP and lentiviruses and specifically retarget them toward HER2-expressing cells. This work therefore provides a VSV-G backbone that makes it possible to construct chimeric Gs specifically targeting cells of interest using nanobodies.

Results

Construction and characterization of a chimeric glycoprotein fused to a nanobody

We constructed a chimeric glycoprotein (G_{C11}) with a nanobody (C11, directed against mCherry) (24) inserted between the signal peptide (SP) and the ectodomain so that the nanobody will be located at the amino-terminal end of the mature G. The nanobody was flanked by an insertion of a QF dipeptide (to optimize the SP cleavage) and a flexible linker (GGGGSGGGGS) before G ectodomain (Figure 1A).

We transfected HEK293T cells with the resulting construct to assess G_{C11} surface expression. Non-permeabilized cells were labeled using the monoclonal antibody (mAb) 8G5F11, directed against G ectodomain and quantified by flow cytometry. Surface expression of G_{C11} was affected compared to that of the wild type glycoprotein (G_{WT}) (Figure 1B) and the median density of G_{C11} protein present at the cell surface was 50 +/- 21% of that of G_{WT} (Figure 1C).

We also assessed the ability of G_{C11} to pseudotype a recombinant VSV (VSV Δ G-GFP) in which the G envelope gene was replaced by the green fluorescent protein (GFP) gene. Chimeric glycoproteins incorporation into the envelope of the particles present in the supernatant was verified by western blot. Incorporation of the G_{C11} chimera into the viral membrane was less efficient than that of G_{WT} (Figure 1D). Pseudotyped viruses were then used to infect HEK293T cells and their infectivity was analyzed by counting GFP-expressing cells using flow cytometry. The infectious titer of the production of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G_{C11} was 1.3 Log₁₀ (*i.e.* 20 times) lower than that of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G_{WT} (Figure 1E). This indicated that the fusion of the nanobody at the N-terminus of G affected the properties of the glycoprotein.

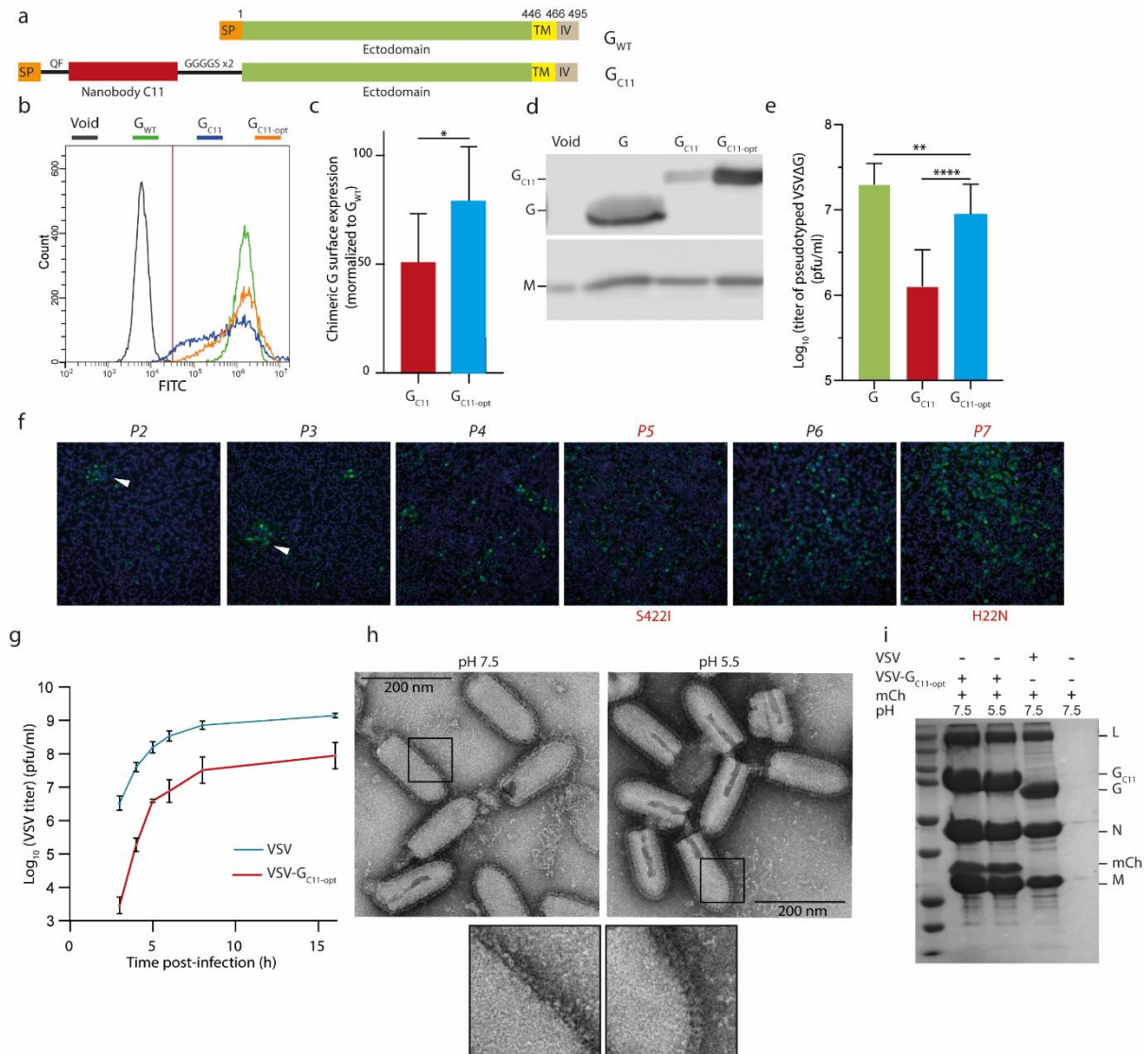


Figure 1: Optimisation of the VSV G backbone to tolerate an aminoterminal fusion with the C11nanobody. **A)** Schematic representation of G_{WT} and of the G_{C11} chimera. SP: signal Peptide; TM: transmembrane domain; IV: intraviral domain. **B)** Presence of G_{WT} , G_{C11} , and $G_{C11-opt}$ at the cell surface of transfected HEK293T cells. G was detected on the surface of non-permeabilized cells using mAb 8G5F11 and a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488. Cells were analyzed by flow cytometry. **C)** Median surface concentration of G_{C11} and $G_{C11-opt}$ normalised to median concentration of G_{WT} on the surface of HEK293T cells. The median fluorescence was measured using flow cytometry. **D)** Incorporation of G_{WT} , G_{C11} , and $G_{C11-opt}$ into VSV Δ G-GFP viral particles assessed by western blot using an anti-VSV G and an anti-VSV M antibody. **E)** Infectivity of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G_{WT} , G_{C11} and $G_{C11-opt}$ in HEK293T cells. VSV Δ G-GFP viruses pseudotyped with WT or chimeric glycoproteins, produced in the same conditions (see material and methods), were used to infect indicated cell lines during 16 h. The percentage of infected cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry and used to calculate the viral titer. **F)** Experimental evolution of rVSV- G_{C11} recombinant virus in BSR cells. rVSV- G_{C11} was serially passaged in BSR cells. Infected cells were labelled using an anti-N antibody and a goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488. DAPI was used to stain nuclei. Genomic RNA was extracted and sequenced after passage 5, 7 and 10 revealing the invasion of G mutations H22N (after P5) and S422I (after P7) into the viral population. **G)** Growth curves of VSV $_{WT}$ and rVSV- $G_{C11-opt}$. At each time point, the viral titer was measured using plaque assay. **H)** Negative staining electron microscopy of rVSV- $G_{C11-opt}$ incubated at pH 7.5 and 5.5. Insets show the magnification of the viral membrane revealing the typical shape of VSV G at high and low pH. **I)** Binding of mCherry protein to rVSV- $G_{C11-opt}$. Indicated viruses were incubated

with mCherry at indicated pHs, centrifuged and the pellet was analysed by SDS-PAGE. L, N, M indicate the position of viral proteins, G and G_{C11-opt} the G proteins and mCh the precipitated mCherry. In **C**), **E**), and **G**), data points represent replicates of at least three independent experiments. Errors bars indicate SD. In **C**) and **E**), statistically significant differences between G, G_{C11} and G_{C11-opt} are indicated by stars (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.00005$).

Optimization of G backbone by experimental evolution

We decided to perform experimental evolution to optimize the backbone of G so that it tolerates an N-terminal fusion with a nanobody. For this, we introduced the gene encoding G_{C11} in place of that encoding G in the viral genome to construct the rVSV-G_{C11} recombinant virus. The use of nanobody C11, which recognizes mCherry, in this construct was a carefully considered choice to avoid uncontrolled gain of function (GOF). We hypothesized that selection for mutations optimizing the G backbone for insertion of the C11 nanobody would also optimize the G backbone for insertion of other nanobodies. The resulting recombinant virus only formed small infection foci in the plaque assay (Figure 1F) and has a titer of $\sim 10^5$ pfu/ml (Table 1). We decided to serially passage the recombinant virus to select mutants with a better fitness. After 4 passages, mutation S422I (Table 1) has invaded the viral genome population with only minor changes in the infectious phenotype. After 7 passages, we observed a strong increase in the viral infectivity. This was due to the selection of a second mutation H22N (Table 1). No other mutation was detected after 10 passages and we decided to stop to passage the virus (Figure 1F). Of note, mutation S422I had been selected in a different context (as a compensatory mutation of the deleterious mutation H407A) and demonstrated to stabilize the prefusion state (19).

Passage	Viral titer	Mutation	Original codon	G _{C11-opt} codon
P1	8.5 10 ⁴ pfu/ml			
P2	1.5 10 ⁵ pfu/ml			
P3	1.4 10 ⁶ pfu/ml			
P4	1.1 10 ⁶ pfu/ml	S422I	AGT	ATT
P5	2.9 10 ⁶ pfu/ml			
P6	2 10 ⁶ pfu/ml			
P7	7 10 ⁷ pfu/ml	H22N	CAT	AAT
P8	7 10 ⁷ pfu/ml			
P9	9 10 ⁷ pfu/ml			

Table 1: Adaptation of rVSV-G_{C11}. Passage number with the corresponding titer on BSR cells and the identified mutation in G ectodomain. The original codon and the codon in G_{C11-opt} are indicated.

Characterization of recombinant rVSV-G_{C11-opt} and its glycoprotein

We characterized the resulting virus rVSV-G_{C11-opt} (opt for optimized indicating that G contains mutations H22N and S422I). We compared the one-step growth curve of rVSV-G_{C11-opt} with that of VSV WT. The titer of the recombinant virus after 16h of infection of BSR cells was ~10⁸ pfu/ml i.e. one log lower than that of VSV WT (Figure 1G).

We also investigated the structure of G_{C11-opt} at the surface of the recombinant virus using electron microscopy after negative staining. At pH 7.5, both G_{WT} and G_{C11-opt} formed the characteristic ~8-nm-wide layer (27). At pH 5.5, at the surface of the viral particles, the spikes were individualized, allowing the visualization of 12-nm-long spikes in their post-fusion conformation that stood perpendicular to the membrane (Figure 1H) (27). This indicated that G_{C11-opt} undergoes the low pH-induced structural transition.

We then verified the ability of G_{C11-opt} at the surface of the recombinant virus to bind to purified mCherry at pH 7.5 and 5.5. For this, the virus was incubated with mCherry at indicated pH before ultracentrifugation through a sucrose cushion. Under both pH conditions, mCherry was found associated with the recombinant virus but not with the WT virus in the pellet indicating G_{C11-opt} binds the mCherry via the C11 nanobody (Figure 1D). The C11 nanobody is thus folded and accessible in both the pre- and post-fusion states of G at the viral surface.

We also compared the surface expression of G_{C11-opt} with that of G_{WT} and G_{C11}. Cells were transfected with plasmids encoding the corresponding glycoproteins and the surface expression was quantified by flow cytometry using mAb 8G5F11. G_{C11-opt} was significantly more expressed at the cell surface than G_{C11}. Indeed, the median density of G_{C11-opt} protein present at the cell surface was 79 +/- 23% of that of G_{WT} (Figure 1B, 1C). Therefore, mutations H22N and S422I improve G transport to the surface.

Finally, we compared the ability of G_{C11-opt}, G_{WT}, and G_{C11} to pseudotype VSVΔG-GFP. Chimeric glycoproteins incorporation into the envelope of the viral particles was verified by western blot revealing that G_{C11-opt} chimera was more efficiently incorporated than G_{C11} (Figure 1D). Pseudotyped viruses were then used to infect HEK293T cells and their infectivity was analyzed by counting GFP-expressing cells using flow cytometry (Figure 1E). The infectious titer of the production of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{C11-opt} (~10^{6.95} pfu/ml) was slightly lower than that of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{WT} (~10^{7.3} pfu/ml) and ~0.85 log₁₀ (*i.e.* 7 fold) higher than that of the VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{C11} confirming that the two mutations H22N and S422I optimize the infectivity of the chimera.

Hydrophobic residues at position 422 combined with Asn at position 22 optimize G for nanobody insertion

The structure of VSV G ectodomain in its pre-fusion conformation reveals that residue S422 points toward F424 and L430. The selection of an isoleucine in position 422 probably stabilizes the β-hairpin structure through hydrophobic stacking of residues I422 between F424 and L430 (Figure 2A). The codon encoding S422 in the G_{WT} gene is AGU (Table 1) and the only codon encoding a hydrophobic residue that is accessible by a single nucleotide change is AUU encoding the isoleucine. Consequently, other hydrophobic amino acids were not directly accessible during experimental evolution. We decided to test the impact of other hydrophobic

amino acid residues (L, V, F, M) in this position. Thus, we replaced isoleucine 422 in $G_{C11-opt}$ by a leucine, a valine, a phenylalanine, or a methionine leading to constructs $G_{C11-opt-L422}$, $G_{C11-opt-V422}$, $G_{C11-opt-F422}$, and $G_{C11-opt-M422}$ (note that all these constructs contain the H22N mutation). We then analyzed the ability of these constructs to pseudotype VSV Δ G-GFP. The infectious titers of VSV Δ G-GFP pseudotyped with chimeric glycoproteins $G_{C11-opt-L422}$, $G_{C11-opt-V422}$, $G_{C11-opt-F422}$, or $G_{C11-opt-M422}$ were similar to that of VSV Δ G-GFP pseudotyped with $G_{C11-opt}$, significantly higher than that of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G_{C11} , but not significantly different from that of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G (Figure 2B). This demonstrated the importance of a hydrophobic residue at position 422 for optimizing G backbone for nanobody insertion.

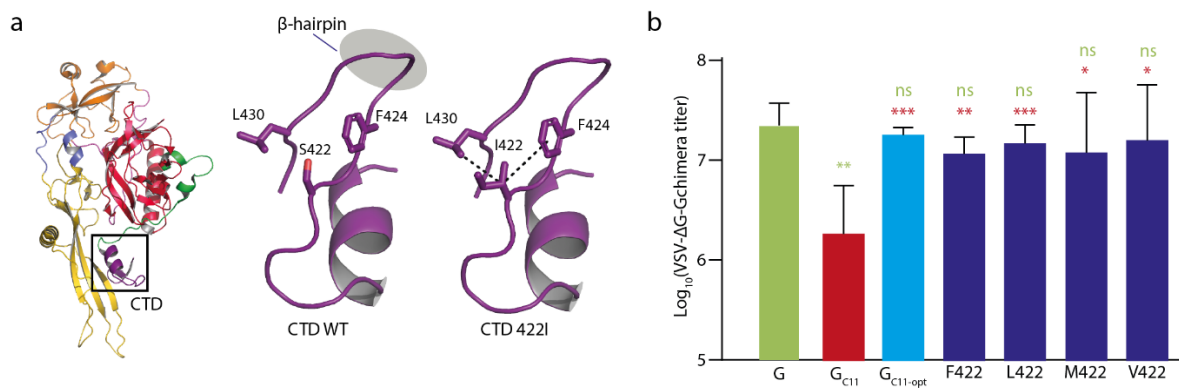


Figure 2: Hydrophobic residues at position 422 optimize G for nanobody insertion

A) Environment of residue S422 in the crystal structure of the prefusion conformation of VSV G. **B)** Mutation S422I stabilizes G C-terminal domain (CTD) through hydrophobic stacking with residues F424 and L430. **C)** Infectivity of VSV Δ G-GFP pseudotyped with G, G_{C11} , $G_{C11-opt}$, $G_{C11-opt-S422F}$, $G_{C11-opt-S422L}$, $G_{C11-opt-S422M}$, and $G_{C11-opt-S422V}$ in HEK293T cells. VSV Δ G-GFP viruses pseudotyped with G_{WT} or chimeras, produced in the same conditions (see material and methods), were used to infect HEK293T during 16 h. The percentage of infected cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry and used to calculate the viral titer. Data points represent replicates of five independent experiments. Errors bars indicate SD. Statistically significant differences with G_{C11} (resp. G) are indicated by red (resp. green) asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, ns not significant).

The optimized G backbone is functional for other nanobodies insertion

We investigated whether the double mutation H22N and S422I also improved the functionality of G chimeras with other nanobodies. For this, we inserted in the G_{WT} or G_{opt} backbones 4 other nanobodies from the same library (24): 8G5 directed against the carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule (CEACAM), 9C2 directed against mucin 1 protein (MUC1), C8 and A10 both targeting HER2 and 6 others (H1 to H6) also targeting HER2, whose sequences were available in databanks.

The resulting constructions were called G_{C8} , G_{8G5} , G_{A10} , G_{9C2} , G_{H1} G_{H2} G_{H3} G_{H4} , G_{H5} , and G_{H6} when the insertion was in the backbone of G_{WT} , and G_{C8-opt} , $G_{8G5-opt}$, $G_{A10-opt}$, $G_{9C2-opt}$, G_{H1-opt} , G_{H2-opt} , G_{H3-opt} , G_{H4-opt} , G_{H5-opt} , and G_{H6-opt} when the insertion was in the optimized G backbone containing the mutations H22N and S422I.

For each nanobody, we then compared the ability of the corresponding pair of chimeras (*i.e.* optimized or non-optimized) to pseudotype VSV Δ G-GFP. For this, HEK293T cells were infected by the viruses pseudotyped with the chimeras. For 9 nanobodies out of 11 (including C11), the infectivity in HEK293T cells of pseudotype production was enhanced when the nanobody was inserted in the optimized backbone. The enhancement factor varied from 6.5 to 29 depending on the nanobody. The geometric mean of the increase for these nine nanobodies was 11 (Figure 3A and table 2). For two chimeras (G_{8G5} and G_{9C2}), the optimized backbone had no significant effect on the infectivity of the chimera.

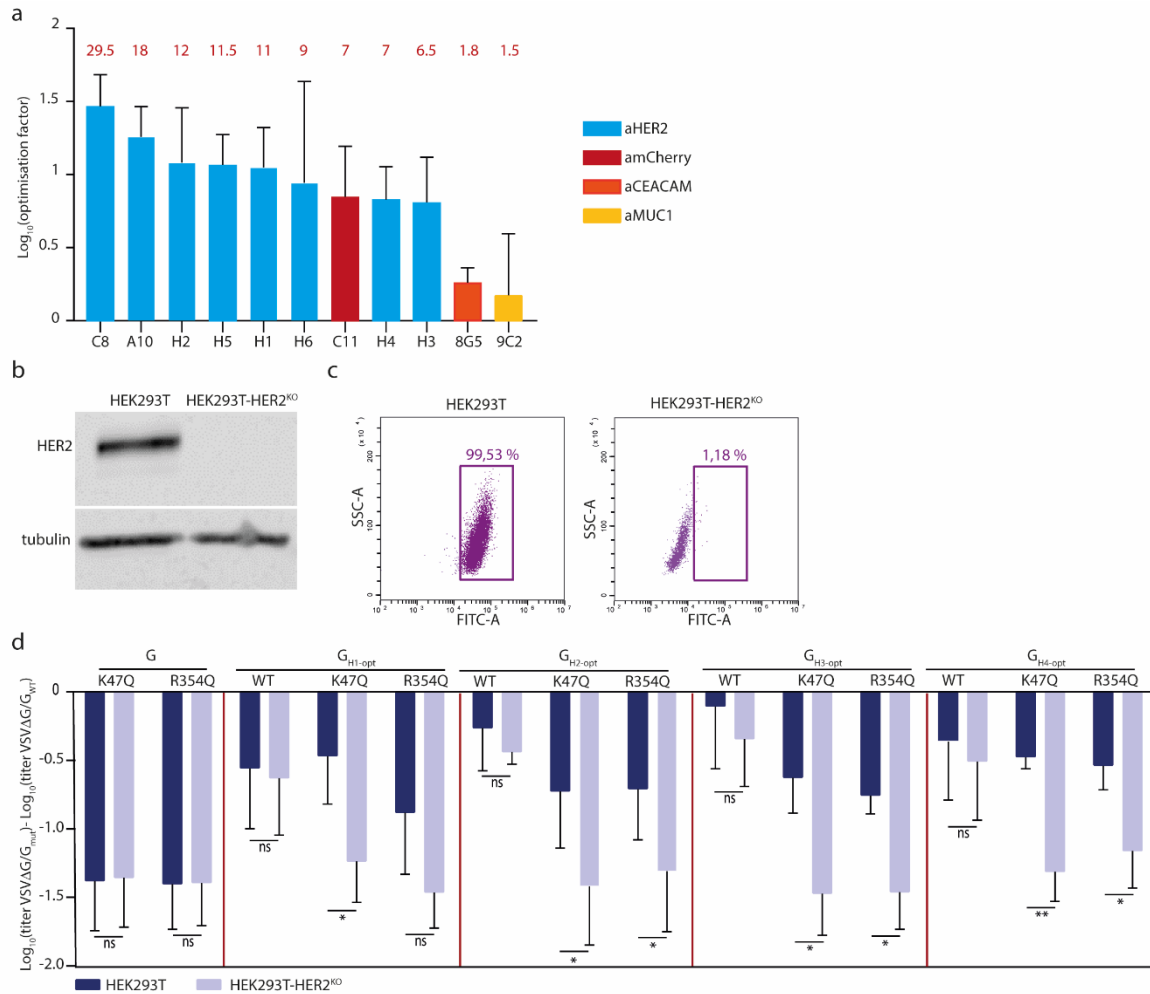


Figure 3: Retargeting of VSVΔG-GFP towards HER2-expressing cells

A) Optimization factor of the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with the chimeric G in the optimized backbone compared with VSVΔG-GFP pseudotyped with a chimera in a non-optimized backbone. VSVΔG-GFP viruses, produced in the same conditions (see material and methods) pseudotyped with chimeras in an optimized or non-optimized backbone were used to infect indicated cell lines during 16 h. The percentage of infected cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry and used to calculate the viral titer and used to calculate the viral titer. The histogram shows the mean difference between the Log₁₀ of the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with the optimized chimera and the Log₁₀ of the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with the non-optimized chimera. The factor of optimization is indicated in red for each chimera. **B)** Expression of HER2 in HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cells. Cell lysates were analysed by western blot with anti-HER2 and anti-tubulin antibodies. **C)** Cell surface expression of HER2 in HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cells. Expression of HER2 was analysed using flow cytometry with an anti-HER2 as a primary antibody and a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488. The percentage of HER2-positive cells is indicated. **D)** Infectivity in HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cells of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{K47Q}, G_{R354Q} or by optimized G chimeras fused to nanobodies H1 to H4 (recognizing HER2) in which mutations K47Q or R354Q have been introduced or not (WT). VSVΔG-GFP viruses pseudotyped with these glycoproteins were used to infect indicated cell lines during 16 h. The percentage of infected cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry and used to calculate the viral titer. The histogram indicates the Log₁₀ of the titer of viruses pseudotyped with mutated or chimeric Gs normalized to that pseudotyped with G_{WT} in the indicated cell line. The Log₁₀ of the titer of VSVΔG-GFP virus pseudotyped with G_{WT} was 7.37 +/- 0.34 in HEK293T and 7.39 +/- 0.38 in HEK293T-HER2^{KO} cells (n=13). **In A) and D)**, error bars represent the SD for experiments carried out in at least in triplicate (see also table 2 for A). All experiments were at least performed in triplicate. Statistically significant differences are indicated by stars (*p < 0.05, **p < 0.005, ns: not significant).

Nanobody	Log ₁₀ (optimization factor) +/- SEM	Optimization factor	Log ₁₀ (Titer of optimized pseudotype)	Target	n
C11	0.85 +/- 0.35	7	6.95 +/- 0.35	mCherry	16
C8	1,47 +/- 0.21	29,5	6.34 +/- 0.3	HER2	3
A10	1.26 +/- 0.21	18	6.08 +/- 0.27	HER2	3
H1	1.05 +/- 0.27	11	6.95 +/- 0.16	HER2	4
H2	1.08 +/- 0.38	12	6.75 +/- 0.19	HER2	5
H3	0.81 +/- 0.31	6,5	7.24 +/- 0.48	HER2	4
H4	0.83 +/- 0.22	7	7.23 +/- 0.48	HER2	4
H5	1.07 +/- 0.21	11,5	6.59 +/- 0.23	HER2	5
H6	0.94 +/- 0.69	9	6.71 +/- 0.46	HER2	3
8G5	0,26 +/- 0.1	1.8	4.94 +/- 0.31	CEACAM	3
9C2	0.17 +/- 0.42	1.5	5.18 +/- 0.43	Muc1	3

Table 2: Optimization factor for each chimera (indicated by its fused nanobody) in the optimized G backbone context versus the non-optimized G context in HEK293T cells. The titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with the optimized chimera is also indicated as well as the nanobody target and the number of experiments performed. The Log₁₀ of the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{WT} (used as a reference in each experiment) was 7.3 +/- 0.25 (n=16).

Retargeting of pseudotyped VSVΔG-GFP toward cells expressing HER2 receptor

We showed that the optimization mutations that we had selected with the G_{C11} chimera also improved most of the chimeras involving other nanobodies. However, all of these chimeras remain capable of recognizing the natural VSV receptor (LDL-R).

We therefore introduced the mutations K47Q or R354Q, abolishing receptor recognition by VSV G (20), in the optimized chimera in which G is fused with nanobodies directed against HER2. We chose to work with chimeras involving nanobodies H1 to H4 because these chimeras had the best infectious titers in their optimized version (Table 2). We thus constructed G_{H1-opt-K47Q}, G_{H1-opt-R354Q}, G_{H2-opt-K47Q}, G_{H2-opt-R354Q}, G_{H3-opt-K47Q}, G_{H3-opt-R354Q}, G_{H4-opt-K47Q}, and G_{H4-opt-R354Q}.

As HER2 was expressed at the surface of HEK293T (Figure 3B and 3C), we constructed a HEK293T-HER2^{KO} cell line in which the *ERBB2* gene (encoding HER2 protein) was knocked out (Figure 3B and 3C). We compared the infectivity of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{WT}, G mutants incapable of recognizing LDL-R (G_{K47Q} and G_{R354Q}) and the different chimeras involving nanobodies H1 to H4 (capable or not of recognizing LDL-R). As expected, the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{K47Q}, G_{R354Q}, was reduced by a factor of ~25 (1.4 Log₁₀) in both cell lines compared to G_{WT} (Figure 3D). The chimeric glycoproteins G_{H1-opt}, G_{H2-opt}, G_{H3-opt}, G_{H4-opt}, still able to recognize LDL-R, efficiently pseudotyped VSVΔG-GFP in both cell lines, nevertheless somewhat less efficiently than G_{WT} in agreement with table 2. Finally, the titer of VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{H1-opt-K47Q}, G_{H1-opt-R354Q}, G_{H2-opt-K47Q}, G_{H2-opt-R354Q}, G_{H3-opt-K47Q}, G_{H3-opt-R354Q}, G_{H4-opt-K47Q}, or G_{H4-opt-R354Q} was only slightly reduced in HEK293T compared to G_{WT} cells and similar to that of G_{K47Q}, G_{R354Q} in HEK293T-HER2^{KO} cells. This indicated that the entry in HEK293T cells of VSVΔG-GFP pseudotyped with the different chimeras involving nanobodies H1 to H4 and unable to recognize LDL-R is mediated by HER2 (Figure 3D).

Chimeras are also functional to retarget lentiviral vectors

VSV G is the most used viral glycoprotein to pseudotype lentivirus vectors. We decided to investigate if the chimera in which G, carrying the mutation K47Q or R354Q, is fused with nanobodies directed against HER2 could specifically redirect lentiviruses toward HER2-expressing cells. To do this, we compared the infectivity of GFP-encoding lentivirus pseudotyped with the different chimeras in HEK293T and HEK293T-HER2^{KO}. Infectivity was analyzed by counting GFP-expressing cells using flow cytometry (Figure 4A).

The results indicated that lentivirus pseudotyped with chimeras G_{H1-opt-K47Q}, G_{H1-opt-R354Q}, G_{H2-opt-K47Q}, G_{H2-opt-R354Q}, G_{H3-opt-K47Q}, G_{H3-opt-R354Q}, G_{H4-opt-K47Q}, or G_{H4-opt-R354Q} infected much more efficiently HEK293T than HEK293T-HER2^{KO} (Figure 4A). This indicated that the lentiviruses were retargeted against cells that express HER2.

This was confirmed using SKBR3 cells that express high level of HER2 at their surface (Figure 4B). Lentiviruses pseudotyped with chimeras G_{H1-opt-K47Q}, G_{H1-opt-R354Q}, G_{H2-opt-K47Q}, G_{H2-opt-R354Q}, G_{H3-opt-K47Q}, G_{H3-opt-R354Q}, G_{H4-opt-K47Q}, or G_{H4-opt-R354Q} infected more efficiently this cell line than those pseudotyped with G_{K47Q} or G_{R354Q}. Strikingly, retargeted lentiviruses (and in particular those pseudotyped with G_{H3-opt-K47Q} or G_{H3-opt-R354Q}) were nearly as efficient as those pseudotyped with G_{WT} (Figure 4C).

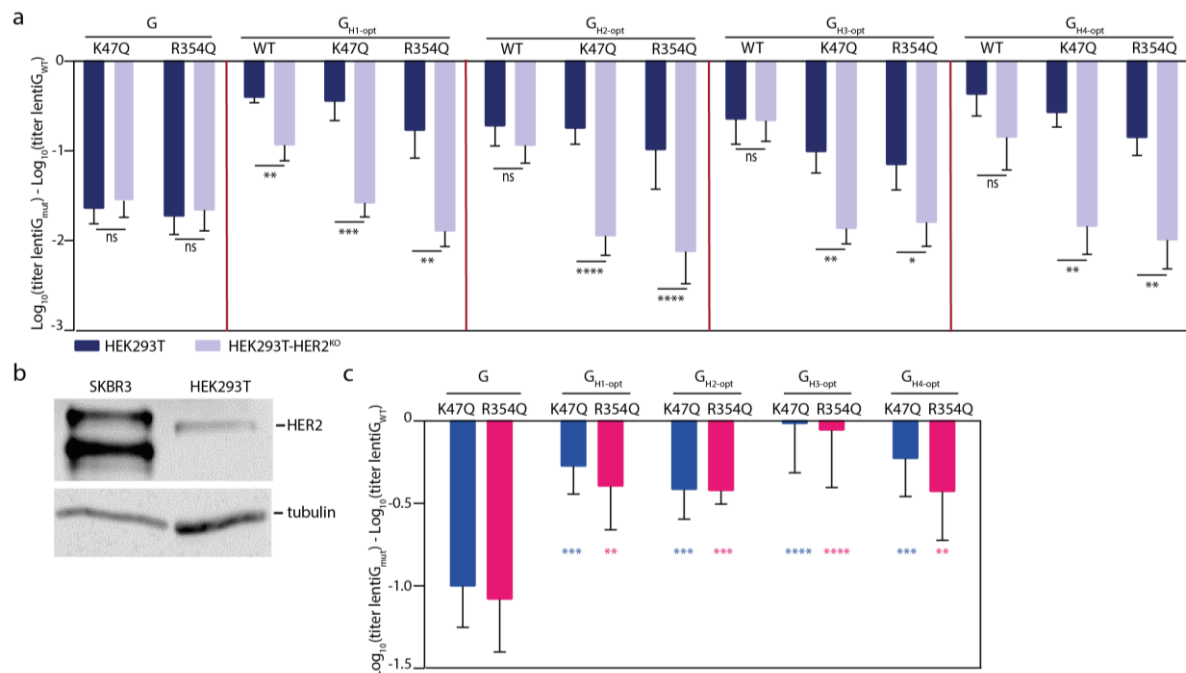


Figure 4: Infectivity of lentiviruses pseudotyped with G_{K47Q}, G_{R354Q} or by optimized G chimeras fused to nanobodies H1 to H4 (recognizing HER2) in which mutations K47Q or R354Q have been introduced or not (WT).

A) Comparison of infectivity of lentiviruses pseudotypes by the indicated G construct in HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cells. The percentage of transduced cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry 48h after transduction. The histogram indicates the Log₁₀ of the titer of lentiviruses pseudotyped with the indicated G construct normalised with the one pseudotyped with G_{WT}. The Log₁₀ of the titer of lentiviruses pseudotyped with G_{WT} was 6.89 +/- 0.22 in HEK293T and 6.83 +/- 0.22 (n=13) in HEK293T-HER2^{KO} cells.

B) Comparison of the expression of HER2 in HEK293T and SKBR3. Cell lysates were analysed by western blot with anti-HER2 and anti-tubulin antibodies.

C) Infectivity of lentiviruses pseudotyped with G_{K47Q}, G_{R354Q} or by optimized G chimeras fused to nanobodies H1 to H4 (recognizing HER2) in which mutations K47Q or R354Q have been introduced in SKBR3 cells. The percentage of transduced cells was measured by counting GFP expressing cells by flow cytometry 48h after transduction. The histogram indicates the Log₁₀ of the titer of lentiviruses pseudotyped with the indicated G construct normalised with the one pseudotyped with G_{WT}. The Log₁₀ of the titer of lentiviruses pseudotyped with G_{WT} was 5.8 +/- 0.15 (n=10) in SKBR3 cells.

In **A)** and **C)**, error bars represent the SD for experiments carried out in at least in triplicate. Statistically significant differences are indicated by stars (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005, ****p < 0.00005, ns: not significant). In **C)**, blue (resp. pink) stars indicate the significance of the difference between G_{K47Q} (resp. GR354Q) and the chimera having the same mutation.

Chimeras specifically target HER2 expressing cells

We then assessed the specificity of the retargeting. For this, we co-cultured HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cells. Each cell line constituted about half of the total cell population at the time of infection by VSVΔG-GFP pseudotyped with different forms of G (Figure 5). VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{WT} infected HEK293T and HEK293T-HER2^{KO} cell lines equally efficiently whereas those pseudotyped with G_{K47Q} and G_{R354Q} were virtually unable to infect either cell line (Figure 5). Interestingly, confirming our previous results, VSVΔG-GFP pseudotyped with G_{H2-opt-K47Q}, G_{H2-opt-R354Q}, G_{H3-opt-K47Q}, G_{H3-opt-R354Q}, G_{H4-opt-K47Q}, or G_{H4-opt-R354Q} selectively infected HEK293T cells in the mixed population. A selectivity index can be calculated by dividing the proportion of infected HEK293T cells by the proportion of infected HEK293T-HER2^{KO} cells. The selectivity indexes of the VSVΔG-GFP pseudotyped with the chimeras ranges from 2.23 for G_{H1-opt-47Q} to 5.18 for G_{H3-opt-K47Q} (Figure 5B).

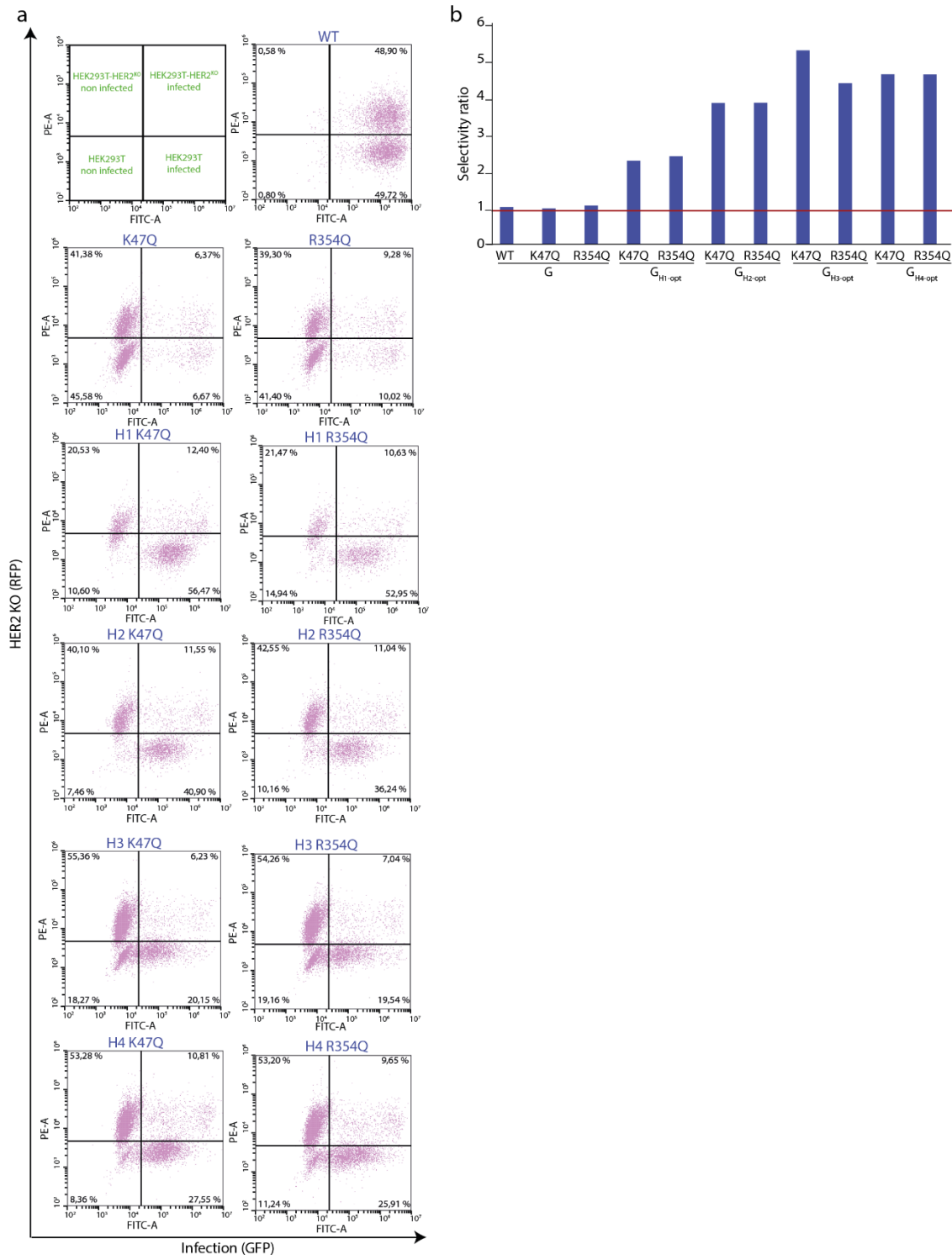


Figure 5: VSV pseudotyped with optimized G_{K47Q} or G_{R354Q} chimeras fused to nanobodies H1 to H4 (recognizing HER2) preferentially infect HEK293T WT cells. **A)** A mix of 50% of HEK293T and 50% of HEK293T-HER2^{KO} (expressing the RFP protein) was infected with VSVΔG-GFP pseudotyped with the indicated G construct. Infected cells were analysed by flow cytometry. Biparametric histograms represent in the x axis the intensity of GFP fluorescence and in the y axis the intensity of RFP. **B)** Selectivity index of VSVΔG-GFP pseudotyped with the chimeras. It was calculated using data shown in panel A) by dividing the proportion of infected HEK293T cells by the proportion of infected HEK293-HER2^{KO} cells.

Discussion

One of the major challenges of *in vivo* therapy, including oncovirotherapy and gene therapy, is to target specifically cells of interest. Indeed, the lack of specificity can lead to off-target toxicity but also, in the case of gene therapy (particularly Chimeric Antigen Receptor - CAR- therapies), to trapping of the vector in non-targeted cells. The identification of mutations in VSV G that abolish LDL receptor recognition without affecting fusion activity has opened the possibility of specifically targeting cells of interest.

Indeed, these mutants have been used in combination with a second transmembrane protein, that binds a ligand/receptor of interest, to pseudotype lentivirus, and specifically target them towards a given cell type (28–31). As second transmembrane protein, a dimerized, surface-tethered IL-13 allowed a specific infection of IL-13R α 1-expressing cells (30), while a transmembrane version of an anti-CD19 single-chain antibody fragment (scFv) efficiently infected CD19⁺ B cell lines, but not CD19⁻ T cell lines (30), as well as CD19-expressing HEK293T but not the parental HEK293T cell line (28).

Recently, a gene encoding VSV G, with mutations K47Q and R354Q, fused to a sequence coding for a scFv directed against HER2, was introduced in place of the G_{WT} gene into the genome of a recombinant VSV. The virus was then adapted through serial passages on HER2-expressing mouse mammary tumor line. The resulting virus has a 15- to 25-fold higher titer in HER2-expressing cell lines than in HER2-negative cells (32). Adaptive mutations occurred in both G and scFv and therefore are specific to the scFv used in the study.

Here, using experimental evolution, we selected two mutations that optimize G_{WT} backbone to tolerate an amino-terminal fusion with a nanobody recognizing mCherry. The choice of this nanobody (in a context of G still recognizing its natural receptor) had the advantage of limiting a possible GOF which would have allowed the virus to acquire a new

receptor (33). Interestingly, these mutations also improved the functionality of most chimeric constructs involving other nanobodies from several libraries. When used to pseudotype VSV Δ G-GFP, the optimized chimeric constructs showed a ~10 fold improvement over the non-optimized chimera. This is particularly interesting given the large number of nanobody libraries available, potentially enabling the targeting of virtually any receptor of interest provided it can induce endocytosis of the viral particle.

Remarkably, the S422I mutation emerged in another context to compensate for the H407A mutation, which abolished the fusion properties of G (19). This mutation stabilizes a β -hairpin structure through hydrophobic stacking of residues I422 between F424 and L430 (19). Here, we show that all hydrophobic residues at this position have the same chimera-optimizing effect suggesting that stabilization of the structural motif is also important in this context. On the other hand, we do not have any molecular explanation for the selection of mutation H22N.

Last but not least, after introducing the K47Q and R354Q mutations in the context of fusion-optimized chimeras with four nanobodies recognizing HER2, we established the proof of concept that it is possible to specifically redirect the infection of pseudotyped VSV or pseudotyped lentiviruses towards this receptor. This specificity is only 5-fold, which may seem limited. However, HEK293T cells do not express much of this receptor on their surface, the specificity could be much greater in the context of a tumor within which cancer cells can express very high levels of this receptor (25). Even using HEK293T cells, our test done using mix population of positive and negative cells showed the capacity of retargeted viruses to specifically infect the subpopulation of positive cells.

Overall, the introduction of the two mutations H22N and S442I (or any other hydrophobic aa in position 422) will therefore make it possible to have functional chimeric glycoproteins both for pseudotyping VSV and lentiviruses, or even for constructing replicative recombinant VSVs, targeting any receptor of interest through the nanobody. These chimera can

also be incorporated into the membrane of extracellular vesicles so that they specifically release their cargo into cells of interest for therapeutic purpose (34,35). Of note, it is known that VSV G pseudotyped lentiviruses are poorly effective in infecting certain cell types that do not express LDL-R on their surface (36). The set-up described here may thus also be used in the context of *ex vivo* gene therapy using a mutant chimeric G targeting a receptor of interest different from the LDLR.

Material and methods

Cell lines

BSR, a clone of BHK-21 (baby hamster kidney; ATCC CCL-10), and HEK293T (human embryonic kidney expressing simian virus 40 T antigen (SV40T); ATCC CRL-3216) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). SKBR3 (Human Breast Cancer Cell Line; ATCC HTB-30) cells were grown in McCoy's 5A (Modified) Medium supplemented with 10% FCS.

Antibodies

Mouse monoclonal antibody directed against VSV G ectodomain was supplied by KeraFAST (8G5F11, dilution 1/1500) and used in cytometry. Mouse anti VSV G (SAB4200695, dilution 1/5000) was purchased from Sigma-Aldrich and used for western blot analysis. Mouse monoclonal 24A1 antibody (kindly provided by Robin Weiss) was used to detect VSV nucleoprotein by immunofluorescence. Mouse anti-HER2 (MA512759, dilution 1/200) was purchased from Invitrogen and used in cytometry. Mouse anti-HER2 (MA513105, dilution 1/200) was purchased from Invitrogen and used in western blot analysis. Goat anti-mouse Alexa fluor 488 (10696113, dilution 1/1000) was purchased from Invitrogen and used as secondary antibody in cytometry. Goat anti-mouse IgG coupled to peroxidase (A4416, dilution 1/5000) was purchased from Merck and used as secondary antibody in western blot analysis.

Plasmids and cloning

The cDNAs of nanobodies directed against HER2 (H1, H2, H3, H4, H5 and H6) were ordered from Eurofins genomics or Twist Bioscience according to the sequences found on the

NCBI database (H1: MP600335, H2: MP600344, H3: MP600340, H4: MP600341, H5: MP600327, H6: MP600331). Chimeric glycoproteins and mutations were created starting from the cloned VSV G gene (Indiana Mudd-Summer strain) in the pCAGGS plasmid (19). For this, overlapping fragments were amplified by PCR and the PCR products and the digested plasmid were assembled using Gibson Assembly kit (New England Biolabs) to obtain the resulting plasmid.

CRISPR/Cas9-mediated *ERBB2* gene knockout

ERBB2 gene (encoding HER2 protein) was knocked out using CRISPR/Cas9 KO and HDR (Homologous directed recombination) plasmids from Santa Cruz biotechnology (37). Briefly, HEK293T were transfected with 1 µg of a pool of three plasmids [CRISPR/Cas9 KO ErbB2/HER2 (h2) (sc-400138-KO-2)] each encoding Cas9 nuclease but distinct ERBB2-specific guide RNA and 1 µg of plasmid HDR [ErbB2/HER2 (h2) (sc-400138-HDR-2)] used for selection. HEK293T-HER2^{KO} cells were then selected using 0.75 µg/ml of puromycin. The invalidation of ERBB2 was confirmed by cytometry and western blot.

Cell surface expression

To quantify the expression of G protein on the cell surface, HEK293T cells plated on six-well dishes at 70% confluence were transfected with G-expressing plasmid using the calcium phosphate method. At 24 h after transfection, cells were detached with 1ml of 2% FCS in PBS (phosphate buffer saline, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7.4), 200 µl were harvested in a 96-well plate, followed by centrifugation at 350 g for 3 min. Cells were then incubated with a 1:1,500 dilution of mouse monoclonal anti-G antibody (8G5F11) in PBS at 4 °C for 30 min. Cells were washed twice in PBS, incubated with a 1:1000 dilution of goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) at 4°C for 30 min., and rinsed in PBS.

After resuspension in 100 μ l of 2% FBS-PBS, the fluorescence of 10,000 cells from each population was determined by flow cytometry using a Cytoflex S cytometer. The median fluorescence intensity (MFI) of the transfected cells expressing G was quantified by flow cytometry. The relative cell surface expression of transfected cells was determined as follows: (MFI for the mutant)/(MFI for the WT). For each mutant, the percentage given is the average of at least three independent experiments.

Generation of rVSV-G_{C11} recombinant

Plasmid pVSV-FL(+) expressing the 11,161-nucleotide (nt) positive-strand full-length VSV RNA sequence and plasmids pBS-N, pBS-P, and pBS-L, respectively, encoding N, P, and L proteins were kindly provided by John K. Rose (Yale University, New Haven, CT, USA). The chimeric G gene of the VSV Indiana serotype (Mudd-Summers strain) in fusion with that encoding the nanobody C11 was inserted into the original full-length genomic plasmid pVSV-FL(+) (38) using two unique restriction sites in pVSVFL(+), MluI in the 5' noncoding sequence of the glycoprotein (G) gene and NheI present in a sequence introduced between G and L genes, after removal of the corresponding VSV Indiana Mudd-Summers G gene. Recombinant rVSV-G_{C11} was recovered in BSR cells as described (39). Briefly, BSR cells were infected with recombinant vaccinia virus expressing bacteriophage T7 RNA polymerase (vTF7-3) at a multiplicity of infection of 10. After 1 h, BSR cells were co-transfected with the pVSV-FL(+), pBS-N, pBS-P, and pBS-L plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in the presence of 10 μ g/ml 1- β -d-arabinofuranosylcytosine (araC; Sigma). The recovery of the recombinant was supported by the expression of functional WT VSV G protein *in trans* from a plasmid (pcDNA3.1 G WT) which was cotransfected with plasmids pVSV-FL(+), pBS-N, pBS-P, and pBS-L.

Experimental evolution of rVSV-G_{C11} and sequencing

Experimental evolution rVSV-G_{C11} was achieved by serially passing virus at very low MOI ($\sim 3 \cdot 10^{-4}$) on BSR cells. At each passage, the virus was titrated by plaque assay. Infected cells were lysed 6 h post infection in RNAnow (Ozyme). RNA were extracted and mRNA were reverse transcribed using a T₁₂CAT primer and the cDNA corresponding to M and G mRNAs were amplified by PCR. The PCR fragments were sequence by the Sanger's method (Eurofins).

Virus purification

rVSV-G_{C11} was propagated on BSR cells. Sixteen hours post-infection, cell debris were eliminated from the supernatant by filtration (0.22 μ m). The virus was then pelleted by centrifugation at 4°C for 45 min at 25,000 rpm in a sw28 rotor (Beckman) and gently suspended in dilution buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA).

Preparation of VSV Δ G-GFP pseudotypes

HEK293T cells at 80% confluence were transfected by pCAGGS encoding WT or chimeric Gs using the calcium phosphate method. Twenty-four hours after transfection, cells were infected with VSV Δ G-GFP pseudotyped with VSV G_{WT} at an MOI of 3. One hour post infection, 1ml of complete DMEM (*i.e.* supplemented with 10% FCS and Penicillin/Streptomycin) was added. At two hours post infection (p.i.), cells were washed to remove residual viruses from the inoculum and 2ml of complete DMEM were added. Cell supernatants containing the pseudotyped viral particles were collected at 16 h p.i. and clarified by centrifugation at 4°C, 600 g, 15 min.

Titration of VSV Δ G-GFP pseudotypes

The infectious titers of pseudotyped VSV Δ G-GFP were calculated by counting cells expressing the GFP using a flow cytometer at 16 h p.i. and using the equation $MOI = -\ln[p(0)]$ where MOI is the multiplicity of infection and $p(0)$ is the proportion of non-infected cells.

Preparation of lentivirus pseudotypes

HEK-293T cells at 80% confluence were transfected by pCAGGS encoding G_{WT} or chimeric Gs, psPAX2 encoding HIV-1 gag and pol (12260 purchased from Addgene), and pHIV-eGFP encoding eGFP (21373 purchased from Addgene) using polyethylenimine (PEI_{Max}; Polyscience) at 1mg/ml. At 18 h after transfection, media was replaced with fresh complete DMEM. After 28 h, cell supernatants containing the pseudotyped viral particles were collected. Supernatants were clarified by centrifugation at 4°C, 600 g, 15 min.

Titration of lentivirus pseudotypes

The infectious titers of the pseudotyped lentiviruses were calculated by counting cells expressing the GFP using a flow cytometer at 48 h post transduction and using the equation $MOI = -\ln[p(0)]$ where MOI is the multiplicity of infection and $p(0)$ is the proportion of non-infected cells.

Western blot analysis

Supernatant containing VSV Δ G-GFP pseudotypes were harvested and centrifuged at 2500 rpm during 15 min. at 4°C. Clarified supernatant were concentrated by ultracentrifugation at 40,000 g during 45 min. at 12°C. After resuspension of the pellets in 100 μ l of TNE (20 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) buffer, 60 μ l were harvested and after the addition of 20 μ l of Laemmli Buffer, pseudotyped viruses were lysed at 95°C.

HEK293T, HEK293T-HER2^{KO} and SKBR3 cells were centrifugated at 600 g for 10 min. at 4°C. Pellets were resuspended using RIPA buffer (Tris-HCL 25 mM pH 8.8, NaCl 50 mM, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS) and a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostic, #11-836-170-001) and incubated on ice for 30 min. before 2 min. of centrifugation at 9500 g. Lysed extracts were denatured in Laemmli Buffer at 95°C.

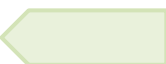
For the western blot, proteins were separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE and electro-transferred into a nitrocellulose membrane before blocking of the membrane with 5% of skimmed milk in Tris Buffer Saline (TBS, pH 7.5 #ET220-B, Euromedex), supplemented with 0,1% Tween 20, for 45 min. at room temperature. The membranes were then incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies in TBS, 0,1% Tween20, 5% skimmed milk. After the incubation, membranes were rinsed three times with TBS 0,1% Tween20 and incubated with the secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing, the membranes were scanned with the Odyssey infrared imaging system (LI-COR, Lincoln, NE)

Electron microscopy

Samples of purified virions diluted in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, or dialyzed against a buffer containing 150 mM NaCl and 50 mM MES at pH 5.5, were analyzed by conventional electron microscopy using the negative staining method. Three microliters of sample suspension were deposited on an air glow-discharged 400 mesh copper carbon-coated grid for 1 minutes. The excess of liquid was blotted, and the grid stained with sodium phosphotungstic acid adjusted to pH (7.5 or 5.5). The grids were visualized at 100 kV with a Tecnai 12 Spirit transmission electron microscope (Thermo Fisher, New York NY, USA) equipped with a K2 Base 4k x 4k camera (Gatan, Pleasanton CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Prism (GraphPad software). Data comparison was performed using Student t-test. Statistical details of experiments are indicated in the figure legends. Results are indicated as mean \pm SD.



Acknowledgements

This work was supported by a grant from a grant from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), France, to YG (EQU202103012746), a grant from l'Agence pour la Recherche sur le Cancer (ARC), France, to AAA and by a grant from la Banque Publique d'Investissement (Projet ETINCELL) including a salary for ID. The work in FP lab work was supported by the CNRS and by the Institut Curie as well as by Labex Cell(n)Scale (ANR-10-LBX-0038 part of the IDEX PSL no. ANR-10- IDEX-0001-02. The authors would like to thank Sandrine Moutel from the Antibody facility of the Institute Curie for the kind gift of specific nanobody sequences.

Competing interests

The mutants described in this work are the subject of a patent application by CNRS on which H.R., F.P., A.A. and Y.G. are named as inventors.

References

1. Gao Y. Oncolytic Therapy of Solid Tumors by Modified Vesicular Stomatitis Virus. *DNA Cell Biol.* févr 2024;43(2):57-60.
2. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* juill 2000;6(7):821-5.
3. Zhang Y, Nagalo BM. Immunovirotherapy Based on Recombinant Vesicular Stomatitis Virus: Where Are We? *Front Immunol.* 2022;13:898631.
4. Huang TG, Ebert O, Shinozaki K, García-Sastre A, Woo SLC. Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* sept 2003;8(3):434-40.
5. Ebert O, Shinozaki K, Huang TG, Savontaus MJ, García-Sastre A, Woo SLC. Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res.* 1 juill 2003;63(13):3605-11.
6. Balachandran S, Barber GN. Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life.* août 2000;50(2):135-8.
7. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell.* oct 2003;4(4):263-75.
8. Gutierrez-Guerrero A, Cosset FL, Verhoeven E. Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. *Viruses.* 11 sept 2020;12(9):1016.
9. Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.* août 2005;5(4):387-98.
10. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 avr 2013;110(18):7306-11.
11. Quiroz E, Moreno N, Peralta PH, Tesh RB. A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am J Trop Med Hyg.* sept 1988;39(3):312-4.
12. Hastie E, Cataldi M, Marriott I, Grdzlishvili VZ. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* sept 2013;176(1-2):16-32.
13. Johnson JE, Nasar F, Coleman JW, Price RE, Javadian A, Draper K, et al. Neurovirulence properties of recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates. *Virology.* 30 mars 2007;360(1):36-49.
14. Belot L, Albertini A, Gaudin Y. Structural and cellular biology of rhabdovirus entry. *Adv Virus Res.* 2019;104:147-83.

15. Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J Virol.* janv 2009;83(1):440-53.
16. Cureton DK, Massol RH, Saffarian S, Kirchhausen TL, Whelan SPJ. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog.* avr 2009;5(4):e1000394.
17. Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science.* 9 févr 2007;315(5813):843-8.
18. Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science.* 14 juill 2006;313(5784):187-91.
19. Beilstein F, Abou Hamdan A, Raux H, Belot L, Ouldali M, Albertini AA, et al. Identification of a pH-Sensitive Switch in VSV-G and a Crystal Structure of the G Pre-fusion State Highlight the VSV-G Structural Transition Pathway. *Cell Rep.* 18 août 2020;32(7):108042.
20. Nikolic J, Belot L, Raux H, Legrand P, Gaudin Y, Albertini A. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. *Nat Commun.* 12 mars 2018;9(1):1029.
21. Desmyter A, Spinelli S, Roussel A, Cambillau C. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Curr Opin Struct Biol.* juin 2015;32:1-8.
22. Frecot DI, Froehlich T, Rothbauer U. 30 years of nanobodies - an ongoing success story of small binders in biological research. *J Cell Sci.* 1 nov 2023;136(21):jcs261395.
23. Liu B, Yang D. Easily Established and Multifunctional Synthetic Nanobody Libraries as Research Tools. *Int J Mol Sci.* 27 janv 2022;23(3):1482.
24. Moutel S, Bery N, Bernard V, Keller L, Lemesre E, de Marco A, et al. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife.* 19 juill 2016;5:e16228.
25. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S15-19.
26. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 15 sept 2010;146(3):264-75.
27. Libersou S, Albertini AAV, Ouldali M, Maury V, Maheu C, Raux H, et al. Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J Cell Biol.* 4 oct 2010;191(1):199-210.
28. Hamilton JR, Chen E, Perez BS, Sandoval Espinoza CR, Kang MH, Trinidad M, et al. In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles. *Nat Biotechnol.* 11 janv 2024;
29. Berckmueller K, Thomas J, Taha EA, Choo S, Madhu R, Kanestrom G, et al. CD90-targeted lentiviral vectors for HSC gene therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 4 oct 2023;31(10):2901-13.

30. Dobson CS, Reich AN, Gaglione S, Smith BE, Kim EJ, Dong J, et al. Antigen identification and high-throughput interaction mapping by reprogramming viral entry. *Nat Methods*. avr 2022;19(4):449-60.
31. Streibinger D, Frangieh CJ, Friedrich MJ, Faure G, Macrae RK, Zhang F. Cell type-specific delivery by modular envelope design. *Nat Commun*. 23 août 2023;14(1):5141.
32. Gao Y, Bergman I. Vesicular Stomatitis Virus (VSV) G Glycoprotein Can Be Modified to Create a Her2/Neu-Targeted VSV That Eliminates Large Implanted Mammary Tumors. *J Virol*. 29 juin 2023;97(6):e0037223.
33. Dance A. The shifting sands of « gain-of-function » research. *Nature*. oct 2021;598(7882):554-7.
34. Zeng W, Zheng L, Li Y, Yang J, Mao T, Zhang J, et al. Engineered extracellular vesicles for delivering functional Cas9/gRNA to eliminate hepatitis B virus cccDNA and integration. *Emerg Microbes Infect*. déc 2024;13(1):2284286.
35. Zhang X, Xu Q, Zi Z, Liu Z, Wan C, Crisman L, et al. Programmable Extracellular Vesicles for Macromolecule Delivery and Genome Modifications. *Dev Cell*. 21 déc 2020;55(6):784-801.e9.
36. Amirache F, Lévy C, Costa C, Mangeot PE, Torbett BE, Wang CX, et al. Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood*. 27 févr 2014;123(9):1422-4.
37. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. nov 2013;8(11):2281-308.
38. Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 mai 1995;92(10):4477-81.
39. Schnell MJ, Buonocore L, Whitt MA, Rose JK. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J Virol*. avr 1996;70(4):2318-23.

III. Résultats complémentaires

III.1. Sensibilité de l'infection de VSVΔG-GFP pseudotypés par différentes G chimériques à l'incubation avec le domaine CR2 ou une forme de HER2 soluble.

Principe de l'expérience

Avant l'obtention de la lignée stable de HEK293T-HER2^{KO}, nous avons souhaité démontrer que les VSVΔG-GFP pseudotypés avec les G_{H2-opt-K47Q} et G_{H2-opt-R354Q} étaient capables d'infecter des cellules HEK293T en utilisant le récepteur HER2. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'inhibition de l'entrée en utilisant des versions solubles du LDLR (domaine CR2 couplé à la GST et produit en bactérie) ou de l'ectodomaine de HER2.

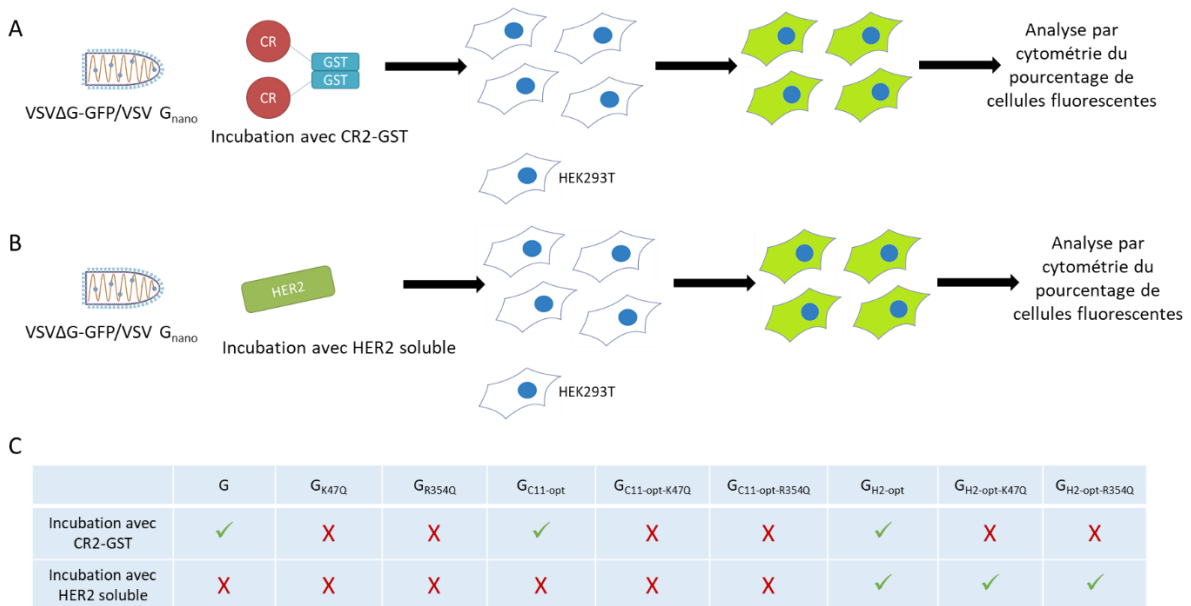


Figure 36: Tests de compétition avec les protéines solubles. A. Test de compétition avec le domaine CR2. Les VSV pseudotypés avec les G_{nano} ont été incubés avec 5μm de domaine CR2. Les cellules ont ensuite été infectées avec le mélange. Le pourcentage de cellules infectées a été détecté, via l'expression de la GFP, par cytométrie et le titre viral a été calculé à partir de ce pourcentage. B. Test de compétition avec l'ectodomaine de HER2. Les VSV pseudotypés avec les G_{nano} ont été incubés avec 50nm d'ectodomaine de HER2. Les cellules ont ensuite été infectées avec le mélange. Le pourcentage de cellules infectées a été détecté, via la GFP, par cytométrie et un titre viral a été calculé à partir de ce pourcentage. C. Tableau illustrant la sensibilité attendue des VSVΔG-GFP pseudotypés avec les glycoprotéines indiquées à CR2-GST et HER2 soluble. Les croix indiquent une insensibilité et les coches (✓) représentent une sensibilité.

Nous avons incubé des VSVΔG-GFP pseudotypés par G_{H2-opt-K47Q} ou G_{H2-opt-R354Q} (tous deux ne reconnaissant plus le LDLR) ou par G_{H2-opt}, soit avec 5μM de domaine CR2, soit

avec 50nM d'ectodomaine de HER2. En comparant l'entrée des virus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ ou $G_{H2-opt-R354Q}$, avec ceux pseudotypés par G_{H2-opt} , dans le contexte des différentes incubations, nous devions pouvoir mettre en évidence une entrée strictement dépendante de HER2 pour les virus pseudotypés par les mutants $G_{H2-opt-K47Q}$ ou $G_{H2-opt-R354Q}$. Cette entrée ne devrait pas être sensible à la présence de CR2-GST, mais être inhibée par la présence d'HER2 soluble (Figure 35).

Résultats

Nous avons observé que tous les virus pseudotypés par une glycoprotéine capable de reconnaître le LDLR (G_{WT} , $G_{C11-opt}$, et G_{H2-opt}) étaient sensibles à l'inhibition par CR2-GST. Cependant, cette sensibilité était beaucoup moins importante pour les virus pseudotypés par G_{H2-opt} , suggérant qu'ils pouvaient utiliser un autre récepteur, probablement HER2.

Tous les virus pseudotypés par une glycoprotéine incapable de reconnaître le LDLR (G_{K47Q} et G_{R354Q} , $G_{C11-opt-K47Q}$ et $G_{C11-opt-R354Q}$ et $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$) étaient insensibles à l'incubation avec CR2-GST (Figure 36). Néanmoins, ces pseudotypes étaient globalement peu infectieux, à l'exception notable des virus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ confirmant ces derniers pouvaient utiliser un autre récepteur, probablement HER2.

Dans un second temps, nous avons réalisé une expérience similaire en incubant les virus pseudotypés avec l'ectodomaine du récepteur HER2. Cette fois-ci, les virus pseudotypés avec G , G_{K47Q} , G_{R354Q} , $G_{C11-opt}$, $G_{C11-opt-K47Q}$, $G_{C11-opt-R354Q}$ ne montraient pas de différence d'infectiosité, qu'ils aient été incubés ou non avec HER2 (Figure 37). En revanche, le virus pseudotypé par G_{H2-opt} montrait une diminution significative de son infectiosité, suggérant qu'ils utilisaient effectivement le récepteur HER2. Finalement, nous n'avons pas observé de différence significative d'infectiosité pour les virus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$.

Ces expériences nous ont permis de formuler l'hypothèse que nos glycoprotéines G chimériques étaient probablement reciblées vers HER2, une hypothèse que nous avons confirmée dans l'article en utilisant une lignée de cellules KO pour ce récepteur.

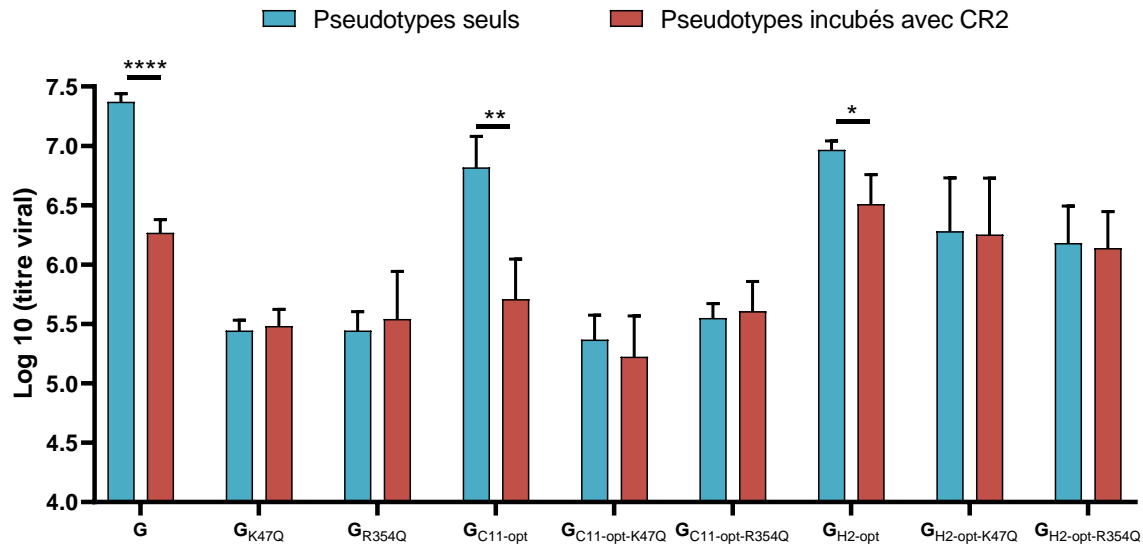


Figure 37: Infectiosité des VSV pseudotypés avec les G_{H2-opt} , $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ après incubation avec CR2-GST dans des cellules HEK293T. L'infectiosité est représentée par le logarithme à base 10 de la moyenne des titres viraux. En bleu, est représenté le titre viral des VSV pseudotypés sans incubation avec CR2-GST. En rouge est représenté le titre viral des VSV pseudotypés incubés avec le domaine CR2-GST. Les expériences ont été réalisées quatre fois. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la moyenne. Les différences statistiques sont indiquées par les astérisques (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).

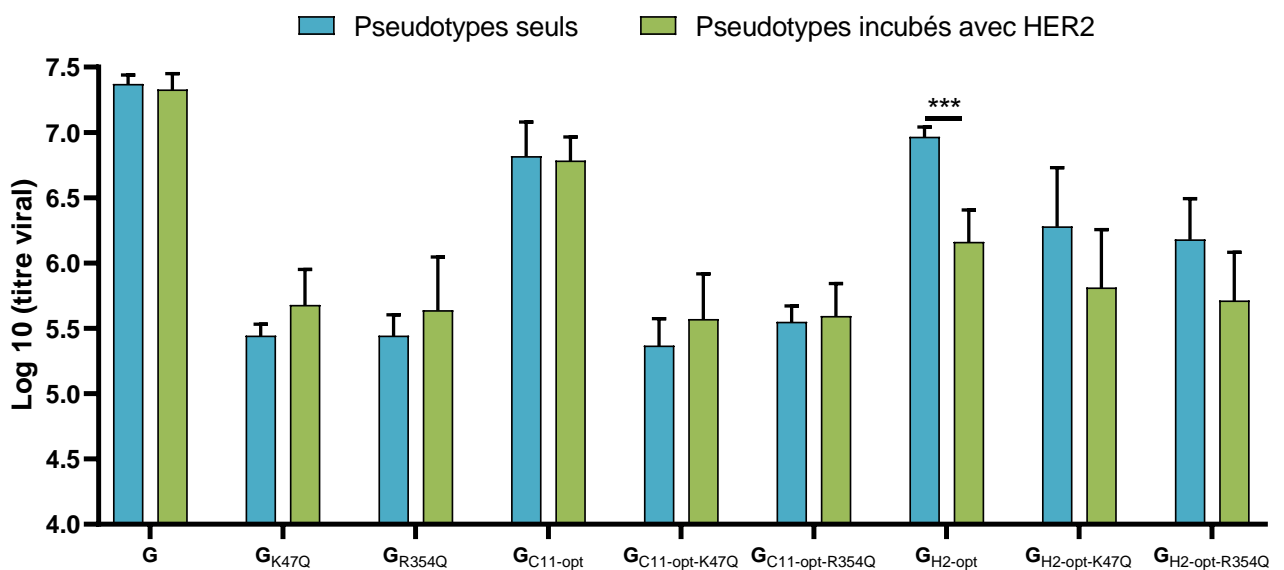


Figure 38: Infectiosité des VSV pseudotypés avec les G_{H2-opt} , $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ après incubation avec l'ectodomaine de HER2 dans des cellules HEK293T. L'infectiosité est représentée par le logarithme à base 10 de la moyenne des titres viraux. En bleu, est représenté le titre viral des VSV pseudotypés sans incubation. En vert, est représenté le titre viral des VSV pseudotypés incubés avec l'ectodomaine de HER2. Les expériences ont été réalisées quatre fois. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la moyenne. Les différences statistiques sont indiquées par les astérisques (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).

III.2. Les lentivirus pseudotypés avec $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ sont reciblés vers HER2 dans des cellules HAP-1 HER2+

Principe de l'expérience

Dans l'article, nous avons mis en évidence une infectiosité réduite des VSV et lentivirus pseudotypés avec les constructions $G_{H2-opt-K47Q}$, $G_{H2-opt-R354Q}$, $G_{H3-opt-K47Q}$, $G_{H3-opt-R354Q}$, $G_{H4-opt-K47Q}$, ou $G_{H4-opt-R354Q}$ dans les HEK293T-HER2^{KO} par rapport aux cellules HEK293T.

Ces résultats suggéraient un reciblage efficace de G vers HER2. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé des cellules HAP-1, qui n'expriment pas naturellement HER2. A partir de cette lignée, nous avons généré une lignée de cellules HAP-1 exprimant le récepteur HER2 en les transduisant avec un lentivirus codant pour le gène ErbB2.

Résultats

L'expression du récepteur HER2 dans ces cellules HAP-1^{HER2+} a été validée par immunoblot et par cytométrie en flux (Figure 38 A et B).

Nous avons ensuite comparé l'infection de lentivirus pseudotypés avec $G_{H2-opt-K47Q}$ ou $G_{H2-opt-R354Q}$ dans les cellules HAP-1^{HER2+} et dans la lignée HAP-1 parentale.

Nous avons observé une diminution significative de l'infectiosité des lentivirus pseudotypés avec G_{K47Q} et G_{R354Q} d'environ un facteur 65 (1,8 Log₁₀) dans les deux types cellulaires, comparé à G_{WT} (Figure 38 C). Bien que G_{H2-opt} puisse pseudotyper les lentivirus, son efficacité restait inférieure à celle de G_{WT} . L'infectiosité des lentivirus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ était encore plus réduite, par rapport à G_{WT} (~ 2,1 Log₁₀) et G_{H2-opt} (~ 1,1 Log₁₀) dans les cellules HAP-1.

Finalement, dans les cellules HAP-1^{HER2+}, nous avons observé une augmentation de l'infectiosité d'un peu plus d'un facteur 10 (~ 1,07 Log₁₀) pour les lentivirus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$, restaurant ainsi l'infectiosité au niveau de G_{H2-opt} .

Ces résultats confirment le reciblage de G vers HER2 dans un autre type cellulaire n'exprimant pas HER2 naturellement.

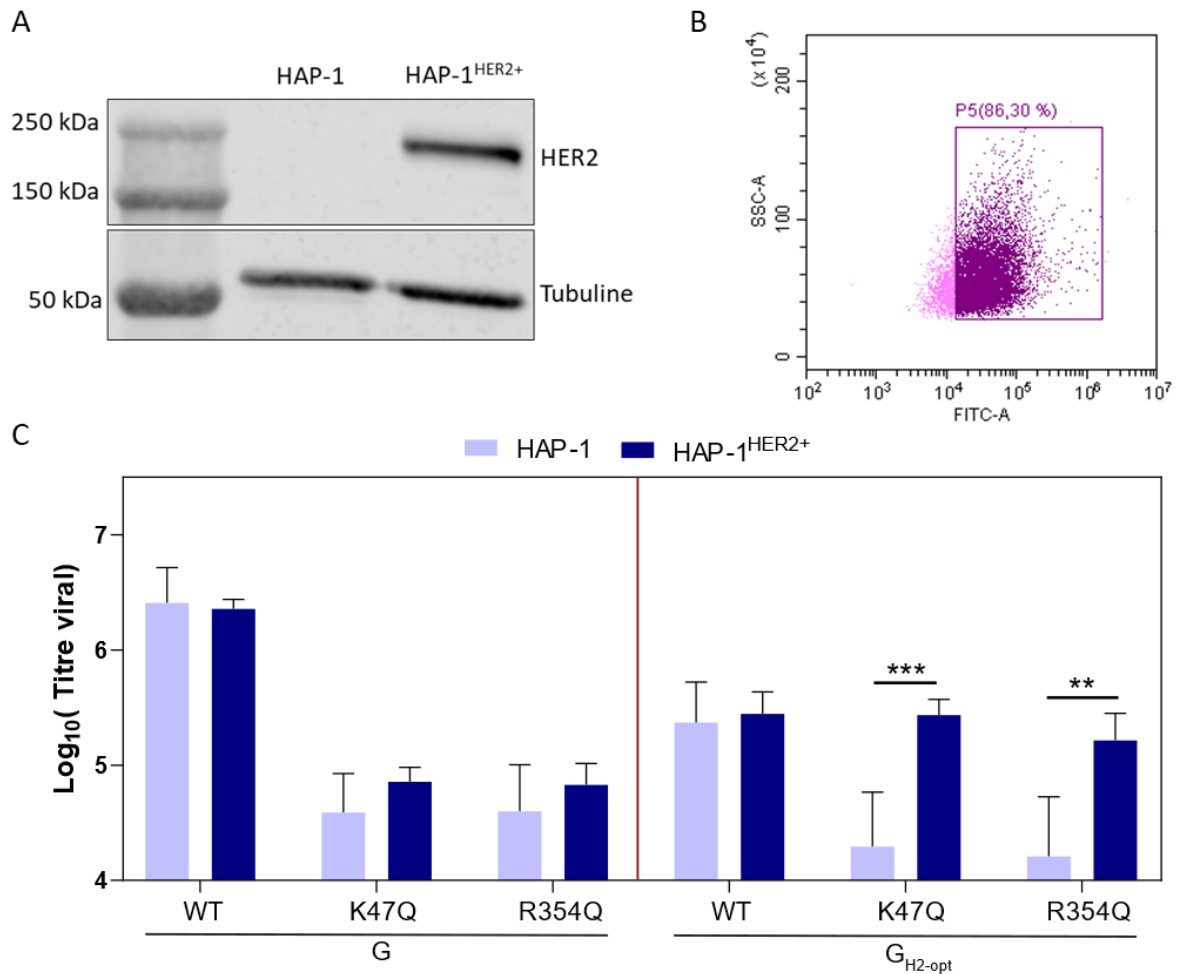


Figure 39: Recyclage des lentivirus pseudotypés avec $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ vers les cellules HAP-1^{HER2+}. A. Taux d'expression du récepteur HER2 et de la tubuline dans des cellules HAP-1 sauvages et HAP-1^{HER2+} détecté par immunoblot. B. Expression du récepteur HER2 à la surface des cellules HAP-1^{HER2+} analysée par cytométrie. SSC-A : Side Scatter (granulosité cellulaire). FITC-A : cellules marquées par l'anti-HER2. C. Infectiosité des lentivirus pseudotypés avec les G indiqués dans les cellules HAP-1 et HAP-1^{HER2+}. L'infectiosité est représentée par le logarithme à base 10 de la moyenne des titres viraux. En bleu clair, est représentée l'infectiosité des lentivirus pseudotypés dans les cellules HAP-1 sauvages, et en bleu foncé dans les cellules HAP-1^{HER2+}. Les expériences ont été réalisées six fois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne. Les différences statistiques sont indiquées par les astérisques (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

IV. Matériel et méthodes

Cellules

Les cellules HEK293T (cellules humaines embryonnaires de reins transformées par l'antigène T du virus simien (SV40T) ; ATCC #CRL-3216) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco-Life Technologies) complété par 10% de de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 unités/ml de Pénicilline et 100 unités/ml de Streptomycine (P/S). La lignée parentale HAP-1 (Horizon Discovery #C631) a été cultivée dans du milieu IMDM (Iscove's Modification from DMEM) complété par 10% de SVF et 100 unités/ml de Pénicilline et 100 unités/ml de Streptomycine.

Plasmides et clonage

La séquence du nanobody H2 dirigé contre HER2 a été commandée chez Eurofins genomics (NCBI : MP600344). Le plasmide pCAGGS codant pour le gène de VSV G (souche Indiana Mudd-Summer) a été utilisé pour construire les différents plasmides comprenant les protéines chimériques et les mutations. Pour cela des fragments chevauchants ont été amplifiés par PCR. Les produits de PCR et le plasmide (linéarisé par EcoRI) sont assemblés en utilisant le Kit d'assemblage Gibson (NEB Builder) de chez New England Biolab.

Anticorps

L'anticorps primaire anti-HER2 (MA512759, dilution 1/200) provient de chez Invitrogen et a été utilisé pour l'analyse par cytométrie en flux. L'anticorps primaire anti-HER2 (MA513105, dilution 1/200) provient de chez Invitrogen et a été utilisé pour l'analyse par immunoblot.

L'anticorps secondaire goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (dilution 1/1000) provient de chez Molecular Probes et a été utilisé pour l'analyse par cytométrie en flux. L'anticorps secondaire (dilution 1/5000) couplé à la l'horseradish peroxidase (HRP) provient de chez Merck et a été utilisé pour l'analyse par immunoblot (anticorps secondaire anti-souris IgG, HRP).

Lignée stable HAP-1 HER2+

Des cellules HAP-1 à 80% de confluence ont été transduites avec un vecteur lentiviral codant pour le gène ErbB2 (NP_004439.2) à différentes multiplicités d'infection (MOI :1, 3, 5 et 10). 72 heures après la transduction, les cellules ont été soumises à une sélection

en ajoutant 10mg/ml de Néomycine (Merck #N1142-20ML) pendant 3 jours dans le milieu. Le milieu a été changé tous les 2 jours. Après sélection, les cellules exprimant HER2 ont été marquées avec un anticorps anti-HER2 (dilution 1/200 #MA512759) et les cellules positives pour HER2 ont été isolées par cytométrie en flux pour isoler une population enrichie. Le tri a été réalisé sur un cytomètre en flux MoFlo Astrios EQ sorter (Beckman-Coulter). L'expression de HER2 dans les cellules HAP-1 a été vérifiée par immunoblot.

Production du domaine CR2-GST soluble

Le domaine CR2-GST a été produit dans des bactéries C41 après induction par 1mM d'IPTG pendant 3h à 37°C sous agitation. Les cultures ont été centrifugées pendant 8 min à 7000 rpm. Le culot a ensuite été resuspendu dans un tampon 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl₂, 2mM EDTA, puis incubé sur glace pendant 20min. Ensuite, 2 % p/v de Sarkozyl et 10mM de DTT ont été ajoutés avant sonication. Le lysat a été clarifié par centrifugation pendant 25 min à 20 000 g. Aux surnageants ont été ajouté 3 % v/v de Triton X-100 et de la résine GST, puis le mélange a été incubé pendant 2 h sous agitation. Après centrifugation pendant 6 min à 1500 g, CR2-GST est élué par un tampon 200mM NaCl, 20m M Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl₂ et 20 mM Glutathion. Les domaines ont ensuite été purifiés par gel filtration et élués dans un tampon 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl₂.

Production des VSVΔG-GFP pseudotypés

Des cellules HEK293T à 80% de confluence dans une plaque 6 puits ont été transfectées avec les différents plasmides codant les constructions chimériques en utilisant la méthode du phosphate de calcium. La transfection a été réalisée en utilisant 8 µg de plasmide. Après 24h de transfection, les cellules sont infectées avec du VSVΔG-GFP/G (i.e. avec la glycoprotéine de VSV sauvage en trans). L'infection a été réalisée à une MOI de 3. Après 1h d'adsorption, 1ml de DMEM supplémenté avec 10% de SVF, 1% pénicilline/ streptomycine (P/S) a été ajouté. Après 2 h d'infection, les cellules sont rincées deux fois avec du DMEM pour éliminer les virus non liés, puis 2 ml de DMEM supplémenté avec 10% SVF, 1% P/S sont ajoutés. Les virus pseudotypés ont été récoltés après 16 h d'infection. Le surnagent est clarifié par centrifugation pendant 15 min à 2500 rpm à 4°C pour éliminer les débris cellulaires.

Les virus sont concentrés par ultracentrifugation ou directement utilisés pour les expériences de titration. Les aliquotes sont stockées à -80°C pour des usages ultérieurs.

Production des lentivirus pseudotypés

Des cellules HEK293T à 80% de confluence ont été co-transfectées avec trois plasmides : Le plasmide pCAGGS codant soit pour G_{WT} soit pour une G chimérique Le plasmide psPAX2 (Addgene #12260) codant pour les protéines Gag et Pol du HIV-1 nécessaire pour l'encapsidation, et un troisième plasmide pHIV-eGFP (Addgene #21373) codant l'eGFP utilisé comme marqueur de transduction. La transfection est réalisée en utilisant du PEIMax (Polyscience) à une concentration de 1mg/ml. Après 18h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% SVF, 1% P/S. Les virus pseudotypés ont été récoltés 28h après changement du milieu, puis clarifiés par centrifugation à 4°C à 2500 rpm pendant 15min pour éliminer les débris. Les surnageants contenant les particules virales sont ensuite conservés à 4°C pour les expériences ultérieures.

Titration des virus pseudotypés

Le titre viral des VSVΔG-GFP pseudotypés a été déterminé en fonction du pourcentage de cellules exprimant la GFP, mesuré par cytométrie en flux. Des HEK293T ont été infectées par différentes dilutions virales (Non dilué, 1/3 et 1/10). Après 16 h d'incubation, les cellules sont récoltées et analysées.

Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est utilisé pour déterminer la MOI en utilisant l'équation $MOI = -\ln[p(0)]$, où $p(0)$ est la proportion des cellules non infectées. La MOI représente le nombre moyen virus moyen infectant une cellule et permet d'estimer le titre viral en fonction de la dilution virale.

Compétition avec les protéines solubles

Les VSVΔG-GFP pseudotypés ont été incubés avec divers ligands solubles pour évaluer leur effet compétitif lors de l'infection. Les virus ont ainsi été incubés avec 5μm de CR2-GST, ou avec 50 nm de l'ectodomaine de HER2 (Sino biological # 10004-H08H), soit avec du DMEM sans sérum comme contrôle négatif. Après 20 minutes d'incubation à 37°C, les cellules HEK293T ont été infectées avec les virus pseudotypés dans chaque condition. Les cellules ont ensuite été incubées durant 1 heure à température ambiante pour permettre

l'adsorption des particules virales. Le surnageant a été retiré puis remplacé par du DMEM complété avec 10% SVF et 1% P/S. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 16h à 37°C. Les cellules ont été récoltées en utilisant une solution de PBS contenant 2% de SVF. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux afin de mesurer l'infection via l'expression de la GFP.

Analyse par immunoblot de l'expression de HER2 dans les cellules HAP-1

Les cellules HAP-1 et HAP-1 surexprimant HER2 (HAP-1 HER2+) ont été centrifugées pendant 10min à 2500 rpm à 4°C. le culot cellulaire a ensuite été re suspendu dans du tampon RIPA (Tris-HCL 25mM pH 8.8, NaCl 50mM, 0,5% Nonidep P-40, 0,1% SDS) supplémenté par du cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostic #11-836-170-001) avant d'être incubé sur glace pendant 30min. Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés pendant 2 min à 10 000 rpm à 4 °C pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant contenant les protéines solubles a été récupéré et les protéines dénaturées en ajoutant du tampon de Laemmli suivit d'une incubation à 95°C pendant 7 minutes.

Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 12%, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées avec une solution de TBS-5% lait écrémé et 0,1% Tween 20 pendant 45 min à 4°C. Après blocage, les membranes ont été incubées sur la nuit avec un anticorps primaire anti-HER2. Le lendemain, elles ont été rincées plusieurs fois avec du TBS, 0,1% Tween 20, puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP. Après lavage, les membranes ont été scannées à l'aide d'un appareil Odyssey (LI-COR, Lincoln) pour détecter les signaux des protéines marquées.

Partie 3 : Discussion et perspectives

I. Optimisation de glycoprotéines chimériques

La fusion du nanobody C11 à l'extrémité amino-terminale de G est délétère pour le repliement de G et pour sa fonctionnalité. Elle affecte son transport à la membrane de la cellule et sa capacité à pseudotyper VSVΔG-GFP. La construction du virus rVSV-G_{C11} a permis, par évolution expérimentale, de sélectionner deux mutations d'optimisation dans G : H22N et S422I. Ces mutations ont permis une amélioration du transport de la glycoprotéine chimérique G_{C11-opt}, sa meilleure incorporation dans les particules virales et une plus grande efficacité à pseudotyper VSVΔG-GFP.

La mutation S422I avait déjà été identifiée lors de précédents travaux dans l'équipe (Beilstein *et al.*, 2020). L'étude portait sur l'identification de résidus histidine jouant le rôle d'interrupteurs sensibles au pH dans la transition structurale de la forme pré-fusion vers la forme post-fusion. La mutation de l'histidine 407 en alanine (H407A) s'était révélée délétère et avait permis la sélection de deux mutations compensatoires, dont la mutation S422I. La présence d'un résidu hydrophobe à cette position semblait pouvoir stabiliser la forme pré-fusion. L'isoleucine étant le seul résidu hydrophobe pouvant être obtenu par la mutation d'un seul nucléotide, la G a été mutée au niveau des résidus 422 en différents résidus hydrophobes (phénylalanine, leucine, méthionine et valine), afin de valider cette hypothèse. Les différentes G mutées ont montré une bonne capacité à pseudotyper VSVΔG-GFP. Ces résultats ont confirmé l'importance d'un résidu hydrophobe en position 422. En revanche, nous n'avons pas d'explication moléculaire pour la seconde mutation H22N.

Afin de valider l'universalité de ces mutations d'optimisation, nous avons testé la capacité de 11 constructions de glycoprotéines chimériques fusionnées à différents nanobodies (dirigés contre le récepteur HER2, la protéine mCherry, Muc1 et CEACAM) à pseudotyper VSVΔG-GFP dans le contexte d'une séquence de G optimisée et non optimisée. Le couple de mutation H22N et S422I a permis d'optimiser la chimère pour la plupart des constructions (9 nanobodies sur 11), avec une moyenne géométrique d'un facteur 11 par rapport aux constructions non optimisées. Ceci a démontré l'intérêt général des mutations d'optimisation sélectionnées.

Au cours de ce travail, nous avons testé essentiellement des nanobodies dirigés contre HER2. En effet, de nombreux nanobodies dirigés contre le récepteur HER2 sont

disponibles, puisqu'il s'agit d'une cible d'intérêt thérapeutique très étudiée. Idéalement, nous aurions souhaité pouvoir tester des nanobodies contre d'autres antigènes. Il n'a toutefois pas été possible de s'en procurer.

Nous avons donc montré qu'il est possible de fusionner un nanobody à l'extrémité amino-terminale de G. Cependant, d'autres positions d'insertion sont envisageables. Un certain nombre de boucles exposées à la surface de G au niveau des résidus 190, 192, 200, 246, 349, 364 et 376 pourraient constituer des sites d'insertion alternatifs (Figure 39). Néanmoins, l'insertion du nanobody C11 en ces différents sites a conduit à l'obtention de glycoprotéines chimériques dont le transport à la membrane est très affecté. Une amélioration de ces constructions par évolution expérimentale pourrait être envisagée, ce qui permettrait probablement d'identifier d'autres mutations d'optimisation.

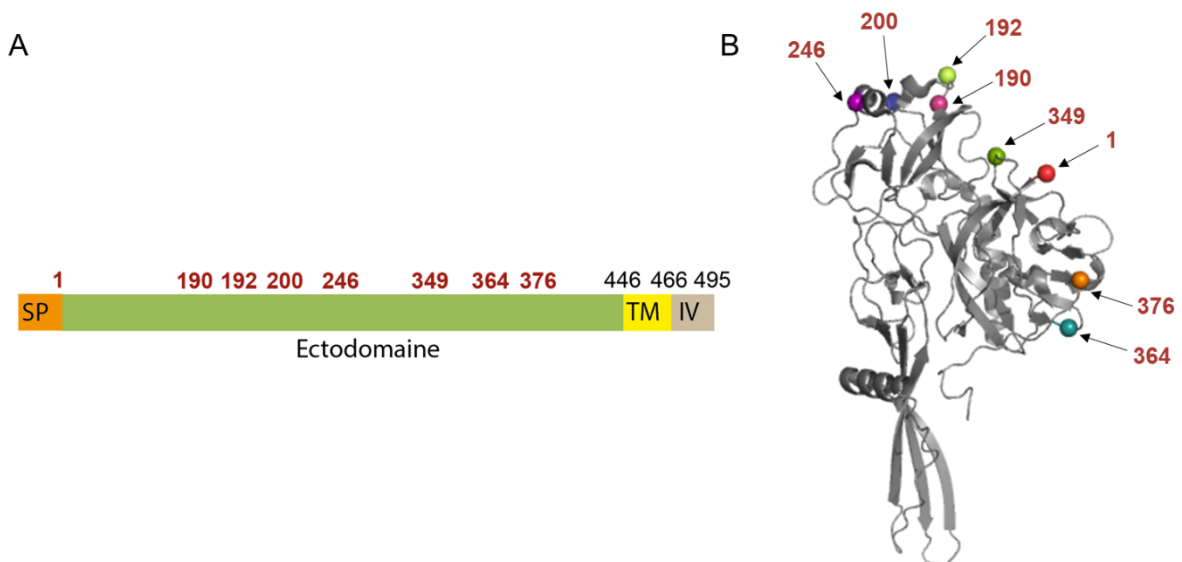


Figure 40: Positions d'insertion identifiées dans G. A. Représentation schématique de VSV G et des positions d'insertion possibles de nanobodies en amino-terminal ou sur des boucles exposées à la surface de G. B. Structure cristallographique de G. Les résidus sont représentés par des sphères de couleur. Les positions d'insertion sont notées en rouge.

II. Modification du tropisme de G

Nous avons établi la preuve de concept qu'il était possible de modifier le tropisme de G et de la recibler vers le récepteur HER2. Les tests d'infectiosités des VSVΔG-GFP et lentivirus pseudotypés par $G_{Hn-opt-K47Q}$ et $G_{Hn-opt-R354Q}$ ont montré une diminution d'infectiosité dans les cellules HEK293T-HER2^{KO} d'environ un Log₁₀ confirmant l'entrée par HER2 dans les HEK293T. De la même manière, nous avons observé une augmentation de l'infectiosité des lentivirus pseudotypés par $G_{H2-opt-K47Q}$ et $G_{H2-opt-R354Q}$ dans les HAP-1^{HER2+} par rapport aux HAP-1. Les lentivirus pseudotypés par $G_{Hn-opt-K47Q}$ et $G_{Hn-opt-R354Q}$ ont aussi montré une bonne infectiosité dans un modèle de cellules cancéreuses du sein, les SKBR3. Par la suite il serait intéressant de réaliser des tests d'infectiosité dans des souris dans lesquelles seraient implantées des tumeurs HER2+, afin de vérifier le reciblage vers HER2 en conditions *in vivo*.

Dans la suite de l'article, nous avons montré une infection préférentielle des VSVΔG-GFP pseudotypés par $G_{Hn-opt-K47Q}$ et $G_{Hn-opt-R354Q}$ des cellules HEK293T dans un mélange de cellules à 50% HER2+ (HEK293T) et 50% HER2- (HEK293T-HER2^{KO}) d'un facteur compris entre 2,23 ($G_{H1-opt-K47Q}$) et 5,18 ($G_{H3-opt-K47Q}$). Ceci indique que la spécificité vers le récepteur HER2 n'est pas encore parfaite puisque quelques cellules HEK293T-HER2^{KO} sont quand même infectées. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. La première est que les cellules HEK293T pourraient utiliser des mécanismes de macropinocytose/phagocytose non spécifiques. Une seconde est que des récepteurs distincts du LDL-R et restant à identifier existeraient à la surface des HEK293T.

D'autres articles ont décrit l'utilisation, dans un système bipartite, de la G mutée sur les résidus K47 et R354 et associée à une seconde protéine transmembranaire permettant le ciblage, pouvant être des CMH chargés avec des peptides (Guo and Elledge, 2022), des scFv (Dobson *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022; Hamilton *et al.*, 2023), des interleukines (Dobson *et al.*, 2022) ou encore des anticorps (Strebinger *et al.*, 2023), chacun montrant un ciblage spécifique de l'antigène cible (cf. Partie 1.V.3.). Dans leur étude Dobson *et al.* (2022), ont montré la versatilité du système en ciblant spécifiquement différents antigènes (IL-13Rα1 (en Anglais : interleukin 13 receptor subunit alpha 1), CD19) via des lentivirus pseudotypés. Les virus pseudotypés et dirigés contre IL-13Rα1, via l'interleukine-13, infectaient préférentiellement les cellules IL-13Rα1+ avec un facteur de 200 par rapport aux cellules IL-13Rα1-. Leurs résultats montrent donc un

indice de spécificité supérieur à celui que nous avons obtenu (facteur 2,23 à 5,18 par rapport à un facteur d'environ 200). Toutefois, il convient de souligner que Dobson *et al.* (2022) ont utilisé une approche différente de la nôtre, puisque leur modèle cellulaire sauvage n'est pas du tout infectable initialement, contrairement à notre modèle, les cellules HEK293T que nous avons utilisées.

Dans notre cas, il pourrait être intéressant de réaliser des tests de spécificité de l'infectiosité en utilisant des lentivirus pseudotypés par les glycoprotéines chimériques $G_{Hn-opt-K47Q}$ et $G_{Hn-opt-R354Q}$, dans un mélange de cellules HAP-1 (lignée parentale n'exprimant pas HER2) et HAP-1^{HER2+}.

III. Choix de la cible HER2

Nous avons choisi de cibler le récepteur HER2, qui présente un intérêt thérapeutique en thérapie anti-cancéreuse de par sa surexpression dans certains types de cancers (sein et ovariens). Ce récepteur présente plusieurs avantages : il est largement décrit dans la littérature, et nous avons pu disposer de plusieurs nanobodies dirigé contre HER2, ainsi que de modèles cellulaires l'exprimant (HEK293T et SKBR3). Il s'agissait donc d'un modèle propice qui nous a permis d'établir la preuve de concept du reciblage de la G vers HER2.

Cependant, l'une des limites au ciblage de ce récepteur est que bien qu'il soit surexprimé dans des cellules cancéreuses, il est tout de même exprimé dans de nombreux types cellulaires (cellules rénales, pulmonaires, du colon, intestinales...), ce qui peut poser problème en termes de spécificité dans le cas de délivrance *in situ*, mais moins dans le cas d'une administration locale stéréotaxique.

Dans ce travail de thèse, nous avons uniquement travaillé avec des virus pseudotypés et non avec des virus recombinants afin d'éviter les gains de fonction. Il s'agit également de la raison pour laquelle le virus recombinant r-VSV-G_{C11} a été construit avec un nanobody dirigé contre la protéine mCherry. En effet, produire un virus ayant la capacité de reconnaissance d'un autre récepteur peut s'avérer risqué, car cela entraîne l'acquisition d'une nouvelle spécificité qui ne peut être obtenue par des mutations simples. La construction de VSV recombinants ciblant HER2 pourrait tout de même constituer une piste prometteuse pour le développement d'oncovirothérapie, puisque cela offrirait alors une alternative ou un complément aux chimiothérapies utilisées actuellement pour le traitement des patients. La construction de tels virus nécessiterait un certain nombre de précautions et impliquerait de travailler dans un environnement avec un niveau de sécurité adéquat, en laboratoire p3 au lieu de p2 comme nous l'avons fait.

La question des conditions de traitement des patients se pose également, puisque les virus seraient répliatifs et potentiellement transmissibles. On peut bien sûr s'interroger sur la persistance virale après un éventuel traitement par un VSV recombinant chez des patients immunodéprimés à cause de leurs autres traitements.

Le choix de construire un VSV recombinant dirigé contre HER2 a néanmoins été fait dans l'étude de Gao *et al.* (2023), avec une G mutée en K47Q et R354Q dont l'extrémité amino-terminale est fusionnée à un scFv dirigé contre HER2.

Bien qu'ils aient confirmé un reciblage vers HER2, en observant une diminution de l'infectiosité des VSV recombinants (environ 1,5 logarithme) dans les cellules n'exprimant pas HER2 par rapport à celles exprimant HER2, les titres viraux obtenus dans les cellules HER2- restent tout de même assez élevés (environ 5.10^6 particules infectieuses par ml). De plus, les courbes de croissance dans les deux types cellulaires montrent une augmentation du titre viral au cours du temps dans les cellules HER2-, atteignant le titre viral obtenu dans les cellules HER2+ (96 heures post infection) Ceci montre également la nécessité d'améliorer la spécificité de ce virus.

Dans cette étude, un test d'inhibition de l'infection des virus recombinants *via* un anticorps anti-ErbB2 (Herceptin/Trastuzumab) a montré une diminution du titre viral dans les cellules HER2+ et donnant ainsi une piste dans le cas de persistance virale chez des patients.

IV. Autres possibilités de reciblage de G

Au-delà de HER2, notre étude ouvre la possibilité de cibler différents récepteurs en fusionnant à l'extrémité amino-terminale de G des nanobodies dirigés contre d'autres cibles. Par ailleurs, il y a de nombreux autres ligands qui peuvent être fusionnés à G tels que les scFv, les affibodies, les DARPins, les α Rep. Il n'est toutefois pas certain que les mutations d'optimisation que nous avons sélectionnées pour les nanobodies soient efficaces pour d'autres ligands.

La liaison à HER2 permettant l'infection, les virus pseudotypés sont donc bien endocytés. Bien que le mécanisme d'internalisation de HER2 ne soit pas clairement identifié, il est suggéré que son endocytose ait lieu, dans certains cas, *via* une voie clathrine dépendante (Austin *et al.*, 2005; Cortese *et al.*, 2013; Wymant *et al.*, 2020), comme pour VSV. Il existe diverses autres voies d'endocytoses des récepteurs dans les cellules (médiée par la clathrine, médiée par la cavéoline ou indépendantes de la clathrine/cavéoline) (Conner and Schmid, 2003), qui seraient à prendre en compte dans le reciblage vers d'autres récepteurs d'intérêt. Par exemple, il serait important de confirmer que le récepteur et les virus pseudotypés, par une G chimérique reconnaissant des récepteurs utilisant ces autres voies, sont bien internalisés et fusionnent bien avec une membrane cellulaire. Enfin, certains marqueurs de cellules tumorales ne sont pas endocytés, ce qui pose problème pour ce type d'approche.

La modification du tropisme de G permet aussi de cibler des cellules qui ne peuvent pas l'être avec une G sauvage, telles que celles de la lignée hématopoïétique. Si ce ciblage se fait *in vitro*, il n'est même pas utile d'introduire les mutations éliminant la reconnaissance du récepteur.

Un autre aspect important est que les G chimériques peuvent être exposées à la surface de différents vecteurs : vecteurs viraux (pseudotypes VSV et lentivirus), cellules CAR-T et liposomes. Cela permet de développer différentes thérapies, allant des modifications de cellules directement chez le patient, par exemple soit pour modifier des lymphocytes T soit pour de la thérapie génique, à la délivrance de molécules directement dans les cellules cibles, par exemple pour des traitements anti-cancéreux.

Une autre utilisation déjà abordée est le reciblage de virus oncolytiques, notamment VSV. Cette approche cible spécifiquement les cellules tumorales, ce qui permet d'une part

la lyse des cellules *via* la capacité oncolytique du virus et d'autre part une activation des cellules du système immunitaire.

Le déclenchement d'une réponse du système immunitaire peut toutefois être un frein à l'utilisation de VSV en oncovirothérapie, puisque certains composants du sérum peuvent le neutraliser (Mills, Beebe and Cooper, 1979). Sa glycoprotéine est également la cible d'anticorps neutralisants, ce qui pose problème dans le cas de thérapies nécessitant plusieurs injections, tel que pour les thérapies par cellules CAR-T.

Pour résumer, nous avons mis en place un outil modulaire pouvant être utilisé à la surface de différents vecteurs. Les résultats que nous avons obtenus ouvrent la voie au développement de nouvelles thérapies personnalisées délivrées *in vivo*.

Bibliographie

A

Abraham, G., and Banerjee, A.K. (1976) 'Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73(5), 1504–1508.

Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B. (2008) 'Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis', *J. Gen. Virol.*, 89(2), 474–484.

Adam-artigues, A., Arenas, E.J., Martínez-sabadell, A., Brasó-maristany, F., Cervera, R., Tormo, E., Hernando, C., Martínez, M.T., Carbonell-asins, J., Simón, S., et al. (2022) 'Targeting HER2-AXL heterodimerization to overcome resistance to HER2 blockade in breast cancer', 2746(May), 1–18.

Ahani, R., Roohvand, F., Cohan, R.A., Etemadzadeh, M.H., Mohajel, N., Behdani, M., Shahosseini, Z., Madani, N., and Azadmanesh, K. (2016) 'Sindbis Virus-Pseudotyped Lentiviral Vectors Carrying VEGFR2-Specific Nanobody for Potential Transductional Targeting of Tumor Vasculature', *Mol. Biotechnol.*, 58(11), 738–747.

Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., and Zarghami, N. (2013) 'Liposome : classification , prepNew aspects of liposomesaration , and applications', *Nanoscale Res. Lett.*, 8(102), 1–9.

Albertini, A.A., Mérigoux, C., Libersou, S., Madiona, K., Bressanelli, S., Roche, S., Lepault, J., Melki, R., Vachette, P., and Gaudin, Y. (2012) 'Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition', *PLoS Pathog.*, 8(2).

Albertini, A.A.V., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B.G., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R.W.H. (2006) 'Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex', *Science (80-.)*, 313(5785), 360–363.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakkhal, S., and Wood, M.J.A. (2011)

'Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes', *Nat. Biotechnol.*, 29(4), 341–345.

Amara, I., Pramila, E., Senamaud-Beaufort, C., Devillers, A., Macedo, R., Lescaille, G., Seguin, J., Tartour, E., Lemoine, F.M., Beaune, P., et al. (2016) 'Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors', *J. Control. Release*, 239, 82–91.

Ammayappan, A., Peng, K.-W., and Russell, S.J. (2013) 'Characteristics of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Displaying Tumor-Targeting Ligands', *J. Virol.*, 87(24), 13543–13555.

El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J.A. (2013) 'Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities', *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12(5), 347–357.

Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015) 'Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma', *J. Clin. Oncol.*, 33(25), 2780–2788.

Arya, S.K., Guo, C., Josephs, S.F., and Wong-Staal, F. (1985) 'Trans-Activator Gene of Human T-Lymphotropic', *Science (80-.)*, 229, 69–73.

Austin, C.D., Wen, X., Gazzard, L., Nelson, C., Scheller, R.H., and Scales, S.J. (2005) 'Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(50), 17987–17992.

B

Backovic, M., Longnecker, R., and Jardetzky, T.S. (2009) 'Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(8), 2880–2885.

- Baden, L.R., El Sahly, H.M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S.A., Rouphael, N., Creech, C.B., et al.** (2021) 'Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine', *N. Engl. J. Med.*, 384(5), 403–416.
- Bangham, A.D., Hill, M.W., and Miller, N.G.A.** (1974) 'Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes', *Methods Membr. Biol.*, 1–68.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Vachette, P., Lepault, J., Bressanelli, S., and Gaudin, Y.** (2013) 'Intermediate conformations during viral fusion glycoprotein structural transition', *Curr. Opin. Virol.*, 3(2), 143–150.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Buonocore, L., Rose, J.K., Bressanelli, S., and Gaudin, Y.** (2015) 'Structure of the Low pH Conformation of Chandipura Virus G Reveals Important Features in the Evolution of the Vesiculovirus Glycoprotein', *PLoS Pathog.*, 11(3), 1–19.
- Baquero, E., Albertini, A.A., Raux, H., Abou-Hamdan, A., Boeri-Erba, E., Ouldali, M., Buonocore, L., Rose, J.K., Lepault, J., Bressanelli, S., et al.** (2017) 'Structural intermediates in the fusion-associated transition of vesiculovirus glycoprotein', *EMBO J.*, 36(5), 679–692.
- Barr, J.N., Whelan, S.P., and Wertz, G.W.** (1997) 'cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation', *J. Virol.*, 71(11), 8718–8725.
- Baselga, J., Cortes, J., Kim, S., Im, S., Hegg, R., Hyuck, Y., Roman, L., Pedrini, José Luiz, Pienkowski, T., Knott, A., et al.** (2012) 'Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer', *N. Engl. J. Med.*, 366(2), 109–119.
- Beglova, N., and Blacklow, S.C.** (2005) 'The LDL receptor: How acid pulls the trigger', *Trends Biochem. Sci.*, 30(6), 309–317.
- Beilstein, F., Obiang, L., Raux, H., and Gaudin, Y.** (2015) 'Characterization of the Interaction between the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and the Immunoproteasome Subunit LMP2', *J. Virol.*, 89(21), 11019–11029.
- Beilstein, F., Hamdan, A.A., Raux, H., Belot, L., Ouldali, M., Albertini, A.A., and Gaudin, Y.** (2020) 'Identification of a pH-Sensitive Switch in VSV-G and a Crystal Structure of the G Pre-fusion State Highlight the VSV-G Structural Transition Pathway', *Cell Rep.*, 32(7).
- Belot, L., Albertini, A., and Gaudin, Y.** (2019) 'Structural and cellular biology of rhabdovirus entry', *Adv. Virus Res.*, 104, 147–183.
- Benz, C.C., Scott, G.K., Sarup, J.C., Johnson, R.M., Tripathy, D., Coronado, E., Shepard, H.M., and Osborne, C.K.** (1992) 'Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu', *Breast Cancer Res. Treat.*, 24(2), 85–95.
- Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Fauré, J., Sadoul, R., et al.** (2005) 'Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids.', *Nat. Cell Biol.*, 7(7), 653–664.
- Blesch, A.** (2004) 'Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer', *Methods*, 33(2), 164–172.
- Bommareddy, P.K., Patel, A., Hossain, S., and Kaufman, H.L.** (2017) 'Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma', *Am. J. Clin. Dermatol.*, 18(1), 1–15.
- Bordignon, C., Notarangelo, L.D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., et al.** (1995) 'Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients', *Science (80-.)*. [Preprint].
- Boudreau, N.J., and Varner, J.A.** (2004) 'The Homeobox Transcription Factor Hox D3 Promotes Integrin $\alpha 5\beta 1$ Expression and Function during Angiogenesis', *J. Biol. Chem.*, 279(6), 4862–4868.

Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.G., and Fuller, S.D. (2003) 'Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores', *EMBO J.*, 22(7), 1707–1715.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998) 'The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system', *Genes Dev.*, 12(12), 1825–1836.

Brown, E.L., and Lyles, D.S. (2003) 'Organization of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein into Membrane Microdomains Occurs Independently of Intracellular Viral Components', *J. Virol.*, 77(7), 3985–3992.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986) 'A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis', *Science (80-.)*, 232(4746), 34–47.

Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992) 'Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(14), 6580–6584.

Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M.H., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.S., and Pathak, V.K. (2020) 'HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 117(10), 5486–5493.

Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003) 'An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors', *Mol. Cell*, 12(3), 541–552.

Burguin, A., Furrer, D., Ouellette, G., Jacob, S., Diorio, C., and Durocher, F. (2020) 'Trastuzumab effects depend on HER2 phosphorylation in HER2-negative breast cancer cell lines', *PLoS One*, 15(6), 1–17.

Burke, H.G., and Heldwein, E.E. (2015) 'Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B', *PLoS Pathog.*, 11(10), 1–21.

Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., and Burrascano, M. (1993) 'Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral transfer into mammalian and nonmammalian cells vectors: Concentration to very high titer and efficient gene', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90(September), 8033–8037.

C

Camussi, G., Deregibus, M.-C., Brun, S., Grange, C., Fonsato, V., and Tetta, C. (2010) 'Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells', *am j cancer res*, 1(1), 98–110.

Carter, B.J. (2004) 'Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: A historical perspective', *Mol. Ther.*, 10(6), 981–989.

Cassani, B., Ph, D., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Ph, D., Andolfi, G., Mirolo, M., Sc, B., Brigida, I., Sc, B., et al. (2009) 'Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency', *N. Engl. J. Med.*, 360(5).

Cesur-Ergün, B., and Demir-Dora, D. (2023) 'Gene therapy in cancer', *J. Gene Med.*, 25(11), 1–11.

Chanda, P.K., Kang, C.Y., and Banerjee, A.K. (1980) 'In vitro synthesis of the full-length complement of defective-interfering particle RNA of vesicular stomatitis virus', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77(7 II), 3927–3931.

Chandramouli, S., Ciferri, C., Nikitin, P.A., Caló, S., Gerrein, R., Balabanis, K., Monroe, J., Hebner, C., Lilja, A.E., Settembre, E.C., et al. (2015) 'Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody', *Nat. Commun.*, 6.

Chen, B.J., and Lamb, R.A. (2008) 'Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT?', *Virology*, 372(2), 221–232.

- Chen, J., Rahman, S.A., Nikolaitchik, O.A., Grunwald, D., Sardo, L., Burdick, R.C., Plisov, S., Liang, E., Tai, S., Pathak, V.K., et al.** (2016) 'HIV-1 RNA genome dimerizes on the plasma membrane in the presence of Gag protein', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(2), E201–E208.
- Chen, M., Ogino, T., and Banerjee, A.K.** (2007) 'Interaction of Vesicular Stomatitis Virus P and N Proteins: Identification of Two Overlapping Domains at the N Terminus of P That Are Involved in N 0 -P Complex Formation and Encapsidation of Viral Genome RNA', *J. Virol.*, 81(24), 13478–13485.
- Chervo, M.F., Cordo Russo, R.I., Petrillo, E., Izzo, F., De Martino, M., Bellora, N., Cenciari, M.E., Chiauzzi, V.A., Santa María de la Parra, L., Pereyra, M.G., et al.** (2020) 'Canonical ErbB-2 isoform and ErbB-2 variant c located in the nucleus drive triple negative breast cancer growth.', *Oncogene*, 39(39), 6245–6262.
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al.** (2014) 'Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma', *N. Engl. J. Med.*, 370(8), 709–722.
- Clinton, G.M., Little, S.P., Hagen, F.S., and Huang, A.S.** (1978) 'The matrix (M) protein of vesicular stomatitis virus regulates transcription', *Cell*, 15(4), 1455–1462.
- Cochrane, A.W., Chen, C.H., and Rosen, C.A.** (1990) 'Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(3), 1198–1202.
- Coil, D.A., and Miller, A.D.** (2004) 'Phosphatidylserine Is Not the Cell Surface Receptor for Vesicular Stomatitis Virus', *J. Virol.*, 78(20), 10920–10926.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L.** (2003) 'Regulated portals of entry into the cell', *Nature*, 422(6927), 37–44.
- Connor, J.H., and Lyles, D.S.** (2002) 'Vesicular Stomatitis Virus Infection Alters the eIF4F Translation Initiation Complex and Causes Dephosphorylation of the eIF4E Binding Protein 4E-BP1', *J. Virol.*, 76(20), 10177–10187.
- Conzelmann, K.K.** (1998) 'Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes.', *Annu. Rev. Genet.*, 32, 123–162.
- Conzelmann, K.K., and Schnell, M.** (1994) 'Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins', *J. Virol.*, 68(2), 713–719.
- Cook, J., Peng, K.W., Witzig, T.E., Broski, S.M., Villasboas, J.C., Paludo, J., Patnaik, M., Rajkumar, V., Dispenzieri, A., Leung, N., et al.** (2022) 'Clinical activity of single-dose systemic oncolytic VSV virotherapy in patients with relapsed refractory T-cell lymphoma', *Blood Adv.*, 6(11), 3268–3279.
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., Van de Wiele, C., Staelens, L., et al.** (2006) 'Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis.', *Arthritis Rheum.*, 54(6), 1856–1866.
- Cortese, K., Howes, M.T., Lundmark, R., Tagliatti, E., Bagnato, P., Petrelli, A., Bono, M., McMahon, H.T., Parton, R.G., and Tacchetti, C.** (2013) 'The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments', *Mol. Biol. Cell*, 24(2), 129–144.
- Coulon, P., Deutsch, V., Lafay, F., Martinet-Edelist, C., Wyers, F., Herman, R.C., and Flamand, A.** (1990) 'Genetic evidence for multiple functions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus', *J. Gen. Virol.*, 71(4), 991–996.
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., and Camaioni, E.** (2001) 'Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors', *Med. Res. Rev.*, 21(2), 105–128.

Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P.J. (2009) 'Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization', *PLoS Pathog.*, 5(4).

Cureton, D.K., Massol, R.H., Whelan, S.P.J., and Kirchhausen, T. (2010) 'The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis', *PLoS Pathog.*, 6(9).

D

Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1994) 'Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation.', *J. Cell Biol.*, 127(4), 915–934.

Dancho, B., McKenzie, M.O., Connor, J.H., and Lyles, D.S. (2009) 'Vesicular stomatitis virus matrix protein mutations that affect association with host membranes and viral nucleocapsids', *J. Biol. Chem.*, 284(7), 4500–4509.

Desfosses, A., Ribeiro, E.A., Schoehn, G., Blondel, D., Guilligay, D., Jamin, M., Ruigrok, R.W.H., and Gutsche, I. (2013) 'Self-organization of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid into a bullet shape', *Nat. Commun.*, 4, 1–5.

Dieckmann, M., Dietrich, M.F., and Herz, J. (2010) 'Lipoprotein receptors—an evolutionarily ancient multifunctional receptor family', *Biol. Chem.*, 391(11), 1341–1363.

Dietzgen, R.G., Kondo, H., Goodin, M.M., Kurath, G., and Vasilakis, N. (2017) 'The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins', *Virus Res.*, 227, 158–170.

Dobson, C.S., Reich, A.N., Gaglione, S., Smith, B.E., Kim, E.J., Dong, J., Ronsard, L., Okonkwo, V., Lingwood, D., Dougan, M., et al. (2022) 'Antigen identification and high-throughput interaction mapping by reprogramming viral entry', *Nat. Methods*,

19(4), 449–460.

Dock, G. (1904) 'THE INFLUENCE OF COMPLICATING DISEASES UPON LEUKÆMIA.*', *Am. J. Med. Sci.*, 127(4), 563–592.

Doms, R.W., Keller, D.S., Helenius, A., and Balch, W.E. (1987) 'Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers.', *J. Cell Biol.*, 105(5), 1957–1969.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002) 'Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion', *Nat. Med.*, 8(8), 793–800.

Dubovi, E.J., and Wagner, R.R. (1977) 'Spatial relationships of the proteins of vesicular stomatitis virus: induction of reversible oligomers by cleavable protein cross-linkers and oxidation', *J. Virol.*, 22(2), 500–509.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998) 'A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System', *J. Virol.*, 72(11), 8463–8471.

E

E A Cohen 1 , E F Terwilliger, J G Sodroski, W.A.H. (1988) 'Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1', *Nature*, 10(1), 10.

Ebert, O., Harbaran, S., Shinozaki, K., and Woo, S.L.C. (2003) 'Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice', *Cancer Gene Ther.*, 12(4), 350–358.

Eleftheriadou, I., Dieringer, M., Poh, X.Y., Sanchez-Garrido, J., Gao, Y., Sgourou, A., Simmons, L.E., and Mazarakis, N.D. (2017) 'Selective transduction of astrocytic and neuronal CNS subpopulations by lentiviral vectors pseudotyped with Chikungunya virus envelope', *Biomaterials*, 123, 1–14.

Emerson, S.U. (1982) 'Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome', *Cell*, 31(PART 2), 635–642.

Emerson, S.U., and Yu, Y. (1975) 'Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus', *J. Virol.*, 15(6), 1348–1356.

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010) 'Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival', *J. Neurosci.*, 30(20), 6838–6851.

Evgin, L., Kottke, T., Tonne, J., Thompson, J., Huff, A.L., van Vloten, J., Moore, M., Michael, J., Driscoll, C., Pulido, J., et al. (2022) 'Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy against solid tumors in mice', *Sci. Transl. Med.*, 14(640), 1–35.

F

Fend, L., Yamazaki, T., Remy, C., Fahrner, C., Gantzer, M., Nourtier, V., Prévaille, X., Quéméneur, E., Kepp, O., Adam, J., et al. (2017) 'Immune checkpoint blockade, immunogenic chemotherapy or IFN- α blockade boost the local and abscopal effects of oncolytic virotherapy', *Cancer Res.*, 77(15), 4146–4157.

Ferlin, A., Raux, H., Baquero, E., Lepault, J., and Gaudin, Y. (2014) 'Characterization of pH-Sensitive Molecular Switches That Trigger the Structural Transition of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein from the Postfusion State toward the Prefusion State', *J. Virol.*, 88(22), 13396–13409.

Finke, S., Cox, J.H., and Conzelmann, K.-K. (2000) 'Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses Overexpressing the Polymerase Gene', *J. Virol.*, 74(16), 7261–7269.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013) 'LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(18), 7306–7311.

Flamand, A., and Delagneau, J.F. (1978) 'Transcriptional mapping of rabies virus in vivo', *J. Virol.*, 28(2), 518–523.

Ford, J.L., Karatza, E., Mody, H., Nagaraja Shastri, P., Khajeh Pour, S., Yang, T.Y., Swanson, M., Chao, D., and Devineni, D. (2024) 'Clinical Pharmacology Perspective on Development of Adeno-Associated Virus Vector-Based Retina Gene Therapy', *Clin. Pharmacol. Ther.*, 115(6), 1212–1232.

Foster, S.L., Woolsey, C., Borisevich, V., Agans, K.N., Prasad, A.N., Deer, D.J., Geisbert, J.B., Dobias, N.S., Fenton, K.A., Cross, R.W., et al. (2022) 'A recombinant VSV-vectored vaccine rapidly protects nonhuman primates against lethal Nipah virus disease Stephanie', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 119(12).

Fouchier, R.A.M., Meyer, B.E., Simon, J.H.M., Fischer, U., and Malim, M.H. (1997) 'HIV-1 infection of non-dividing cells: Evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import', *EMBO J.*, 16(15), 4531–4539.

Frey, N. V., and Porter, D.L. (2016) 'Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute lymphoblastic leukemia', *Hematol. (United States)*, 2016(1), 567–572.

Fung, J.J., Demetris, A.J., and Porter, K.A. (1987) 'Use of OKT3 with ciclosporin and steroids for reversal of acute kidney and liver allograft rejection', *Nephron*, 46(SUPPL. 1), 19–33.

Furió, V., Moya, A., and Sanjuán, R. (2005) 'The cost of replication fidelity in an RNA virus', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(29), 10233–10237. ¹⁴²

G

- Galanis, E., Atherton, P.J., Maurer, M.J., Knutson, K.L., Dowdy, S.C., Cliby, W.A., Haluska, P., Long, H.J., Oberg, A., Aderca, I., et al.** (2015) 'Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer', *Cancer Res.*, 75(1), 22–30.
- Galanis, E., Dooley, K.E., Keith Anderson, S., Kurokawa, C.B., Carrero, X.W., Uhm, J.H., Federspiel, M.J., Leontovich, A.A., Aderca, I., Viker, K.B., et al.** (2024) 'Carcinoembryonic antigen-expressing oncolytic measles virus derivative in recurrent glioblastoma: a phase 1 trial', *Nat. Commun.*, 15(1), 1–12.
- Gao, Y.** (2023) 'Vesicular Stomatitis Virus (VSV) G Glycoprotein Can Be Modified to Create a Her2 / Neu-Targeted VSV That Eliminates Large Implanted Mammary Tumors', *J. Virol.* [Preprint].
- Gao, Y. and Lenard, J.** (1995) 'Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly', *J. Virol.*, 69(12), 7718–7723.
- Gao, Yuan, and Lenard, J.** (1995) 'Multimerization and transcriptional activation of the phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus by casein kinase-II', *EMBO J.*, 14(6), 1240–1247.
- Garbutt, M., Liebscher, R., Wahl-Jensen, V., Jones, S., Möller, P., Wagner, R., Volchkov, V., Klenk, H.-D., Feldmann, H., and Stroher, U.** (2004) 'Properties of Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus Vectors Expressing Glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses', *J. Virol.*, 78(10), 5458–65.
- Garcia, G., Chakravarty, N., Paiola, S., Urena, E., Gyani, P., Tse, C., French, S.W., Danielpour, M., Breunig, J.J., Nathanson, D.A., et al.** (2023) 'Differential Susceptibility of Ex Vivo Primary Glioblastoma Tumors to Oncolytic Effect of Modified Zika Virus', *Cells*, 12(19), 1–19.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Benmansour, A., and Flamand, A.** (1991) 'Fatty acylation of rabies virus proteins', *Virology*, 184(1), 441–444.
- Gaudin, Y., Barge, A., Ebel, C., and Ruigrok, R.W.H.** (1995) 'Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implications for viral assembly', *Virology*, 206, 28–37.
- Gaudin, Y., Sturgis, J., Doumith, M., Barge, A., Robert, B., and Ruigrok, R.W.H.** (1997) 'Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein', *J. Mol. Biol.*, 274(5), 816–825.
- Gaudin, Y.** (1997) 'Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones', *J. Virol.*, 71(5), 3742–3750.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, Todd J., Luo, M., and Zhou, Z. Hong** (2010) 'CryoEM Model of the Bullet-Shaped Vesicular Stomatitis Virus', *Science* (80-.), 327(5966), 689–693.
- Gerard, F.C.A., Ribeiro, E.D.A., Albertini, A.A.V., Gutsche, I., Zaccai, G., Ruigrok, R.W.H., and Jamin, M.** (2007) 'Unphosphorylated Rhabdoviridae phosphoproteins form elongated dimers in solution', *Biochemistry*, 46(36), 10328–10338.
- Giri, D.K., Ali-Seyed, M., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S.-C., and Hung, M.-C.** (2005) 'Endosomal Transport of ErbB-2: Mechanism for Nuclear Entry of the Cell Surface Receptor', *Mol. Cell. Biol.*, 25(24), 11005–11018.
- Gliozzi, M., Musolino, V., Bosco, F., Scicchitano, M., Scarano, F., Nucera, S., Zito, M.C., Ruga, S., Carresi, C., Macrì, R., et al.** (2021) 'Cholesterol homeostasis: Researching a dialogue between the brain and peripheral tissues', *Pharmacol. Res.*, 163(September 2020), 105215.
- Goad, D.W., Nesmelova, A.Y., Yohe, L.R., and Grdzlishvili, V.Z.** (2023) 'Intertumoral heterogeneity impacts oncolytic vesicular stomatitis virus efficacy in mouse pancreatic cancer cells.', *J. Virol.*, 0(0), e0100523.

Goad, D.W., Nesmelova, A.Y., Yohe, L.R., Grdzlishvili, V.Z., Goad, D.W., Nesmelova, A.Y., Yohe, L.R., Grdzlishvili, V.Z., Goad, D.W., Nesmelova, A.Y., et al. (2023)

'Stomatitis Virus Efficacy in Mouse Pancreatic Cancer Cells', *J. Virol.*, 97(9).

Gould, J.R., Qiu, S., Shang, Q., Ogino, T., Prevelige, P.E., Petit, C.M., and Green, T.J. (2020) 'The Connector Domain of Vesicular Stomatitis Virus Large Protein Interacts with the Viral Phosphoprotein', *J. Virol.*, 94(6), 1–14.

Graham, S.C., Assenberg, R., Delmas, O., Verma, A., Gholami, A., Talbi, C., Owens, R.J., Stuart, D.I., Grimes, J.M., and Bourhy, H. (2008) 'Rhabdovirus matrix protein structures reveal a novel mode of self-association', *PLoS Pathog.*, 4(12).

Green, T.J., Zhang, X., Wertz, Gail W., and Ming Luo (2006) 'Structure of the Vesicular Stomatitis Virus Nucleoprotein-RNA Complex' Author (s): Todd J. Green, Xin Zhang, Gail W. Wertz and Ming Luo Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/38466>, *Science* (80-.), 313, 357–360.

Green, T.J., Rowse, M., Tsao, J., Kang, J., Ge, P., Zhou, Z.H., and Luo, M. (2011) 'Access to RNA Encapsidated in the Nucleocapsid of Vesicular Stomatitis Virus', *J. Virol.*, 85(6), 2714–2722.

Griciuc, A., Federico, A.N., Natasan, J., Forte, A.M., McGinty, D., Nguyen, H., Volak, A., Leroy, S., Gandhi, S., Lerner, E.P., et al. (2020) 'Gene therapy for Alzheimer's disease targeting CD33 reduces amyloid beta accumulation and neuroinflammation', *Hum. Mol. Genet.*, 29(17), 2920–2935.

Grunwald, V., Ngo, H.D., Formanski, J.P., Jonas, J.S., Pöhlking, C., Schwalbe, B., and Schreiber, M. (2023) 'Development of Zika Virus E Variants for Pseudotyping Retroviral Vectors Targeting Glioblastoma Cells'.

Guo, X.J., and Elledge, S.J. (2022) 'V-CARMA: A tool for the detection and modification of antigen-specific T cells', 119(4), 1–6.

H

Hamilton, J.R., Chen, E., Perez, B.S., Espinoza, C.R.S., Kang, M.H., Trinidad, M., Ngo, W., and Doudna, J.A. (2023) 'In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles', *Nat. Biotechnol.* [Preprint].

Hammond, C., and Helenius, A. (1994) 'Folding of VSV G Protein: Sequential Interaction with BiP and Calnexin', *Science* (80-.), 266, 456–458.

Hanafusa, H., Hanafusa, T., and Rubin, H. (1963) 'The defectiveness of Rous sarcoma virus.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 49, 572–580.

Hanson, R.P. (1952) 'The natural history of vesicular stomatitis.', *Bacteriol. Rev.*, 16(3), 179–204.

Harty, R.N., Paragas, J., Sudol, M., and Palese, P. (1999) 'A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding', *J. Virol.*, 73(4), 2921–2929.

Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A., and Schnell, M.J. (2001) 'Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: a Budding Interaction', *J. Virol.*, 75(22), 10623–10629.

Has, C., and Sunthar, P. (2020) 'A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes', *J. Liposome Res.*, 30(4), 336–365.

Heinrich, B.S., Maliga, Z., Stein, D.A., Hyman, A.A., and Whelan, S.P.J. (2018) 'Phase transitions drive the formation of vesicular stomatitis virus replication compartments', *MBio*, 9(5).

Hercyk, N., Horikami, S.M., and Moyer, S.A. (1988) 'The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities', *Virology*, 163(1), 222–225.

Hinzman, E.E., Barr, J.N., and Wertz, G.W. (2008) 'Selection for gene junction sequences important for VSV transcription', *Virology*, 380(2), 379–387.

Hislop, J.N., Islam, T.A., Eleftheriadou, I., Carpentier, D.C.J., Trabalza, A., Parkinson, M., Schiavo, G., and Mazarakis, N.D. (2014) 'Rabies virus envelope glycoprotein targets lentiviral vectors to the axonal retrograde pathway in motor neurons', *J. Biol. Chem.*, 289(23), 16148–16163.

Hodges, J., Tang, X., Landesman, M.B., Ruedas, J.B., Ghimire, A., Gudheti, M. V., Perrault, J., Jorgensen, E.M., Gerton, J.M., and Saffarian, S. (2013) 'Asymmetric packaging of polymerases within vesicular stomatitis virus', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 440(2), 271–276.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., et al. (2020) 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor', *Cell*, 181(2), 271–280.e8.

Holland, J.J., de la Torre, J.C., Steinhauer, D.A., Clarke, D., Duarte, E., and Domingo, E. (1989) 'Virus mutation frequencies can be greatly underestimated by monoclonal antibody neutralization of virions', *J. Virol.*, 63(12), 5030–5036.

Hummeler, K., Koprowski, H., and Wiktor, T.J. (1967) 'Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture', *J. Virol.*, 1(1), 152–170.

Hwang, L.N., Englund, N., and Pattnaik, A.K. (1998) 'Polyadenylation of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Dictates Efficient Transcription Termination at the Intercistronic Gene Junctions', *J. Virol.*, 72(3), 1805–1813.

I

Irie, T., Liu, Y., Drolet, B.S., Carnero, E., García-Sastre, A., and Harty, R.N. (2012) 'Cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus is regulated by the PSAP motif of M

protein in a species-dependent manner', *Viruses*, 4(9), 1605–1618.

Ithinji, D.G., Buchholz, D.W., Ezzatpour, S., Monreal, I.A., Cong, Y., Sahler, J., Bangar, A.S., Imbiakha, B., Upadhye, V., Liang, J., et al. (2022) 'Multivalent viral particles elicit safe and efficient immunoprotection against Nipah Hendra and Ebola viruses', *npj Vaccines*, 7(1).

Iverson, L.E., and Rose, J.K. (1981) 'Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription', *Cell*, 23(2), 477–484.

J

Jayakar, H.R., Jeetendra, E., and Whitt, M.A. (2004) 'Rhabdovirus assembly and budding', *Virus Res.*, 106(2 SPEC.ISS.), 117–132.

Jayakar, H.R., and Whitt, M.A. (2002) 'Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene That Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology', *J. Virol.*, 76(16), 8011–8018.

Jenni, S., Bloyet, L.M., Diaz-Avalos, R., Liang, B., Whelan, S.P.J., Grigorieff, N., and Harrison, S.C. (2020) 'Structure of the Vesicular Stomatitis Virus L Protein in Complex with Its Phosphoprotein Cofactor', *Cell Rep.*, 30(1), 53–60.e5.

Jenni, S., Horwitz, J.A., Bloyet, L.M., Whelan, S.P.J., and Harrison, S.C. (2022) 'Visualizing molecular interactions that determine assembly of a bullet-shaped vesicular stomatitis virus particle', *Nat. Commun.*, 13(1).

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012) 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science (80-.)*, 337(6096), 816–821.

Johannsdottir, H.K., Mancini, R., Kartenbeck, J., Amato, L., and Helenius, A. (2009) 'Host Cell Factors and Functions Involved in Vesicular Stomatitis Virus Entry', *J. Virol.*, 83(1), 440–453.

June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S., and Milone, M.C. (2018) 'CAR T cell immunotherapy for human cancer', *Science* (80-.), 359(6382), 1361–1365.

K

Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N.G.A., Stuart, D.I., and Jones, I.M. (2008) 'The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines', *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(10), 1024–1030.

Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C.H., Saso, K., Butler, M.O., Minden, M.D., and Hirano, N. (2018) 'A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects', *Nat. Med.*, 24(3), 352–359.

Katoh, I., Yoshinaka, Y., Rein, A., Shibuya, M., Odaka, T., and Oroszlan, S. (1985) 'Murine leukemia virus maturation: Protease region required for conversion from "immature" to "Mature" core form and for virus infectivity', *Virology*, 145(2), 280–292.

Katsouri, L., Lim, Y.M., Blondrath, K., Eleftheriadou, I., Lombardero, L., Birch, A.M., Mirzaei, N., Irvine, E.E., Mazarakis, N.D., and Sastre, M. (2016) 'PPAR γ -coactivator-1 α gene transfer reduces neuronal loss and amyloid- β generation by reducing β -secretase in an Alzheimer's disease model', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(43), 12292–12297.

Kawabata, K., Migita, M., Mochizuki, H., Miyake, K., Igarashi, T., Fukunaga, Y., and Shimada, T. (2006) 'Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres', *Brain Res.*, 1094(1), 13–23.

Khalil, M.A., Habibian, L., Martin, C., Semaan, K., Khaddage, A., El Kassis, N., Kesserouani, C., Kourie, H.R., and Atallah, D. (2024) 'Landscape of HER2-low breast cancer: Insights from a six-year study on prevalence and clinicopathological characteristics', *Ann. Diagn. Pathol.*, 72, 152326.

Khetawat, D., and Broder, C.C. (2010) 'A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system', *Virology*, 7, 1–14.

Khong Nguyen, V., Hamers, R., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1999) 'Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies', *Mol. Immunol.*, 36(8), 515–524.

Kim, G.B., Nam, G.H., Hong, Y., Woo, J., Cho, Y., Kwon, I.C., Yang, Y., and Kim, I.S. (2020) 'Xenogenization of tumor cells by fusogenic exosomes in tumor microenvironment ignites and propagates antitumor immunity', *Sci. Adv.*, 6(27), 1–13.

King, C.R., Kraus, M.H., and Aaronson, S.A. (2013) 'Amplification of a Novel v-erbB-Related Gene in a Human Mammary Carcinoma Author (s): C . Richter King , Matthias H . Kraus and Stuart A . Aaronson Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stab>', 229(4717), 974–976.

Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G.B., Mendelsohn, J., and Fan, Z. (2003) 'HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells.', *Oncogene*, 22(21), 3205–3212.

Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A.F., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988) 'Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(13), 4686–4690.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975) 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity', *Nature*, 256(5517), 495–7.

Kolkman, J.A., and Law, D.A. (2010) 'Nanobodies - From llamas to therapeutic proteins', *Drug Discov. Today Technol.*, 7(2), e139–e146.

Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C., and Cooper, L.J.N. (2006) 'CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells', *Cancer Res.*, 66(22), 10995–11004.

Kreis, T.E., and Lodish, H.F. (1986) 'Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface', *Cell*, 46(6), 929–937.

Kretzschmar, E., Peluso, R., Schnell, M.J., Whitt, M.A., and Rose, J.K. (1996) 'Normal replication of vesicular stomatitis virus without C proteins', *Virology*, 216(2), 309–316.

Kwilas, A.R., Donahue, R.N., Tsang, K.Y., and Hodge, J.W. (2015) '乳鼠心肌提取 HHS Public Access', *Cancer Cell*, 2(1), 1–17.

L

Lancman, G., Moshier, E., Cho, H.J., Parekh, S., Richard, S., Richter, J., Rodriguez, C., Rossi, A., Sanchez, L., Jagannath, S., et al. (2023) 'Trial designs and endpoints for immune therapies in multiple myeloma', *Am. J. Hematol.*, 98(S2), S35–S45.

Large, D.E., Abdelmessih, R.G., Fink, E.A., and Auguste, D.T. (2021) 'Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application', *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 176, 113851.

Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., and Rose, J.K. (1995) 'Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(10), 4477–4481.

Lee, A.S.Y., Burdeinick-Kerr, R., and Whelan, S.P.J. (2013) 'A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(1), 324–329.

Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-stevenson, M., Cui, Y.K., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Nirali, N.,

Steinberg, S.M., et al. (2015) 'T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial', *Lancet*, 385(9967), 517–528.

Lee, Y., El Andaloussi, S., and Wood, M.J.A. (2012) 'Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy', *Hum. Mol. Genet.*, 21(R1), 125–134.

Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982) 'The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus', *Virology*, 121, 157–167.

Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1983) 'Antigenic determinants of vesicular stomatitis virus: analysis with antigenic variants.', *J. Immunol.*, 130(1), 394–398.

Leibman, R.S., and Riley, J.L. (2015) 'Engineering T cells to functionally cure HIV-1 infection', *Mol. Ther.*, 23(7), 1149–1159.

Lemos de Matos, A., Franco, L.S., and McFadden, G. (2020) 'Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo', *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 17(June), 349–358.

Lenard, J., and Vanderoef, R. (1990) 'Localization of the membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe 125I-TID', *J. Virol.*, 64(7), 3486–3491.

Lengrand, J., Pastushenko, I., Vanuytven, S., Song, Y., Venet, D., Sarate, R.M., Bellina, M., Moers, V., Boinet, A., Sifrim, A., et al. (2023) 'Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer', *Nature*, 620(7973), 402–408.

Lennemann, N.J., Herbert, A.S., Brouillette, R., Rhein, B., Bakken, R.A., Perschbacher, K.J., Cooney, A.L., Miller-Hunt, C.L., Ten Eyck, P., Biggins, J., et al. (2017) 'Vesicular Stomatitis Virus Pseudotyped with Ebola Virus Glycoprotein Serves as a Protective, Noninfectious Vaccine against Ebola Virus Challenge in Mice', *J. Virol.*, 91(17).

- Letchworth, G., Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., Del, J., and Barrera, C.** (1999) 'Review Vesicular Stomatitis'.
- Leyrat, C., Schneider, R., Ribeiro, E.A., Yabukarski, F., Yao, M., Gérard, F.C.A., Jensen, M.R., Ruigrok, R.W.H., Blackledge, M., and Jamin, M.** (2012) 'Ensemble structure of the modular and flexible full-length vesicular stomatitis virus phosphoprotein', *J. Mol. Biol.*, 423(2), 182–197.
- Li, J., Wang, J.T., and Whelan, S.P.J.** (2006) 'A unique strategy for mRNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(22), 8493–8498.
- Li, R., Shah, P.H., Stewart, T.F., Nam, J.K., Bivalacqua, T.J., Lamm, D.L., Uchio, E.M., Geynisman, D.M., Jacob, J.M., Meeks, J.J., et al.** (2024) 'Oncolytic adenoviral therapy plus pembrolizumab in BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: the phase 2 CORE-001 trial', *Nat. Med.*, 30(8), 2216–2223.
- Liang, B., Li, Z., Jenni, S., Rahmeh, A.A., Morin, B.M., Grant, T., Grigorieff, N., Harrison, S.C., and Whelan, S.P.J.** (2015) 'Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy', *Cell*, 162(2), 314–327.
- Libersou, S., Albertini, A.A.V., Ouldali, M., Maury, V., Maheu, C., Raux, H., De Haas, F., Roche, S., Gaudin, Y., and Lepault, J.** (2010) 'Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion', *J. Cell Biol.*, 191(1), 199–210.
- Lichty, B.D., Breitbach, C.J., Stojdl, D.F., and Bell, J.C.** (2014) 'Going viral with cancer immunotherapy', *Nat. Rev. Cancer*, 14(8), 559–567.
- Lim, B., Apperley, J.F., Orkin, S.H., and Williams, D.A.** (1989) 'Long-term expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with retrovirus-infected hematopoietic stem cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(22), 8892–8896.
- Liu, S., Li, S., Hai, J., Wang, X., Chen, T., Quinn, M.M., Gao, P., Zhang, Y., Ji, H., Cross, D.A.E., et al.** (2018) 'Targeting HER2 aberrations in non-small cell lung cancer with osimertinib', *Clin. Cancer Res.*, 24(11), 2594–2604.
- Loibl, S., and Gianni, L.** (2017) 'HER2-positive breast cancer', *Lancet*, 389(10087), 2415–2429.
- Lu, T., Ma, R., Dong, W., Teng, K.Y., Kollath, D.S., Li, Zhiyao, Yi, J., Bustillos, C., Ma, S., Tian, L., et al.** (2022) 'Off-the-shelf CAR natural killer cells secreting IL-15 target spike in treating COVID-19', *Nat. Commun.*, 13(1).
- Lyles, D.S., Varela, V.A., and Parce, J.W.** (1990) 'Dynamic Nature of the Quaternary Structure of the Vesicular Stomatitis Virus Envelope Glycoprotein', *Biochemistry*, 29(10), 2442–2449.

M

- M H Malim 1 , J Hauber, R Fenrick, B.R.C.** (1988) 'Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes', *Nature*, 8(335), 181–3.
- MacPherson, I.R., Spiliopoulou, P., Rafii, S., Saggese, M., Baird, R.D., Garcia-Corbacho, J., Italiano, A., Bonnetterre, J., Campone, M., Cresti, N., et al.** (2019) 'A phase I/II study of epertinib plus trastuzumab with or without chemotherapy in patients with HER2-positive metastatic breast cancer', *Breast Cancer Res.*, 22(1), 1–9.
- Madera, S., Izzo, F., Chervo, M.F., Dupont, A., Chiauzzi, V.A., and Petrillo, E.** (2023) 'Halting ErbB-2 isoforms retrograde transport to the nucleus as a new theragnostic approach for triple-negative breast cancer', *CDDpress* [Preprint], (February 2022).
- Maja, L., Željko, K., and Mateja, P.** (2020) 'Sustainable technologies for liposome preparation', *J. Supercrit. Fluids*, 165.
- Majzner, R.G., and Mackall, C.L.** (2019) 'Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey', *Nat. Med.*, 25(9), 1341–1355.

Malekan, M., Haass, N.K., Rokni, G.R., Gholizadeh, N., Ebrahimzadeh, M.A., and Kazeminejad, A. (2024) 'VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma: Current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives.', *Life Sci.*, 345, 122563.

Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J. V., and Cullen, B.R. (1989) 'The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA', *Nature*, 254–257.

Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. (1983) 'Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus', *Cell*, 33(1), 153–159.

**Mark H. Tuszynski, Ph.D, M.D.1,2,*,
Jennifer H. Yang, B.S.1, David Barba, M.D.3,
H S U, M.D. 3, Roy Bakay, M.D.4, Mary M.
Pay1, Eliezer Masliah, M.D.1, James M.
Conner, Ph.D1, Peter Kobalka, M.D.1,5,
Subhojit Roy, Ph.D, M.D.1,5, and Alan H.
Nagahara, P..** (2015) 'Nerve Growth Factor Gene Therapy Activates Neuronal Responses in Alzheimer's Diseases', *JAMA Neurol.*, 72(10), 1139–1147.

Markus, B.H., J.J. Fung, Gordon, R.D., Iwatsuki, S., Esquivel, C.O., Makowka, L., and Starzl, and T.E. (1987) 'Effect of OKT3 on Survival and Rate of Retransplantation', *Transplant. Proc.*, 19(4), 61–62.

Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Antón, I., Lluch, A., et al. (2005) 'Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 study group', *J. Clin. Oncol.*, 23(19), 4265–4274.

Masters, P.S., and Banerjee, A.K. (1988) 'Resolution of multiple complexes of phosphoprotein NS with nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus', *J. Virol.*, 62(8), 2651–2657.

Mastromarino, P., Conti, C., Goldoni, P., Hauttecoeur, B., and Orsi, N. (1987) 'Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH.', *J. Gen. Virol.*, 68 (Pt 9), 2359–2369.

Mathieu, M.E., Grigera, P.R., Helenius, A., and Wagner, R.R. (1996) 'Folding, unfolding, and refolding of the vesicular stomatitis virus glycoprotein', *Biochemistry*, 35(13), 4084–4093.

Mátrai, J., Chuah, M.K., and Vandendriessche, T. (2010) 'Recent advances in lentiviral vector development and applications', *Mol. Ther.*, 18(3), 477–490.

Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C.S., Whitt, M.A., et al. (2001) 'Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins', *Virology*, 286(2), 263–275.

Mavrakis, M., McCarthy, A.A., Roche, S., Blondel, D., and Ruigrok, R.W.H. (2004) 'Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus', *J. Mol. Biol.*, 343(4), 819–831.

Mehrabadi, A.Z., Ranjbar, R., Farzanehpour, M., Shahriary, A., Dorostkar, R., Hamidinejad, M.A., and Ghaleh, H.E.G. (2022) 'Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review', *Biomed. Pharmacother.*, 146, 112512.

Menotti, L., Cerretani, A., Hengel, H., and Campadelli-Fiume, G. (2008) 'Construction of a Fully Retargeted Herpes Simplex Virus 1 Recombinant Capable of Entering Cells Solely via Human Epidermal Growth Factor Receptor 2', *J. Virol.*, 82(20), 10153–10161.

Miller, D.G., Adam, M.A., and Miller, A.D. (1990) 'Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection.', *Mol. Cell. Biol.*, 10(8), 4239–4242.

Mills, B.J., Beebe, D.P., and Cooper, N.R. (1979) 'Antibody-independent neutralization of vesicular stomatitis virus by human complement. II. Formation of VSV-lipoprotein complexes in human serum and complement-dependent viral lysis.', *J. Immunol.*, 123(6), 2518–2524.

Mire, C.E., White, J.M., and Whitt, M.A. (2010) 'A spatio-temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating', *PLoS Pathog.*, 6(7), 1–15.

Monga, I., Kaur, K., and Dhanda, S.K. (2022) 'Revisiting hematopoiesis: applications of the bulk and single-cell transcriptomics dissecting transcriptional heterogeneity in hematopoietic stem cells', *Brief. Funct. Genomics*, 21(3), 159–176.

Morgan, R.A., Gray, D., Lomova, A., and Kohn, D.B. (2017) 'Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned', *Cell Stem Cell*, 21(5), 574–590.

Murthy, R.K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S.A., Lin, N.U., Borges, V., Abramson, V., Anders, C., et al. (2020) 'Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer', *N. Engl. J. Med.*, 382(7), 597–609.

Muyldermans, S. (2013) 'Nanobodies: Natural single-domain antibodies', *Annu. Rev. Biochem.*, 82(March), 775–797.

N

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996) 'In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector', *Science (80-.)*, 272(5259), 263–267.

Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996) 'The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses', *J. Virol.*, 70(8), 5701–5705.

Nikolic, J., Le Bars, R., Lama, Z., Scrima, N., Lagaudrière-Gesbert, C., Gaudin, Y., and Blondel, D. (2017) 'Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles', *Nat. Commun.*, 8(1), 1–12.

Nikolic, J., Belot, L., Raux, H., Legrand, P., Gaudin, Y., and Albertini, A.A. (2018) 'Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein', *Nat. Commun.*, 9(1), 1–12.

O

O'Hagan, R.C., and Hassell, J.A. (1998) 'The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase.', *Oncogene*, 16(3), 301–310.

Obiang, L., Raux, H., Ouldali, M., Blondel, D., and Gaudin, Y. (2012) 'Phenotypes of vesicular stomatitis virus mutants with mutations in the PSAP motif of the matrix protein', *J. Gen. Virol.*, 93(4), 857–865.

Ogino, M., Gupta, N., Green, T.J., and Ogino, T. (2018) 'A dual-functional priming-capping loop of rhabdoviral RNA polymerases directs terminal de novo initiation and capping intermediate formation', *Nucleic Acids Res.*, 47(1), 299–309.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008) 'Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology', *Cell*, 132(4), 631–644.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2017) 'CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014', *Neuro. Oncol.*, 19(5), v1–v88.

P

Page, K.A., Landau, N.R., and Littman, D.R. (1990) 'Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity', *J. Virol.*, 64(11), 5270–5276.

Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.Y., and Kunz, S. (2011) 'Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport', *PLoS Pathog.*, 7(9).

Peles, E., Levy, R. Ben, Or, E., Ulirich, A., and Yarden, Y. (1991) 'Oncogenic forms of the neu/HER2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase C-y', *EMBO J.*, 10(8), 2077–2086.

Peluso, R.W., Richardson, J.C., Talon, J., and Lock, M. (1996) 'Identification of a set of proteins (C' and C) encoded by the bicistronic P gene of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus and analysis of their effect on transcription by the viral RNA polymerase', *Virology*, 218(2), 335–342.

Pelzel-McCluskey, A.M. (2023) 'Vesicular Stomatitis Virus', *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 39(1), 147–155.

Pipe, S., Leebeek, F.W.G., Ferreira, V., Sawyer, E.K., and Pasi, J. (2019) 'Clinical Considerations for Capsid Choice in the Development of Liver-Targeted AAV-Based Gene Transfer', *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 15(December), 170–178.

Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990) 'Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains', *J. Gen. Virol.*, 71(5), 1153–1162.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011) 'Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia', *N. Engl. J. Med.*, 365(8), 725–733.

Press, M.F., Pike, M.C., Hung, G., Zhou, J.Y., Ma, Y., George, J., Dietz-Band, J., James, W., Slamon, D.J., and Batsakis, J.G. (1994) 'Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis.', *Cancer Res.*, 54(21), 5675–5682.

Priceman, S.J., Tilakawardane, D., Jeang, B., Aguilar, B., Murad, J.P., Park, A.K., Chang, W.C., Ostberg, J.R., Neman, J., Jandial, R., et

al. (2018) 'Regional delivery of chimeric antigen receptor-engineered T cells effectively targets HER2 + breast cancer metastasis to the brain', *Clin. Cancer Res.*, 24(1), 95–105.

Publicover, J., Ramsburg, E., Robek, M., and Rose, J.K. (2006) 'Rapid Pathogenesis Induced by a Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Mutant: Viral Pathogenesis Is Linked to Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha', *J. Virol.*, 80(14), 7028–7036.

Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (2005) 'A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells', *Mol. Ther.*, 12(5), 933–941.

Pupo, A., Fernández, A., Low, S.H., François, A., Suárez-Amarán, L., and Samulski, R.J. (2022) 'AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy', *Mol. Ther.*, 30(12), 3515–3541.

Q

Qu, K., Glass, B., Dolezal, M., Schur, F.K.M., Murciano, B., Rein, A., Rumlová, M., Ruml, T., Kräusslich, H.G., and Briggs, J.A.G. (2018) 'Structure and architecture of immature and mature murine leukemia virus capsids', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115(50), E11751–E11760.

R

Racaniello, V.R., and Baltimore, D. (1981) 'Cloned Poliovirus Complementary DNA Is Infectious in Isolate flethent BarnmHI', *Science (80-.)*, 214, 916–919.

Rajani, K.R., Pettit Kneller, E.L., McKenzie, M.O., Horita, D.A., Chou, J.W., and Lyles, D.S. (2012) 'Complexes of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein with Host Rae1 and Nup98 Involved in Inhibition of Host Transcription', *PLoS Pathog.*, 8(9).

Rapisarda, A., and Melillo, G. (2012) *Role of the VEGF/VEGFR Axis in Cancer Biology and Therapy*. 1st edn, *Adv. Cancer Res.* 1st edn. Elsevier Inc.

- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., et al.** (1985) 'Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III', *Nature*, 313(6000), 277–284.
- Raux, H., Obiang, L., Richard, N., Harper, F., Blondel, D., and Gaudin, Y.** (2010) 'The Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus Binds Dynamin for Efficient Viral Assembly', *J. Virol.*, 84(24), 12609–12618.
- Ribeiro, E.A., Favier, A., Gerard, F.C.A., Leyrat, C., Brutscher, B., Blondel, D., Ruigrok, R.W.H., Blackledge, M., and Jamin, M.** (2008) 'Solution Structure of the C-Terminal Nucleoprotein-RNA Binding Domain of the Vesicular Stomatitis Virus Phosphoprotein', *J. Mol. Biol.*, 382(2), 525–538.
- Rive, C.M., Yung, E., Dreolini, L., Brown, S.D., May, C.G., Woodsworth, D.J., and Holt, R.A.** (2022) 'Selective B cell depletion upon intravenous infusion of replication-incompetent anti-CD19 CAR lentivirus', *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 26(September), 4–14.
- Rivière, I., Brose, K., and Mulligan, R.C.** (1995) 'Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(15), 6733–6737.
- Robison, C.S., and Whitt, M.A.** (2000) 'The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly', *J. Virol.*, 74(5), 2239–2246.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y.** (2006) 'Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G', *Science (80-.)*, 313(5784), 187–191.
- Roche, S., Ray, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S.** (2007) 'Structure of the Prefusion Form of VSV G', *Science (80-.)*, 315(February), 843–848.
- Roche, S., and Gaudin, Y.** (2002) 'Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers', *Virology*, 297(1), 128–135.
- Rodriguez, S.E., Cross, R.W., Fenton, K.A., Bente, D.A., Mire, C.E., and Geisbert, T.W.** (2019) 'Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Mice against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever', *Sci. Rep.*, 9(1), 1–13.
- Rose, J.K., Adams, G.A., and Gallione, C.J.** (1984) 'The presence of cysteine in the cytoplasmic domain of the vesicular stomatitis virus glycoprotein is required for palmitate addition', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81(7 I), 2050–2054.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A.** (1985) 'Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82(19), 6502–6506.
- Rubinstein, M.** (2018) 'Is Lgr4 essential for VSV- and VSV-G-pseudotyped lentiviral vector entry to cells?', *J. Biol. Chem.*, 293(1), 112.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Deisenhofer, J.** (2002) 'Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH', *Science (80-.)*, 298(5602), 2353–2358.
- Russell, D.W., Schneider, W.J., Yamamoto, T., Luskey, K.L., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.** (1984) 'Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor', *Cell*, 37(2), 577–585.
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.-F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., et al.** (2017) 'Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65y2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial', *Lancet*, 390(10097), 849–860.

S

- Salmon, F., Grosios, K., and Petry, H.** (2014) 'Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera®)', *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 7(1), 53–65.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., et al.** (2004) 'High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers', *Science (80-.)*, 304(5670), 554.
- Sarni, S., Biswas, B., Liu, S., Olson, E.D., Kitzrow, J.P., Rein, A., Wysocki, V.H., and Musier-Forsyth, K.** (2020) 'HIV-1 Gag protein with or without p6 specifically dimerizes on the viral RNA packaging signal', *J. Biol. Chem.*, 295(42), 14391–14401.
- Sato-Dahlman, M., and Yamamoto, M.** (2017) 'The Development of Oncolytic Adenovirus Therapy in the Past and Future - For the Case of Pancreatic Cancer', *Curr. Cancer Drug Targets*, 18(2), 153–161.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., and Weinberg, R.A.** (1984) 'The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen', *Nature*, 312(5994), 513–516.
- Schechter, A.L., Hung, M.C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R.A., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Ullrich, A., and Coussens, L.** (1985) 'The neu gene: An erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor', *Science (80-.)*, 229(4717), 976–978.
- Scheuermann, R.H., and Racila, E.** (1995) 'CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy.', *Leuk. Lymphoma*, 18(5–6), 385–397.
- Schimmer, J., and Breazzano, S.** (2016) 'Investor Outlook: Rising from the Ashes; GSK's European Approval of Strimvelis for ADA-SCID', *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, 27(2), 57–61.
- Schlam, I., and Swain, S.M.** (2021) 'HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors : the time is now', *npj Breast Cancer* [Preprint].
- Schlegel, R., Tralka, T.S., Willingham, M.C., and Pastan, I.** (1983) 'Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site?', *Cell*, 32(2), 639–646.
- Schnell, M.J., Johnson, J.E., Buonocore, L., and Rose, J.K.** (1997) 'Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection', *Cell*, 90(5), 849–857.
- Scholler, J., Brady, T.L., Gwendolyn Binder-Scholl, W.-T.H., Plesa, G., Hege, K.M., Vogel, A.N., Kalos, M., Riley, J.L., Deeks, S.G., Mitsuyasu, R.T., et al.** (2015) 'Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T-cells', *Sci. Transl. Med.*, 34(3), 132ra53.
- Sefton, B.M.** (1988) 'news about c-erb-B-2 and HER2', *Trends Genet.*, 4(9), 247–248.
- Sevier, C.S., Weisz, O.A., Davis, M., and Machamer, C.E.** (2000) 'Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs', *Mol. Biol. Cell*, 11(1), 13–22.
- Shah, N., Chari, A., Scott, E., Mezzi, K., and Usmani, S.Z.** (2020) 'B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches', *Leukemia*, 34(4), 985–1005.
- Shew, R.L., and Deamer, D.W.** (1985) 'A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes', *BBA - Biomembr.*, 816(1), 1–8.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., and Weinberg, R.A.** (1981) 'Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts', *Nature*, 290(5803), 261–264.

- Shinoda, S., Sharma, N.S., Nakamura, N., Inoko, K., Sato-Dahlman, M., Murugan, P., Davydova, J., and Yamamoto, M.** (2023) 'Interferon-expressing oncolytic adenovirus + chemoradiation inhibited pancreatic cancer growth in a hamster model.', *Cancer Sci.*, (March), 1–11.
- Shinozaki, K., Ebert, O., and Woo, S.L.C.** (2005) 'Eradication of advanced hepatocellular carcinoma in rats via repeated hepatic arterial infusions of recombinant VSV', *Hepatology*, 41(1), 196–203.
- Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R.** (2003) 'Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses', *Traffic*, 4(5), 333–343.
- Simões, S., Slepishkin, V., Düzgünes, N., and Pedroso de Lima, M.C.** (2001) 'On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes', *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1515(1), 23–37.
- SIVA SUBRAMANIAN, K.N., WEISMAN, L.E., RHODES, T., ARIAGNO, R., SÁNCHEZ, P.J., STEICHEN, J., GIVNER, L.B., JENNINGS, T.L., TOP, F.H.J.R., CARLIN, D., et al.** (1998) 'Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia', *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17(2).
- Skidmore, L., Sakamuri, S., Knudsen, N.A., Hewet, A.G., Milutinovic, S., Barkho, W., Biroc, S.L., Kirtley, J., Marsden, R., Storey, K., et al.** (2020) 'ARX788, a Site-specific Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate, Demonstrates Potent and Selective Activity in HER2-low and T-DM1-resistant Breast and Gastric Cancers.', *Mol. Cancer Ther.*, 19(9), 1833–1843.
- SLAMON, D.J., JONES, B.L., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., et al.** (2001) 'Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2', *N. Engl. J. Med.*, 344(11), 783–792.
- Sliwkowski, M.X.** (2003) 'news and views Ready to partner TM', *Nat. Struct. Biol.*, 10(3), 9–11.
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Zaki Salahuddin, S., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R.C., and Haseltine, W.A.** (1985) 'Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat', *Science (80-.)*, 227(4683), 171–173.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Tartar, A., Portetelle, D., Burny, A., and Haseltine, W.** (1986) 'Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions', *Science (80-.)*, 231(4745), 1549–1553.
- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J.** (1995) 'A transient three plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors', *Nucleic Acids Res.*, 23(4), 628–633.
- Sritama Nath and Pinku Mukherjee** (2017) 'Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression Sritama', *Physiol. Behav.*, 176(12), 139–148.
- Starzl, T.E., and Fung, J.J.** (1986) 'ORTHOCLONE OKT3 in treatment of allografts rejected under cyclosporine-steroid therapy', *Transplant. Proc.*, 18(4), 937–941.
- Steinhauer, D.A., de la Torre, J.C., and Holland, J.J.** (1989) 'High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus', *J. Virol.*, 63(5), 2063–2071.
- Sterner, R.C., and Sterner, R.M.** (2021) 'CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies', *Blood Cancer J.*, 11(4).
- Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C.** (2000) 'Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus', *Nat. Med.*, 6(7), 821–825.
- ¹⁵⁴
Stojdl, D.F., Lichty, B.D., TenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., et al. (2003) 'VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are

potent systemic anti-cancer agents', *Cancer Cell*, 4(4), 263–275.

Strebinger, D., Frangieh, C.J., Friedrich, M.J., Faure, G., Macrae, R.K., and Zhang, F. (2023) 'Cell type-specific delivery by modular envelope design', *Nat. Commun.*, 14(1).

Stupp, R., Mason, W.P., Bent, M.J. van den, Weller, M., B.F., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., J. U.B., et al. (2005) 'Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients', *N. Engl. J. Med.*, 352(10), 987–996.

Suder, E., Furuyama, W., Feldmann, H., Marzihttps, A., Wit, E. De, Suder, E., Furuyama, W., Feldmann, H., Marzi, A., and Wit, E. De (2018) 'The vesicular stomatitis virus-based Ebola virus vaccine : From concept to clinical trials to clinical trials', *Hum. Vaccin. Immunother.*, 0(0), 1–7.

Sudhakar, V., and Richardson, & R.M. (2018) 'Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases(nörodejeneratif hastalıklarda gen terapisi)', 166–175.

Suksanpaisan, L., Susantad, T., and Smith, D.R. (2009) 'Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells', *J. Biomed. Sci.*, 16(1), 1–13.

Sun, F., Peers de Nieuwburgh, M., Hubinont, C., Debiève, F., and Colson, A. (2024) 'Gene therapy in preeclampsia: the dawn of a new era', *Hypertens. Pregnancy*, 43(1).

Sun, X., Roth, S.L., Bialecki, M.A., and Whittaker, G.R. (2010) 'Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses', *Future Virol.*, 5(1), 85–96.

Swain, S.M., Baselga, J., Kim, S., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J., Schneeweiss, A., Heeson, S., et al. (2015) 'Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer', *N. Engl. J. Med.*, 372(8).

Szoka, F., and Papahadjopoulos, D. (1978) 'Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation', *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75(9), 4194–4198.

T

Tai, W., Mahato, R., and Cheng, K. (2010) 'The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery', *J. Control. Release*, 146(3), 264–275.

Tai, Y.T., Acharya, C., An, G., Moschetta, M., Zhong, M.Y., Feng, X., Cea, M., Cagnetta, A., Wen, K., Van Eenennaam, H., et al. (2016) 'APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment', *Blood*, 127(25), 3225–3236.

Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K.G., Whitt, M.A., and Kawaoka, Y. (1997) 'A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(26), 14764–14769.

Teachey, D.T., Rheingold, S.R., Maude, S.L., Zugmaier, G., Barrett, D.M., Seif, A.E., Nichols, K.E., Suppa, E.K., Kalos, M., Berg, R.A., et al. (2013) 'Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy', *Blood*, 121(26), 5154–5157.

Todo, T., Ito, H., Ino, Y., Ohtsu, H., Ota, Y., Shibahara, J., and Tanaka, M. (2022) 'Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial', *Nat. Med.*, 28(8), 1630–1639.

Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., and Keith, G. (1986) 'Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV', *Nucleic Acids Res.*, 14(6), 2671–2683.

Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., and Rougeon, F. (1986) 'Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene?', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(11), 3914–3918.

Tratschin, J.D., West, M.H., Sandbank, T., and Carter, B.J. (1984) 'A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for

chloramphenicol acetyltransferase.', *Mol. Cell Biol.*, 4(10), 2072–2081.

Turini, M.E., and DuBois, R.N. (2002) 'Cyclooxygenase-2: a therapeutic target.', *Annu. Rev. Med.*, 53, 35–57.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., and Yarden, Y. (1996) 'A Hierarchical Network of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction by Neu Differentiation Factor/Neuregulin and Epidermal Growth Factor', *Mol. Cell Biol.*, 16(10), 5276–5287.

U

Urvoas, A., Guellouz, A., Valerio-Lepiniec, M., Graille, M., Durand, D., Desravines, D.C., van Tilbeurgh, H., Desmadril, M., and Minard, P. (2010) 'Design, Production and Molecular Structure of a New Family of Artificial Alpha-helical Repeat Proteins (α Rep) Based on Thermostable HEAT-like Repeats', *J. Mol. Biol.*, 404(2), 307–327.

V

Vandepol, S.B., Lefrancois, L., and Holland, J.J. (1986) 'Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus.', *Virology*, 148(2), 312–325.

Vanlandschoot, P., Stortelers, C., Beirnaert, E., Ibañez, L.I., Schepens, B., Depla, E., and Saelens, X. (2011) 'Nanobodies': New ammunition to battle viruses', *Antiviral Res.*, 92(3), 389–407.

Vella, L., Sharples, R., Lawson, V., Masters, C., Cappai, R., and Hill, A. (2007) 'Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing', *J. Pathol.*, 211(March), 582–590.

W

Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985) 'Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV', *Cell*, 40(1), 9–17.

Walker, P.J., Firth, C., Widen, S.G., Blasdel, K.R., Guzman, H., Wood, T.G., Paradkar, P.N., Holmes, E.C., Tesh, R.B., and Vasilakis, N. (2015) 'Evolution of Genome Size and Complexity in the Rhabdoviridae', *PLoS Pathog.*, 11(2), 1–25.

Walker, P.J., Freitas-Astua, J., Bejerman, N., Blasdel, K.R., Breyta, R., Dietzgen, R.G., Fooks, A.R., Kondo, H., Kurath, G., Kuzmin, I. V., et al. (2022) 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae 2022', *J. Gen. Virol.*, 103(6), 2021–2022.

Wang, S., Zhang, J., Wang, T., Ren, F., Liu, X., Lu, Y., Xu, Linying, Zhang, Yang, Wang, D., Xu, Lu, et al. (2017) *ErbB Receptors and Cancer*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

Wang, Z. (2017) 'ErbB Receptors and Cancer.', *Methods Mol. Biol.*, 1652, 3–35.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerrhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., et al. (2009) 'Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity', *Med. Microbiol. Immunol.*, 198(3), 157–174.

Wiles, P.G., Guy, R., Watkins, S.M., and Reeves, W.G. (1983) 'Allergy to purified bovine, porcine, and human insulins', *Br. Med. J.*, 287(6391), 531.

Willey, R.L., Bonifacino, J.S., Potts, B.J., Martin, M.A., and Klausner, R.D. (1988) 'Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(24), 9580–9584.

Williamson, P., and Schlegel, R.A. (2002) 'Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells', *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1585(2–3), 53–63.

Wirblich, C., Tan, G.S., Papaneri, A., Godlewski, P.J., Orenstein, J.M., Harty, R.N., and Schnell, M.J. (2008) 'PPEY Motif within the Rabies Virus (RV) Matrix Protein Is Essential for Efficient Virion Release and RV Pathogenicity', *J. Virol.*, 82(19), 9730–9738.

Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttuala, S.

(2013) 'History of gene therapy', *Gene*, 525(2), 162–169.

Wymant, J.M., Sayers, E.J., Muir, D., and Jones, A.T. (2020) 'Strategic trastuzumab mediated crosslinking driving concomitant HER2 and HER3 endocytosis and degradation in breastcancer', *J. Cancer*, 11(11), 3288–3302.

Y

Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L., and Russell, D.W. (1984) 'The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA', *Cell*, 39, 27–38.

Yamamoto, V., Ha, D.P., Liu, Z., Huang, M., Samanta, S., Neamati, N., and Lee, A.S. (2024) 'GRP78 inhibitor YUM70 upregulates 4E-BP1 and suppresses c-MYC expression and viability of oncogenic c-MYC tumors', *Neoplasia (United States)*, 55(April), 101020.

Yeager, M., Wilson-Kubalek, E.M., Weiner, S.G., Brown, P.O., and Rein, A. (1998) 'Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: Implications for retroviral assembly mechanisms', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(13), 7299–7304.

Yi, J., Xiong, W., Gong, X., Bellister, S., Ellis, L.M., and Liu, Q. (2013) 'Analysis of LGR4 Receptor Distribution in Human and Mouse Tissues', *PLoS One*, 8(10), 1–11.

Yonemura, Y., Ninomiya, I., Ohoyama, S., Kimura, H., Yamaguchi, A., Fushida, S., Kosaka, T., Miwa, K., Miyazaki, I., and Endou, Y. (1991) 'Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma.', *Cancer*, 67(11), 2914–2918.

Yu, B., Shi, Q., Belk, J.A., Yost, K.E., Parker, K.R., Li, R., Liu, B.B., Huang, H., Lingwood, D., Greenleaf, W.J., et al. (2022) 'Engineered cell entry links receptor biology with single-

cell genomics', *Cell*, 185(26), 4904–4920.e22.

Yu, J., Jia, J., Guo, X., Chen, R., and Feng, L. (2017) 'Modulating circulating sFlt1 in an animal model of preeclampsia using PAMAM nanoparticles for siRNA delivery', *Placenta*, 58, 1–8.

Z

Závada, J. (1972) 'Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses.', *J. Gen. Virol.*, 15(3), 183–191.

Zeng, W., Zheng, L., Li, Y., Yang, J., Mao, T., Zhang, J., Liu, Y., Ning, J., Zhang, T., Huang, H., et al. (2024) 'Engineered extracellular vesicles for delivering functional Cas9/gRNA to eliminate hepatitis B virus cccDNA and integration', *Emerg. Microbes Infect.*, 13(1).

Zhang, H., Liu, H., Wei, J., Dang, Y., Wang, Y., Yang, Q., Zhang, L., Ye, C., Wang, B., Jin, X., et al. (2024) 'Single dose recombinant VSV based vaccine elicits robust and durable neutralizing antibody against Hantaan virus', *npj Vaccines*, 9(1), 1–15.

Zhang, L., Liu, S., and Wang, Y. (2023) 'Pseudotyped Viruses for Marburgvirus and Ebolavirus.', *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1407, 105–132.

Zhang, N., Huang, H., Tan, B., Wei, Y., Xiong, Q., Yan, Y., Hou, L., Wu, N., Siwko, S., Cimorelli, A., et al. (2017) 'Leucine-rich repeat-containing G protein- coupled receptor 4 facilitates vesicular stomatitis virus infection by binding vesicular stomatitis virus glycoprotein', *J. Biol. Chem.*, 292(40), 16527–16538.

Zheng, M., Huang, J., Tong, A., and Yang, H. (2019) 'Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances', *Mol. Ther. - Oncolytics*, 15(37), 234–247.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997) 'Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo', *Nat. Biotechnol.*, 15(9), 871–875.

Modification du tropisme de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire : ciblage de récepteurs d'intérêt

Résumé

Le transfert d'un cargo, contenu dans une vésicule, vers des cellules d'intérêt reste un défi pour les thérapies ciblées. Les glycoprotéines virales, se liant à un récepteur cellulaire et induisant la fusion membranaire, constituent des outils prometteurs pour ce type d'approche. La glycoprotéine G du VSV est la glycoprotéine virale la plus utilisée pour pseudotyper des lentivirus en thérapie génique. Néanmoins, il y a des limites à l'utilisation de G : les récepteurs de G (membres de la famille du LDLR) sont ubiquitaires et présents à la surface de cellules non cibles.

Les travaux de l'équipe sur la structure du complexe VSVG/LDLR avaient identifié des mutants de G ne liant plus le LDLR mais conservant leur activité de fusion. Ce découplage entre reconnaissance du récepteur et fusion ouvrait la possibilité de cibler spécifiquement la glycoprotéine vers des récepteurs d'intérêt.

Nous avons construit une glycoprotéine chimérique en fusion avec un nanobody dirigé contre la mCherry en position amino-terminale de G. L'insertion de ce nanobody dans G est délétère. Par évolution expérimentale, nous avons identifié deux mutations dans G améliorant le repliement de la chimère. Ces mutations favorisent le repliement des G chimériques, quel que soit le nanobody inséré en position amino-terminale. Les virus pseudotypés (VSV et lentivirus) avec ces G chimériques ont un titre 10 fois plus élevé lorsque les mutations d'optimisations sont présentes.

Nous avons ensuite construit des glycoprotéines chimériques avec plusieurs nanobodies ciblant le récepteur HER2. Dans ces glycoprotéines, nous avons introduit les mutations abolissant la reconnaissance des récepteurs naturels de G. Les virus pseudotypés par ces glycoprotéines n'infectent plus que des cellules exprimant le récepteur HER2.

Nous avons donc identifié des mutations de G permettant de conférer un nouveau tropisme à G par insertion amino-terminale de nanobodies. Ceci ouvre la voie à des thérapies ciblées personnalisées.

Mots clés : Glycoprotéine, virus de la stomatite vésiculaire, cellules tumorales, ciblage, nanobody